

Doença Mucosa Crônica e o Papel da Infecção Intracelular e os Biofilmes

Ruth Thornton e Harvey Coates

Introdução

A otite média crônica com efusão (OME) e otite média aguda recorrente (OMAr) são as razões mais comuns para que as crianças sejam submetidas a cirurgia e não responder bem ao tratamento com antibióticos. Mais de 33% das crianças terão três ou mais episódios de otite média aguda (OMA) quando tiverem três anos de idade ¹. Tem sido observado um aumento no número de crianças com OMAr ². Muitas vezes, a OME crônica não responde ao tratamento e a OMAr muitas vezes recidiva em até um mês após o término da administração de antibióticos ^{3,4}. Ainda que o papel importante das bactérias no desenvolvimento da otite média (OM) seja reconhecido, com frequência elas não podem ser cultivadas a partir de efusões da orelha média, e os mecanismos de recorrência e persistência não são bem compreendidos. As evidências sugerem que o biofilme bacteriano e a infecção intracelular estão envolvidos.

Biofilme

A formação de biofilme é um mecanismo universal usado pelas bactérias para sua sobrevivência no meio ambiente ⁵. As bactérias dentro de um biofilme têm um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição gênica de suas contrapartes planctônicas, as que flutuam livremente ⁶⁻⁹. As bactérias do biofilme são difíceis de cultivar, são resistentes a antibióticos e são o fenótipo bacteriano preferencialmente adotado para sua persistência crônica ¹⁰. Dados *in vivo* e *in vitro* sugerem que os otopatógenos são capazes de formar biofilmes e também de invadir e sobreviver dentro de células. As bactérias podem usar estes mecanismos para esquivar-se das respostas imunológicas, tanto celular como humoral, e subsequentemente sobreviver e persistir dentro do hospedeiro. As bactérias do biofilme são resistentes a tratamentos antibacterianos devido à sua fisiologia nutricional limitada e sua adoção do fenótipo biofilme. Além disso, as bactérias que resistem dentro das células estão protegidas contra os antibióticos incapazes de penetrar através das membranas celulares (incluindo os do grupo dos β -lactâmicos).

Infecção intracelular

A persistência intracelular representa um mecanismo adicional pelo qual as bactérias, vírus e parasitas são capazes de persistir no organismo e poderem atuar como um reservatório de infecção sob condições persistentes. Quando as bacté-

rias tornam-se intracelulares são capazes de esquivar-se das respostas imunes do hospedeiro e de muitas terapias antimicrobianas que não penetram bem através da membrana celular. Há uma gama de patógenos que consegue aproveitar os ambientes intracelulares, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* em infecções pulmonares, o *Streptococcus pyogenes* em amigdalite, a *Escherichia coli* em infecções recorrentes no tratamento urinário, o *Helicobacter pylori* em infecções gástricas crônicas e a *Salmonella* em infecções gastrointestinais ¹¹⁻¹⁶.

Infecção intracelular em otite média

Usando microscópio eletrônico de transmissão, nosso grupo foi o primeiro a demonstrar a persistência intracelular de bactérias na mucosa da orelha média de crianças com OME crônica ¹⁷. Com base em resultados de PCR (*polymerase chain reaction*) positivos para a presença de pneumolisina (uma endotoxina pneumocócica) e em critérios morfológicos, as bactérias foram identificadas como *S. pneumoniae*. Devido às limitações da metodologia de microscopia eletrônica, entretanto, o biofilme não foi demonstrado e, sendo assim, a espécie bacteriana presente nas células epiteliais não pode ser identificada de forma definitiva.

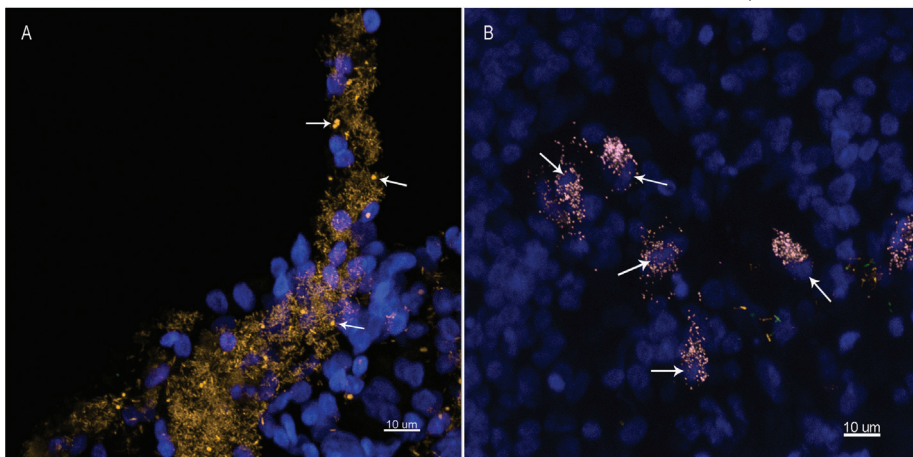
Biofilme na otite média

As evidências mais diretas de biofilmes na OM foram obtidas em modelos animais ^{10, 18}. Estudos mais recentes, contudo, demonstraram o biofilme bacteriano na orelha média de crianças com OM crônica supurativa (OMCS), OMAr ou OME ¹⁹⁻²¹. Com exceção do estudo de Hall-Stoodley et al, que identificou a espécie bacteriana em um subgrupo de crianças ¹⁹, os biofilmes foram demonstrados com o uso de técnicas inespecíficas de imagem, incluindo a microscopia eletrônica de varredura e a coloração de viabilidade. Esta ausência de identificação dos patógenos limita a possibilidade de determinar o papel que o biofilme desempenha como um mecanismo de persistência em OME e OMAr crônicas e foi importante demonstrar os otopatógenos nestas estruturas.

Trabalhos atuais sobre biofilme e infecção intracelular na otite média

Em Perth, Austrália Ocidental, nosso grupo estabeleceu técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para identificar otopatógenos em biofilme e intracelulares na mucosa da orelha média de crianças com OMAr e OME crônica. FISH é uma técnica que pode ser usada para identificar a espécies bacterianas usando sondas fluorescentes de oligonucleotídeos, tendo o RNA ribossomal 16S como alvo. Nosso laboratório estabeleceu uma sonda eubacteriana universal e sondas específicas para o *S. pneumoniae*, o *Haemophilus influenzae* e a *Moraxella catarrhalis*, para avaliar amostras de biópsia de mucosa da orelha média usando FISH e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM-*confocal laser scanning microscopy*). Usando estas técnicas, tivemos sucesso na identificação tanto do biofilme como da infecção intracelular contendo otopatógenos conhecidos **Figura 1**). A *M. catarrhalis* e o *S. pneumoniae* foram vistos nas formações de biofilme e intracelularmente, mas o *H. influenzae* pareceu estar mais presente intracelularmente. Com frequência, o biofilme e as bactérias intracelulares estavam presentes ao mesmo tempo nas biópsias de orelha média. Outras bactérias, de espécies não identificadas, também estavam presentes freqüentemente, uma indicação da natureza polimicrobiana deste mecanismo de persistência.

Figura 1. Imagens representativas de biópsia de mucosa de uma criança com OMAr; FISH: Sonda universal, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* e Hoechst 33342 (núcleos corados). A) Biofilme bacteriano extenso cobrindo a mucosa da orelha média. B) Bactérias intracelulares nas células da mucosa da orelha média, as setas apontam para os núcleos das células do hospedeiro cercadas por células bacterianas. Muitas bactérias não foram identificadas. O *S. pneumoniae*, entretanto, foi encontrado tanto intracelularmente como no biofilme em toda a amostra, e a *M. catarrhalis* foi observada nos biofilmes. Barras = 10µm.



Implicações no tratamento

Estes achados indicam que a infecção intracelular e o biofilme contendo otopatógenos conhecidos podem contribuir para a persistência bacteriana, resultando na falha das terapias convencionais e na refratariedade da infecção. Estes biofilmes têm muitas vezes uma natureza polimicrobiana, sendo provável que contenham outras espécies além das comumente identificadas como otopatógenos. Isto tem implicações para a formulação de futuras estratégias de tratamento, uma vez que as bactérias do biofilme são em grande parte resistentes aos antimicrobianos, e muitos antibióticos falham em alcançar as bactérias intracelulares. Fica claro que estes dois mecanismos de persistência precisam ser o alvo para que os tratamentos sejam efetivos. É preciso considerar métodos que possam interferir, interrompendo os biofilmes, e que sejam direcionados contra as bactérias intracelulares, sendo provável que sejam necessários tratamentos combinados.

Trabalhos futuros

De forma similar ao que temos observado nas infecções da orelha média, a infecção intracelular pode estar presente nos tecidos do trato respiratório superior e inferior, proporcionando um mecanismo adicional que permite a persistência das bactérias e a reinfeção do hospedeiro. Este mecanismo de persistência pode ser importante também em outras condições crônicas incluindo a rinossinusite, a apnéia obstrutiva do sono e a fibrose cística. Ainda que a maioria dos estudos tenha focado a presença do biofilme nestas condições, poucos trabalhos têm sido conduzidos considerando o papel que a infecção intracelular pode desempenhar. A presença concomitante de biofilme e infecção intracelular com patógenos conhecidos precisa ser explorada, pois pode ter implicações importantes na formulação de novos tratamentos para erradicar os reservatórios determinantes de infecções.

Referências bibliográficas

1. Giebink GS. Vaccination against middle-ear bacterial and viral pathogens. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 830:330-52.
2. Joki-Erkkila VP, Laippala P, Pukander J. Increase in paediatric acute otitis media diagnosed by primary care in two Finnish municipalities--1994-5 versus 1978-9. *Epidemiol Infect.* 1998; 121(3):529-34.
3. Pichichero ME. Recurrent and persistent otitis media. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19(9):911-6.
4. Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Maragoudakis P, et al. Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they? *Laryngoscope.* 2007; 117(4):668-73.
5. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, et al. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 12(3):185-90.
6. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49:711-45.
7. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2):167-93.
8. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 2002; 184(4):1140-54.
9. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56:187-209.
10. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *Jama.* 2002; 287(13):1710-5.
11. Amano A, Nakagawa I, Yoshimori T. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J Biochem (Tokyo).* 2006; 140(2):161-6.
12. Cheminay C, Mohlenbrink A, Hensel M. Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2005; 174(5):2892-9.
13. Marouni MJ, Barzilai A, Keller N, et al. Intracellular survival of persistent group A streptococci in cultured epithelial cells. *Int J Med Microbiol.* 2004; 294(1):27-33.
14. Osterlund A, Poppa R, Nikkila T, et al. Intracellular reservoir of *Streptococcus pyogenes* in vivo: a possible explanation for recurrent pharyngotonsillitis. *Laryngoscope.* 1997; 107(5):640-7.
15. Schmid D, Dengjel J, Schoor O, et al. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med.* 2006; 84(3):194-202.
16. Shin JS, Abraham SN. Cell biology. Caveolae--not just craters in the cellular landscape. *Science.* 2001; 293(5534):1447-8.
17. Coates H, Thornton R, Langlands J, et al. The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 138(6):778-81.
18. Reid SD, Hong W, Dew KE, et al. *Streptococcus pneumoniae* Forms Surface-Attached Communities in the Middle Ear of Experimentally Infected Chinchillas. *J Infect Dis.* 2009.

19. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *Jama*. 2006; 296(2):202-11.
20. Homoe P, Bjarnsholt T, Wessman M, et al. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009.
21. Lee MR, Pawlowski KS, Luong A, et al. Biofilm presence in humans with chronic suppurative otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009; 141(5):567-71.