

Patobiologia da Otite Média: Avanços a Partir da Genética

Mahmood F Bhutta

A inflamação da orelha média (otite média - OM) é altamente prevalente na infância. Na maioria das vezes torna-se evidente como uma "infecção de ouvido", uma inflamação purulenta denominada otite média aguda (OMA). Com a idade de cinco anos, dois terços das crianças, em países desenvolvidos, sofreram pelo menos um episódio de OMA¹ (há poucas estimativas de prevalência de OMA nos países em desenvolvimento). Em algumas crianças, a inflamação não se resolve, levando à doença crônica da orelha média, geralmente associada a uma otite média purulenta (OMCS - otite média crônica supurativa) ou não-purulenta (otite média crônica com efusão - OMCE). A OMCE é a causa mais comum de perda auditiva em crianças no mundo desenvolvido², enquanto OMCS é um grande fardo para o mundo em desenvolvimento³.

Apesar da enorme prevalência da doença e da riqueza de literatura sobre a OM, a patobiologia da inflamação da orelha média permanece mal compreendida. As visões tradicionais que sugerem alterações de pressões estáticas ou dinâmicas na tuba auditiva como um dos principais fatores predisponentes⁴ parecem não resistir a uma análise mais profunda, e essas teorias estão sendo questionadas⁵. Em comum com outras doenças inflamatórias que afetam outros órgãos, a etiologia provável representa interação em um nível molecular, sugerindo interações complexas entre a biologia do patógeno e resposta do hospedeiro. Em termos mais simples, a OMA pode ser vista como uma falha do hospedeiro em propor uma resposta imune suficiente para livrar a orelha média de patógenos potenciais tais como o *Haemophilus influenzae* não tipável, o *Streptococcus pneumoniae*, ou a *Moraxella catarrhalis*. Em contraste, formas crônicas da OM representam uma falha da resolução desse processo inflamatório, muitas vezes levando a secreção persistente na orelha média, mas também causando danos nos tecidos, tais como a erosão ossicular, retração da membrana timpânica, timpanosclerose ou colesteatoma.

Uma das dificuldades enfrentadas pela biologia molecular tem sido a tentativa de compreender as vias principais de condução do processo inflamatório. Análises anteriores foram embasadas nos níveis de proteínas e genes expressos na orelha média inflamada, mas estas análises invariavelmente descobriram que milhares de genes e proteínas foram expressos⁶, e não oferecem nenhuma pista sobre qual destas vias poderia ter iniciado a resposta. No entanto, os recentes avanços na genética disponibilizaram novos métodos de análise. Assim, mutações genéticas ou outras variações podem predispor à doença, e através de uma compreensão dos efeitos funcionais destas variações/mutações, podemos recolher pistas vitais para as vias moleculares que podem ser ativadas. O tipo mais comum de variação genética, e que desempenha o papel mais importante na susceptibilidade à doença, é o polimorfismo de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism*

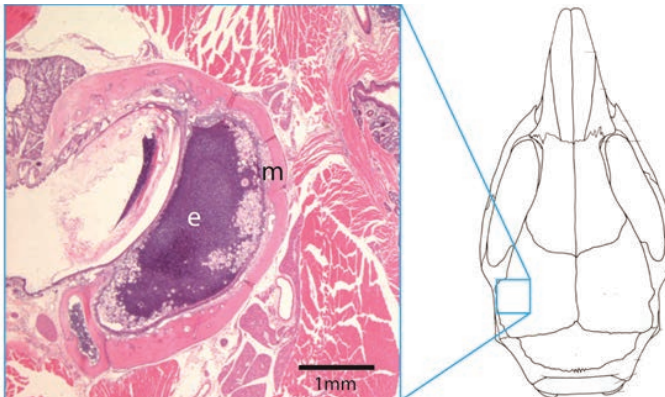
-SNP), uma única alteração de uma das quatro bases químicas que constituem o código do DNA. Essas mudanças costumam causar alterações na estrutura de dobra da proteína codificadas nos genes, e por isso podem alterar a função da proteína de modo sutil ou significativo.

Desvendando a genética da otite média

É importante reconhecer que a susceptibilidade à OM é altamente hereditária. Um estudo retrospectivo com gêmeos estimou que a suscetibilidade da população à OMA recorrente em crianças é 49 % devida a fatores herdados⁷. Um estudo prospectivo de gêmeos e trigêmeos sugeriu que o tempo com efusão da orelha média é herdada em 72%⁸. A agregação familiar da doença sugere que a OMCS⁹ e o colesteatoma^{10,11} também deverão ter um componente genético importante na predisposição à doença. Isso é confirmado pela experiência pessoal de muitos otorrinolaringologistas, que relatam famílias, em que várias gerações são afetadas pelas otites recorrentes ou persistentes. Em comum com outras doenças complexas, não haverá nenhum gene mágico que será a chave para a compreensão da OM. O componente genético para susceptibilidade à OM irá incluir centenas de genes e também a interação com os genes de agentes patogênicos potenciais.

Os modelos animais representam uma forma de interrogar a arquitetura genética de susceptibilidade à doença. Em particular, o rato é agora o modelo animal preferido para estudos sobre a otite média¹² (**Figura 1**). Isto tem uma boa razão: o rato é fácil de reproduzir, e compartilha 95% de seus genes com o ser humano. Há também um grande conjunto de ferramentas disponíveis para manipular genes de rato. Usando a tecnologia transgênica, os genes podem ser "eliminados" (removidos), os genes podem ser adicionados, ou eles podem ser mutados para alterar a sua função¹³. Estes modelos mutantes do rato, criados em um ambiente de laboratório, nunca serão uma mímica biológica perfeita do bebê humano em desenvolvimento, mas como eles podem ser manipulados, podem ser explorados para investigar possíveis vias moleculares subjacentes da suscetibilidade da OM¹². Naturalmente, os resultados devem ser verificados no homem, para fornecer garantias de confirmação da hipótese da tradução das vias moleculares.

Figura 1. Corte axial através da orelha média do rato jumbo. A mucosa da orelha média (m) é hiperplásica e há um exsudato inflamatório (e) na fenda da orelha média.



Há um grande número de modelos animais, com ratos, relacionados à OM, e um grande número de estudos em seres humanos^{14,15}. Neste capítulo, foram selecionados os estudos que têm sido mais úteis para avançar nosso entendimento da patogênese da doença.

Genética da OMA

Um grande número de genes são conhecidos por regular a resposta inflamatória aguda na orelha média, tornando-se muito difícil determinar qual destes é mais importante. Investigadores selecionaram vias moleculares específicas e, em seguida, testaram estas vias no camundongo e no homem .

Os camundongos não são naturalmente susceptíveis a otopatógenos humanos, e assim, o *Streptococcus pneumoniae* ou o *Haemophilus influenzae* não tipável devem ser experimentalmente injetados na orelha média do camundongo para induzir uma resposta inflamatória. Esta injeção foi feita em camundongos *knock-out*, aqueles com genes específicos desativados. Se for verificado atraso, prolongamento ou inflamação mais grave em um camundongo *knock-out*, isto sugere que o gene *knock-out* desempenha um papel importante na resposta inflamatória aguda.

Os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* - TLRs) fazem parte do sistema imune inato, e são importantes no início da resposta inflamatória aguda de uma série de órgãos. Eles residem na superfície dos leucócitos e detectam proteínas na superfície de microorganismos. Camundongos *knock-out* com genes dos receptores *toll-like* *Tlr2*¹⁶, *Tlr4*^{17 18} ou *Tlr9*¹⁹, ou de moléculas associadas à sinalização TLR (*MyD8820* ou *Trif19*), demonstram retardo em se livrar da infecção aguda induzida com os otopatógenos. Estes resultados sugerem que a sinalização TLR desempenha um papel importante na OMA, mas dado que todos esses camundongos *knock-out* que, eventualmente, eliminam a infecção, também sugere que este papel não pode ou não deve ser considerado absolutamente crítico²⁰.

O sistema complemento é também um componente importante do sistema imune inato. Proteínas do complemento ligam-se aos microorganismos para causar a ruptura da membrana, ou para melhorar a quimiotaxia de leucócitos e fagocitose. Tong *et al* demonstraram *clearance* retardado da infecção em camundongos *knock-out* com genes *Bf*, *Bf/C2* e *C1qa* e todos os componentes do sistema complemento²¹. No entanto, mais uma vez, todos estes camundongos ficaram livres da infecção.

Outros componentes do sistema imune inato que têm sido investigados com camundongos *knockout* são as moléculas de sinalização intracelular *Nod1*, *Nod2*, *rip2*, e *Nirp3*, com todos estes mutantes mostrando *clearance* retardado da infecção²². No entanto, como acontece com o TLR e o sistema de complemento, os camundongos *knock-out* conseguem eliminar a infecção .

O que estes resultados nos dizem sobre os genes que são importantes na OMA ou OMA recorrente? Parece que nenhum componente da resposta imune inata é, por si só, responsável pela susceptibilidade à doença .

É possível que nós estejamos olhando para o componente errado do sistema imunológico. O sistema imunológico da mucosa é difícil de ser isolado e, assim, relativamente pouco se sabe sobre como ele funciona, quando comparado com

a imunidade inata ou sistêmica. Em particular, o sistema imune da mucosa tem a tarefa complexa de permitir a tolerância de microorganismos sobre superfícies mucosas (os que se encontram na flora normal da mucosa), e ainda desenvolver uma resposta imunitária, por vezes exatamente contra os mesmos microorganismos se eles se tornarem patogênicos. Talvez genes com um papel central na imunidade adaptativa da mucosa, por exemplo, os que regulam a função das células B, sejam importantes para a resposta imune do hospedeiro na OMA. A OMA recorrente é mais característica em crianças com defeitos congênitos na imunidade da mucosa (imunodeficiência comum variável, agamaglobulinemia ligada ao X, ou síndrome de hiper IgM). Em contraste, crianças com defeitos na imunidade inata, muitas vezes sofrem de infecções bacterianas ou virais em múltiplos órgãos (neutropenia congênita, neutropenia cíclica, deficiência de adesão de leucócitos, ou síndrome do *bare lymphocyte*). Como nossa compreensão da imunologia das mucosas tem melhorado, talvez cheguemos a entender melhor a susceptibilidade à OMA.

Uma explicação alternativa para a susceptibilidade à OMA seria devido à variações em muitos loci genéticos, sendo que, uma menor variação de um único gene ou uma única via seria insuficiente para provocar um problema. Entretanto, um grande número de variações de genes diferentes, em um indivíduo, pode levar a uma doença clinicamente distinta. Cada vez mais tem sido reconhecido que muitas doenças complexas e comuns podem ser devidas a defeitos em centenas ou mesmo milhares de genes, todas conduzindo a quadro clínico semelhante da doença. O sistema imunológico utiliza um grande número de genes, gerando um certo grau de redundância.

Há muitos estudos humanos de susceptibilidade à OMA, que são analisados na literatura, em detalhe¹⁴⁻¹⁵. Estes estudos testaram variações SNP nos genes que se sabe estarem envolvidos na sinalização imune. Susceptibilidade à doença tem sido associada com as variações nos genes que codificam as moléculas de sinalização de leucócitos (*TNFA*, *IL-6*, *IL10*, *IFN γ* , *IL1 α* , *CD14*, *MBL2*), receptores de leucócitos (*TLR4*), e as mucinas da orelha média (*MUC2*, *MUC5A2*). No entanto, todos estes estudos em humanos tiveram amostras pequenas e não foram replicados, significando que suas descobertas podem ser equivocadas.

Dada a complexidade potencial de genes envolvidos na resposta inflamatória aguda na orelha média, pode ser difícil fazer rápidos avanços em direção a uma compreensão abrangente da base genética da doença. No entanto, há esperança de que talvez possamos ter uma compreensão melhor de alguns dos principais componentes da resposta imune na OMA. Talvez isso permitiria a vacinação direcionada ou individualizada contra potenciais otopatógenos baseadas no genótipo de uma criança.

Genética da OMC

A inflamação crônica da orelha média é a principal razão para a cirurgia otológica. O que leva ao fracasso da resolução da inflamação ainda não é bem entendido²³, mas pode estar relacionada com a falta de desligamento de reguladores de inflamação, ou resposta antigênica contínua pela presença persistente de patógenos .

Um grande número de modelos em ratos com otite média crônica têm sido relatados, mas a maioria deles tem uma série de outros defeitos¹⁴ anatômicos ou funcionais, e pode, por isso, não imitar a criança não-sindrômica com otite média. No entanto, existem algumas exceções.

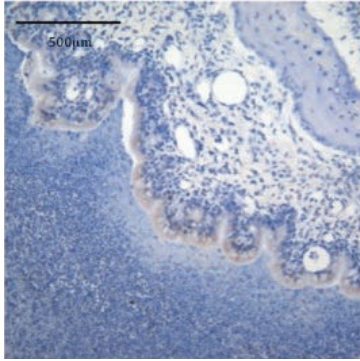
O rato *knock out EYA4* desenvolve otite média crônica espontânea, assim como perda auditiva sensorineural²⁴. No entanto, no homem, a mutação *EYA4* leva à perda auditiva sensorineural, sem evidência de doença na orelha média¹², sugerindo que o gene *EYA4* pode ter diferentes funções no camundongo e no homem.

No meu laboratório, temos recuperado dois modelos de camundongos com otite média crônica de uma tela de mutagênese. Sujeitamos camundongos machos a um agente mutagênico químico que induz mutações pontuais aleatórias no DNA de seu esperma, e, em seguida, avalia-se sua descendência para anormalidades, incluindo testes audiológicos. A partir desta tela de mutagênese, encontramos dois modelos de camundongos que desenvolvem otite média crônica espontânea devido a mutações pontuais do gene. O rato *Jeff*²⁵ tem uma mutação pontual no gene *Fbxo11* e o rato *Jumbo*²⁶ tem uma mutação pontual no gene *Evi1*. Ambos os camundongos desenvolvem otite média crônica espontânea dentro de algumas semanas de nascimento (eles são mantidos em um ambiente livre de patógenos, sem exposição a qualquer agente patogênico conhecido). A histologia revela hiperplasia da mucosa, com uma exsudação e infiltração de leucócitos, com celularidade variável (**Figura 1**). É importante ressaltar que nenhum desses camundongos desenvolve inflamação fora da orelha média, nem demonstram outras anomalias significativas. Conseqüentemente, eles representam potencialmente excelentes modelos para otite média crônica humana.

Alguns grupos têm testado se a susceptibilidade humana para a otite média pode estar associada com as variações no SNP e os genes *FBXO11* *EVII*, os genes mutantes em modelos de camundongos *Jeff* e *Jumbo*. Nenhum grupo relatou associação com o gene *EVI*, mas há relatos do gene *FBXO11*. O grupo de Minnesota analisou 142 famílias com sinais ou sintomas de OM, e relatou o polimorfismo SNP rs2134056 no gene *FBXO11* que pode ser associado com a susceptibilidade à doença. O grupo australiano testou 434 famílias com OMA predominantemente recorrente e mostrou que o polimorfismo rs12712997 em *FBXO11* foi associado com a susceptibilidade²⁷. Dados preliminares do meu próprio estudo de 500 famílias com crianças que sofrem principalmente de otite média crônica com efusão, também mostra associação com polimorfismo no gene *FBXO11*, e polimorfismo rs2537742. Embora estes estudos têm cada associação relatada com uma variante diferente para o gene *FBXO11*, tomados em conjunto eles apontam fortemente que o gene *FBXO11* desempenha um papel na predisposição para a inflamação da orelha média no homem.

Tendo em conta que os nossos modelos de camundongos parecem ser razoavelmente bons modelos de doenças humanas, nós começamos a explorá-los para compreender melhor os mecanismos da doença. Usando o camundongo *Jeff* demonstramos que *Fbxo11* é um regulador de sinalização na via *TGF-β*²⁸. A via de *TGF-β* é conhecida por interagir com as vias de hipoxia, e por isso também começamos a olhar para a sinalização de hipoxia²⁹.

Figura 2. Seção da orelha média do *Jumbo* corados com piodinazol para demonstrar hipóxia celular. Piodinazole identifica tecidos com níveis de oxigênio abaixo de 1,5%, e aqui é reativa em marrom. A borda da mucosa inflamada (m) é marcada, como são alguns dos leucócitos no derrame.



Hipoxia (baixa oxigenação dos tecidos) é um achado comum em locais onde há inflamação, pois ela consome oxigênio celular e também afasta as células dos vasos. Nós exploramos o papel da hipoxia na inflamação crônica da orelha média em nossos modelos de camundongos. Descobrimos que tanto no *Jumbo* como no *Jeff*, a hipoxia está presente nos leucócitos e na mucosa da orelha média inflamada (**Figura 2**). Há genes que respondem à hipoxia, como o *Vegf*. Curiosamente, se administrarmos sistemicamente inibidores de *Vegf* em ratos experimentais (PTK787, SU - 11248, e BAY 43-9006) vemos uma redução da inflamação e perda auditiva menor. Isto implica que a hipoxia é um caminho fundamental na orelha média cronicamente inflamada, e que a segmentação das vias de hipoxia pode ser

uma potencial terapia médica. Na verdade, a ventilação cirúrgica da orelha também pode ser benéfica, através da redução da hipoxia celular, pela exposição ao oxigênio atmosférico.

O futuro

Estamos apenas no início de nossa compreensão da base genética na otite média, mas o campo está avançando rapidamente. Recentemente, o Consórcio Otigen³⁰ foi formado, um grupo de pesquisadores da área, com o objetivo de reunir recursos ou comparar DNA para permitir detalhamento genético mais adequado.

Nossa compreensão da susceptibilidade genética para a otite média aguda permanece ainda limitada, mas há novos desenvolvimentos interessantes em nossa compreensão da otite média crônica, habilitados através do desenvolvimento de modelos de camundongos com esta alteração. Em meu laboratório continuamos a explorar a importância da hipoxia como um mecanismo-chave da inflamação, incluindo novos estudos sobre a expressão de genes de hipoxia na otite média humana.

Estudos genéticos futuros precisarão explorar mecanismos da doença de forma mais ampla. Em particular, um método chamado de associação do genoma (*genome-wide association - GWAS*) pode interrogar toda a totalidade de DNA para procurar genes que podem predispor à doença, e assim potencialmente destacar novas vias moleculares da inflamação da orelha média. Com os recentes avanços da genética dos camundongos, há também uma oportunidade para testar a função de todos os genes realçadas através de um GWAS em modelos do camundongo, por mutação alvo desses genes e análise consequente da patobiologia.

A Genética tem, e continuará a oferecer métodos proveitosos para explorar mecanismos da doença. Em última análise, a esperança é que levará a terapias moleculares para o tratamento da otite média nas crianças.

Referências bibliográficas

1. Casselbrant ML. Epidemiology. In: Rosenfeld RM, Bluestone C.D., editor. *Evidence-Based Otitis Media*. 2 ed. Hamilton: B C Decker, 2003:147-62.
2. Kubba H, Pearson JP, Birchall JP. The aetiology of otitis media with effusion: a review. *Clinical otolaryngology and allied sciences* 2000;25(3):181-94.
3. WHO. Chronic suppurative otitis media: Burden of Illness and Management Options. Geneva: World Health Organisation, 2004.
4. Bluestone CD, Bluestone, M.B., Coulter, J. *The Eustachian Tube: Structure, Function, Role in Otitis Media*. Hamilton: B C Decker, 2005.
5. Ars B. *Chronic Otitis Media: Pathogenesis-Oriented Therapeutic Management*. Amsterdam: Kugler, 2008.
6. Otitis media research: unresolved issues and future research. 6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media; 2009; Seoul, Korea.
7. Rovers M, Haggard M, Gannon M, Koeppen-Schomerus G, Plomin R. Heritability of symptom domains in otitis media: a longitudinal study of 1,373 twin pairs. *American Journal of Epidemiology* 2002;155(10):958-64.
8. Casselbrant ML, Mandel EM, Rockette HE, Kurs-Lasky M, Fall PA, Bluestone CD, et al. The genetic component of middle ear disease in the first 5 years of life. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck surgery* 2004;130(3):273-8.
9. Jensen RG, Homoe P, Andersson M, Koch A. Long-term follow-up of chronic suppurative otitis media in a high-risk children cohort. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2011;75(7):948-54.
10. Prinsley P. Familial cholesteatoma in East Anglia, UK. *The Journal of Laryngology and Otolology* 2008:1-4.
11. Homoe P, Rosborg J. Family cluster of cholesteatoma. *The Journal of Laryngology and Otolology* 2007;121(1):65-7.
12. Bhutta MF. Mouse Models of Otitis Media: Strengths and Limitations. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012.
13. Brown SD, Wurst W, Kuhn R, Hancock JM. The functional annotation of mammalian genomes: the challenge of phenotyping. *Annu Rev Genet* 2009;43:305-33.
14. Rye MS, Bhutta MF, Cheeseman MT, Burgner D, Blackwell JM, Brown SD, et al. Unraveling the genetics of otitis media: from mouse to human and back again. *Mamm Genome* 2011;22(1-2):66-82.
15. Rye MS, Blackwell JM, Jamieson SE. Genetic susceptibility to otitis media in childhood. *The Laryngoscope* 2012;122(3):665-75.
16. Leichtle A, Hernandez M, Pak K, Yamasaki K, Cheng CF, Webster NJ, et al. TLR4-mediated induction of TLR2 signaling is critical in the pathogenesis and resolution of otitis media. *Innate Immun* 2009;15(4):205-15.
17. Hirano T, Kodama S, Fujita K, Maeda K, Suzuki M. Role of Toll-like receptor 4 in innate immune responses in a mouse model of acute otitis media. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2007;49(1):75-83.
18. MacArthur CJ, Hefeneider SH, Kempton JB, Trune DR. C3H/HeJ mouse model for spontaneous chronic otitis media. *The Laryngoscope* 2006;116(7):1071-9.
19. Leichtle A, Hernandez M, Lee J, Pak K, Webster NJ, Wollenberg B, et al. The role of DNA sensing and innate immune receptor TLR9 in otitis media. *Innate Immun* 2011.
20. Hernandez M, Leichtle A, Pak K, Ebmeyer J, Euteneuer S, Obonyo M, et al. Myeloid differentiation primary response gene 88 is required for the resolution of otitis media. *The Journal of Infectious Diseases* 2008;198(12):1862-9.
21. Tong HH, Li YX, Stahl GL, Thurman JM. Enhanced susceptibility to acute pneumococcal otitis media in mice deficient in complement C1qa, factor B, and factor B/C2. *Infection and Immunity* 2010;78(3):976-83.
22. Ryan AF. Host gene networks during bacterial infection of the middle ear. *10th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media*. New Orleans, 2011.

23. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* 2007;21(2):325-32.
24. Depreux FF, Darrow K, Conner DA, Eavey RD, Liberman MC, Seidman CE, et al. Eya4-deficient mice are a model for heritable otitis media. *The Journal of Clinical Investigation* 2008;118(2):651-8.
25. Hardisty-Hughes RE, Tateossian H, Morse SA, Romero MR, Middleton A, Tymowska-Lalanne Z, et al. A mutation in the F-box gene, Fbxo11, causes otitis media in the Jeff mouse. *Human Molecular Genetics* 2006;15(22):3273-9.
26. Parkinson N, Hardisty-Hughes RE, Tateossian H, Tsai HT, Brooker D, Morse S, et al. Mutation at the Evi1 locus in Junbo mice causes susceptibility to otitis media. *PLoS Genetics* 2006;2(10):e149.
27. Rye MS, Wiertsema SP, Scaman ES, Oommen J, Sun W, Francis RW, et al. FBXO11, a regulator of the TGFbeta pathway, is associated with severe otitis media in Western Australian children. *Genes Immun* 2011;12:352-59.
28. Tateossian H, Hardisty-Hughes RE, Morse S, Romero MR, Hilton H, Dean C, et al. Regulation of TGF-beta signalling by Fbxo11, the gene mutated in the Jeff otitis media mouse mutant. *Pathogenetics* 2009;2(1):5.
29. Cheeseman MT, Tyrer HE, Williams D, Hough TA, Pathak P, Romero MR, et al. HIF-VEGF Pathways Are Critical for Chronic Otitis Media in Junbo and Jeff Mouse Mutants. *PLoS Genetics* 2011;7(10):e1002336.
30. <http://www.otigen.org>. 2011.