

Thiago Freire Pinto Bezerra

**O papel do biofilme na rinosinusite crônica
com polipose nasossinusal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Richard Louis Voegels

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Thiago Freire Pinto

O papel do biofilme na rinossinusite crônica com polipose nasossinusal /
Thiago Freire Pinto Bezerra. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Richard Louis Voegels.

Descritores: 1.Adulto 2.Face 3.Mucosa nasal 4.Biofilmes 5.Pólipos nasais
6.Sinusite

USP/FM/DBD-121/12

A Deus...

À minha esposa, Lilian. Seu amor... , seu sorriso me ilumina; sua presença me fortalece; seu colo me ampara; seu exemplo me inspira... em todos os instantes da minha vida. Te amo para sempre!

Ao meu filho, Pedrinho. Seu nome é o que significa para mim. Desde sua chegada, aprendo diuturnamente sobre a beleza que existe nas pequenas coisas, nos pequenos gestos, no sorriso fácil... Aprendi que cada instante é único.

Aos meus pais, Murilo e Montanha, primeiros e grandes mestres, médicos... Dedicção traz frutos, trabalho traz resultados, honestidade é essencial, a família é tudo. Amo vocês...

À minha irmã, Ana, minha amiga na infância, minha primeira professora de inglês, meu estímulo para ser médico, para virar otorrinolaringologista. Seguir seus passos tornou minha vida melhor

Ao meu irmão, Otávio, grande irmão e companheiro, verdadeiro, você sempre foi um exemplo pela dedicação às causas em que acredita e pela forma de saber viver.

Aos meus sogros, José Alfredo e Sônia Maria, vocês são meus segundos pais, verdadeiros presentes de Deus em minha vida.

À minha avó Tula (*in memoriam*). Você me fez querer ser médico e pesquisador... Obrigado!

À minha avó Alexandrina. Sua sabedoria e serenidade nos guia em todos os momentos.

Aos meus avôs (*in memoriam*). O exemplo que vocês deixaram em minha vida são bases sólidas para a constituição da minha família.

Ao meu tio, José Carlos, primeiro ídolo médico; ao meu pediatra Getúlio, e ao Dr. Edson Ando, meu oftalmologista ,“O” MÉDICO.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Richard Louis Voegels, por ter aberto as portas desta instituição para mim e ter me proporcionado muitas oportunidades de crescimento científico e profissional. Um grande líder servidor, a quem eu considero como um amigo, sempre disponível para ajudar o grupo. Serei sempre agradecido por tudo que aprendi com você, principalmente, a não impor limites às aspirações dos seus coordenados, nos incentivando e ajudando a torná-las possíveis. A companhia da sua mão me permitiu caminhar com muito mais segurança.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por seu espírito empreendedor e transformador de tudo à sua volta.

Ao Prof. Dr. Luis Ubirajara Sennes, Professor Associado do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Coordenador da Pós-graduação em Otorrinolaringologia, por sua postura séria e determinada, por sua relação horizontal com todos os pós-graduandos e pelos conhecimentos compartilhados através de pesquisas científicas.

Ao Prof. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Prof. Titular do Departamento de Patologia, por todo o seu entusiasmo com a ciência, com a pesquisa científica, com o embrião de idéia desta tese e pelo enorme conhecimento transmitido durante este projeto. Obrigado por me ajudar a enxergar longe.

Ao Prof. Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, meu primeiro professor de otorrinolaringologia, meu “iniciador” em metodologia científica, um grande incentivador na minha opção pela otorrinolaringologia e na minha entrada para o doutorado nesta instituição.

À Prof. Dr. Eloisa Maria Mello Santiago Gebrim, pela sua disponibilidade no serviço de imagem e todas as suas sugestões durante a elaboração e conclusão deste projeto.

Ao Prof. Dr. João Ferreira de Mello Júnior, por todas as suas sugestões no desenvolvimento da metodologia deste estudo, na qualificação da tese e no decorrer do estudo, grande professor e amigo.

Ao Dr. Fabio de Rezende Pinna, por ser um grande amigo, pela sua sinceridade, pela sua confiança, pelo conhecimento científico que detém, pelas valiosas sugestões na qualificação e pela confiança.

Ao Dr. Enoque Godoy e ao Dr. Frederico Jucá, vocês serão sempre grandes exemplos profissionais para serem seguidos. Muito obrigado por tudo!

Ao Dr. Michel Burihan Cahali, por suas valiosas sugestões no desenvolvimento deste estudo e por sua amizade.

À Dra. Francini Grecco de Melo Pádua, que muito auxiliou no desenvolvimento de grande parte do desenho deste estudo e pelas oportunidades oferecidas.

À Dra. Tatiana Regina Telles Abdo, pela ajuda no rastreamento dos pacientes, nas reuniões pós-operatórias e pela oportunidade para participar do desenvolvimento conjunto de trabalhos científicos e de sua tese.

À Renata Pilan, pelo auxílio no início da validação dos instrumentos de qualidade vida, essenciais para esta tese e pela oportunidade para participação e desenvolvimento de trabalhos científicos e de sua tese.

A Daniel Lorena Dutra, Renata Lopes Mori, Giovana Moretti, Ana Paula Bezerra, Ricardo Guimarães e Adja Oliveira, pela sua amizade e pela significativa ajuda na coleta das amostras dos pacientes.

Ao Miguel Tepedino Jr, Marco Aurelio Fornazieri, e Maria Dantas, por seu apoio e amizade sincera.

Aos funcionários do laboratório de biologia celular (LIM-59) por todo auxílio no preparo das amostras. Ao Boleta, pela prontidão em ajudar. Às funcionárias do laboratório de microscopia eletrônica, por toda a paciência durante a análise das amostras.

Aos atuais e ex-residentes do serviço que me auxiliaram durante o desenvolvimento deste estudo. Em especial ao Henrique Ramos, pelas sugestões na ilustração da capa desta tese.

À Marilede, Luci, Marcia e Kátia, secretárias do departamento, sempre disponíveis, sempre prestativas, vocês ajudaram muito a tornar possível este projeto .

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias / elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo primário	4
2.2 Objetivos secundários	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal	5
3.2 Fatores relacionados a RSCcPN	5
3.2.1 Superantígenos	6
3.2.2 Rinite Alérgica.....	6
3.2.3 Asma Brônquica	7
3.2.4 Doença Respiratória Exarcebada pela Aspirina	7
3.2.5 Fatores intrínsecos das vias aéreas	8
3.2.6 Remodelamento tissular	8
3.2.7 Clearance mucociliar	9
3.2.8 Anormalidades anatômicas.....	9
3.2.9 Fungos.....	9
3.2.10 Osteíte	10
3.2.11 Biofilme	11
3.2.11.1 Técnicas laboratoriais para identificação do biofilme	13
4 MÉTODOS	15
4.1 Pacientes	15
4.1.1 Critérios de inclusão	15
4.1.2 Pacientes do grupo controle	16
4.1.3 Critérios de exclusão para ambos os grupos de pacientes.....	16
4.2 Métodos	17
4.2.1 Pacientes com RSCcPN.....	17
4.2.1.1 Avaliação pré-operatória	17
4.2.1.2 Coleta de Amostras.....	18
4.2.1.3 Pós-operatório.....	18

4.2.2	Pacientes do grupo controle	19
4.2.2.1	Coleta de Amostras.....	19
4.2.2.2	Pós-operatório.....	19
4.2.3	Preparo e Análise das amostras de ambos os grupos	19
4.3	Tamanho mínimo amostral.....	20
4.4	Análise estatística	20
4.4.1	Estudo transversal do tipo caso-controle.....	21
4.4.2	Avaliação dos preditores clínicos pré-operatórios e do prognóstico pós-operatório após 1 ano segundo a presença do biofilme intraoperatória	21
4.4.3	Testes estatísticos	22
5	RESULTADOS	23
6	DISCUSSÃO	32
7	CONCLUSÕES	42
8	ANEXOS	43
9	REFERÊNCIAS	45

Lista de Abreviaturas

AB - Asma brônquica

COM - Complexo ósteo-meatal

CLSM – Microscopia confocal de varredura laser

FESS- cirurgia endoscópica nasossinusal funcional

FISH – Hibridização fluorescente in situ

LT - linfócitos T

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

QV – Qualidade de vida

RA – Rinite Alérgica

RS - Rinossinusite

RSC - Rinossinusite Crônica

RSCsPN - Rinossinusite Crônica sem Polipose Nasossinusal

RSCcPN - Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal

RSFA – Rinossinusite Fúngica Alérgica

SA - Staphylococcus aureus

SAB - Biofilme de Staphylococcus aureus

SAg – Superantígeno de Staphylococcus aureus

TCSF - Tomografia computadorizada das cavidades paranasais

Th1 - T-helper tipo 1

Th17 - T-helper tipo 17

Th2 - T-helper tipo 2

Lista de Figuras

Figura 1. Biofilme bacteriano (12.000x)	24
Figura 2. Biofilme bacteriano (Aumento 5.000x)	24
Figura 3. Biofilme bacteriano (Aumento 12.000x)	25
Figura 4. Biofilme bacteriano (12.000x)	25
Figura 5. Biofilme bacteriano (12.000x)	26
Figura 6. Biofilme bacteriano (2.500x)	26
Figura 7. Biofilme bacteriano (1.000x)	27
Figura 8. Biofilme dentro de uma área de epitélio ciliado saudável	27
Figura 9. Metaplasia escamosa do epitélio respiratório (5000x)	28
Figura 10. Paciente com RSCcPN apresentando uma área de transição de epitélio ciliado para uma área de epitélio destruído e metaplasia. (600x).....	28
Figura 11. Paciente do grupo controle sem biofilme, mas com o mesmo padrão de imagem (200x)	29

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados pré-operatórios segundo a presença do biofilme30

Tabela 2. Dados dos resultados pós-operatórios segundo a presença
do biofilme31

Resumo

Bezerra TFP. *O Papel do Biofilme na Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 53p.

Introdução: A patogenia da rinossinusite crônica com polipose nasossinusal não está completamente estabelecida e existem algumas explicações para essa doença como os superantígenos, o desequilíbrio inflamatório e, mais recentemente, o biofilme. **Objetivos:** Avaliar a associação entre a presença do biofilme e a presença de rinossinusite crônica com polipose nasossinusal. Avaliar o quadro clínico e radiológico pré-operatória e pós-operatória segundo a presença do biofilme. **Métodos:** Este é um estudo realizado em um hospital terciário universitário. A primeira parte foi um estudo caso-controle com um grupo de 33 pacientes consecutivos com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal submetidos a cirurgia endoscópica nasossinusal e um grupo controle de 27 pacientes submetidos a septoplastia para tratamento de obstrução nasal. As amostras da mucosa foram coletadas no intra-operatório para avaliação por microscopia eletrônica de varredura para determinar a presença do biofilme. A segunda parte foi um estudo prospectivo em que dados pré-operatórios e pós-operatórios foram registrados, incluindo avaliações padronizadas da qualidade de vida doença-específica relacionadas à obstrução nasal e à rinossinusite, da endoscopia nasal e da tomografia de cavidades paranasais. A análise estatística foi realizada. Para todos os testes um $p=0.05$ foi considerado significativo. **Resultados:** Os biofilmes foram encontrados em 72.7% (24/33) dos pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal e 48.1% (13/27) dos pacientes submetidos a septoplastia (Odd ratio=2.87, IC95% 0.9796-8.419, $p=0.051$). Este foi o primeiro estudo a analisar o efeito da presença do biofilme nos resultados pós-operatórios com medidas padronizadas de um grupo de pacientes apenas com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal. O biofilme estava presente em 72.4% (21/29) dos pacientes que completaram o seguimento. Os pacientes com biofilmes apresentaram uma pior pontuação pré-operatória NOSE e Lund-Kennedy estatisticamente significativos, mas uma mediana semelhante na pontuação total do SNOT-20. Os pacientes com biofilme apresentaram uma melhor resultado na pontuação Lund-Kennedy ($p=0.036$). Estes pacientes apresentaram piores resultados no SNOT-20 e resultados similares quanto ao NOSE e o Lund-Mackay. **Conclusão:** Os biofilmes foram demonstrados presentes nos pacientes submetidos a cirurgia endoscópica funcional para rinossinusite crônica com polipose nasossinusal mas também nos controles. Embora a prevalência não tenha sido diferente significativamente, o intervalo de confiança extremamente amplo de 95%, que apenas cruza a unidade, sugere que uma diferença significativa pode ter sido perdida por causa do baixo poder estatístico e estudos futuros serão necessários. Os biofilmes estiveram relacionados com pior qualidade de vida doença-específica pré-operatória NOSE e avaliação endoscópica (Lund-Kennedy), e melhores resultados endoscópicos. Nossos resultados sugerem que nos pacientes

com uma melhora clínica significativa após a cirurgia, o biofilme representou um papel mais predominante na fisiopatologia da doença. Neste subgrupo, a cirurgia provavelmente removeu a quantidade de biofilme necessária para restaurar o desequilíbrio inflamatório na mucosa.

Descritores: 1.Adulto 2.Face 3.Mucosa nasal 4.Biofilmes 5.Pólipos nasais 6.Sinusite

Summary

Bezerra TFP. *The role of biofilms in Chronic Sinusitis with Nasal Polyps* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 53p.

Introduction: The pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps is not completely established and there are some explanations for this disease, such as superantigens, inflammatory imbalance and, more recently, biofilms.

Objective: Evaluate the association of biofilms presence and chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Evaluate outcomes after sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyps according to the presence of biofilms.

Methods: This is a University based-tertiary care center study. The first part was a case-control study that evaluated a group of 33 consecutive patients undergoing functional endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyps and a control group of 27 patients undergoing septoplasty for nasal obstruction treatment. Mucosal samples were harvested intra-operatively for scanning electron microscopic examination to determine biofilms presence. The second part was a prospective study. Preoperative and follow up data were recorded, including standardized evaluations of disease-specific quality of life related to nasal obstruction and rhinosinusitis, of nasal endoscopy and sinus computer tomography scan. Statistical analysis was performed. For all statistical tests $p=0.05$ was considered significant.

Results: Biofilms were found in 72.7% (24/33) of chronic rhinosinusitis with nasal polyps patients and in 48.1%(13/27) of septoplasty patients (Odds ratio = 2.87, CI95% from 0.9796 to 8.419, $p=0.051$). This was the first report to analyze the effect of biofilms in outcomes with standardized measures of a group of only chronic rhinosinusitis with nasal polyps' patients. Biofilms were present in 72.4% (21/29) of these patients. Patients with biofilms had a statistically significant worst preoperative score related to nasal obstruction and nasal endoscopy, but a similar median sinusitis total score. Patients with biofilms presented better Lund-Kennedy outcome (-3[5]vs.-1[2], $U=46.0, p=0.036$), but the best endoscopic improvement might reflect the worst clinical preoperative status. These patients had worst outcomes in SNOT-20 (-0.75[1.15]vs.-1.30[1.32], $U=69.0, p=0.21$) and similar outcomes in NOSE(-55.0[50.0] vs. -60.0[50.0], $U=81.0, p=0.67$) and Lund-Mackay (-4[5]vs.-4[4]), $U=75.5, p=0.49$). Patients with biofilms presented better Lund-Kennedy outcome ($p=0.036$). There was a correlation among some QoL outcome scores in both groups.

Conclusion: Biofilms were demonstrated to be present in patients undergoing functional endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyps but also in controls. Although the prevalence was not significantly different, the extremely wide 95% confidence interval, which just crosses unity, suggests that a meaningful clinical difference may have been missed because of low statistical power and that further study is necessary. Biofilms were related with worst preoperative disease-specific quality of life questionnaire (NOSE) and endoscopic evaluation (Lund-Kennedy), and better endoscopic outcome. Our findings suggest that in patients with a significant clinical improvement after

surgery, the biofilm had a more predominant role in the pathophysiology of the disease. In this subgroup, the surgery probably removed the amount of biofilms needed to restore the mucosal inflammatory imbalance.

Descriptors: 1. Adult 2.Face 3.Nasal mucosa 4.Biofilms 5.Nasal polyps
6.Sinusitis

1 Introdução

A rinossinusite (RS) é uma doença inflamatória que envolve a mucosa das fossas nasais e de uma ou mais cavidades paranasais. É uma das queixas mais comuns apresentadas em todas as visitas médicas americanas, e uma das principais razões para prescrição de antibióticos e perda de produtividade laboral. Estima-se que cerca 135 em cada 1000 pessoas ou um total de 31 milhões de pessoas são afetadas nos Estados Unidos a cada ano, com um custo total de seis bilhões de dólares ao ano (Benninger, 2003; Osguthorpe, 2001; Fokkens, 2005). A prevalência estimada da rinossinusite crônica (RSC) como um grupo único é de 15,5% nos Estados Unidos, 10% nos países pertencentes a União Européia e 6% na cidade de São Paulo (Hastan, 2011; Pleis, 2006; Fokkens, 2007).

Ela pode ser didaticamente dividida em três síndromes clínicas distintas; com causas, fatores relacionados e resposta ao tratamento clínico e cirúrgico diferentes: Rinossinusite Crônica sem Polipose Nasossinusal (RSCsPN), Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal (RSCcPN) e Rinossinusite Fúngica Alérgica (RSFA)(Meltzer, 2004). A RSCsPN é a forma mais comum de RSC, responsável por 60 a 65 % dos casos, seguida pela RSCcPN (20 a 33%) e pela RSFA (8 a 12 %)(Fokkens, 2007). A prevalência estimada da RSC com pólipos nasais na população européia é de 4% (Pleis, 2006; Stammberger, 1999).

A RSC interfere significativamente na qualidade de vida(QV) em cujo impacto é muito maior do que é atribuído atualmente. Apresenta um impacto maior na qualidade de vida global do indivíduo do que outras doenças crônicas conhecidas como insuficiência cardíaca congestiva, doença pulmonar obstrutiva crônica, angina e dor nas costas (Gliklich, 1995).

É uma doença multifatorial e de etiologia não estabelecida. Muitos agentes podem contribuir para sua fisiopatogenia (Fokkens, 2005; Fokkens,

2007). Um papel chave normalmente está relacionado ao complexo óstio-meatal(COM), cuja patência é fundamental para a fisiologia adequada das cavidades paranasais relacionadas anatômicamente à ele.

A RSC é definida pela persistência por mais de 12 semanas de dois ou mais dos seguintes sintomas após tratamento adequado, e um desses deverá ser um dos dois primeiros: a) bloqueio ou congestão nasal; b) secreção nasal anterior ou gotejamento nasal posterior; c) dor ou pressão na face; d) e redução ou ausência de olfato. Associa-se à presença desses sintomas, as alterações identificadas no exame físico, na endoscopia nasal e/ou na tomografia computadorizada das cavidades paranasais(TCSF). A imagem tomográfica das cavidades paranasais poderá evidenciar alterações na mucosa dentro do COM e/ou cavidades paranasais. A endoscopia nasal poderá evidenciar secreção mucopurulenta primariamente do meato médio e/ou obstrução por edema ou pela mucosa primariamente no meato médio; ou pólipos nas cavidades paranasais (Fokkens, 2007).

Segundo Fokkens et al., a ausência ou presença de pólipos bilaterais nas fossas nasais divide esta doença em duas: RSCsPN e RSCcPN. A histopatologia da RSC geralmente também diferencia-se conforme a presença de polipose nasossinusal, o que demonstra uma fisiopatogenia diferente.^{4,5} A mucosa nasossinusal do paciente com RSCsPN apresenta processo inflamatório predominantemente neutrofílico, membrana basal espessada, hiperplasia de células caliciformes, edema subepitelial limitado, fibrose proeminente e infiltração celular mononuclear. Por outro lado, a mucosa nasossinusal do paciente com RSCcPN apresenta processo inflamatório predominantemente eosinofílico, dano epitelial freqüente, membrana basal espessada, um tecido estromal mais edematoso, ou algumas vezes fibrótico, com número reduzido de vasos e glândulas, mas virtualmente nenhuma estrutura neuronal(Fokkens, 2005; Fokkens, 2007). Segundo Voegels e Pádua, existe também uma diferença no tipo de resposta inflamatória presente, com um diminuição significativa das interleucinas envolvidas nos casos com bom prognóstico pós-operatório (Voegels, 2005). A RSCcPN comumente apresenta uma resposta do tipo T-

helper 2(Th2) em ocidentais e T-helper 17(Th17) em países do leste asiático, enquanto a RSCsPN apresenta uma resposta do tipo *T-helper 1*(Th1)(Bachert, 2002; Fokkens, 2007; Cheng, 2007).

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Avaliar a associação entre a presença do biofilme e o diagnóstico de rinossinusite crônica com polipose nasossinusal.

2.2 Objetivos secundários

- Avaliar a relação entre a presença do biofilme e a avaliação clínica e radiológica pré-operatória dos pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal.
- Avaliar a relação entre a presença do biofilme e o prognóstico pós-operatório clínico e radiológico dos pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal.

3 Revisão de Literatura

3.1 Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal

A RSCcPN afeta comumente pacientes imunocompetentes e pode estar associado a sensibilidade a aspirina e asma brônquica (AB) em 40% dos pacientes, resultando em uma síndrome clínica chamada de doença respiratória exacerbada pela aspirina (Fokkens, 2007).

A RSCcPN caracteriza-se pela presença de pólipos nasais bilaterais preenchidos de material inflamatório, relativamente avasculares e hipoestésicos. É desconhecido o fator desencadeante do desenvolvimento destes pólipos, mas contém tipicamente uma predominância de eosinófilos e altos níveis de interleucina relacionadas com a resposta Th2 em ocidentais, como interleucina (IL)-5 e IL-13; ou com a resposta Th17 em orientais, como IL-17. Normalmente, estes pólipos começam a crescer no meato médio, próximo ao complexo ósteo-meatal (COM); embora possam estar presentes nas fossas nasais e em outras cavidades paranasais(Fokkens, 2007).

3.2 Fatores relacionados a RSCcPN

Várias teorias procuram explicar a fisiopatogenia da RSCcPN. Entende-se hoje, que a RSC é uma doença inflamatória imunológica relacionada simultaneamente ou individualmente com diversos fatores como: superantígenos de *Staphylococcus aureus*(SA), fatores intrínsecos das vias aéreas superiores, distúrbios imunológicos, colonização fúngica que induz e mantém um processo inflamatório eosinofílico, perturbações metabólicas

como a hipersensibilidade à aspirina, e agressão persistente a partir da osteíte e/ou do biofilme (Meltzer, 2004; Fokkens, 2007).

3.2.1 Superantígenos

Os superantígenos são agentes pró-inflamatórios poderosos que podem ser produzidos por bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas e outros microorganismos. São encontrados em várias doenças, mas o real papel na patogênese delas ainda precisa ser elucidado. O mecanismo de ação é através da ligação fora da fenda de ligação de peptídeo do receptor de célula T, na sua porção variante Beta. Esta ligação é menos seletiva e, ao invés de ativar até 0,1% dos linfócitos, pode causar uma ativação de até 20% do sistema imunológico simultaneamente. Desta forma, provoca um atordoamento do sistema imunológico ao ativar uma resposta ineficaz supraclonal dos linfócitos T (LT) simultaneamente, e desencadeia uma tolerância no mesmo, uma anergia. Os superantígenos promovem também a ativação de LT regulatórios que suprimem a resposta imunológica. Os superantígenos podem atuar também como superalérgenos através da ligação ao IgE nos basófilos e mastócitos, acentuando condições alérgicas (Seiberling, 2005). Os superantígenos podem ser encontrados na mucosa dos pacientes com RSCcPN e promover uma resposta imune ineficaz local às bactérias. Existe evidência de uma hiperresponsividade alérgica local ao SA nos pacientes com RSCcPN, pela produção local de anticorpos IgE específicos contra suas enterotoxinas (Seiberling, 2005) nas cavidades nasais com níveis séricos indetectáveis. Este fato não é verificado nos pacientes com RSCsPN (Van Zele, 2004).

3.2.2 Rinite Alérgica

A prevalência da Rinite Alérgica (RA) é superior nos pacientes com RSC do que na população geral (60% vs. 30 a 40%), mas a prevalência de

4,5% da RSCcPN em pacientes com RA é comparável a da população geral. Os pacientes com RSC são comumente mais sensibilizados a alérgenos perenes, como poeira doméstica, epitélio de animais e fungos, do que a alérgenos sazonais, como pólen (Berrettini, 1999). Os pacientes com RSCcPN e RA podem apresentar também uma inflamação alérgica crônica demonstrada por uma resposta clássica Th2 que promove produção local de IgE, infiltração eosinofílica e prolongamento da sobrevivência dos eosinófilos (Hamilos, 1995).

Os estudos epidemiológicos falharam em demonstrar essa relação. Por outro lado, nos pacientes com RSC, o controle da RA é importante para o tratamento da RSC, uma vez que acentua a sua sintomatologia. Acredita-se que pode ter existido um viés de seleção em alguns estudos publicados, por terem sido realizados por pesquisadores com interesse particular em alergia. Esta relação precisaria ser melhor estudada (Fokkens, 2007).

3.2.3 Asma Brônquica

Os pacientes com RSC apresentam uma prevalência de AB superior à da população geral (20% vs. 6%). Os pacientes com AB apresentam evidência de RSC em 66% dos casos; e de RSCcPN, em 7% (Jani, 2005). Os pacientes com RSCcPN apresentam uma associação mais importante com asma, inclusive com aspecto histopatológico similar (Ponikau, 2003). Todavia, a maioria dos estudos que evidenciaram que o tratamento da RSC melhora a AB foram realizados em crianças, e mais estudos são necessários em adultos (Fokkens, 2007).

3.2.4 Doença Respiratória Exarcebada pela Aspirina

Conhecida anteriormente como Tríade de Samter ou Doença de Widal, é uma doença em que os pacientes reagem de forma exarcebada com sintomas de rinite e asma uma a quatro horas após exposição aos anti-

inflamatórios não hormonais que inibem a COX-1. Apresentam uma história clínica de rinite que evolui com o passar dos anos para o desenvolvimento de RSCcPN e Asma Brônquica de difícil tratamento. Estes pacientes apresentam uma hiperprodução e hiperresponsividade consistente aos leucotrienos. São pacientes comumente submetidos a múltiplas cirurgias nasossinusais mas, atualmente, o tratamento através da dessensibilização tem evidenciado controle clínico de uma parcela dos pacientes com RSCcPN sem necessidade de novas cirurgias (Szczeklik, 2001; Szczeklik, 2003; Steinke, 2003).

3.2.5 Fatores intrínsecos das vias aéreas

A hipótese da barreira imune da mucosa sugere que a imunidade adaptativa seria secundária a alterações inatas do sistema imune, ao invés de acreditar que a RSC seja uma desordem da imunidade adaptativa. Segundo esta teoria, as bactérias e fungos seriam muito mais modificadores da doença do que um agente causal primário em indivíduos predispostos (Kern, 2008).

A descoberta do papel de outros componentes da imunidade inata presentes na mucosa nasal deverá trazer no futuro novas fronteiras na fisiopatologia da RSC, como os receptores *Toll-like*, que participam na mediação do tipo de resposta inflamatória, e os peptídeos antimicrobianos, como lisozima, lactoferrina, inibidor secretório de peptidases leucocitárias, os surfactantes (SP) e a Catelicidina LL-37 (Kumar, 2009; Cole, 2002; Ooi, 2007; Chennupati, 2009).

3.2.6 Remodelamento tissular

O tipo de resposta inflamatória local Th2 ou Th1 é essencial na resposta inflamatória da mucosa nasossinusal e diretamente relacionado com o tipo de remodelamento tissular, influenciando o equilíbrio entre as

metaloproteinases e seus inibidores tissulares localmente. O TGF-beta representa a função de interruptor inicial deste processo. Os pacientes com RSCcPN apresentam uma redução do TGF-beta e do inibidor de metaloproteinase-1 (TIMP-1), com aumento da matriz metaloproteinase 9 (MMP-9). Desta forma, verifica-se um remodelamento degradativo da matriz extra-celular e um processo de cicatrização pobre, com formação dos pólipos (Watelet, 2005).

3.2.7 Clearance mucociliar

A fibrose cística e a discinesia ciliar primária são síndromes raras que podem apresentar RSCcPN e representam menos de 1% dos casos de RSC em adultos. Contudo estes pólipos geralmente são neutrofílicos e sugere-se que tenham uma histopatologia diferente (Baroody, 2007).

3.2.8 Anormalidades anatômicas

Não existe evidência de uma relação causal entre variações anatômicas nas fossas nasais, como o desvio de septo nasal, hipertrofia da bula etmoidal ou aeração da concha média, e a incidência de RSC (Fokkens, 2007; Zinreich, 1988).

3.2.9 Fungos

A teoria da etiologia fúngica para a RSC surgiu a partir da detecção de elementos fúngicos por um teste muito sensível nestes pacientes e o uso posterior de anfotericina B sem um grupo controle que resultou em uma melhora de 75% nos sintomas (Ponikau, 2002). Em um estudo posterior o mesmo autor apresentou resultados com uma melhora endoscópica e tomográfica, contudo o significado clínico desta melhora estatística foi questionável (Ponikau, 2005).

56. Shin SH, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, et al. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol* 2004 ;114(6):1369-75.

Todos estes resultados não foram reproduzidos, com uma melhora de apenas 39% em um estudo posterior e ensaios clínicos randomizados controlados também não confirmaram os resultados do primeiro estudo (Ricchetti, 2002; Weschta, 2004; Ebbens, 2009). Estudos *in vitro* também mostraram um aumento da produção de IL-5 e IL-13 em 89% em pacientes com RSC, mas não em pacientes de um grupo controle quando colocados em contato com fungos. Este aumento foi mais rápido quando estimulado por *Alternaria*. Essa estimulação acontece através de um mecanismo não alérgico independente de IgE fungo-específica, mas correlacionada com com IgG fungo-específica (Shin, 2004). Contudo estudos posteriores não confirmaram estes resultados (Orlandi, 2009).

Os fungos podem estar presentes associados com biofilmes, e estudos recentes demonstraram que a interação de um biofilme de SA com hifas de *Candida ssp.* alterou o fenótipo do biofilme e sua interação com a mucosa. Esta modificação é atribuída a regulação diferente de fatores de virulência específicos (Peters, 2010).

3.2.10 Osteíte

Lee e cols. mostraram a prevalência da osteíte paranasal em pacientes com RSC entre 36 e 53%, conforme o critério radiológico ou histopatológico, respectivamente (Lee, 2006). Foi encontrada uma prevalência de 6.7% nos pacientes submetidos à primeira cirurgia e 58% no pacientes reoperados. Foi avaliada a osteíte e seu efeito no prognóstico através do SPECT e comprovou-se a existência de um remodelamento ósseo consistente com a osteíte em pacientes com RSC maior do que no grupo controle. Os pacientes com maior índice de remodelamento apresentavam pior prognóstico (Khalid, 2002).

3.2.11 Biofilme

O biofilme é uma reunião de células de microorganismos irreversivelmente ancorada à uma superfície inerte ou viva, envolvida em uma matriz de uma substância polimérica extracelular autoproduzida e composta de material primariamente polissacáride, que representa mais de 90% da massa do biofilme. Essa forma de vida o torna altamente resistente a alterações de pH, temperatura e à atividade dos antibióticos, possivelmente justificando as infecções crônicas persistentes, refratárias a tratamento clínico, como a RSC (Donlan, 2002; Costerton, 2003; Mah, 2001; Perloff, 2004).

A importância dada nas doenças humanas é nova, inclusive nas da nossa especialidade (Post, 2001). Embora no passado os microbiologistas tenham sempre focado a bactéria em sua forma planctônica, a recalcitrância clínica aos antibióticos tem aumentado o interesse no comportamento das bactérias quando elas colonizam superfícies produzindo biofilmes (Sanclement, 2005). Publicações recentes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças Americano (CDC) estimam que pelo menos 65% de todos os processos infecciosos bacterianos crônicos em humanos envolveriam biofilmes (Donlan, 2002; Potera, 1999). Os organismos importantes nas doenças otorrinolaringológicas são comprovadamente formadores de biofilme, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Post, 2004). Entretanto, foi mostrado que uma ausência de relação entre os resultados da cultura com a presença do biofilme e com o tipo de bactéria identificada no mesmo (Sanderson, 2006).

Post realizou o primeiro estudo que avaliou a presença de biofilmes na otorrinolaringologia. Ele identificou biofilmes em tubos de ventilação de crianças com otite média serosa crônica através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e mostrou a associação destas estruturas às otites médias em um modelo experimental (Post, 2001). Em outras áreas da otorrinolaringologia, já foi demonstrada a presença de biofilme no

colesteatoma, nas tonsilites crônicas, nas adenóides de pacientes com sinusites crônicas e nas infecções associadas à biomateriais como as próteses vocais (Post, 2004; Van Den Hoogen, 1996; Zuliani, 2006)

O biofilme é um fator também associado com a RSC. Estima-se que 10% dos pacientes com RSC não respondam a nenhum tipo de tratamento clínico ou cirúrgico. Os biofilmes explicariam em parte o porquê da incapacidade dos antibióticos em eliminar essa população bacteriana cronicamente estabelecida em um grupo destes pacientes. As bactérias que estão no biofilme são envolvidas por uma matriz de glicopolissacarídeos e podem crescer coordenadamente uma vez que certa densidade celular seja alcançada pela indução de várias moléculas de sinalização, habilidade conhecida como *quorum sensing*. É uma organização complexa de bactérias ancoradas em uma superfície, agrupadas numa espécie de sincício com forma de torres e cogumelos (Perloff, 2004).

Perloff e Palmer foram responsáveis por uma série de estudos que confirmaram a hipótese da presença do biofilme na mucosa dos pacientes com RSC (Perloff, 2004; Cryer, 2004; Perloff, 2005), cuja presença explicaria o porquê destes pacientes melhorarem durante o curso de antibióticos com recidiva clínica algum tempo após sua interrupção (Ferguson, 2005). Outros estudos confirmaram a presença de bactérias no interior do biofilme através de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal a laser com hibridização fluorescente in situ (FISH/CSLM) (Ferguson, 2005; Sanclement, 2005; Sanderson, 2006).

Estudos recentes têm relacionado a presença do biofilme com um pior prognóstico em pacientes com rinosinusite crônica (Sanclement, 2005; Psaltis, 2008; Bendouah, 2006). Acredita-se que uma parcela das falhas cirúrgicas possa ser atribuída a persistência do biofilme dentro de sulcos de uma mucosa edemaciada, cronicamente inflamada, com ausência de cílios, o qual poderia predispor o paciente para uma rápida reinfecção (Al-Rawi, 1998).

3.2.11.1 Técnicas laboratoriais para identificação do biofilme

Existem várias técnicas para investigar a presença do biofilme na RSC com grande variação de acurácia, conforme o método escolhido. Os estudos com microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram uma prevalência de 25 a 100% nos pacientes com RSC (Cryer, 2004; Sanclement,2004; Ramadan, 2005) A FISH/CSLM demonstrou uma prevalência de cerca de 77% (Sanderson, 2006), enquanto a CSLM demonstrou uma prevalência de 44 a 50% (Psaltis, 2008). Recentemente, Foreman conseguiu identificar a presença de biofilmes em 90% de uma amostra de 20 pacientes quando ele combinou os resultados da CLSM (65%) e da FISH/CSLM (70%), mas com uma reprodutibilidade dos resultados em 55% dos pacientes (Foreman, 2010). A demonstração indireta da formação *in vitro* do biofilme foi aproximadamente de 28,6% em um artigo (Prince, 2008) enquanto outro, com um tamanho de amostra bem menor evidenciou o biofilme em 84% (Bendouah, 2006). É esperado que este exame tenha uma baixa acurácia porque algumas vezes a coleta pode ser ineficaz (Prince, 2008, Bendouah, 2006). Algumas das razões para baixa reprodutibilidade dos métodos pode ser atribuída aos diferentes critérios de inclusão e tamanhos de amostra. Outra razão, é que cada fragmento só pode ser avaliados por um método diagnóstico, e o mesmo fragmento não pode ser avaliado por dois métodos diferentes. Desta forma, o aumento da acurácia só seria alcançado através da combinação de resultados de métodos diferentes avaliando fragmentos diferentes. Foreman e cols. alcançaram uma prevalência de 90% associando a avaliação por FISH/CSLM com a avaliação por CSLM com resultados similares em cada método (65% vs. 70%), mas só foram reprodutíveis em 55% dos pacientes (Foreman, 2010).

A presença do biofilme em grupos controle foi reportada entre 0 a 40%, com as mesmas dificuldades dos pacientes com RSC descritas acima (Sanclement, 2005; Sanderson, 2006; Psaltis, 2008).

A microbiologia da rinosinusite evolui por várias fases. Inicia-se com uma infecção viral que normalmente apresenta resolução espontânea em

cerca de 10 dias na maioria dos pacientes (Benninger, 2003; Fokkens, 2007). Em cerca de 0,5 a 2% dos pacientes ocorre uma infecção bacteriana secundária por aeróbios, comumente *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (Fokkens, 2007). Nos pacientes em que não ocorre a resolução da RSA, anaeróbios, como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella ssp*, *Porphyromonas ssp*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus* ; e aeróbios, como o *Staphylococcus aureus* e alguns bacilos gram-negativos tornam-se predominantes. A infecção polimicrobiana é comum e pode ser sinérgica (Stephenson,2010). Os pacientes com RSCcPN apresentam principalmente *Staphylococcus aureus* evidenciado por cultura de secreção do meato médio ou por FISH/CSLM (Foreman, 2011).

4 Métodos

4.1 Pacientes

Este é um estudo prospectivo que foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo entre 2008 e 2010, após autorização da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq no. 0669/07), em que foram incluídos após consentimento escrito 33 pacientes portadores de RSC com polipose nasossinusal e 27 pacientes de um grupo controle.

4.1.1 Critérios de inclusão

- a) Pacientes portadores de RSC com polipose nasossinusal sem histórico de cirurgia nasossinusal
- b) Ausência de remissão das queixas clínicas compatíveis com o diagnóstico de RSC ao tratamento clínico com o uso de antibióticos orais, antagonistas dos leucotrienos e/ ou inibidores da sua síntese, solução salina nasal isotônica (NaCl 0.9%), corticóide tópico nasal e/ou, em alguns casos, corticóide sistêmico;
- c) Maiores de 18 anos;
- d) Não gestantes e não lactantes
- e) Ausência de história de trauma de face;
- f) Bom estado geral de saúde, sem doenças sistêmicas ou localizadas que o comprometam ou possam vir a comprometê-lo

4.1.2 Pacientes do grupo controle

- a) Portadores de obstrução nasal devido a hipertrofia de conchas nasais inferiores de 3 ou 4 cruces em 4 cruces e/ou desvio de septo nasal em área III e IV de Cottle de grau III ou IV
- b) Ausência de remissão da queixa de obstrução nasal após tratamento clínico com o uso de antagonistas dos leucotrienos e/ou inibidores da sua síntese, solução salina nasal isotônica (NaCl 0.9%), corticóide tópico nasal e/ou, em alguns casos, corticóide sistêmico;
- c) Indicação cirúrgica para septoplastia c/ ou s/ turbinectomia inferior parcial
- d) Ausência dos critérios diagnósticos para RSC
- e) Ausência de polipose nasossinusal unilateral ou bilateral à endoscopia nasal;
- f) Maiores de 18 anos,
- g) Não gestantes e não lactantes
- h) Ausência de história de trauma de face;
- i) Bom estado geral de saúde, sem doenças sistêmicas ou localizadas que o comprometam ou possam vir a comprometê-lo

4.1.3 Critérios de exclusão para ambos os grupos de pacientes

- a) Análise histológica por microscopia ótica da mucosa nasal com infiltração celular predominantemente não eosinofílica.
- b) Portadores de causas secundárias de RSC: bola fúngica, doença fúngica invasiva, doenças granulomatosas, vasculites, mucocelos isoladas, tumores malignos e benignos nasossinuais, anormalidades congênitas (como discinesia ciliar primária, fibrose cística) e fístulas oro-antrais;
- c) Anormalidades congênitas craniofaciais
- d) Imunodeficiências primárias ou secundárias

- e) Artefato dental importante impedindo o estadiamento preciso da TC;
- f) Pacientes que utilizaram durante o último mês antes da cirurgia: antibiótico oral, corticóide tópico nasal e/ ou sistêmico, anti-histamínico tópico e/ ou sistêmico, ou antagonistas dos leucotrienos e/ ou inibidores da sua síntese;

4.2 Métodos

4.2.1 Pacientes com RSCcPN

4.2.1.1 Avaliação pré-operatória

Todos os pacientes foram avaliados através de dois questionários de avaliação de qualidade de vida doença-específico validados para o português, pela endoscopia nasal e pela tomografia de cavidades paranasais (TCSF).

Primeiro questionário foi o SNOT-20 (do inglês *Sinonasal Outcome Test*, teste para avaliar resultados nasossinusal), um instrumento para avaliar QV doença-específico para pacientes com RSC, Anexo A (Piccirillo, 2002; Bezerra, 2011). O segundo foi o NOSE (do inglês *Nasal Obstruction Symptom Evaluation*, Avaliação do sintoma de obstrução nasal), um instrumento para avaliar QV doença-específico para pacientes com obstrução nasal, Anexo B (Stewart, 2004; Bezerra, 2011).

A endoscopia nasal foi estadiada conforme os critérios de Lund-Kennedy modificados por Johannsson. A TCSF foi estadiada quanto a extensão da RSC conforme os critérios estabelecidos por Lund-Mackay (Fokkens, 2007).

4.2.1.2 Coleta de Amostras

Após um período de até trinta dias depois dessa avaliação, os pacientes foram submetidos à cirurgia endoscópica nasossinusal funcional(FESS) de acordo com a extensão de sua doença. Coletamos no transoperatório amostra de tecido ósteo-mucoso da bula etmoidal para posterior preparo e análise.

4.2.1.3 Pós-operatório

Todos os pacientes foram medicados com amoxicilina/clavulanato de potássio na dose de 500mg/125mg de 8/8h por 21 dias, budesonida em spray nasal aquoso na dose de 64 mcg em cada narina de 12 em 12 horas por 12 meses e solução salina isotônica 0,9% 20 ml em cada narina de 12 em 12 horas por 12 meses.

Os pacientes foram acompanhados após a cirurgia através das seguintes visitas: no primeiro dia pós-operatório, semanalmente no primeiro mês e depois trimestralmente no primeiro ano. Nessas consultas pós-operatórias avaliamos subjetivamente os pacientes através da intensidade das queixas clínicas presentes antes da cirurgia e realizamos a limpeza endoscópica das fossas e cavidades paranasais sob anestesia local com lidocaína Hcl 1% e vasoconstricção da mucosa das cavidades nasais e do meato médio com adrenalina em uma concentração de 1:100.000.

Todos os pacientes que apresentaram persistência da sua polipose nasal após o período de um ano da cirurgia foram reconduzidos ao ambulatório de rinologia (Reunião do Grupo de Nariz) para reavaliação terapêutica, e decisão conjunta com o paciente quanto à manutenção do controle clínico com budesonida nasal em spray na dose acima especificada ou a necessidade de nova FESS, conforme a rotina do ambulatório.

4.2.2 Pacientes do grupo controle

4.2.2.1 Coleta de Amostras

A coleta das amostras ocorreu durante a cirurgia de septoplastia e/ou turbinectomia inferior parcial, imediatamente após vasoconstricção da mucosa da cavidade nasal e do meato médio através da colocação por um período de 10 minutos de cotonóide com adrenalina 1:100.000 (Hamilos, 1995). Coletamos no transoperatório amostra de tecido ósteo-mucoso da bula etmoidal para posterior preparo e análise através da microscopia eletrônica de varredura.

4.2.2.2 Pós-operatório

Todos os pacientes foram acompanhados segundo o protocolo do grupo de nariz pelo médico residente sob supervisão do médico assistente no ambulatório do HC-FMUSP através de visitas mensais.

4.2.3 Preparo e Análise das amostras de ambos os grupos

Os fragmentos de aproximadamente 1,0 x 1,0cm extraídos durante a cirurgia realizada por um dos médicos-residentes do serviço foram fixados por 2 horas com glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,15M (pH 7,2), à temperatura ambiente. Submeteu-se as amostras a agitação contínua durante os primeiros 5 minutos para remover o excesso de muco (Davis, 1988).

Lavou-se por três vezes a peça em solução de lavagem contendo NaCl (1,2 g), Sacarose (14,6 g) e água destilada (200 ml), e realizou-se uma pós-fixação em OsO₄ a 1% por 1 hora. As amostras foram então desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico a partir de 70% até 100%, secadas ao ponto crítico em CO₂ e montadas em suportes para MEV. Realizou-se metalização com platina e observação com o microscópio eletrônico de varredura Quanta 600 FEG, com uma voltagem de aceleração

de 10kV. Fotomicrografias foram capturadas no formato TIFF com a magnificação de 1000 a 12000. Determinou-se a presença de biofilme bacteriano através da avaliação por um patologista com experiência em ultraestrutura (P.H.N.S) cego para o estado clínico do paciente através das fotomicrografias com visualização da estrutura tridimensional com estruturas esféricas envolvidas por uma matriz amorfa e os canais de água conectando estas estruturas esféricas (Bezerra, 2009).

4.3 Tamanho mínimo amostral

Uma análise previu que uma amostra mínima de 25 pacientes com RSCcPN e 25 pacientes no grupo controle seria necessária para alcançar um poder de 80% (Beta=20%) com um erro alfa de 5%. Estimamos uma perda de até 25% dos pacientes com RSCcPN no preparo das amostras e seguimento pós-operatório por 1 ano e determinamos uma amostra de 33 pacientes neste grupo. Como não haveria seguimento pós-operatório nos pacientes do grupo controle, arbitramos uma perda de até 10% no preparo das amostras, e determinamos uma amostra de 28 pacientes neste grupo.

4.4 Análise estatística

O programa SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) foi utilizado para análise estatística. Um alfa de 5% foi considerado significativo para todos os testes.

4.4.1 Estudo transversal do tipo caso-controle

O teste de Kolmogorov-Smirnov mostrou uma distribuição não paramétrica dos valores das variáveis. Todas as variáveis quantitativas foram caracterizadas por mediana [intervalo interquartilico]. A razão de chances (odd ratio, OR) e a razão de verossimilhança (likelihood ratio, LR), com um intervalo de confiança de 95% foram determinadas. Um alfa de 5% foi determinado e um $p < 0.05$ considerado significativo para todos os testes.

4.4.2 Avaliação dos preditores clínicos pré-operatórios e do prognóstico pós-operatório após 1 ano segundo a presença do biofilme intraoperatória

O teste de Kolmogorov-smirnov mostrou uma distribuição não paramétrica dos valores. Todas as variáveis quantitativas foram caracterizadas por mediana [intervalo interquartilico].

Os 33 pacientes submetidos a FESS para tratamento de RSCcPN foram acompanhados por 12 meses, apenas 4 pacientes perderam o seguimento pós-operatório por mudança de domicílio, e 29 pacientes completaram o período do seguimento.

Os pacientes foram avaliados no pré-operatório segundo a presença de biofilmes nos seguintes itens: SNOT-20 (a pontuação total, a pontuação nos 5 itens mais importantes para cada paciente, a pontuação em cada subgrupo do questionário); NOSE; Endoscopia Nasal, segundo Lund-Kennedy; TCSF, segundo Lund Mackay. (Piccirillo, 2002; Stewart, 2004; Bezerra, 2011; Bezerra, 2011, Fokkens, 2007).

Os pacientes foram avaliados após doze meses de pós-operatório segundo a presença dos biofilmes conforme a diferença entre o valor pós-operatório e pré-operatório nos seguintes itens: SNOT-20 (a pontuação total, a pontuação nos 5 itens mais importantes para cada paciente, a pontuação em cada subgrupo do questionário, e uma melhora significativa na pontuação maior que 0.8); NOSE; Endoscopia Nasal, segundo Lund-

Kennedy; TCSF, segundo Lund-Mackay. (Piccirillo, 2002; Stewart, 2004; Bezerra, 2011; Bezerra, 2011, Fokkens, 2007; Browne , 2007).

4.4.3 Testes estatísticos

As diferenças entre as médias de duas amostras independentes foram analisadas pelo teste U de *Mann-Whitney*, e a correlação entre as variáveis quantitativas, pelo teste de correlação de *Spearman*. O teste do Chi-quadrado ou o teste exato de Fisher, para as variáveis qualitativas ou dicotômicas. Para todos os testes estatísticos um alfa de 5% foi determinado e um $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 Resultados

A mediana da idade dos pacientes com RSCcPN e controles foi de 33 [IIQ=15] e 46[18], respectivamente; e a razão entre sexo feminino/masculino foi 1.08 (14:13) e 0.5 (11:22). Os biofilmes foram identificados em 72.7%(24/33) dos pacientes com RSCcPN em 48.1%(13/27) dos controles. A razão de chances (*Odds ratio*, OR) para a presença do biofilme foi de 2.89 (IC 95%: 0.98-8.42) e a razão de verossimilhança (*Likelihood ratio*, LR) foi de 1.51 (IC 95%: 0.97-2.35, $p = 0.051$).

A maioria das imagens dos biofilmes mostrou elementos esféricos assemelhando-se bactérias do tipo cocos dentro de uma matriz amorfa **(Figuras 1,2,3,4,5,6,7)**. Os biofilmes também foram encontrados dentro de uma área de epitélio ciliado sadio. **(Figura 8)**. Os pacientes com biofilmes comumente mostraram uma marcante destruição do epitélio, perda de epitélio ciliado e metaplasia epitelial **(Figura 9 a 11)**.

O avaliação do seguimento após 12 meses foi completada por 87.9% (29/33) dos pacientes. Os biofilmes haviam sido identificados em 72.4% (21/29) destes. Três pacientes com biofilme e um paciente sem biofilme perderam o seguimento. Os resultados pré-operatórios e pós-operatórios segundo a presença do biofilme estão descritos nas tabelas 1 e 2.

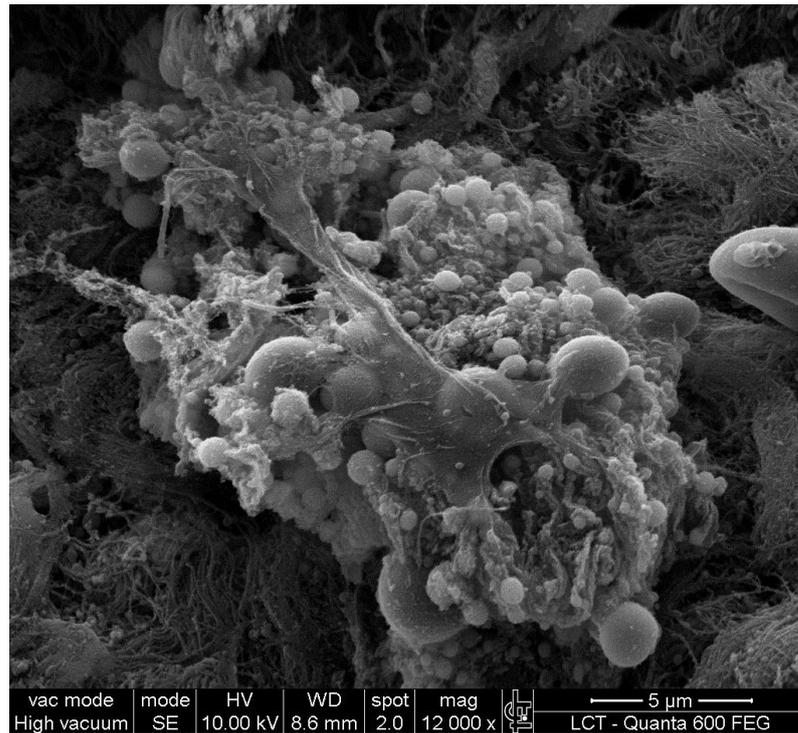


Figura 1. Biofilme bacteriano (12.000x)

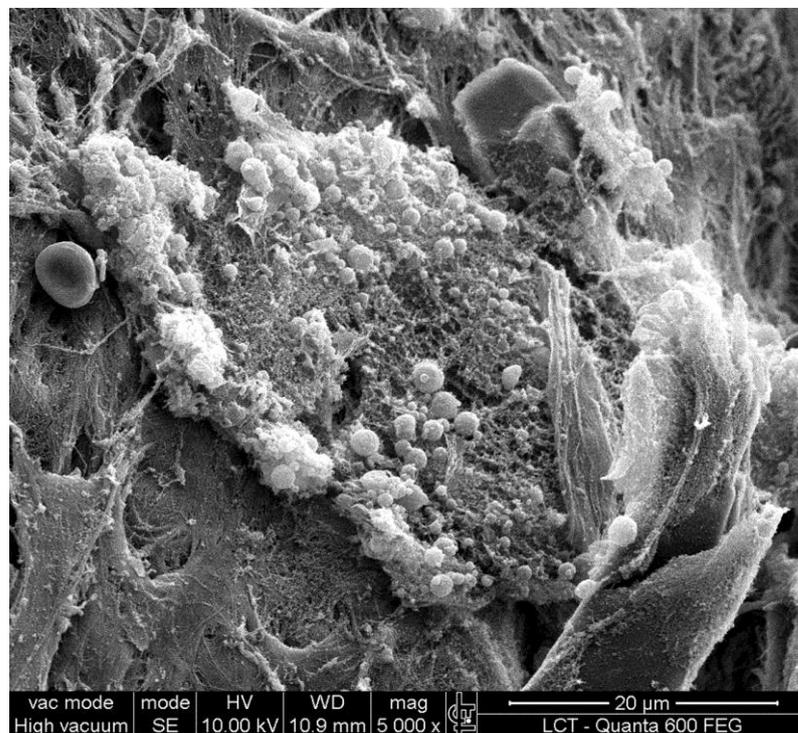


Figura 2. Biofilme bacteriano (Aumento 5.000x)

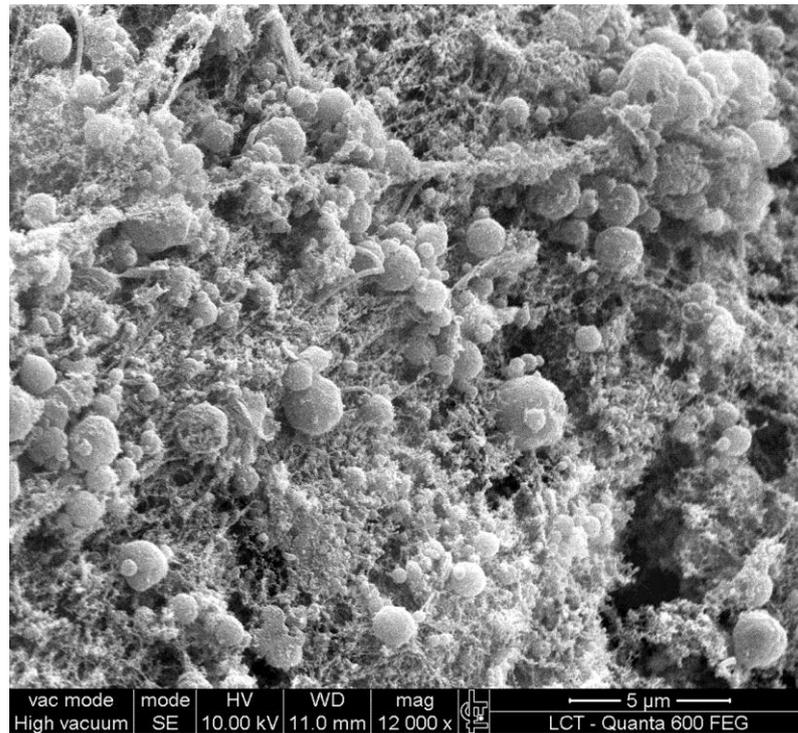


Figura 3. Biofilme bacteriano (Aumento 12.000x)

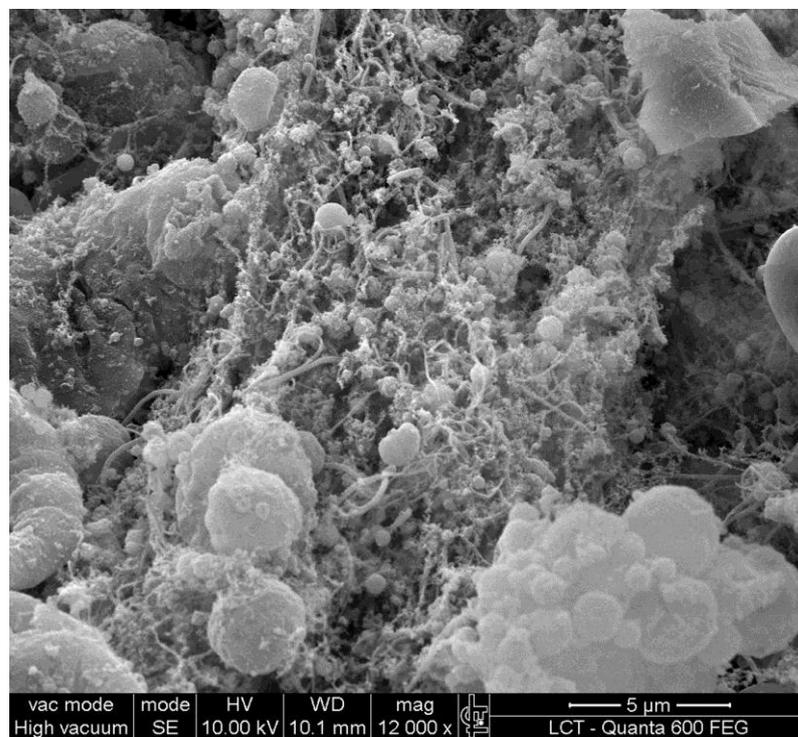


Figura 4. Biofilme bacteriano (12.000x)



Figura 5. Biofilme bacteriano (12.000x)

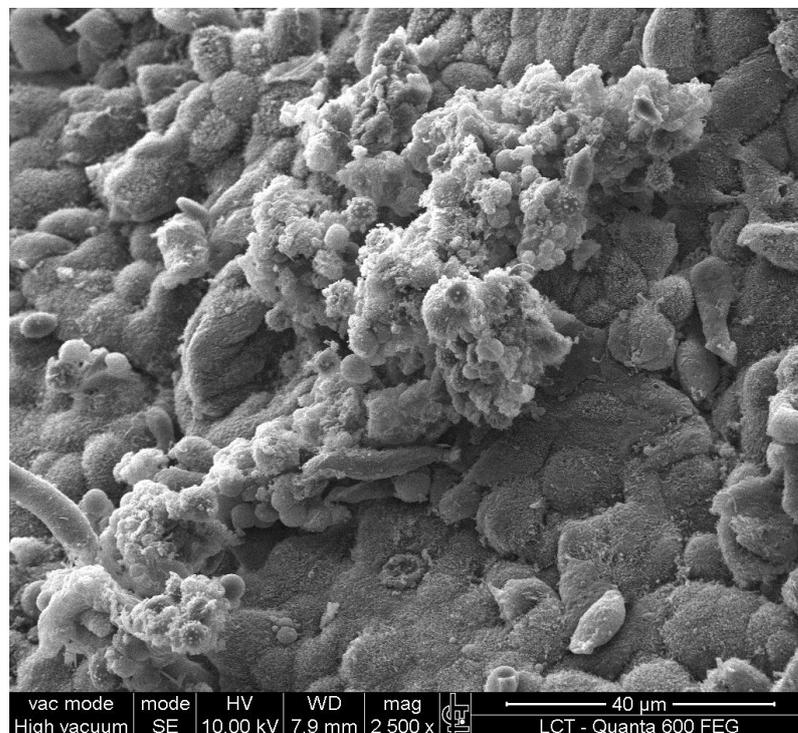


Figura 6. Biofilme bacteriano (2.500x)

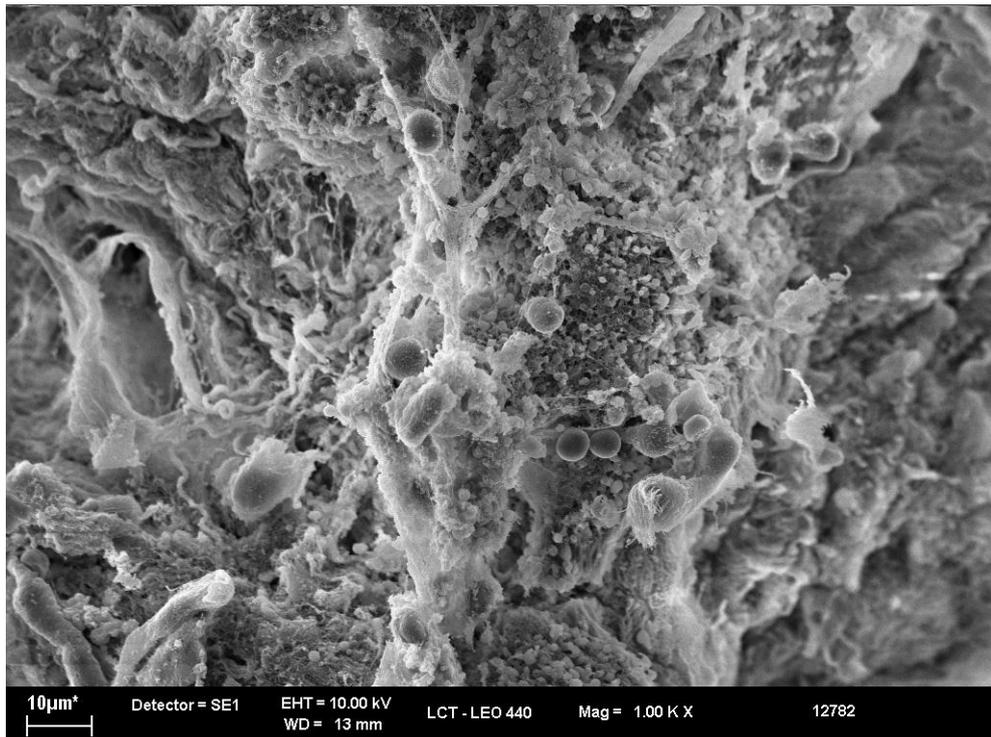


Figura 7. Biofilme bacteriano (1.000x)

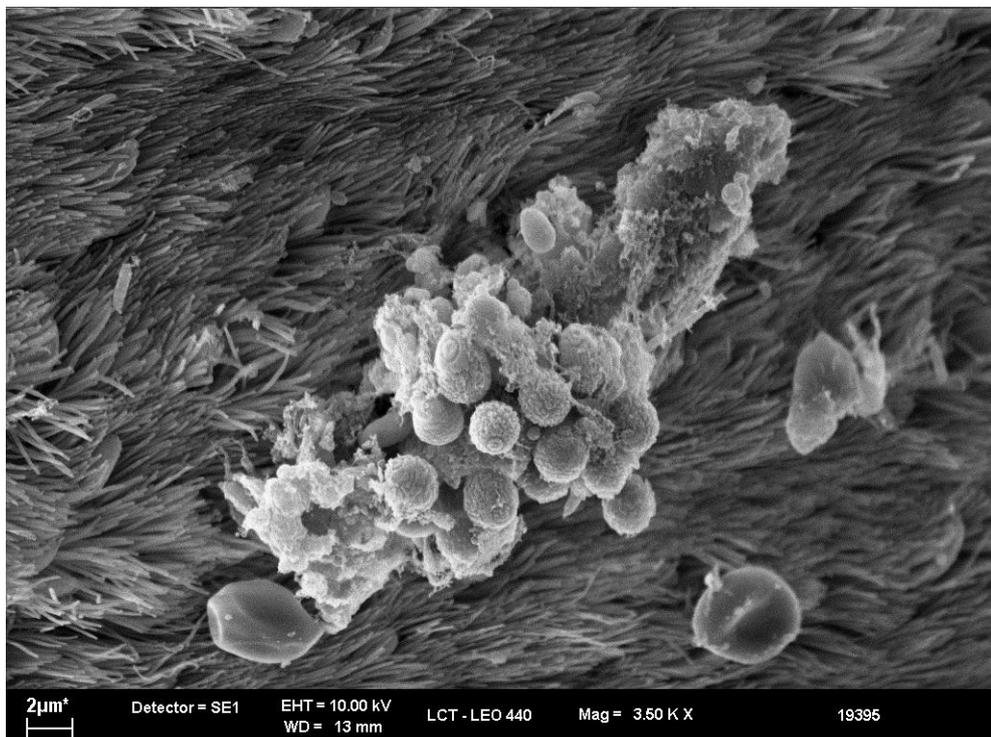


Figura 8. Biofilme dentro de uma área de epitélio ciliado saudável

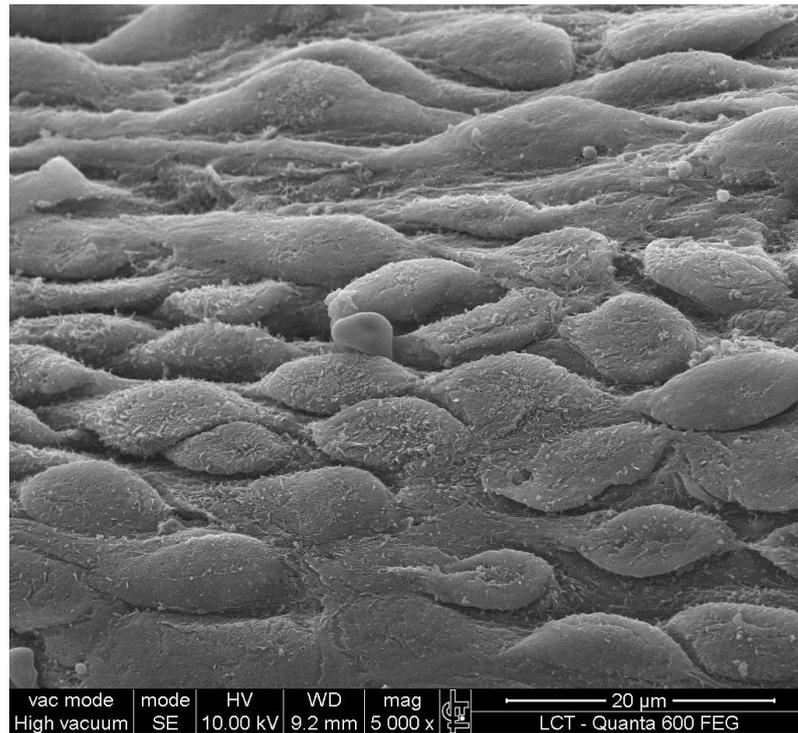


Figura 9. Metaplasia escamosa do epitélio respiratório (5000x)

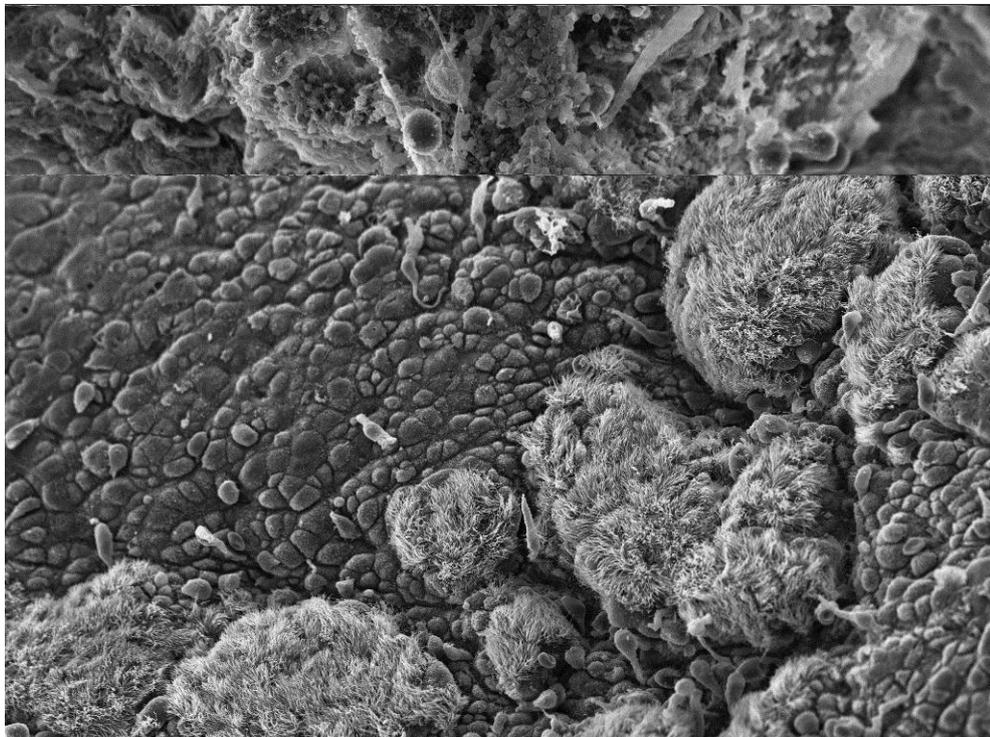


Figura 10. Paciente com RSCcPN apresentando uma área de transição de epitélio ciliado para uma área de epitélio destruído e metaplasia. (600x)

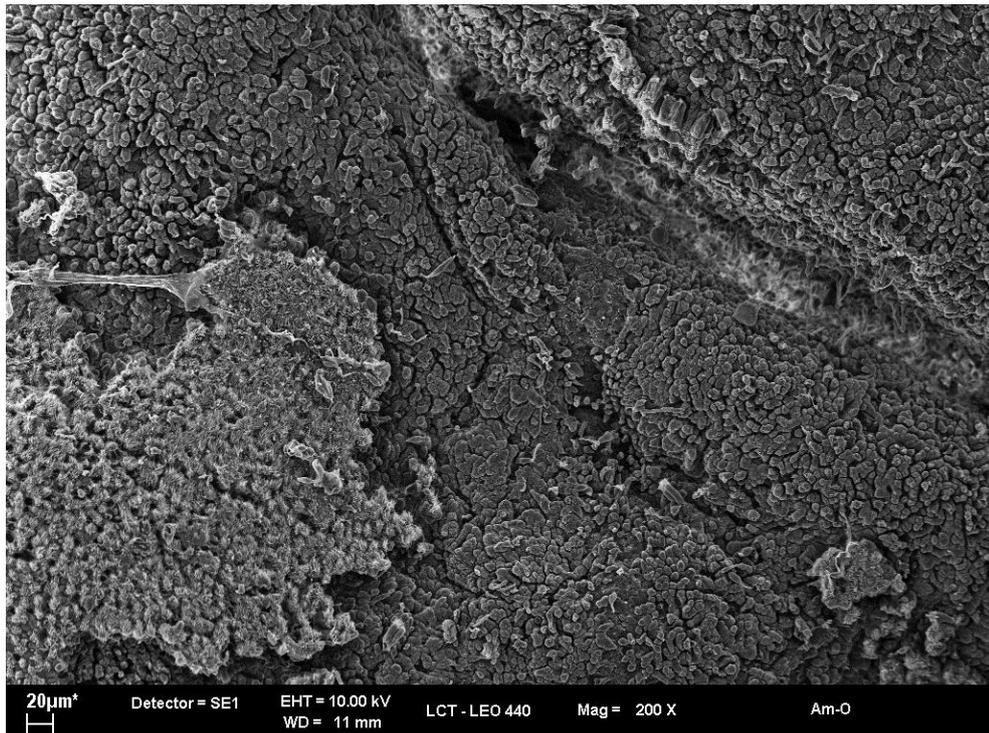


Figura 11. Paciente do grupo controle sem biofilme, mas com o mesmo padrão de imagem (200x)

Tabela 1. Dados pré-operatórios segundo a presença do biofilme

	Biofilme ausente	Biofilme presente	p
Sexo (M/F)	27.3% (9/33)	72.7% (24/33)	0.167
Idade	51.00 [16]	45.50 [19]	0.686
NOSE	<u>60 [47]</u>	<u>82 [35]</u>	<u>*0.044</u>
SNOT-20 total	1.75 [2.50]	1.75 [2.01]	0.530
SNOT-20 (5+)	3.80 [1.90]	4.08 [1.95]	0.536
Sintomas nasais	13.00 [11.50]	13.75 [9.75]	0.478
Sintomas em ouvido ou face	3.00 [11.00]	4.50 [8.75]	0.903
Problemas no sono	3.00 [10.50]	7.04 [9.50]	0.339
Problemas psicológicos	6.00 [23.00]	11.50 [16.00]	0.557
Lund-Mackay pré-operatório	16.00 [7.00]	15.00 [6.00]	0.776
Lund-Kennedy pré-operatório	<u>7.00 [6.00]</u>	<u>10.00 [3.00]</u>	<u>*0.047</u>

Todos os valores expressos em mediana [intervalo interquartilico]. Lund-Kennedy – pontuação da avaliação endoscópica; Lund-Mackay – pontuação da avaliação tomográfica das cavidades paranasais; NOSE- Questionário de qualidade de vida doença-específico para avaliar obstrução nasal; SNOT-20 - Questionário de qualidade de vida doença-específico para avaliar rinosinusites; SNOT-20 (5+) – as 5 queixas mais importantes para cada paciente no questionário.

Tabela 2. Dados dos resultados pós-operatórios segundo a presença do biofilme

	Biofilme ausente	Biofilme presente	P
Sexo (M/F)	27.6% (8/29)	72.4% (21/29)	0.167
Idade	52.50 [13]	47.00 [22]	0.686
Resultado no NOSE	-41.3 [38.8]	-60.0 [45.0]	0.135
Resultado no SNOT-20	-1.05 [1.24]	-0.80 [1.30]	0.981
Melhora significativa no SNOT-20	63% (5/8)	33% (7/21)	0.218
Sintomas nasais	-7.00 [7.25]	-10.00 [7.50]	0.524
Sintomas em ouvido e face	-2.50 [7.50]	-2.00 [5.00]	0.209
Problemas no sono	-0.50 [5.25]	-3.00 [7.00]	0.855
Problemas psicológicos	0.00 [7.25]	-4.00 [9.00]	0.557
Resultado do SNOT-20 (5+)	-2.68 [2.75]	-2.60 [3.00]	0.695
Resultado do Lund-Mackay	-5.00 [5.25]	-4.00 [4.50]	0.491
Resultado do Lund-Kennedy	<u>-2.00 [2.50]</u>	<u>-5.00 [4.50]</u>	<u>*0.026</u>

Todos os valores expressos em mediana [intervalo interquartilico]. Lund-Kennedy – pontuação da avaliação endoscópica; Lund-Mackay – pontuação da avaliação tomográfica das cavidades paranasais; Melhora significativa no SNOT-20 – definida como uma diminuição maior que 0.8 entre a pontuação pré-operatória e pós-operatória; NOSE- Questionário de qualidade de vida doença-específico para avaliar obstrução nasal; SNOT-20 - Questionário de qualidade de vida doença-específico para avaliar rinosinusites; SNOT-20 (5+) – as 5 queixas mais importantes para cada paciente no questionário.

Uma correlação estatisticamente significativa foi encontrada entre o Resultado no NOSE e o Resultado no SNOT-20 no subgrupo de pacientes com biofilme ($r=0.463$, $p=0.01$) e na amostra total de pacientes ($r=0.470$, $p=0.03$). Não existiu qualquer outra correlação estatisticamente significativa detectada entre o SNOT-20, SNOT-20 (5+), Lund-Kennedy e Lund-Mackay.

6 Discussão

A RSCcPN representa um verdadeiro desafio para os otorrinolaringologistas, com muitas questões não elucidadas sobre a fisiopatologia desta doença (Fokkens, 2007). É mais provável que a RSCcPN não represente um única doença, mas sim uma manifestação nasal de diferentes doenças ou da interação de múltiplos fatores do ambiente e do hospedeiro com vários microorganismos. Os dados da literatura sugerem que influências epigenéticas podem predispor o desenvolvimento da doença (Zuliani, 2006). Por outro lado, pesquisas recentes têm indicado que a presença do biofilme bacteriano pode predispor os pacientes à piores resultados após FESS (Psaltis, 2008; Bendouah, 2006; Foreman, 2010)

Encontramos biofilmes nos pacientes com RSCcPN, como evidenciado por estudos anteriores. Os biofilmes foram encontrados em 72.7%(24/33) dos pacientes com RSCcPN e em 48.1%(13/27) dos pacientes do grupo controle no presente estudo. Os resultados deste estudo não mostram uma forte associação entre a presença do biofilme e a RSCcPN (OR = 2.89, IC 95%, 0.98-8.42; LR = 1.51, IC 95%, 0.97-2.35; $p = .051$). Embora a diferença da prevalência dos biofilmes no grupo de pacientes com RSCcPN não tenha sido estatisticamente significativa dos controles, o intervalo de confiança de 95% extremamente amplo, que estava imediatamente abaixo da unidade, sugere que uma diferença clinicamente significativa pode ter sido perdida por causa do baixo poder estatístico do pequeno tamanho da amostra. Apesar da diferença não ser estatisticamente significativa ($p = .051$).

A prevalência de biofilmes nos pacientes com RSCcPN foi similar à encontrada por Foreman e cols. (70%) (Foreman, 2011); contudo este estudo utilizou FISH/CSLM, um método mais sensível e específico

(Foreman, 2010). Isto sugere que nosso método não superestimou uma alta prevalência de biofilmes na mucosa nasossinusal, embora nós não tenhamos identificado quais espécies estavam dentro dele.

Existem muitas técnicas para investigar a presença dos biofilmes na RSC, com uma ampla variedade de precisão nos seus resultados conforme o método escolhido. Os estudos anteriores de MEV demonstraram uma prevalência de biofilme entre 25 a 100% (Cryer, 2004; Sanclement, 2005; Ramadan, 2005). A CLSM sem hibridização *in situ* fluorescente mostrou uma prevalência de 44 a 50% (Psaltis, 2008), enquanto com hibridização foi de cerca de 70% (Sanderson, 2006; Foreman, 2011). A demonstração indireta da formação *in vitro* encontrou biofilmes em cerca de 28.6% dos pacientes em um estudo (Zhang, 2011), mas era esperada uma baixa positividade neste método (Prince, 2008; Zhang, 2011). Diferentes critérios de inclusão, diferentes acurácias dos métodos e diferentes tamanhos de amostra podem ser dois importantes motivos para a baixa reprodutibilidade dos estudos. Uma outra razão é que apenas um dos métodos acima pode ser aplicada à mesma parte da amostra, aumentando a positividade dos resultados de análises de amostras por mais de um método apenas somando resultados ao invés de avaliar a precisão de diferentes métodos em diferentes amostras de estudos com pequeno tamanho de amostra. Recentemente, Foreman e cols. mostraram uma prevalência de biofilmes de 90% em pacientes com RSC quando combinaram os resultados da CLSM e FISH/CSLM com resultados similares em cada um dos métodos (65% vs 70%), mas reprodutíveis em apenas 55% dos pacientes (Foreman, 2010).

A presença do biofilme em metade dos indivíduos sem RSC deve nos suscitar a revisão do papel dos biofilmes na RSCcPN. Este papel pode estar sendo provavelmente exagerado, uma vez que o dano epitelial e a metaplasia associados estiveram presente também em alguns indivíduos sem RSC. Galli e cols. sugeriram que precisaria existir uma destruição marcante do epitélio ciliar no desenvolvimento do biofilme, mas no presente estudo, nós também encontramos biofilmes em um epitélio ciliado sadio apesar de ser mais frequente encontrar o biofilme sobre um epitélio

metaplásico (Galli, 2008). De forma similar ao presente estudo, no estudo de Galli e cols. o pequeno tamanho amostral também foi um inconveniente. A presença do biofilmes em pacientes de grupo controle foi relatada entre 0 a 40% em estudos anteriores, com as mesmas dificuldades dos resultados para os pacientes com RSC biofilmes mencionadas anteriormente (Sanclement, 2005; Psaltis, 2008; Sanderson, 2006).

Recentemente, Mladina e cols. publicaram resultados em concordância com os resultados dos estudos anteriores, mas também encontraram biofilmes em paciente sem RSC. O viés de observação que poderia existir no presente estudo foi minimizado através da análise “cega” de todas as imagens, sem conhecimento do quadro clínico do paciente. (Mladina, 2010)

Nosso estudo também mostrou que os pacientes com biofilme têm uma pior pontuação pré-operatória no questionário NOSE (60 [47] vs. 82[35], $p=0.044$) e na endoscopia nasal segundo Lund-Kennedy (7.00 [6.00] vs. 10.00 [3.00], $p=0.047$). Provavelmente, os biofilmes presentes nos pólipos nasais podem ser um dos responsáveis para uma pior morbidade pré-operatória desta doença demonstrada pela pior qualidade de vida doença-específica relacionada à obstrução nasal e por uma pior endoscopia nasal. Zhang e cols. avaliaram fatores clínicos associados com a demonstração de biofilme bacteriano por um método indireto em pacientes com RSCsPN e RSCcPN (Zhang, 2011). Embora eles não tenham encontrado qualquer associação significativa com a presença de pólipos nasais, o método utilizado para demonstrar o biofilme é de baixa sensibilidade. A amostra do presente estudo, composta apenas por pacientes com RSCcPN e sem cirurgias anteriores, também é diferente. O estudo de Zhang e cols. incluiu paciente com RSCcPN e RSCsPN; e pacientes reoperados.

Nós esperávamos que os pacientes com biofilmes apresentassem uma pior qualidade de vida doença-específica relacionada com a rinossinusite no pré-operatório. Este fato não foi confirmado pela pontuação total do SNOT-20 (1.75 [2.50] vs. 1.75 [2.01] $p=0.530$), nos 5 itens escolhidos por eles como mais importantes no SNOT-20 (+3.80 [1.90] vs. 4.08 [1.95], $p= 0.536$) e na

avaliação da pontuação nos subdomínios do SNOT-20. Um outro resultado inesperado foi a pior pontuação de Lund-Mackay antes da cirurgia nos pacientes sem biofilme (16.00 [7.00] vs. 15.00 [6.00], $p=0.776$), embora também sem uma diferença estatisticamente significativa.

Muitos estudos tem sugerido que o biofilme pode influenciar a evolução clínica e pode ajudar a explicar a persistência da doença na RSC. Contudo, estudos anteriores que avaliaram a associação do biofilme com o prognóstico dos pacientes não analisaram os pacientes com pontuação padronizada para questionários de qualidade de vida doença-específica, como o NOSE e o SNOT-20; ou para endoscopia nasal, como o Lund-Kennedy (Bendouah, 2006; Psaltis, 2008; Foreman, 2010). Bendouah e cols. mostraram que a presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* com capacidade para formar biofilme em pacientes submetidos à cirurgia em um ensaio *in vitro* influenciou negativamente a evolução clínica dos pacientes (Bendouah, 2006). Ressalta-se o fato de todos os pacientes terem sido submetidos a cirurgia nasossinusal tecnicamente bem sucedida prévia e que o autor não analisou os resultados conforme a presença de RSCcPN. Um achado muito importante deste estudo é o fato dos estafilococos coagulase-negativos formadores de biofilme não estiveram relacionados a piores resultados. Estes estafilococos são os agentes mais frequentemente encontrados em cavidades paranasais de pacientes assintomáticos após FESS (Singhal, 2011).

No presente estudo, nós encontramos melhores resultados na avaliação endoscópica segundo a pontuação de Lund-Kennedy nos pacientes com biofilme (-2.00 [2.50] vs. -5.00 [4.50], $p=0.026$). Nossos achados podem refletir a importância da remoção dos biofilmes durante a FESS em pacientes com RSCcPN e a consequente diminuição da sua quantidade sobre a mucosa no pós-operatório; mas também pode ser reflexo de uma maior pontuação pré-operatória estatisticamente significativa. Por outro lado, Psaltis e cols. encontraram piores resultados pós-operatórios em pacientes com biofilmes (Psaltis, 2008), mas a sua amostra de pacientes foi diferente da nossa, e incluiu pacientes com ou sem histórico de cirurgia prévia.

A média dos resultados na pontuação do questionário NOSE após FESS foi melhor nos pacientes com biofilmes (-41.3 [38.8] vs. -60.0 [45.0], $p=0.135$), mas este fato pode ser o resultado de uma pior e estatisticamente significativa pontuação pré-operatória NOSE (60 [47] vs. 82[35], $p=0.044$) neste grupo.

Embora sem significância estatística, os pacientes sem biofilmes mostraram melhores resultados na pontuação total do SNOT-20 (-1.05 [1.24] vs. -0.80 [1.30], $p=0.981$) e um maior percentual de pacientes com uma melhora significativa do SNOT [63% (5/8) vs. 33% (7/21), $p=0.218$]. Por outro lado, quando realizamos a análise dos subdomínios do SNOT-20 separadamente, encontramos uma melhora mais importante nos pacientes com biofilmes nos sintomas nasais, psicológicos e nas alterações do sono. Contudo, essa melhora pode ter sido devido a pontuação pré-operatória e uma diferença estatisticamente significativa não foi encontrada.

Psaltis e cols. indicaram que a presença dos biofilmes bacterianos poderia predispor os pacientes para piores resultados relacionados aos sintomas pós-operatórios (Psaltis, 2008). Contudo, a amostra composta de 60% dos pacientes com FESS prévia suscita uma importante questão: “Os biofilmes já estavam na mucosa antes da primeira cirurgia ou a cicatrização alterada na região da mucosa submetida a cirurgia proporcionou que eles se estabelecessem como biofilmes?”

Ao contrário de Psaltis e cols., que encontrou uma pior avaliação tomográfica pré-operatória estatisticamente significativa nos pacientes com biofilmes (Psaltis, 2008), nosso estudo não encontrou uma pior pontuação pré-operatória ($p=0.776$) ou uma diferença nos resultados da pontuação segundo Lund-Mackay ($p= 0.491$). Psaltis e cols. não realizaram avaliação tomográfica pós-operatória.

Nós encontramos uma correlação da melhora na pontuação NOSE com a melhora na pontuação SNOT-20 no subgrupo de pacientes com biofilmes e em toda a amostra de pacientes. O resultado da pontuação NOSE foi também maior em pacientes com uma melhora significativa no SNOT-20. Estes dados sugerem a importância da percepção de obstrução

nasal para a apresentação clínica destes pacientes e o quanto isto é relacionado com a QV doença-específica.

Os biofilmes encontrados nos pacientes do presente estudo eram em sua grande maioria compostos por cocos. Foreman e cols. encontraram biofilmes compostos principalmente por *Staphylococcus aureus* em pacientes com RSCcPN (Foreman, 2011). Contudo, Bendouah e cols. encontraram biofilmes de *Staphylococcus coagulase-negativo* sem implicação significativa no prognóstico, enquanto que a presença dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* (SAB) interferia significativamente com o prognóstico (Bendouah, 2006). Avaliando os pacientes com RSCsPN e RSCcPN, Sanderson e cols. reportou a presença de *Haemophilus influenza* em aproximadamente 80% dos pacientes da sua amostra, mas demonstrou que a cultura intra-operatória das cavidades paranasais não se correlacionou com as bactérias identificadas nos biofilmes (Sanderson,2006). O presente estudo não utilizou nenhum método de cultura para caracterizar as espécies de bactéria encontrada na MEV e acreditamos que o ideal em estudos futuros seja a realização de CLSM com FISH para saber quais os tipos de bactéria encontrados no biofilme e realizar uma correlação mais estreita com o prognóstico, uma vez que os métodos de cultura podem detectar bactérias sobre a mucosa que não estão estabelecidas como biofilmes no paciente.

A conexão entre os biofilmes e a resposta inflamatória da mucosa nasossinusal é pobremente compreendida. Embora Heikert e cols. sugeriram que a presença do biofilme estava relacionada ao perfil inflamatório Th1, o pequeno tamanho amostral assegurou uma posterior investigação para avaliar estes resultados (Heikert, 2009). Apesar do fato da RSCcPN ser relacionada com a resposta inflamatória Th2, alguns estudos demonstram a necessidade de estudos posteriores para elucidar a resposta inflamatória na RSCcPN (Bachert, 2002; Cheng, 2007). Posteriormente a publicação do primeiro artigo resultante da presente tese, Foreman e cols. confirmaram os dados do presente estudo e mostraram SAB nos pacientes com RSCcPN e resposta inflamatória do padrão Th2(Foreman, 2011).

A bactéria mais comumente associada com a RSCcPN na literatura é o *Staphylococcus aureus* (Kern, 2008). A hipótese do Superantígeno na RSCcPN é amplamente suportada pela literatura, mas o mecanismo de ação do SAg local na geração de pólipos permanece especulativo (Winstead, 2003). A alta taxa de *Staphylococcus aureus* secretor de enterotoxina cultivado da cavidade nasal e a recente evidência desta bactéria vivendo como biofilme nos pacientes com RSCcPN aumentam a evidência de um papel importante nesta doença. Eles também são capazes de viver dentro de células e dentro da mucosa nasossinusal (Fokkens, 2007). Talvez, isto justifique o fato que alguns SAB não são encontrados em associação com uma resposta Th2.

Hipotetizamos na publicação da primeira parte desta tese que os SAB produzindo SAg poderiam estar significativamente associados com a RSCcPN (Bezerra, 2011). Foreman e cols. haviam publicado um estudo que mostrou que os paciente com RSC, e não apenas com a RSCcPN, em que foram encontrados SAB apresentavam um pior prognóstico do que os pacientes em que foram encontradas outras bactérias, como o *Haemophilus influenza* (Foreman, 2010). Eles mostraram que o SAB estava associado com sintomas mais graves e uma piores imagens tomográficas. Posteriormente a primeira publicação desta tese, Foreman e cols. publicaram uma evidência da ligação entre os biofilmes de *Staphylococcus aureus* e um desvio da resposta de células T em direção ao tipo Th2, independentes do estado do pólipo e das atividades de superantígeno (Foreman, 2011). Eles sugeriram que outros mecanismos deveriam ter um papel se os SAB ainda interage com o hospedeiro na RSC na ausência do SAB e IgE específica para Superantígenos combinada na maioria dos pacientes com SAB. Talvez o modo de ação do SAg e do SaB possa ser independente como os resultados de Foreman e cols. sugerem, mas acreditamos que estudos com amostras maiores mostrem no futuro alguma interrelação entre essas duas variáveis.

O motivo de não termos encontrado uma diferença estatisticamente significativa na pontuação dos questionários pode ter ocorrido porque alguns

biofilmes identificados pela MEV podem não ter sido compostos por SA, mas por *Staphylococcus* coagulase-negativo. A resposta inflamatória desviada pela presença de Sab independente do grau da polipose poderia ser o real problema da RSCcPN. Outra importante observação é que, a avaliação clínica dos pacientes a partir da quantificação isolada de cada sintoma dos pacientes realizadas por estudos anteriores, ao invés de questionários de qualidade de vida previamente validados podem mostrar resultados menos consistentes (Bendouah, 2006; Psaltis, 2008). Os questionários nos permitem uma avaliação mais ampla da morbidade da doença para estes pacientes.

Atualmente, a mais importante pergunta a ser respondida talvez seja: o *Staphylococcus aureus* predisposto a formar biofilme ao encontrar uma mucosa com uma resposta inflamatória previamente desviada para o padrão Th2 e metaplásica ativaria o seu fenótipo de biofilme para se estabelecer; ou a presença do SAB na mucosa é que induziria o desvio da resposta para uma resposta inflamatória padrão Th2 e consequente agressão e metaplasia da mucosa (Bezerra, 2011; Foreman, 2011). O estudo de Foreman e cols. mostrou que estes dois fatores agem de forma independente (Foreman, 2011). Outra questão importante seria analisar como este modelo se encaixa na RSCcPN associada à intolerância à aspirina.

A primeira limitação deste estudo foi o método escolhido para identificar os biofilmes, embora vários estudos anteriores também escolheram esses métodos (Cryer, 2004; Sanclement, 2004; Ramadan, 2005). Alguns autores têm criticado esta técnica de identificação do biofilme, mais outros autores tem concordado que este método é consistente e confiável como a CSLM, considerado o melhor método para avaliar o biofilme na RSC, mas que pode produzir muita interferência de fundo (Post, 2001; Zuliani, 2006; Perloff, 2004; Cryer, 2004; Ferguson, 2005; Sanclement, 2005; Psaltis, 2008; Hekiert, 2009). Estávamos cientes da possibilidade de alguns artefatos poderem se parecer com biofilmes na MEV, como coágulos e muco, por causa de desidratação e ligações cruzada protéicas. Outra dificuldade sugerida, é que a desidratação ao ponto crítico poderia murchar e distorcer a arquitetura, mas os artefatos são ainda facilmente reconhecidos. O muco foi removido da

superfície da mucosa através da agitação das amostras em glutaraldeído por 5 minutos, logo após a coleta (Biedlingmaier, 1998). Ao comparar os resultados do presente estudo com os do considerado o melhor método, o percentual de pacientes com biofilme detectado sugere que o nosso método não reduziu a precisão e nos ajuda a encontrar algumas imagens que são similares à outros estudos (Foreman, 2010).

Os pacientes escolhidos como controle são outra limitação do presente estudo. Eles não tinham fossas nasais completamente saudáveis, embora não tivessem o diagnóstico de RSC. O fato da obstrução nasal crônica poder ter afetado a mucosa nasossinusal e presumivelmente justificar em parte os resultados nos controles. Psaltis e cols. escolheram como controles pacientes que seriam submetidos acesso cirúrgico trasfenoidal e que provavelmente teriam uma mucosa mais saudável do que os do nosso estudo (Psaltis, 2008). Por outro lado, os nossos resultados foram similares à Sanderson e cols., que também escolheram pacientes que seriam submetidos a septoplastia e relataram resultados similares à Psaltis e cols. (Sanderson, 2006; Psaltis, 2008)

Os pacientes no presente estudo não foram submetidos a cirurgia endoscópica prévia, embora o hospital seja um unidade terciária de atendimento. Nossa amostra composta apenas de pacientes submetidos a FESS pela primeira vez para RSCcPN após falha do tratamento clínico pode nos ajudar a avaliar a relação primária entre a mucosa sinusal não submetida à agressão cirúrgica e remodelamento pós-operatório; e os biofilmes na via aérea superior. Algumas discrepâncias entre os resultados apresentados aqui e outros previamente publicados podem ter sido resultado de diferentes modalidades para detecção utilizadas, diferentes amostras de pacientes estudadas ou erros de amostragem ou analítico.

O presente estudo concorda com os estudos anteriores que os biofilmes estão associados com a RSC, embora não tenhamos encontrados uma associação forte. Os biofilmes podem desempenhar um papel na fisiopatologia da RSCcPN, como já foi previamente demonstrado, mas a presença consistente dos biofilmes nos tecidos nasossinusais dos pacientes

com RSC e também dos controles nos conduz a acreditar que não apenas a presença destas estruturas possam desempenhar um papel na patogênese ou na persistência da RSC, mas também o tipo de espécie de cepa bacteriana que está presente dentro dele pode unir-se a outros fatores desconhecidos do hospedeiro responsáveis pela recalcitrância desta doença. No futuro, as opções de tratamento podem ser direcionadas em muitas formas para remover esses prováveis ninhos produtores de biofilmes da mucosa nasossinusal dos pacientes com RSCcPN, porque os procedimentos cirúrgicos não tem provado ser uma alternativa de sucesso para todos os pacientes. Talvez alguns procedimentos cirúrgicos mais agressivos possam eliminar a RSCcPN, mas no futuro, opções de tratamentos mais conservadores como a terapia de substituição bacteriana contra estas cepas de estafilococcus podem ajudar a resolver esta doença. Embora a presença do biofilme possa não ser o problema em alguns pacientes, as espécies dentro deles podem ser a parte do problema, como demonstrado pela presença de biofilmes nos pacientes do grupo controle que não tinham RSCcPN.

Este estudo foi o primeiro estudo publicado que analisou a presença do biofilme em um grupo de pacientes com o diagnóstico exclusivo de RSCcPN. Esta também é a primeira vez que os resultados foram analisados estatisticamente com um estudo do tipo caso controle, ainda que amostra precisaria ser bem maior para um estudo adequado deste tipo. Estudos futuros com um tamanho amostral aumentado nos dará poder estatístico suficiente para avaliar esses resultados. Nós acreditamos que não alcançamos um resultado estatisticamente significativo em algumas dessas análises devido ao pequeno tamanho amostral.

No momento da submissão, este estudo aparenta ser a primeira publicação a analisar o prognóstico relacionado com a presença do biofilme em um grupo de pacientes compostos unicamente por pacientes com RSCcPN através de questionários de QV.

7 Conclusões

Mostramos a presença de biofilmes em pacientes submetidos a cirurgia endoscópica para rinosinusite crônica com polipose nasossinusal e também em pacientes do grupo controle. Este fato sugere que apenas o biofilme pode não ser suficiente para causar rinosinusite crônica sem outros co-fatores e que fatores relacionados ao hospedeiro podem ser responsáveis pela patogênese do biofilme. A presença de biofilmes nos pacientes do grupo controle pode implicar que os biofilmes, possam simplesmente ser colonizadores em uma parcela dos pacientes e, talvez, não sejam a chave para essa doença. Acreditamos que possam ser responsáveis em parte por esta doença em alguns pacientes, ou possam agir como agravantes em outros casos, mas que não sejam a única chave para esta doença.

A presença dos biofilmes relacionou-se no pré-operatório dos pacientes com rinosinusite crônica com polipose nasossinusal com pior qualidade de vida doença-específico para obstrução nasal e pior avaliação endoscópica; e no pós-operatório com melhores resultados endoscópicos.

Nosso estudo concorda com as publicações anteriores que os biofilmes estão associados com a RSCcPN, mais o papel da presença deste “ninho” e da sua interação com a mucosa nasossinusal, que pode ser independente da resposta inflamatória, necessita ser determinado por estudos de coorte à longo prazo com SaB documentados por CLSM/FISH em pacientes com histórias clínicas semelhantes, preferivelmente sem cirurgia prévia.

8 Anexos



GRUPO DE RINOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA USP

NOME: _____ SEXO: ____

RGHC: _____ IDADE: __ TELEFONE: (____) _____ - _____

AVALIAÇÃO DE RESULTADOS NASOSSINUSAIS. (SNOT-20)

Você encontrará abaixo uma lista de sintomas e conseqüências sociais e emocionais da sua rinossinusite. Gostaríamos de saber mais sobre estes problemas e pedimos que respondesse às seguintes perguntas da melhor maneira possível. Não há respostas certas ou erradas e somente você pode nos dar essas informações. Por gentileza, dê uma nota para seus problemas conforme se apresentaram nas duas últimas semanas. Obrigado por sua participação. Caso tenha alguma dúvida, peça a nossa ajuda imediatamente.

	Nenhum problema	Problema muito pequeno	Problema pequeno	Problema moderado	Problema sério	Pior problema possível	5 itens mais importantes
1. Considerando a gravidade do problema, quando aparece e a freqüência com que acontece; dê uma nota para cada item abaixo de acordo com o grau de intensidade do problema. Faça um círculo ao redor do número que corresponde ao que você sente. Use a escala ao lado:							
1. Necessidade de assoar o nariz	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
2. Espirros	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
3. Nariz escorrendo	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
4. Tosse	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
5. Secreção nasal escorrendo para a garganta	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
6. Secreção nasal grossa	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
7. Ouvido tampado	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
8. Tontura	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
9. Dor de Ouvido	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
10. Dor/ pressão na face	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
11. Dificuldade de pegar no sono	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
12. Acordar durante a noite	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
13. Falta de uma boa noite de sono	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
14. Acordar cansado	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
15. Fadiga	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
16. Produtividade diminuída	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
17. Concentração reduzida	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
18. Frustrado / Inquieto/ Irritado	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
19. Triste	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
20. Envergonhado com a doença	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>

2. Favor marcar os itens mais importantes que estão prejudicando sua saúde (máximo de 5 itens) ↑



Grupo de Rinologia do Hospital das Clínicas da USP

Nome: _____ Sexo: ____ Idade: ____

RGHC: _____ Telefone: (____) _____ - _____

Instrumento para Avaliação dos Sintomas da Obstrução Nasal NOSE

→ Ao paciente: Pedimos que nos ajude a compreender melhor o impacto da obstrução nasal em sua qualidade de vida.
Por favor, dê suas respostas a esta pesquisa. Obrigado!

Durante **o último mês** qual foi a intensidade em que as situações abaixo foram um **problema** para você?

Faça um círculo na resposta mais correta

	Não é um problema	Problema muito pequeno	Problema moderado	Problema razoavelmente grave	Problema grave
1. Congestão nasal ou sensação de nariz cheio	0	1	2	3	4
2. Bloqueio ou obstrução nasal	0	1	2	3	4
3. Dificuldade para respirar pelo nariz	0	1	2	3	4
4. Dificuldade para dormir	0	1	2	3	4
5. Incapaz de respirar o suficiente pelo nariz durante exercício ou esforço	0	1	2	3	4

9 Referências

Al-Rawi MM, Edelstein DR, and Erlandson RA. Changes in nasal epithelium in patients with severe chronic sinusitis: A clinicopathologic and electron microscopic study. *Laryngoscope*. 1998; 108:1816–1823.

Baroody FM. Mucociliary transport in chronic rhinosinusitis. *Clin Allergy Immunol*. 2007;20:103-19.

Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, van Cauwenberge P. Mediators in nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002;2(6):481-7.

Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 134(6):991-6.

Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129(3 Suppl):S1-32.

Berrettini S, Carabelli A, Sellari-Franceschini S, Bruschini L, Abruzzese A, Quartieri F, et al. Perennial allergic rhinitis and chronic sinusitis: correlation with rhinologic risk factors. *Allergy*. 1999;54(3):242.

Bezerra TFP, Piccirillo JF, Fornazieri MA, Pilan RMM, Abdo TRT, Pinna FR, Padua FGM, Voegels RL. Cross-cultural adaptation and validation of SNOT-20 in Portuguese. *Int J Otolaryngol*. 2011, Article ID 306529, 5 pages.

Bezerra TFP, Padua FGM, Gebrim EMMS, Saldiva PH, Voegels RL. Biofilms in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011. 144(4) 612–616.

Bezerra TFP, Padua FGM, Ogawa AI, Gebrim EMMS, Saldiva PH, Voegels RL. Biofilm in Chronic Sinusitis with Nasal Polyps: Pilot study. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(6):788-93.

Bezerra TFP, Padua FGM, Pilan RMM, Stewart MG, Voegels RL. Cross-cultural adaptation and validation of a Quality of Life questionnaire: The Nasal Obstruction Symptom Evaluation questionnaire. *Rhinology.* 2011, 49:227-231.

Biedlingmaier JF, Trifillis A. Comparison of CT scan and electron microscopic findings on endoscopically harvested middle turbinates. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;118(2):165-73.

Browne JP, Hopkins C, Slack R, Cano SJ. The Sino-Nasal Outcome Test (SNOT): Can we make it more clinically meaningful? *Otolaryngol Head Neck.* 2007; 136, 736-741.

Chennupati SK, Chiu AG, Tamashiro E, Banks CA, Cohen MB, Bleier BS, et al. Effects of an LL-37-derived antimicrobial peptide in an animal model of biofilm *Pseudomonas sinusitis*. *Am J Rhinol Allergy.* 2009 ;23(1):46-51.

Cheng W, Zheng C, Tian J, et al. T helper cell population and eosinophilia in nasal polyps. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007;17(5):297-301.

Cole AM, Liao HI, Stuchlik O, Tilan J, Pohl J, Ganz T.. Cationic polypeptides for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol.* 2002; 169(12):6985-91

Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1466-77.

Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2004; 66(3):155-8.

Davis, A E and Smallman, L A. An ultrastructural study of the mucosal surface of the human inferior concha. I. Normal appearances. *J Anat.* 1988, Vol. 161, pp. 61-71.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg infect dis.* 2002; 8(9):881-90.

Ebbens FA, Georgalas C, Luiten S, van Drunen CM, Badia L, Scadding GK, et al. The effect of topical amphotericin B on inflammatory markers in patients with chronic rhinosinusitis: a multicenter randomized controlled study. *Laryngoscope.* 2009; 119(2):401-8. 59.

Ferguson BJ, Stolz DB. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol.* 2005; 19(5): 452-7

Fokkens W, Lund V, Bachert C. EAACI position paper on rhinosinusitis and nasal polyps executive summary. *Allergy.* 2005;60(5):583-601.

Fokkens W, Lund V, Mullol J. EP3OS 2007: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology.* 2007;45:97–101.

Foreman A, Singhal D, Psaltis AJ, Wormald PJ. Targeted imaging modality selection for bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2010;120:427-431.

Foreman A, Wormald PJ. Different Biofilms, Different Disease? A Clinical Outcomes Study. *Laryngoscope*. 2010. 120:1701–1706.

Foreman A, Holtappels G, Psaltis AJ, Jervis-Bardy J, Field J, Wormald PJ, Bachert C. Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2011;66(11):1449-56

Galli J, Calo L, Ardito F, et al. Damage to ciliated epithelium in chronic rhinosinusitis: what is the role of bacterial biofilms? *Ann Otol Rhinol Laryngo*. 2008;117(12):902-8.

Gliklich RE, Metson R. The health impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;113: 104-9

Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C. Chronic rhinosinusitis in Europe – an underestimated disease. A GA2LEN study. *Allergy*. 2011;66(9):1216-23.

Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Cunningham L, Bean DK, Yasruel Z, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96(4):537-44.

Hekiart AM, Kofonow JM, Doghramji L, et al. Biofilms correlate with TH1 inflammation in the sinonasal tissue of patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;141(4):448-53.

Jani AL, Hamilos DL. Current thinking on the relationship between rhinosinusitis and asthma. *J Asthma*. 2005;42(1):1-7.

Khalid AN, Hunt J, Perloff JR, Kennedy DW. The role of bone in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2002;112(11):1951-7.

Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol*. 2008; 22(6):549-59.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J*. 2009; 420(1):1-16.

Lee JT, Kennedy DW, Palmer JN, Feldman M, Chiu AG. The incidence of concurrent osteitis in patients with chronic rhinosinusitis: a clinicopathological study. *Am J Rhinol*. 2006;20(3):278-82.

Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends microbiol*. 2001; 9(1):34-9.

Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA et al. Rhinosinusitis: Establishing definitions for clinical research and patient care. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;131(6 Suppl):S1-62

Mladina R, Skitarelić N, Musić S, Ristić M. A biofilm exists on healthy mucosa of the paranasal sinuses: a prospectively performed, blinded, scanning electron microscope study. *Clinical Otolaryngology*. 2010;35(2):104-10.

Ooi EH, Wormald PJ, Carney AS, James CL, Tan LW. SP-D expression in CRS patients and immune responses in vitro to *Aspergillus* and *Alternaria* in a nasal explant model. *Laryngoscope*. 2007; 117(1):51-7.

Orlandi RR, Marple BF, Georgelas A, Durtschi D, Barr L. Immunologic response to fungus is not universally associated with rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;141(6):750-6.e1-2.

Osguthorpe JD. Adult rhinosinusitis: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2001;63(1):69-76.

Perloff JR, Palmer JN. Evidence of bacterial biofilms on frontal recess stents in patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*. 2004; 18(6):377-80.

Perloff JR, Palmer JN. Evidence of bacterial biofilms in a rabbit model of sinusitis. *Am J Rhinol*. 2005; 19(1):1-6.

- Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 ;59(3):493-503
- Piccirillo JF, Merritt Jr. MG, Richards ML. Psychometric and clinimetric validity of the 20-Item Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-20). *Otolaryngol Head Neck.* 2002; 126(1): 41–47.
- Pleis JR, Lethbridge-Cejku M. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2006. *Vital Health Stat* 10. 2007 Dec;(235):1-153.
- Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Gaffey TA, Tarara JE, et al. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: Is the histopathology similar to asthma? *Journal of Allergy & Clinical Immunology.* 2003;112(5):877-82.
- Ponikau JU, Sherris DA, Kita H, Kern EB. Intranasal antifungal treatment in 51 patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(6):862-6.
- Ponikau JU, Sherris DA, Weaver A, Kita H. Treatment of CRS with intranasal amphotericin B: a randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 ;115(1):125-31
- Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope.* 2001; 111(12):2083-94.
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 12(3):185-90.

Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999; 283(5409):1837-9.

Prince AA, Steiger JD, Khalid AN, Dogrhamji L, Reger C, Eau Claire S, et al. Prevalence of biofilm-forming bacteria in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*. 2008;22:239-245.

Psaltis AJ, Weitzel EK, Ha KR, Wormald PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol*. 2008; 22(1):1-6.

Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132:414-417.

Ricchetti A, Landis BN, Maffioli A, Giger R, Zeng C, Lacroix JS. Effect of anti-fungal nasal lavage with amphotericin B on nasal polyposis. *J Laryngol Otol*. 2002 ;116(4):261-3.

Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2005; 115(4):578-82.

Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2006; 116(7):1121-6.

Seiberling KA, Grammer L, Kern RC. Chronic rhinosinusitis and superantigens. *Otolaryngol Clin North Am*. 2005;38(6):1215-36, ix.

Shin SH, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, et al. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 ;114(6):1369-75.

Singhal D, Foreman A, Bardy JJ, Wormald PJ. Staphylococcus aureus biofilms: Nemesis of endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope*. 2011;121(7):1578-83.

Stammberger H. Surgical treatment of nasal polyps: past, present, and future. *Allergy*. 1999;54 Suppl 53:7-11.

Steinke JW, Bradley D, Arango P, Crouse CD, Frierson H, Kountakis SE, et al. Cysteinyl leukotriene expression in chronic hyperplastic sinusitis-nasal polyposis: importance. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2):342-9.

Stephenson MF, Mfuna L, Dowd SE, Wolcott RD, Barbeau J, Poisson M, James G, Desrosiers M. Molecular characterization of the polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 39(2):182-7.

Stewart MG, Witsell DL, Smith TL, et al. Development and validation of the Nasal Obstruction Symptom Evaluation (NOSE) scale. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 130: 157-163.

Szczeklik A, Nizankowska E, Sanak M, Swierczynska M. Aspirin-induced rhinitis and asthma. *Current Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1:27-33.

Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(5):913-21.

Van Den Hoogen FJ, Oudes MJ, Hombergen G, Nijdam HF, Manni JJ. The Groningen, Nijdam and Provox voice prostheses: a prospective clinical comparison based on 845 replacements. *Acta Otolaryngol*. 1996; 116(1):119-24.

Van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, et al. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(4):981-3.

Voegels RL, de Melo Padua FG. Expression of interleukins in patients with nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(4):613-9.

Watelet JB, Demetter P, Claeys C, Van Cauwenberge P, Cuvelier C, Bachert C. Neutrophil-derived MMP-9 predicts healing quality after sinus surgery. *Laryngoscope*. 2005;115(1):56-61.

Weschta M, Rimek D, Formanek M, Polzehl D, Podbielski A, Riechelmann H. Topical antifungal treatment of CRSwNP: a randomized, double-blind clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 ;113(6):1122-8.

Winstead W. Rhinosinusitis. *Prim Care*. 2003;30(1):137-54.

Zhang Z, Kofonow JM, Finkelman BS, Doghramji L, Chiu AG, Kennedy DW, Cohen NA, Palmer JN. Clinical factors associated with bacterial biofilm formation in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;144(3):457-62.

Zinreich SJ, Mattox DE, Kennedy DW, Chisholm HL, Diffley DM, Rosenbaum AE. Concha bullosa: CT evaluation. *J Comput Assist Tomogr*. 1988;12:788-4.

Zuliani G, Carron M, Gurrola J, Coleman C, Hauptert M, Berk R, et al. Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006; 70(9): 1613-7