

DANIEL LORENA DUTRA

**Composição e diversidade do microbioma do meato médio de
pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasal**

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

Programa: Otorrinolaringologia
Orientador: Prof. Dr. Richard Louis Voegels

**São Paulo
2019**

DANIEL LORENA DUTRA

**Composição e diversidade do microbioma do meato médio de
pacientes com rinosinusite crônica com polipose nasal**

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

Programa: Otorrinolaringologia
Orientador: Prof. Dr. Richard Louis Voegels

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dutra, Daniel Lorena

Composição e diversidade do microbioma do meato médio de pacientes com rinosinusite crônica com polipose nasal / Daniel Lorena Dutra. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Otorrinolaringologia.
Orientador: Richard Louis Voegels.

Descritores: 1.Sinusite 2.Microbioma 3.Pólipos nasais 4.RNA ribossômico 16S 5.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 6.Análise de sequência de DNA 7.Seio etmoidal

USP/FM/DBD-425/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico...

Aos meus pais, José Inajá (in memoriam) e Matildes, que sempre me inspiraram ao longo da vida e incentivaram a buscar desafios.

A minha esposa, Rosane, seu apoio incondicional e compreensão foram fundamentais para realização deste trabalho.

Aos meus filhos, Caio, Lorenzo e Isabela, fonte de estímulo permanente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Richard Louis Voegels**, pela orientação, competência e sabedoria no auxílio ao trabalho. Minha grande admiração e fonte de inspiração profissional e acadêmica, a opção de carreira com ênfase em rinologia se deve muito ao seu incentivo.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, responsável pela pós-graduação da otorrinolaringologia no início do desenvolvimento deste estudo, por acreditar e apoiar a proposta científica do trabalho desenvolvido.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia da FMUSP, pela competência na condução do departamento, elevando ainda mais a notoriedade e referência assistencial, acadêmica e científica do departamento.

Ao **Prof. Alkis J Psaltis MBBS (Hons) FRACS PhD**, Professor Associado do Departamento de Cirurgia da Universidade de Adelaide, Austrália, que liderou estudo internacional de microbioma e permitiu nossa colaboração, viabilizando a realização deste trabalho.

Aos caros (as) **Dr. Fabio de Rezende Pinna, Dra. Renata Ribeiro de Mendonça Pilan, Dra. Tatiana Regina Teles Abdo**, membros da equipe de Rinologia do HCFMUSP, pelos ensinamentos, conselhos e orientação acadêmico-profissional durante grande parte da minha formação.

À **Profa. Dra. Renata Cantisani Di Francesco**, que gentilmente participou do exame de qualificação desta pesquisa e pelo auxílio e orientação em questões éticas e burocráticas junto aos comitês local e nacional.

À **Dra. Milena Pereira Lopes da Costa**, pelo apoio e auxílio na obtenção de documentação junto à Universidade de Stanford, Califórnia, Estados Unidos.

À **Dra. Flávia Gonçalves de Oliveira Maestrali e Dra. Ana Carolina Pinto Bezerra Soter** pelo apoio, auxílio e solidariedade em questões operacionais do estudo.

À toda equipe da Unidade de Criopreservação – BIOB-02 – UCB, da FMUSP, em especial a **Mara de Souza Junqueira e Juliana** por viabilizarem o armazenamento de amostras para este trabalho.

Ao **Sr. Adevar Viana Alves e Sra. Milva Rosa Luciano Braz** e todos demais funcionários do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HCFMUSP, pelo auxílio operacional dos pacientes ambulatoriais.

À **Solange**, funcionária do Centro Cirúrgico do HCFMUSP, pelo auxílio operacional na coleta de amostras nas salas operatórias.

Aos alunos da pós-graduação da USP, **Gustavo Sparvoli e Ramon Cortez** e ao pesquisador **Ahmed Bassiouni PhD**, da Universidade de Adelaide, Austrália, pelo auxílio nas análises de bioinformática.

Às secretárias da Clínica de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, **Maria Márcia Alves, Maria Marilede Alves, Kátia Tereza Kayano Cota e Lucivânia Lima da Silva**, pela assessoria nas questões burocráticas e no contato com toda equipe da Otorrinolaringologia da FMUSP.

Ao meu sogro **Ubirajara** e minha sogra **Rozângela**, “pais” adicionais que a vida me presenteou em momento oportuno.

Aos meus queridos irmãos **Tiago** e **Marcos**, suas esposas **Gabriela** e **Cristina**, e meus adoráveis sobrinhos **Vicente** e **Eduardo**.

Ao meu cunhado **Douglas**, sua esposa **Adriana** e seus adoráveis filhos **Felipe** e **Flávio**.

Aos residentes, preceptores, pós-graduandos e demais colegas da Otorrinolaringologia da FMUSP que de forma direta ou indireta contribuíram para esta pesquisa ao longo do desenvolvimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram nesta jornada, mas que eventualmente não foram citadas.

A Deus, por me dar sabedoria, saúde e perseverança para concluir este trabalho.

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. Divisão 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 dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Siglas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo principal	5
2.2 Objetivos secundários.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 Evolução da microbiologia	7
3.2 Termo microbioma.....	8
3.3 Bactérias e o gene 16S rRNA	9
3.4 Sequenciamento de nova geração	10
3.5 Microbioma nasossinusal.....	11
3.5.1 Coleta de amostra.....	11
3.5.2 Microbioma do meato médio.....	12
3.5.3 Microbioma na RSC.....	12
4. MÉTODOS	17
4.1 Ética, participantes e questionário	17
4.2 Critérios de inclusão e exclusão	18
4.3 Coleta das amostras	18
4.4 Remessa das amostras	19
4.5 Processamento das amostras	19
4.6 Sequenciamento do material genético	20
4.7 Pipeline de Bioinformática	21
4.8 Análise estatística	22
5. RESULTADOS	24
5.1 Dados descritivos	24
5.2 Comparação entre os grupos	25
5.2.1 Abundância relativa – filos	25
5.2.2 Abundância relativa – gêneros	27
5.2.3 Alfa diversidade.....	31
5.2.3 Beta diversidade	33
5.2.4 Abundância de filos e gêneros em subgrupos de pacientes com RSC	35
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	53
8. ANEXOS	55
9. REFERÊNCIAS	77

LISTA DE SIGLAS

AGRF	<i>Australian Genome Research Facility</i>
BIOB-02 UCB	Biobanco 02, Unidade de Criopreservação
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
NIH	<i>National Institutes of Health</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal 16S
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
HMP	<i>Human Microbiome Project</i>
IL-5	Interleucina 5
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OS3	<i>Open Source Sinonasal Survey</i>
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
p	valor-p
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RSC	Rinossinusite crônica
RSCcp	Rinossinusite crônica com polipose nasal
RSCsp	Rinossinusite crônica sem polipose nasal
SMRT	<i>Single molecule real time sequencing</i>
SNOT-22	<i>22-Item Sino-Nasal Outcome Test</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimol
ng	nanograma
nM	nanomol
pM	picomol
s	segundo
μL	microlitro
μM	micromol
\sim	aproximadamente
$=$	igual
$>$	maior
\geq	maior ou igual
$<$	menor
\leq	menor ou igual
%	por cento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais filamentos encontrados nos grupos.....	26
Figura 2	Distribuição dos principais filamentos entre os participantes.....	27
Figura 3	Principais gêneros encontrados nos grupos.....	28
Figura 4	Distribuição dos principais gêneros entre os participantes.....	29
Figura 5	<i>Heatmap</i> contendo os principais gêneros encontrados nos grupos..	30
Figura 6	Prevalência cumulativa dos principais gêneros nos grupos.....	31
Figura 7	Índices de alfa diversidade entre os grupos.....	32
Figura 8	Beta diversidade entre os grupos – 7a diagnóstico; 7b asma, 7c tabagismo.....	34
Figura 9	Principais filamentos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação à sensibilidade a aspirina.....	35
Figura 10	Principais filamentos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação à presença de refluxo gastroesofágico.....	36
Figura 11	Principais filamentos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) que apresentavam diabetes.....	37
Figura 12	Principais filamentos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) que já haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico.....	38
Figura 13	Principais filamentos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) que apresentavam asma.....	40
Figura 14	Principais filamentos encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação ao tabagismo.....	41
Figura 15	Principais gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação ao tabagismo.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados descritivos da população.....	43
Tabela 2	Filos bacterianos observados entre os grupos.....	44
Tabela 3	Gêneros bacterianos observados entre os grupos.....	46
Tabela 4	Índices de alfa diversidade entre os grupos.....	49

RESUMO

Dutra DL. *Composição e diversidade do microbioma do meato médio de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasal*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A comunidade microbiológica presente no corpo humano apresenta papel crucial na homeostase normal de diversos sistemas fisiológicos e em inúmeros cenários fisiopatológicos. O surgimento de tecnologias que independem de cultura está permitindo o mapeamento desta microbiota com alta sensibilidade. Nos seios paranasais saudáveis e na rinossinusite crônica esta comunidade ainda precisa ser determinada, não há estabelecido um microbioma nasossinusal típico. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é avaliar a composição e diversidade do microbioma do meato médio de pacientes brasileiros adultos com rinossinusite crônica com polipose, utilizando tecnologia de sequenciamento de nova geração. **Método:** Realizou-se coleta com *swab* de meato médio de 20 pacientes saudáveis, considerado grupo controle e 29 pacientes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp). Após extração de DNA da amostra coletada, procedeu-se o sequenciamento de regiões variáveis V3-V4 do gene 16S rRNA para identificação filogenética bacteriana. A composição foi determinada por meio das abundâncias relativas dos gêneros mais prevalentes. Avaliação da diversidade foi realizada utilizando os índices mais frequentes. **Resultados:** Os gêneros com maior abundância relativa nos controles foram *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Na RSCcp os gêneros mais abundantes foram *Staphylococcus*, *Haemophilus* e *Corynebacterium*, mas com depleção significativa dos representantes das *Corynebacteriaceae*. Os índices de diversidade e a riqueza não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos. **Conclusão:** Os gêneros *Staphylococcus*, *Haemophilus* e *Corynebacterium*, apresentaram dominância na composição do meato médio de pacientes com RSCcp. A comunidade bacteriana deste sítio anatômico mostrou uma depleção significativa de *Corynebacterium*.

Descritores: 1. Sinusite 2. Microbioma 3. Pólipos Nasais 4. RNA ribossômico 16S 5. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 6. Análise de sequência de DNA 7. Seio etmoidal.

ABSTRACT

Dutra DL. *Middle meatus microbiome composition and diversity of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2019.

Introduction: The microbiological community present in the human body plays a crucial role in the normal homeostasis of several physiological systems and numerous pathophysiological scenarios. The emergence of culture-independent technologies is allowing the mapping of this microbiota with high sensitivity. In healthy paranasal sinuses and chronic rhinosinusitis, this community is still being determined. The core sinonasal microbiome still needs to be established. **Objective:** This study aims to evaluate the middle meatus microbiome composition of adult Brazilian patients with chronic rhinosinusitis with polyps using next-generation sequencing technology. **Methods:** Middle meatus swabs from 20 healthy subjects and 29 patients with chronic rhinosinusitis with polyps (CRSwNP) were collected. Extraction of DNA from samples was performed and phylogenetic identification was determined using 16S rRNA gene sequencing of V3-V4 variable regions. The composition was determined through relative abundances of the most prevalent genera. Diversity was evaluated using the most common diversity indexes. **Results:** The genera with the highest relative abundances in the controls were *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus*. In CRSwNP the most abundant genera were *Staphylococcus*, *Haemophilus* *Corynebacterium*, but with significant depletion of *Corynebacteriaceae* representatives. Diversity and richness did not reach a statistically significant difference between the 2 groups. **Conclusion:** The genera *Staphylococcus*, *Haemophilus* and *Corynebacterium* were dominant in the middle meatus composition of Brazilian adult patients with CRSwNP. The bacterial community of this anatomical site showed a significant depletion of *Corynebacterium*.

Descriptors: 1. Sinusitis 2. Microbiome 3. Nasal Polyps 4. 16S rRNA 5. Next-generation sequencing 6. DNA sequencing 7. Ethmoid sinus.

1. INTRODUÇÃO

A forma inicial de identificação de microrganismos se amparava no século 18 em sua observação direta com auxílio de microscópios, por meio da observação de atribuições físicas observáveis com as lentes de aumento de tais instrumentos. A evolução do conhecimento caminhou para outro método, bem tradicional, utilizado até hoje na prática clínica: o cultivo destes seres. A cultura utiliza técnicas que envolvem o fornecimento de condições ideais de pH, temperatura e nutrientes, de forma controlada, necessários para o crescimento destes microrganismos. Entretanto, esta dependência de condições ideais introduz um viés, a competição entre organismos em determinado meio enriquecido favorece a dominância de um ou mais organismos cujas taxas de crescimento sejam mais altas. A cultura não é capaz de representar, portanto a diversidade real presente naquele ambiente investigado. Além disso, as características que diferem os microrganismos cultivados são baseadas em conhecimentos morfológicos e bioquímicos de células microbianas, características frequentemente insuficientes para uma descrição microbiana precisa e para caracterização de sua ecologia.

A evolução dos métodos moleculares de detecção, por meio da identificação dos ácidos nucleicos dos microrganismos utilizando técnicas de sequenciamento, revolucionou a forma de identificação de bactérias, reduzindo as limitações encontradas previamente. Este avanço permite uma maior compreensão da complexidade do conjunto de micróbios que habitam o corpo humano, chamada de microbiota humana. Pesquisas têm tentado determinar a real população de micróbios vivendo em determinados sítios anatômicos mediante análise do conteúdo genômico destas populações⁽¹⁾. Uma

cooperação científica de larga escala para se avaliar o conteúdo genômico da microbiota humana, chamado *The Human Microbiome Project*, contemplou diversos sítios anatômicos do ser humano^(1,2). Entretanto, apesar do pioneirismo do projeto, seu escopo de avaliação não englobou os seios paranasais.

O reconhecimento da importância da microbiota para estados de saúde e doença do ser humano vem aumentando a medida que os métodos moleculares estão permitindo uma caracterização melhor das comunidades microbiológicas. Atualmente diversos estudos demonstram a contribuição da microbiota em processos biológicos básicos como metabolismo, biossíntese, neurotransmissão e imunomodulação⁽³⁻⁵⁾. Há envolvimento do microbioma em diversos estados patológicos do trato digestivo, da via aérea, do sistema nervoso central e do sistema imune⁽⁶⁻⁹⁾. O envolvimento da comunidade microbiológica em estados de disfunção imunológica como alergia, asma, doenças autoimunes e imunodeficiências primária e adquiridas suscita questionamentos pertinentes na fisiopatologia de estados inflamatórios crônicos nasais, em especial na rinossinusite crônica (RSC). Deve-se lembrar que as superfícies mucosas representam um interface crucial na interação entre o sistema imune e os microrganismos⁽⁹⁾.

A rinossinusite crônica representa um dos problemas de saúde mais comuns no continente americano. Estatísticas norte-americanas relatam uma prevalência que varia de 2 a 16% nos Estados Unidos⁽¹⁰⁾. No Brasil, estudo publicado com a população da cidade de São Paulo aponta prevalência de 5,51%, indicando assim mais de 500.000 pessoas acometidas na região metropolitana da cidade⁽¹¹⁾. Desde a sua caracterização, muito conhecimento foi adquirido em relação a sua natureza inflamatória, envolvendo em sua fisiopatologia fatores do hospedeiro, como alergia, imunodeficiência, imobilidade ciliar, obstrução anatômica e fatores ambientais, como infecções bacterianas, virais, fúngicas, biofilmes e poluentes. No entanto, até o momento não se

compreende de forma clara e suficiente a etiologia da RSC. Embora a colonização bacteriana crônica tenha sido implicada, a relação precisa entre esses micróbios e a RSC continua a ser alvo de debate.

Ampliar o conhecimento da real microbiota dos seios paranasais pode ajudar a determinar o papel destes organismos na homeostase normal e nos estados patológicos deste sítio anatômico. Estudos comparativos de microbioma nasossinusal com padronização de metodologia em diferentes populações são necessários. Tais estudos comparativos proporcionarão substrato relevante para se compreender o papel dos microrganismos nos mecanismos fisiopatológicos da RSC. A melhor compreensão da comunidade microbiana dos seios paranasais e de suas interações em diferentes populações pode proporcionar soluções médicas inovadoras na otorrinolaringologia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O objetivo primário deste estudo é avaliar composição do microbioma do meato médio de pacientes com rinossinusite crônica com polipose e de uma população controle, utilizando tecnologia de sequenciamento de DNA.

2.2 Objetivos secundários

Comparar o perfil do microbioma do meato médio de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasal com indivíduos sem esta condição (controles) utilizando índices de diversidade;

Descrever os principais grupos taxonômicos encontrados nos pacientes com RSCcp com asma.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Evolução da microbiologia

A descoberta do universo microbiano foi inicialmente revelada por dois grandes gênios, Robert Hooke e Antoni van Leeuwenhoek entre 1665 e 1678⁽¹²⁾. Hooke descreveu o fungo microscópico *Mucor* em 1665, Leeuwenhoek observou e descreveu protozoários microscópicos e bactérias, citadas em cartas de 1676 e que são consideradas as primeiras observações de microrganismos bacterianos. Estes dois pioneiros tinham em comum o desenvolvimento e utilização de microscópios para suas descobertas e são considerados os “pais” da microbiologia⁽¹²⁾.

A microbiologia apresentou um novo renascimento duzentos anos depois com Louis Pasteur quando a teoria da geração espontânea foi refutada e este postulou a “teoria dos germes”. Nos anos subsequentes técnicas essenciais para o cultivo, crescimento e identificação apresentaram saltos significativos, com surgimento dos meios de cultura enriquecidos, placas de Petri e coloração de Gram⁽¹³⁾. Os germes patogênicos estão entre os primeiros a serem cultivados como mostra a história da descoberta de *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio Cholerae* e *Yersinia pestis*⁽¹⁴⁾. A cultura hoje representa uma ferramenta importante na rotina clínica, essencial para diagnóstico e tomada de decisão nos mais diversos cenários clínicos.

Após a descrição do DNA e surgimento de técnicas do seu sequenciamento, inicia-se a era moderna, com a biologia molecular desempenhando papel importante na evolução do conhecimento microbiológico. Uma evolução fundamental ocorreu quando Linus Pauling introduziu o conceito de sistemática molecular utilizando proteínas e

ácidos nucleicos para identificação de microrganismos⁽¹⁵⁾. A evolução das técnicas de sequenciamento e surgimento do PCR culminaram nos anos 90 com o primeiro sequenciamento completo do genoma de um organismo vivo, o *Haemophilus Influenzae*⁽¹⁶⁾. As técnicas de sequenciamento automático possibilitaram a análise de fragmentos maiores, o que permitiu o desenvolvimento do Projeto Genoma Humano, iniciado em 1990 e finalizado em 2003 como sequenciamento completo do genoma humano⁽¹⁷⁾. Entretanto a metodologia empregada ainda apresentava um alto custo e baixo rendimento, com necessidade de clonagem dos fragmentos antes do sequenciamento, principalmente em se tratando de genomas maiores.

O esperado avanço surgiu com o desenvolvimento das tecnologias nomeadas de sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*) ou NGS, disponíveis comercialmente a partir de 2004⁽¹⁸⁾. Esta metodologia não necessita da clonagem prévia do material a ser sequenciado e gera quantidades muito maiores de informação por tempo de processamento. Dentre as tecnologias empregadas estão aquelas desenvolvidas pelas empresas 454 Life Sciences/Roche (pirosequenciamento 454), Life Technologies (Solid, IonTorrent), Illumina (HiSeq2000), Pacific Biosciences (PacBio SMRT). Uma grande vantagem do emprego de tais tecnologias foi a redução dos custos, o que aliado a um aumento na capacidade da análise computacional permitiu o desenvolvimento de estudos em vários centros no mundo.

3.2 Termo microbioma

O termo microbioma apresenta suas raízes nos primórdios da ecologia microbiana⁽¹⁹⁾. A popularidade e atenção médica atual nos leva a acreditar que o conceito

de microbioma seja uma descoberta recente. Uma premissa é que o ganhador do prêmio Nobel, o microbiologista Joshua Lederberg, primeiro cunhou o termo “microbioma” em 2001, definindo como “a comunidade ecológica de microrganismos comensalistas, simbioses ou patogênicos, que literalmente compartilham o espaço de nosso corpo”⁽²⁰⁾. Entretanto debate que data de 1988 já definia o conceito de microbioma alinhado com o pensamento microbiológico atual: *“Isto pode ser definido como a comunidade microbiológica característica ocupando um habitat razoavelmente bem definido que apresenta distintas propriedades físico-químicas. O termo portanto se refere não apenas aos microrganismos envolvidos mas também abrange o seu teatro de atividade”*⁽²¹⁾.

Há debate ainda de quando e como o termo é apropriado, um argumento é que como o termo é derivado da família de terminologia “*omics*” (do inglês), ele deve ser utilizado para descrever a coleção de genomas de espécies microbianas, enquanto a coleção de organismos deve ser chamada microbiota⁽²²⁾. Há outro argumento que não se baseia nesta derivação, definindo que o termo advém da fusão de micróbio e bioma, descrevendo assim o ecossistema microbiano, habitantes e ambiente a sua volta, não apenas genomas⁽²³⁾. De qualquer modo o termo microbioma muitas vezes é usado de forma indistinta de microbiota e seu emprego normalmente implica numa visão de certa forma mais holística da comunidade microbiana de determinado local.

3.3 Bactérias e o gene 16S rRNA

O foco principal dos estudos de microbioma humano se concentram nas bactérias. Fungos e vírus podem fazer parte da comunidade, entretanto frequentemente os estudos científicos se referem a estes seres com a denominação separada, utilizando os termos

“microbioma” e “viroma”, respectivamente^(24, 25).

A identificação molecular e classificação filogenética das bactérias se baseia no sequenciamento de regiões do gene 16S rRNA, em 1985 Lane et al. já descrevia sua utilização para este fim^(26, 27). O emprego desta metodologia se beneficia de algumas características, este gene apresenta uma distribuição universal nos procariotos, contém 9 regiões variáveis que permitem classificar os organismos nos diferentes grupos taxonômicos e mantém regiões conservadas adequadas para o desenho de *primers*^(27, 28). Estas características tornaram este gene o marcador filogenético padrão-ouro na identificação de bactérias utilizando sequenciamento genético de nova geração^(28, 29).

3.4 Sequenciamento de nova geração

As principais plataformas de análise com tecnologia NGS utilizadas dos estudos publicados são a Roche 454/FLX *pyrosequencing* e Illumina. O sequenciador Roche foi o primeiro a chegar ao mercado em 2004 e utilizava uma técnica chamada de pirosequenciamento⁽¹⁸⁾. A maioria das investigações iniciais de microbioma nasossinusal com tecnologia de sequenciamento utilizaram esta plataforma de análise^(30, 31). O sistema Illumina utiliza uma técnica de sequenciamento por síntese, a plataforma MiSeq realiza leituras pareadas de 300 pares de bases com custo menor e maior desempenho do que o sequenciamento tradicional de Sanger, do qual deriva^(18, 32). Esta plataforma passou a ser a mais utilizada nos anos mais recentes nos estudos de microbioma nasossinusal, principalmente com parada de produção dos sequenciadores Roche 454/FLX a partir de 2013⁽³³⁾.

3.5 Microbioma nasossinusal

Estudos visando identificar a composição do microbioma nasossinusal empregando plataformas NGS, tanto em estados de normalidade quanto em estados de inflamação aguda e crônica dos seios paranasais tiveram seu maior crescimento nos últimos 10 anos, inicialmente com pequeno número de pacientes e muitas vezes metodologias distintas⁽³⁴⁻³⁷⁾. A forma de coleta bem como sua localização é etapa relevante em estudos que empregam metodologia com alta sensibilidade como os estudos de microbioma. Estas etapas foram avaliadas em investigações prévias e merecem menção.

3.5.1 Coleta de amostra

Na coleta da amostra nasossinusal, as metodologias mais comumente empregadas foram lavados, biópsias, *swabs* e escovados^(34, 36, 38, 39). Estudo visando elucidar a diferença entre biópsia do etmoide e *swab* do meato médio, não encontrou diferenças significativas entre os métodos, recomendando-se assim a técnica menos invasiva como padrão^(40, 41).

O local de coleta escolhido também apresenta variabilidade entre os estudos. Os mais utilizados foram porção anterior da fossa nasal, seio maxilar, meato médio, seio frontal, seio esfenoidal. Um estudo visando elucidar esta organização espacial do microbioma concluiu que o meato médio é um local adequado e representativo dos seios paranasais para coleta de sítio único⁽⁴²⁾.

3.5.2 Microbioma do meato médio

Estudo de Ramakrishnan et al. avaliando pacientes saudáveis coletou *swab* de meato médio de 28 pacientes, utilizando PCR quantitativo e sequenciamento do 16S rRNA, demonstrou bactérias em todos os pacientes⁽³⁸⁾. As mais prevalentes e abundantes foram *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus*, prevalência de 82, 92 e 86% respectivamente, abundância de 11, 15 e 8% respectivamente. Agentes oportunistas também foram detectados. Os autores sugerem que os achados subentendem que indivíduos podem abrigar patógenos em um estado de normalidade desde que estes microrganismos não tenham oportunidade de dominar a flora residente. Sugerem, desta forma, que a abundância relativa deve ter mais impacto do que a prevalência na patogênese de um estado de doença.

3.5.3 Microbioma na RSC

Os pacientes com RSC parecem apresentar uma redução substancial na riqueza, regularidade e diversidade bacteriana, pelos menos 3 estudos apontam nesta direção^(35, 37, 43). No entanto há pelo menos um estudo que aponta para um aumento nos índices de diversidade bacteriana⁽³⁶⁾.

Estudo publicado por Abreu et. al. demonstrou depleção de múltiplas e filogeneticamente distintas bactérias ácido lácticas em pacientes com RSC, com redução específica de *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*) e aumento concomitante em *Corynebacterium tuberculostearicum* (*C. tuberculostearicum*)⁽³⁵⁾. Os gêneros, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Aerococcaceae*, e *Streptococcaceae*, estavam associados com pontuação menor no questionário de qualidade de vida (SNOT-22) enquanto, *C. tuberculostearicum* estava associado a uma pontuação maior neste questionário. A partir

deste resultado sugeriu-se a possibilidade deste microrganismo participar em processos fisiopatológicos que contribuem para os sintomas nasossinusais da RSC.

Estudo publicado por Aurora et al. encontrou aumento na diversidade microbiana em pacientes com RSC em relação aos controles⁽³⁶⁾. O filo mais abundante foi o das *Cyanobacteria*, resultado intrigante, já que estes organismos são fototróficos encontrados no solo e em ambientes marinhos, sua abundância alta em ambiente relativamente escuro, como o dos seios paranasais, surpreendeu os autores.

Outra característica que alguns estudos apontam é a presença maior de anaeróbios, além de grupos novos (ex. *Aggregatibacter*, *Bradyrhizobium*) nunca antes relatados na RSC^(34, 44, 45). O aumento do relato dos anaeróbios e microrganismos novos provavelmente esteja ligado a dificuldade de seu cultivo em estudos prévios.

Uma metanálise interessando o microbioma nasossinusal reuniu os principais estudos publicados até 2017, onze trabalhos atingiram os critérios de inclusão, perfazendo um total de 131 pacientes com RSC e 58 indivíduos saudáveis⁽³¹⁾. Apenas um gênero, o *Corynebacterium*, apresentou associação com RSC, corroborando 2 achados anteriores de Abreu et al., 2012 e Aurora et al., 2013, citados anteriormente^(35, 36). Este gênero, no entanto, já foi associado a um estado de boa saúde respiratória em crianças⁽⁴⁶⁾ e vários integrantes aparentam ser comensais de pele e mucosa^(47, 48). Os gêneros mais abundantes em todos os participantes foram os *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e uma linhagem não-classificada de *Actinobacteria*. Outros achados do estudo foram uma redução na diversidade e uma fragmentação das comunidades microbianas na RSC.

Desde a metanálise, estudos adicionais foram publicados avaliando o perfil do

microbioma nas RSC. Hoggard et al. investigou 94 pacientes com RSC (n=43 RSCcp, n=8 FC) submetidos a cirurgia endoscópica endonasal e 29 controles submetidos a outras cirurgias⁽⁴⁹⁾. A composição microbiana encontrada nos controles foi representada por 2 gêneros principais, *Corynebacterium* e *Staphylococcus*. As comunidades dos pacientes com RSC apresentaram depleção significativa de *Corynebacterium* e foram compostas principalmente por 5 gêneros, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* e *Moraxella*.

Kuhar et al. também avaliou o microbioma de pacientes submetidos a cirurgia endoscópica endonasal e verificou a possibilidade de alterações na composição estarem relacionadas a histopatologia do tecido⁽⁵⁰⁾. Nos 51 pacientes, a abundância dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* estava associada a algumas características histopatológicas das RSC, como ulceração de mucosa.

Estudo publicado por Koeller et al. comparou o microbioma de sujeitos saudáveis (n=3) com pacientes com RSCcp (n=5), RSCsp (n=5) e RSC caracterizada por rinorreia maxilar unilateral (n=5)⁽⁵¹⁾. As amostras foram coletadas por meio de 3 biópsias, contemplando o etmoide e seio maxilar. Os autores não encontraram diferença clara entre as comunidades do grupo controle e do grupo com RSCcp. Entretanto, nas RSCsp a composição da microbiota apresentava aumento significativo dos seguintes grupos: *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Porphyromonas*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* e *Achromobacter*.

Avaliação de escovado de seios paranasais de 59 pacientes com RSC e 10 controles foi publicada por Cope et al. em 2017⁽³⁹⁾. Os autores propuseram o agrupamento dos pacientes em 3 subgrupos distintos, definidos por um padrão específico de co-colonização bacteriana, sendo um dos grupos dominados pelas famílias

Corynebacteriaceae ou *Staphylococcaceae*. Além da composição, os autores avaliaram o potencial funcional das comunidades, por meio de predição metagenômica e a relação com a resposta imune do hospedeiro, por meio do perfil de RNA da mucosa. Neste estudo, a presença de comunidades microbianas dominadas pela família *Corynebacteriaceae* estava associada a uma expressão gênica aumentada de IL-5.

Estudo englobando especificamente pacientes com RSCcp foi publicado por Gan et al. em 2019, totalizando 59 indivíduos com RSCcp e 27 controles⁽⁵²⁾. Diferentemente da metanálise citada previamente, não houve diferença na diversidade entre os grupos. Além disso, foi encontrado depleção de forma significativa de *Corynebacterium* e *Dolosigranulum* na RSCcp. Os cinco gêneros com maior abundância relativa neste grupo foram, em ordem decrescente: *Lactobacillus* (23,56%), *Corynebacterium* (9,84%), *Staphylococcus* (8,74%), *Streptococcus* (7,19%), *Erysipelotrichales* (4,18%).

Não é possível definir até o momento um perfil exato do microbioma dos pacientes com RSC. Os resultados de análise de riqueza e diversidade não são completamente homogêneos, enquanto alguns encontram redução destes parâmetros, há relato de aumento desta característica. Há ainda aqueles que não encontram diferenças nas avaliações de riqueza e diversidade das comunidades. Existe também descrição da presença de microrganismos tipicamente existentes em solo e em ambientes marinhos.

Os estudos publicados utilizam diferentes métodos de coleta de material, extração de ácidos nucleicos, metodologias de sequenciamento e de análise dos dados resultantes do sequenciamento. Estas diferentes metodologias dificultam e limitam a comparação entre os resultados obtidos. Além disso, limitações da resolução filogenética em leituras curtas do genoma devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados. Dados provenientes de estudos que utilizam este tipo de estratégia de leitura genômica e

determinam espécie, devem ser avaliados com cautela.

4. MÉTODOS

4.1 Ética, participantes e questionário

Quarenta e nove pacientes foram recrutados no serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sendo divididos em 2 grupos, um com vinte e nove (n=29) indivíduos com diagnóstico de rinossinusite crônica com polipose e outro com vinte (n=20) controles. Estes pacientes foram submetidos a um questionário padronizado, chamado de *Open Source Sinonasal Survey – OS3* (Anexos A e B) sobre diversos aspectos de sua saúde, inclusive medicações utilizadas, antecedentes pessoais e comorbidades, incluindo asma, alergias e preencheram o SNOT-22 em versão adaptada ao português⁽⁵³⁾. Os pacientes com rinossinusite crônica foram assim classificados levando-se em consideração a definição do *International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis*⁽⁵⁴⁾.

Todos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CaPPesq) mas subordinada a aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde (Anexo D).

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Grupo controle: Inclusão de qualquer paciente acima de 18 anos desde que a amostra seja coletada de forma adequada. Os pacientes não podem ter qualquer sintoma nasossinusal ou ter qualquer alteração visibilizada na endoscopia nasal.

Grupo rinosinusite crônica com polipose nasal: Inclusão de qualquer paciente com rinosinusite crônica desde que se caracterize com pólipos na endoscopia nasal. Exclusão dos pacientes que tenham recebido antibióticos orais e corticosteroides orais no último mês antes da coleta. Excluídos ainda pacientes com tumores nasossinusais, gestantes e crianças (pacientes < 18 anos de idade).

4.3 Coleta das amostras

Coletou-se de material do meato médio nasal utilizando *swab* nasal (Copan Diagnostics Inc., *swab* número 503CS01, COPAN ITALIA, Brescia, Itália), guiado por endoscopia e protegido de contaminação da fossa nasal e do vestíbulo nasal utilizando para isso uma cânula estéril de 14cm (*Mixing Canula* código 500.11.14, ConVatec Inc., Austrália). Realizou-se antissepsia do vestíbulo, ponta e asa nasal visando evitar contaminação com microrganismos destas regiões. O material coletado foi resfriado de forma imediata até o armazenamento definitivo utilizando maleta térmica com controle de temperatura em tempo real. Coleta sempre foi realizada com técnica asséptica e tubo de preservação livre DNAase ou RNAase (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha) próprios para criopreservação a -80°C. Armazenamento foi feito na Unidade de Criopreservação da FMUSP (BIOB-02, UCB).

4.4 Remessa das amostras

O material coletado foi enviado à Universidade de Adelaide (Austrália) dentro de armazenamento específico chamado de *DRY SHIPPER (aluminum container, HS Code 7613.00.0000* – Cryoport, Irvine, Califórnia, Estados Unidos) com monitoramento de temperatura 24hrs/dia até o destino. O dispositivo citado para o transporte das amostras utiliza nitrogênio líquido e tem capacidade para manter o resfriamento estável dos tubos por pelo menos 15 dias. Uma cópia do monitoramento da temperatura do transporte pode ser avaliada no Anexo E.

4.5 Processamento das amostras

Toda extração de DNA foi realizada na Universidade de Adelaide (Austrália) utilizando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. DNA total foi extraído de todas as amostras bem como controles DNA-negativos com apenas reagentes de extração. Toda extração foi realizada sob condições estritamente estéreis, utilizando equipamento novo a cada amostra para se evitar contaminação cruzada. As pontas de *swab* foram preparadas para extração ao serem cortadas em pedaços de 2-3mm e colocadas em tubo de micro centrifugação. Uma solução de lisozima (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) a 20mg/ml em solução lítica tampão (20 mM Tris-Cl, pH8; 2mM sodium EDTA; 1.2% Triton X-100, filter sterilised; Sigma, St Louis, Estados Unidos) foi adicionada a cada amostra e deixado por uma noite a temperatura ambiente. As amostras foram então homogeneizadas usando microesferas de aço inoxidável de 5mm e *Tissue Lyser II* (Qiagen, Hilden, Alemanha) a 15Hz por 20 segundos. As microesferas de aço foram retiradas antes de nova homogeneização com

50mg de microesferas de vidro, novamente utilizando *Tissue Lyser II* a 30Hz por 5 minutos. *Proteinase K* e *Buffer AL* (Qiagen, Hilden, Alemanha) foram adicionados a cada amostra e deixados incubar por 30 minutos a 56°C. Os tubos foram então brevemente centrifugados para coleta das esferas e sobrenadante foi transferido para novos tubos de micro centrifugação. Após adição de etanol a 100% ao sobrenadante, a nova mistura foi pipetada nas colunas *DNeasy Mini Spin* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Subsequente extração de DNA da mistura sobrenadante seguiu conforme instruções do fabricante, com um total de 100µl de DNA extraído por amostra. A concentração foi determinada utilizando um espectrofotômetro *Nano Drop 1000* (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). O DNA extraído foi armazenado a -80°C até o sequenciamento. Qualquer amostra suspeita de ter sido manejada de forma inadequada, contaminada ou não passasse no controle de qualidade durante o processamento foi excluída.

4.6 Sequenciamento do material genético

A reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento foram realizados pela *Australian Genome Research Facility*. As bibliotecas foram geradas ao amplificar os *primers* (341F-806R) contra as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA (CCTAYGGGRBGCASCAG *foward primer*, GGACTACNNGGGTATCTAAT *reverse primer*). O PCR foi realizado utilizando o *AmpliTag Gold 360 master mix* (Life Technologies, Mulgrave, Austrália) seguindo um protocolo de dois estágios, 29 ciclos para o primeiro estágio e 14 ciclos para o estágio de indexação. As concentrações resultantes dos *amplicons* amplificados foram medidas usando fluorometria (Invitrogen Picogreen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Os *amplicons* foram normalizados de acordo com as concentrações obtidas antes do

sequenciamento. O sequenciamento foi realizado na plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos) com pares de 300 bases *paired-ended chemistry* em 8 ciclos

4.7 Pipeline de Bioinformática

Após a obtenção das sequências, foi realizada a demultiplexação das amostras de acordo com as sequências dos *barcodes*. Posteriormente, as sequências foram avaliadas através do software QIIME v.1.9.1 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*)⁽⁵⁵⁾. Neste estudo, a abordagem utilizada foi o método baseado em OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais). O software foi utilizado para remover as sequências de *barcodes* e do *primer*, retirar artefatos quiméricos, efetuar o alinhamento das sequências, a construção da matriz de distância, o agrupamento das OTUs e a construção da árvore filogenética, assim como para calcular os índices de diversidade – alfa diversidade (índice de riqueza de Chao1, diversidade de Shannon, índice de dominância de Simpson e número de OTUs observadas) e beta diversidade (baseada na distância *Bray-Curtis*). As sequências das bibliotecas remanescentes foram agrupadas em OTUs, com similaridade de 99% contra o banco de dados Greengenes versão 13.5⁽⁵⁶⁾.

Uma linha de corte de 400 foi escolhida com relação a profundidade de rarefação antes do prosseguimento da análise de diversidade e comparação das abundâncias relativas dos *taxa*. A plotagem de rarefação, assim como o índice de diversidade Shannon, confirmaram que quase todas as amostras atingiram um platô a esta profundidade indicando amostragem suficiente. Aplicando esta profundidade resultou-se em 38 amostras para seguimento com avaliação. *Taxa* foram comparados no nível gênero. Abundância relativa bem como prevalência do gênero foram calculados para cada grupo.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS versão 22. O teste utilizado foi o modelo linear generalizado (GLZM), no qual foi avaliado o efeito das variáveis independentes (grupos) sobre as variáveis dependentes (índices de alfa diversidade e filos e gêneros bacterianos). Para selecionar o tipo de distribuição (gamma ou normal), adotamos a distribuição com melhor aderência para cada variável dependente. Os índices de alfa diversidade analisados foram: Chao1 para estimar a riqueza e Shannon e Simpson para estimar a diversidade e também foi calculado o número de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) observadas. O *software Microbiome Analyst*⁽⁵⁷⁾ foi utilizado para observar as diferenças na beta diversidade entre os tipos de amostra, presença de asma e tabagismo. O teste ANOSIM foi realizado para cada variável utilizando a distância Bray-Curtis. Para todas as análises, o nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Dados descritivos

Os dados descritivos dos participantes nos grupos controle e rinosinusite crônica com polipose (RSCcp) podem ser observados na Tabela 1. Das 49 amostras, 38 se mostraram de adequadas para análise após verificação de concentração de DNA, qualidade das sequências e testes de rarefação, sendo 22 participantes RSCcp e 16 Controles. No grupo RSCcp, a média de idade dos participantes foi 57,3 anos, enquanto que no grupo controle a média de idade foi de 48,8 anos. A maioria dos participantes do grupo RSCcp era do sexo masculino (54,5% - 12 participantes) e no grupo controle a maioria dos participantes do sexo feminino (68,8% - 11 participantes). Adicionalmente, 12 participantes do grupo RSCcp apresentavam asma (54,54%), 3 apresentavam diabetes (13,64%), 4 apresentavam sensibilidade à aspirina (18,19%), 10 eram ex-tabagistas (45,45%) e 2 eram fumantes (9,10%).

Tabela 1: Dados descritivos da população (n=38)

Variável	RSCcp (n=22)	Controle (n=16)
Idade (anos) ¹	57,3 ± 1,9	48,8 ± 2,2
Sexo , n (%) ²		
Masculino	12 (54,5)	05 (31,2)
Feminino	10 (45,5)	11 (68,8)
Asma , n (%) ²		
Sim	12 (54,54)	1 (06,25)
Não	10 (45,46)	15 (93,75)
Diabetes , n (%) ²		
Sim	3 (13,64)	1 (06,25)
Não	19 (86,36)	15 (93,75)
Sensibilidade à aspirina , n (%) ²		
Sim	4 (18,19)	2 (12,50)
Não	18 (81,81)	14 (87,50)
Tabagista , n (%) ²		
Sim	2 (09,10)	2 (12,50)
Ex-tabagista	10 (45,45)	3 (18,75)
Não	10 (45,45)	11 (68,75)
Última IVAS , n (%) ²		
Há mais de 2 meses	17 (77,27)	13 (81,25)
Há mais de 1 mês	3 (13,63)	3 (18,75)
Entre 2 a 4 semanas	1 (04,55)	0
Entre 1 a 2 semanas	1 (04,55)	0
Questionário SNOT-22 , n ³	36 (09-74)	--

SNOT-22 (Sino-Nasal Outcome Test). IVAS (infecção de via aéreas superiores)

Valores apresentados em ¹média ± desvio padrão; ²número (porcentagem);

³média(mínimo-máximo); -- Não coletado.

5.2 Comparação entre os grupos

5.2.1 Abundância relativa – fillos

A abundância dos principais fillos encontrados nos grupos pode ser observada na Tabela 2 e na Figura 1 (fillos por grupo) e Figura 2 (fillos por participante). O principal

filo observado no grupo controle foi Actinobacteria ($50,431 \pm 7,128$ – valor apresentado em média e desvio padrão), o qual apresentou significância estatística em relação ao grupo RSCcp ($16,213 \pm 6,079$ – $p < 0,05$, valor apresentado em média e desvio padrão), e o segundo filo mais abundante no grupo controle foi Firmicutes ($33,218 \pm 9,310$ - valor apresentado em média e desvio padrão). No grupo RSCcp, o filo mais abundante foi Proteobacteria (41,209%), seguido de Firmicutes ($36,459 \pm 8,714$ - valor apresentado em média e desvio padrão).

Tabela 2: Filos bacterianos observados entre os grupos.

Filos	Média ± desvio padrão		Comparação entre os grupos		
	RSCcp (n=22)	Controle (n=16)	Wald	P	B
Actinobacteria	16,213 ± 6,079	50,431 ± 7,128	13,374	<0,05*	34,218
Bacteroidetes	5,009 ± 2,024	0,556 ± 2,373	2,037	0,153	4,453
Firmicutes	36,459 ± 8,714	33,218 ± 9,310	0,065	0,799	3,240
Proteobacteria	41,209 ± 12,233	15,275 ± 5,317	3,780	0,052	25,934

RSCcp (rinosinusite crônica com polipose); Wald (Qui quadrado de Wald); * Significância confirmada pelo pós-teste de Sidak.

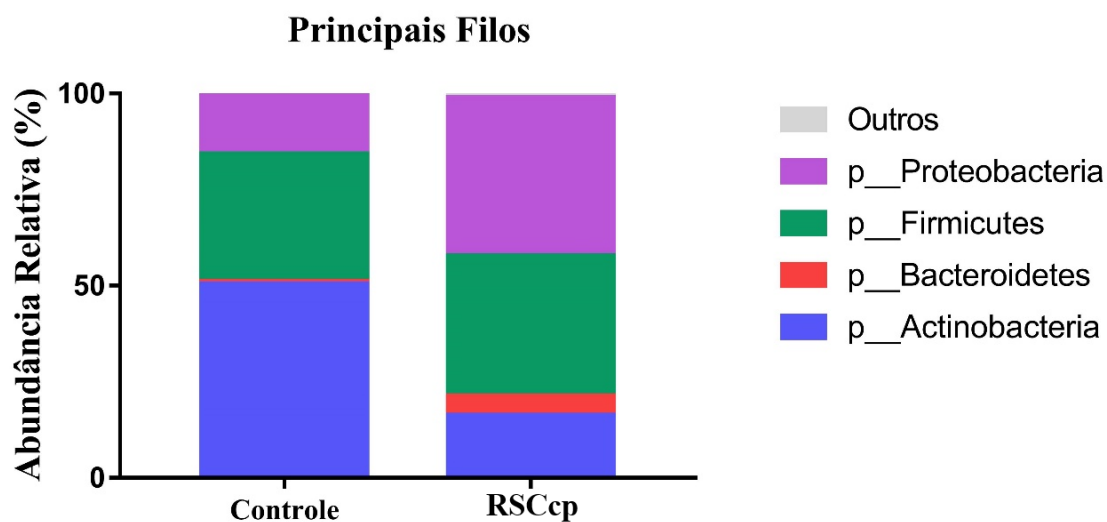


Figura 1: Principais filos encontrados nos grupos

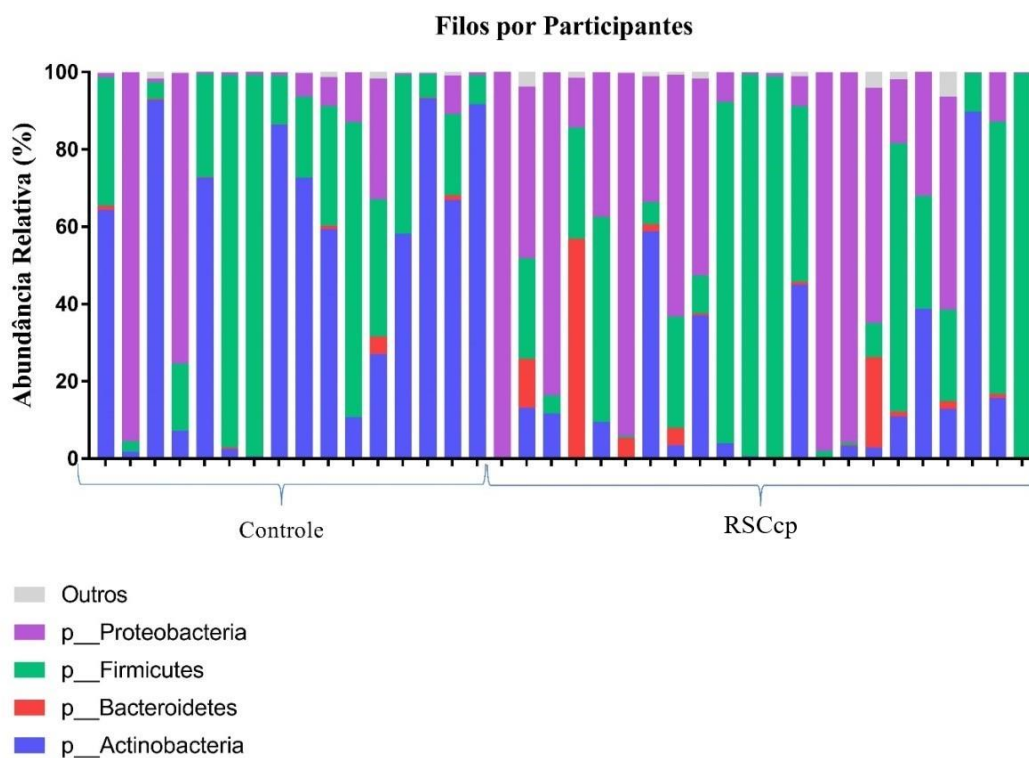


Figura 2: Distribuição dos principais filos entre os participantes

5.2.2 Abundância relativa – gêneros

Em relação aos principais gêneros observados, os resultados podem ser observados na Tabela 3 e na Figura 3 (filos por grupo) e Figura 4 (filos por participante). O principal gênero presente no grupo controle foi *Corynebacterium* ($48,581 \pm 7,727$ - valor apresentado em média e desvio padrão), o qual apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo RSCcp ($14,586 \pm 5,082$ - $p < 0,05$, valor apresentado em média e desvio padrão). O mapa de calor permite uma boa representação desta diferença, no topo da Figura 5 é possível ver o contraste de cor das células que representam *Corynebacterim* nos grupos controle e RSCcp. O segundo gênero mais abundante no grupo controle foi *Staphylococcus* ($21,118 \pm 6,926$ - valor apresentado em média e desvio padrão). No grupo RSCcp o gênero mais abundante foi *Staphylococcus*

(20,427 \pm 5,873 - valor apresentado em média e desvio padrão), seguido do gênero *Haemophilus* (16,640 \pm 4,871 - valor apresentado em média e desvio padrão), o qual apresentou valores quase estatisticamente significativos em relação ao grupo controle (03,031 \pm 5,046 – p= 0,052, valor apresentado em média e desvio padrão).

Tabela 3: Gêneros bacterianos observados entre os grupos

Gêneros	Média \pm desvio padrão		Comparação entre os grupos		
	RSCcp (n=22)	Controle (n=16)	Wald	P	B
<i>Corynebacterium</i>	14,586 \pm 5,082	48,581 \pm 7,727	13,509	<0,05*	33,995
<i>Prevotella</i>	2,945 \pm 1,904	0,093 \pm 2,233	0,944	0,331	2,852
<i>Staphylococcus</i>	20,427 \pm 5,873	21,118 \pm 6,926	0,006	0,939	0,691
<i>Alloiococcus</i>	2,604 \pm 1,626	5,106 \pm 1,953	0,968	0,325	2,502
<i>Streptococcus</i>	9,531 \pm 3,364	2,037 \pm 3,674	2,263	0,133	7,494
<i>Neisseriaceae</i>	2,827 \pm 1,318	0,506 \pm 1,546	1,305	0,253	2,321
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,677 \pm 2,017	5,325 \pm 2,474	2,119	0,145	4,648
<i>Klebsiella</i>	4,331 \pm 3,206	0,006 \pm 3,759	0,766	0,381	4,326
<i>Haemophilus</i>	16,640 \pm 4,871	03,031 \pm 5,046	3,765	0,052	13,610
<i>Moraxella</i>	3,681 \pm 2,053	3,181 \pm 2,395	0,025	0,874	0,005
<i>Pseudomonas</i>	6,063 \pm 2,487	0,125 \pm 2,753	2,562	0,109	5,939

CRS (rinossinusite crônica com polipose); Wald (Qui quadrado de Wald); * Significância confirmada pelo pós-teste de Sidak.

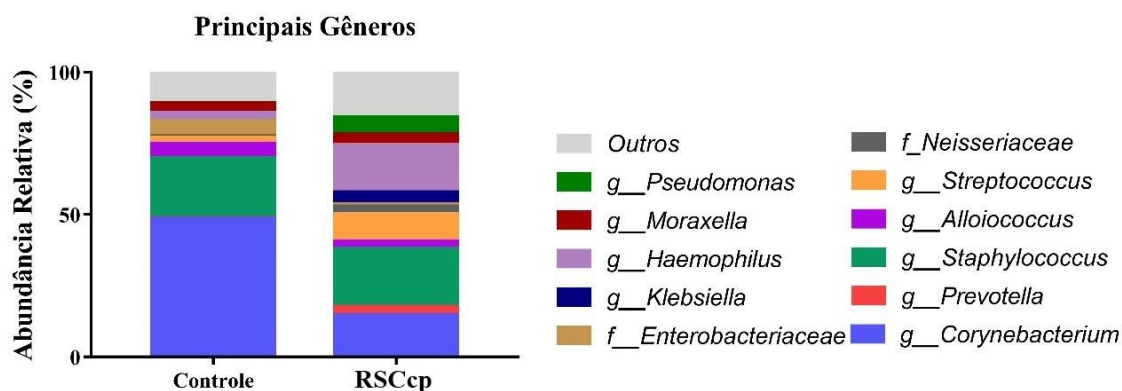


Figura 3: Principais gêneros encontrados nos grupos

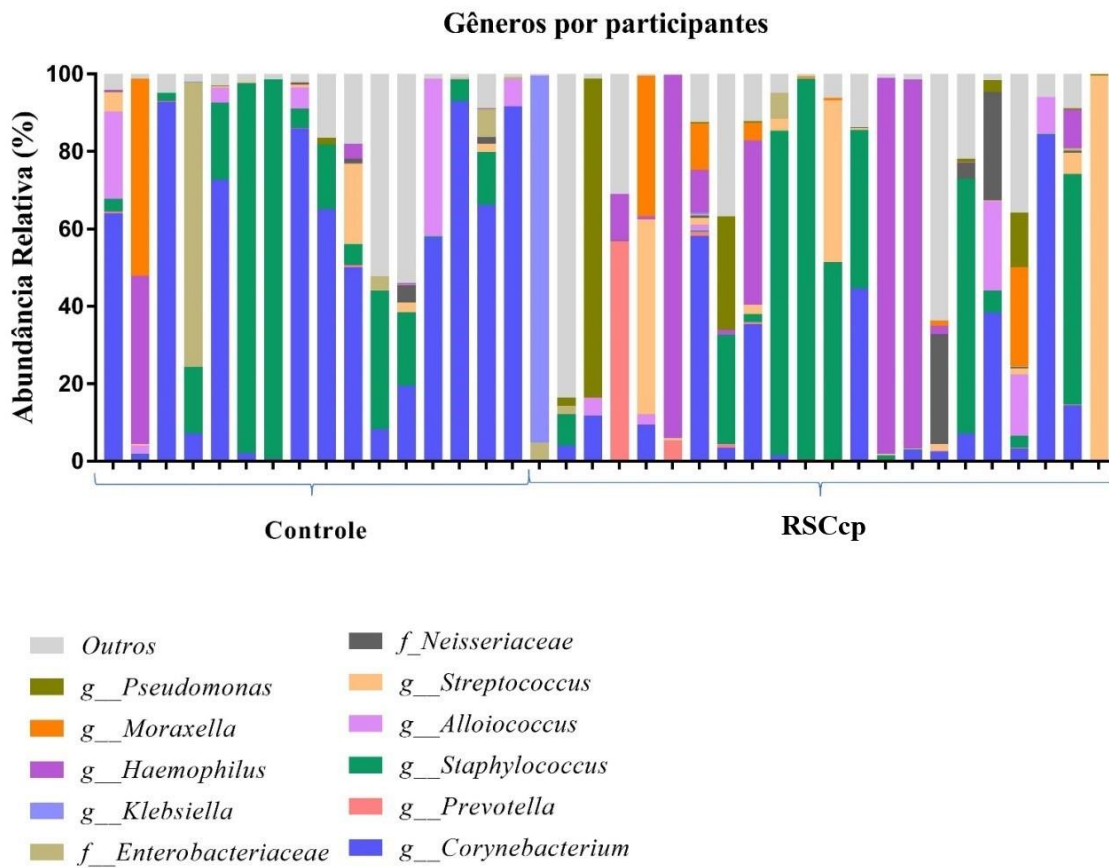


Figura 4: Distribuição dos principais gêneros entre os participantes

Principais gêneros nos grupos

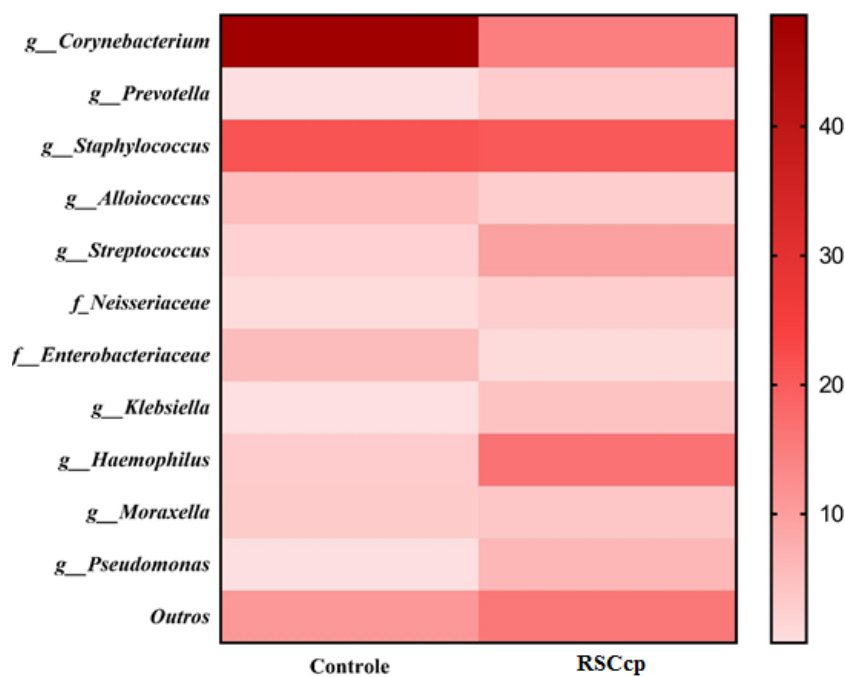


Figura 5: Heatmap contendo os principais gêneros encontrados entre os grupos

A Figura 6 contém a prevalência cumulativa dos principais gêneros observados nos grupos (*Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Moraxella*). Neste gráfico é possível constatar que nos controles, *Corynebacterium* e *Staphylococcus* apresentam prevalência cumulativa de cerca de 70% e a partir desse ponto há uma inflexão de modo a apresentar variação constantemente pequena a medida que se adiciona os demais gêneros mais prevalentes.

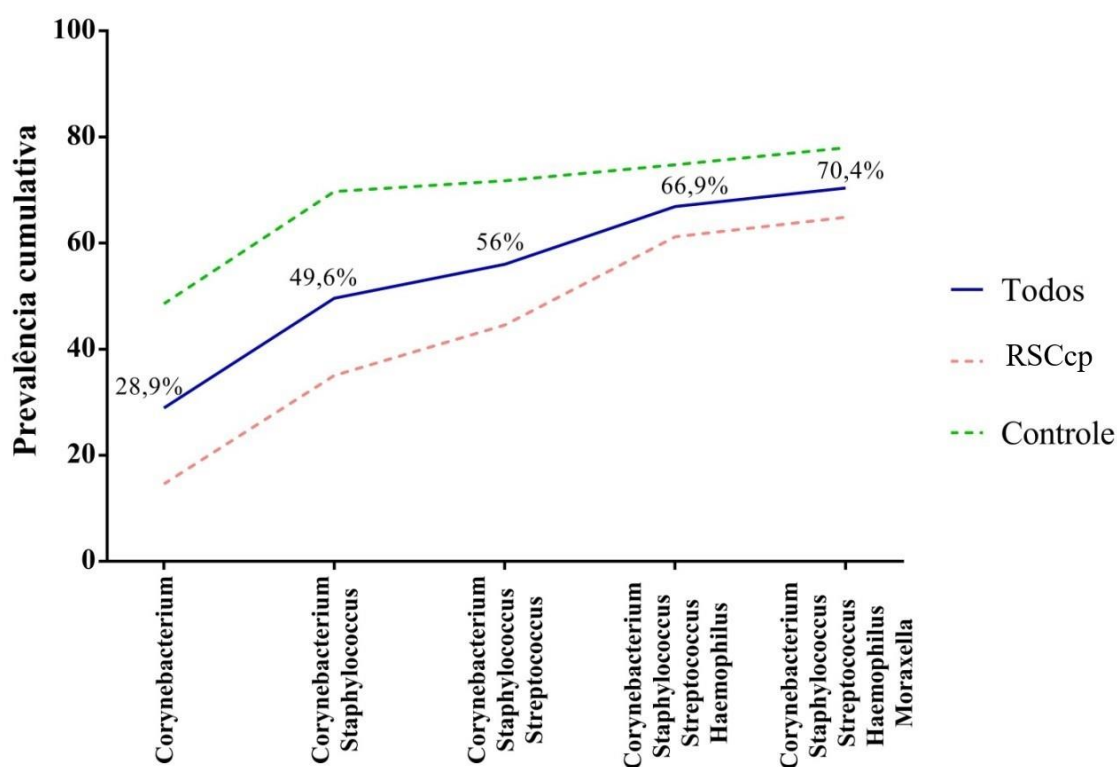


Figura 6: Prevalência cumulativa dos principais gêneros nos grupos

5.2.2 Alfa diversidade

Os resultados da comparação dos índices de alfa diversidade entre os grupos (Chao1, Shannon, Simpson e número de OTUs observadas) podem ser observados na Tabela 4 e na Figura 7. O grupo RSCcp apresentou maior riqueza, como observado no estimador de riqueza Chao1 ($645,298 \pm 67,691$ – valor apresentado em média e desvio padrão) em relação ao grupo controle ($540,668 \pm 66,505$ – valor apresentado em média e desvio padrão). Adicionalmente, o grupo RSCcp também apresentou valores discretamente mais elevados no índice de diversidade de Shannon ($2,165 \pm 0,189$ – valor apresentado em média e desvio padrão) e no número de OTUs ($492,227 \pm 59,090$ – valor apresentado em média e desvio padrão); em contrapartida, o grupo controle apresentou valores mais elevados no índice de Simpson ($0,652 \pm 0,055$ – valor apresentado em média

e desvio padrão). Nenhuma das comparações entre os grupos em relação aos índices de alfa diversidade apresentaram significância estatística.

Tabela 4: Índices de alfa diversidade entre os grupos

Índices de diversidade	Média \pm desvio padrão		Comparação entre os grupos		
	RSCcp (n=22)	Controle (n=16)	Wald	<i>P</i>	<i>B</i>
Chao 1	645,298 \pm 67,691	540,668 \pm 66,505	1,216	0,270	104,630
Shannon	2,165 \pm 0,189	2,026 \pm 0,221	0,226	0,635	0,139
Simpson	0,650 \pm 0,047	0,652 \pm 0,055	0,000	0,982	0,002
Número de OTUs	492,227 \pm 59,090	372,750 \pm 52,471	2,286	0,131	119,477

OTU (Operational Taxonomic Unit); RSCcp (Rinossinusite crônica com polipose); Wald (Qui quadrado de Wald).

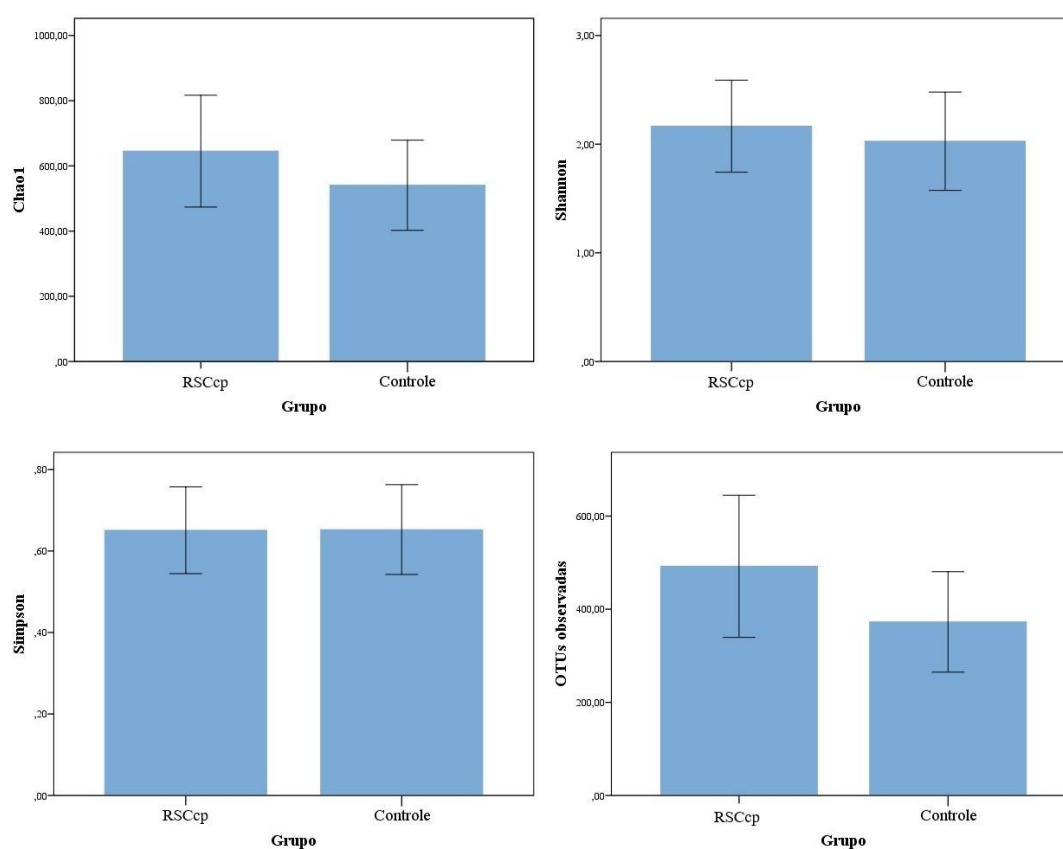


Figura 7: Índices de alfa diversidade entre os grupos

5.2.3 Beta diversidade

Os resultados em relação a beta diversidade, através da distância de Bray-Curtis, podem ser observados na Figura 8 – a, b e c. Podemos observar na Figura 8-a a comparação da beta diversidade em relação ao diagnóstico (comparação do grupo saudável com o grupo RSCcp). Na presente análise, não identificamos composição significativamente diferente entre os grupos ($R = 0,0024$ e $p = 0,442$). Na Figura 8-b podemos observar entre os grupos a comparação entre participantes com e sem asma, porém também não é possível identificar diferença na diversidade entre os grupos ($R = 0,0445$ e $p = 0,177$). Na Figura 8-c observamos a comparação entre participantes de ambos os grupos em relação ao tabagismo (fumantes, ex-fumantes e participantes que nunca foram tabagistas). Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($R = 0,0311$ e $p = 0,311$).

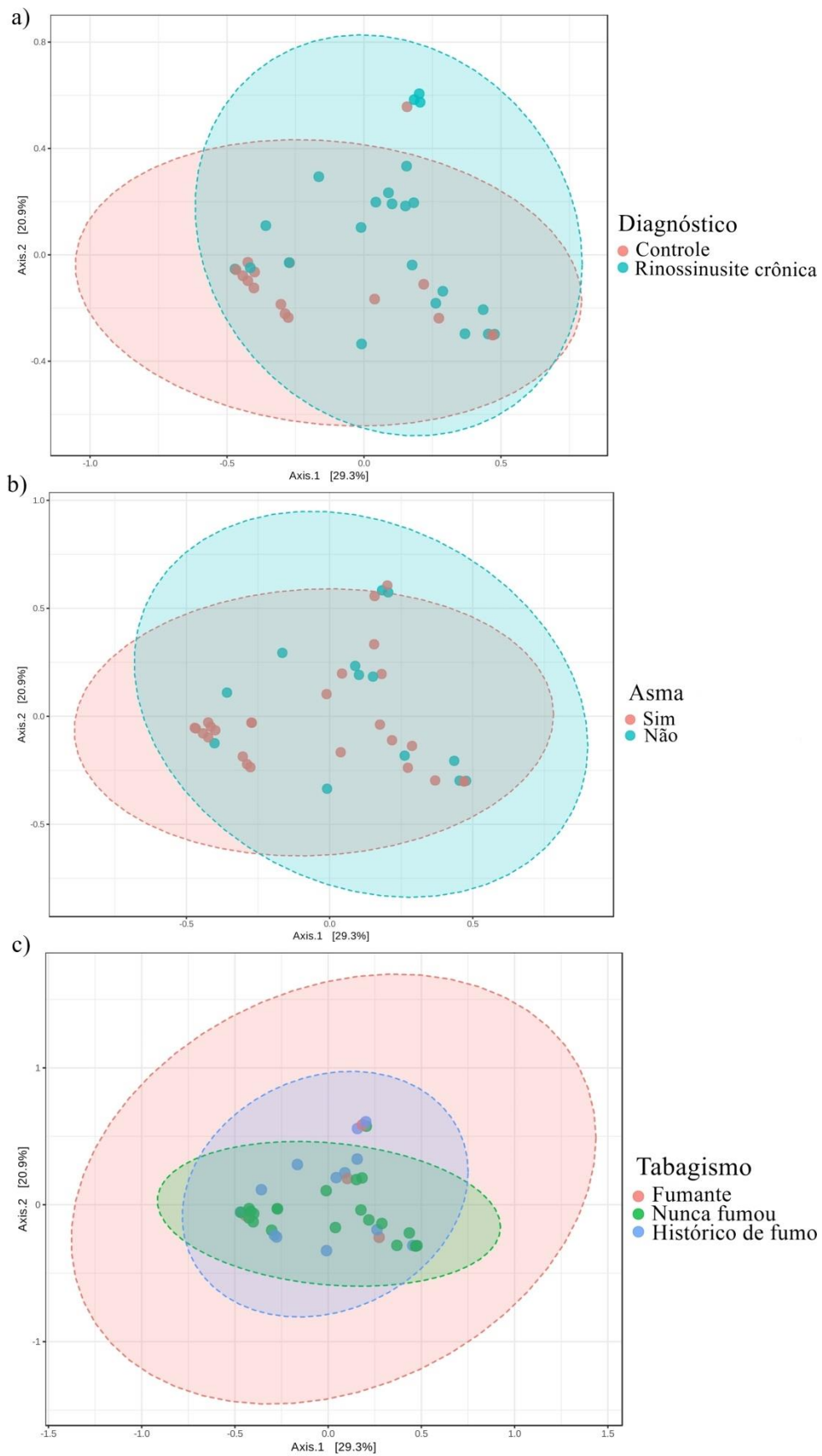


Figura 8: Beta diversidade entre os grupos

5.2.4 Abundância de filios e gêneros em subgrupos de pacientes com RSC

Sensibilidade à aspirina

A abundância de filios e gêneros nos pacientes do grupo RSCcp em relação à sensibilidade a aspirina pode ser observada na Figura 9. O principal filio observado nos participantes sensíveis a aspirina foi Proteobacteria (73%), seguido de Firmicutes (16%), enquanto que nos participantes não sensíveis a aspirina o principal filio observado foi Firmicutes (41%), seguido por Proteobacteria (34%). Em relação aos principais gêneros, o principal gênero observado no grupo sensível a aspirina foi *Haemophilus* (48,9%), seguido por *Streptococcus* (13,2%). No grupo não sensível a aspirina, o principal gênero observado foi *Staphylococcus* (24,9%), seguido por *Corynebacterium* (17%).

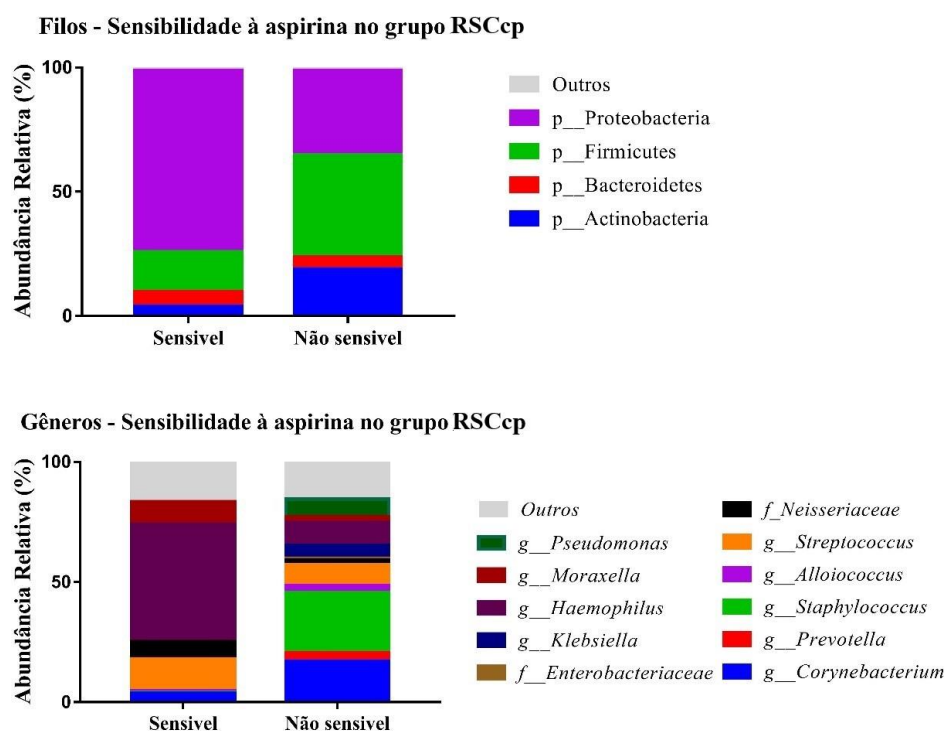


Figura 9: Principais filios e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação à sensibilidade a aspirina

Doença do refluxo gastroesofágico (DRGE)

A abundância de filos e gêneros nos pacientes do grupo RSCcp em relação à presença de refluxo gastroesofágico pode ser observada na Figura 10. O principal filo observado nos participantes com refluxo gastroesofágico foi Firmicutes (43,6%), seguido de Proteobacteria (42,2%), enquanto que nos participantes sem refluxo gastroesofágico o principal filo observado foi Proteobacteria (40%), seguido por Firmicutes (35%). Em relação aos principais gêneros, o principal gênero observado no grupo com refluxo gastroesofágico foi *Staphylococcus* (30,6%), seguido por *Haemophilus* (28,4%). No grupo sem refluxo gastroesofágico, o principal gênero observado foi *Staphylococcus* (17,4%), seguido por *Corynebacterium* (16,6%).

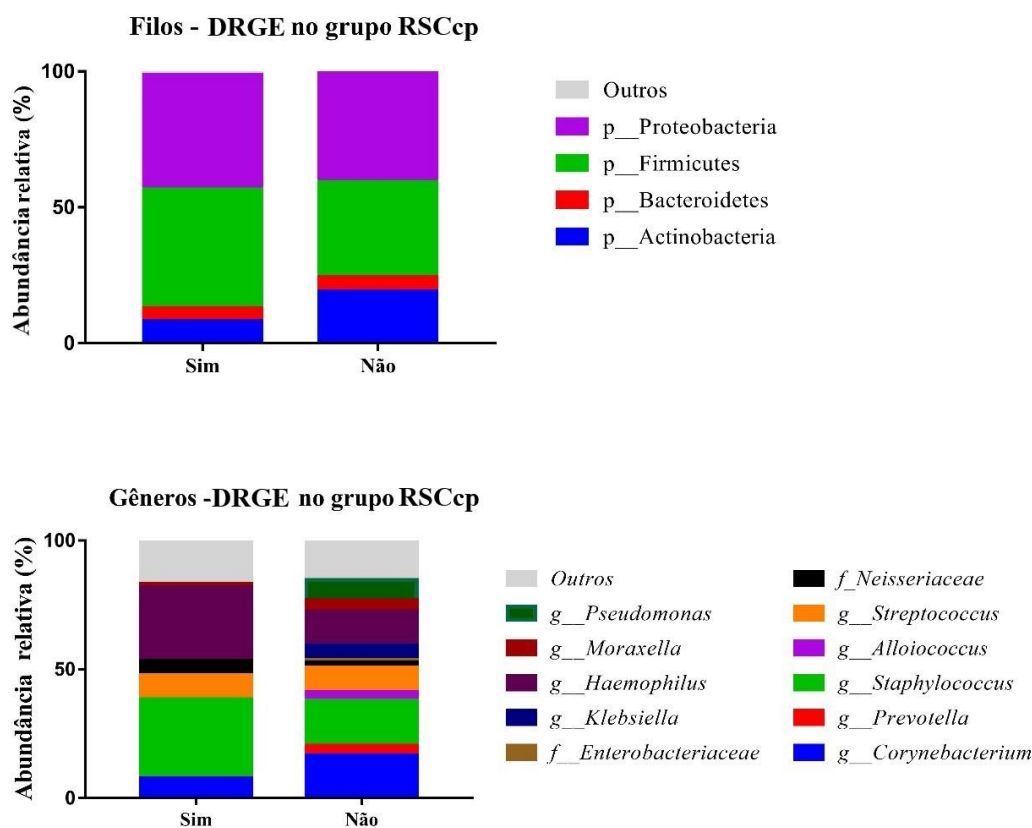


Figura 10: Principais filos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação à presença de refluxo gastroesofágico

Diabetes

A abundância de filos e gêneros nos pacientes do grupo RSCcp em relação à presença de diabetes pode ser observada na Figura 11. O principal filo observado nos participantes com diabetes foi Proteobacteria (71,9%), seguido de Firmicutes (18%), enquanto que nos participantes sem diabetes o principal filo observado foi Firmicutes (39,4%), seguido por Proteobacteria (36,4%). Em relação aos principais gêneros, o principal gênero observado no grupo com diabetes foi *Haemophilus* (32,8%), seguido por *Pseudomonas* (14,5%). No grupo sem diabetes, o principal gênero observado foi *Staphylococcus* (21,9%), seguido por *Corynebacterium* (16,5%).

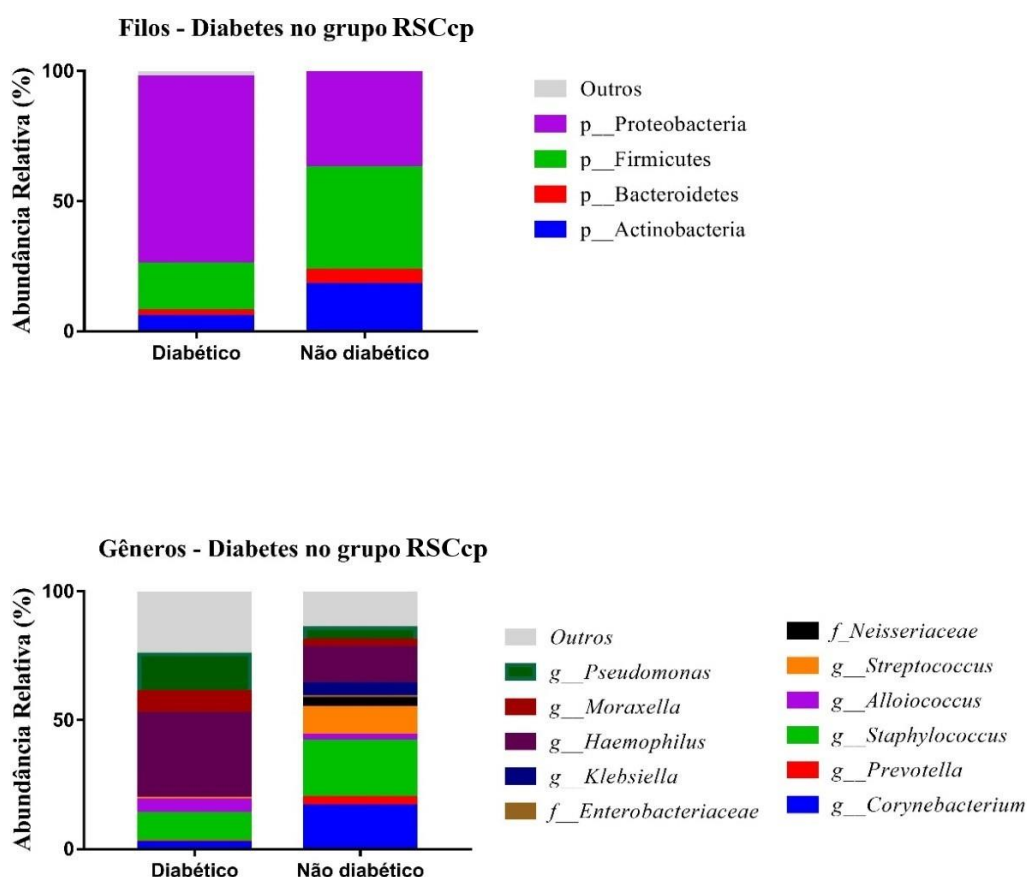


Figura 11: Principais filos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) que apresentavam diabetes.

Cirurgia prévia

A abundância de filos e gêneros nos pacientes do grupo RSCcp em relação à presença cirurgia nasossinusal prévia pode ser observada na Figura 12. O principal filo observado nos participantes que realizaram presença cirurgia foi Firmicutes (43,7%), seguido de Actinobacteria (30,8%), enquanto que nos participantes que não realizaram o principal filo observado foi Proteobacteria (32,6%), seguido por Firmicutes (32,3%). Em relação aos principais gêneros, o principal gênero observado no grupo que realizou cirurgia anterior foi *Staphylococcus* (34,6%), seguido por *Corynebacterium* (27%). No grupo que não realizou, o principal gênero observado foi *Haemophilus* (24,7%), seguido por *Streptococcus* (14,3%).

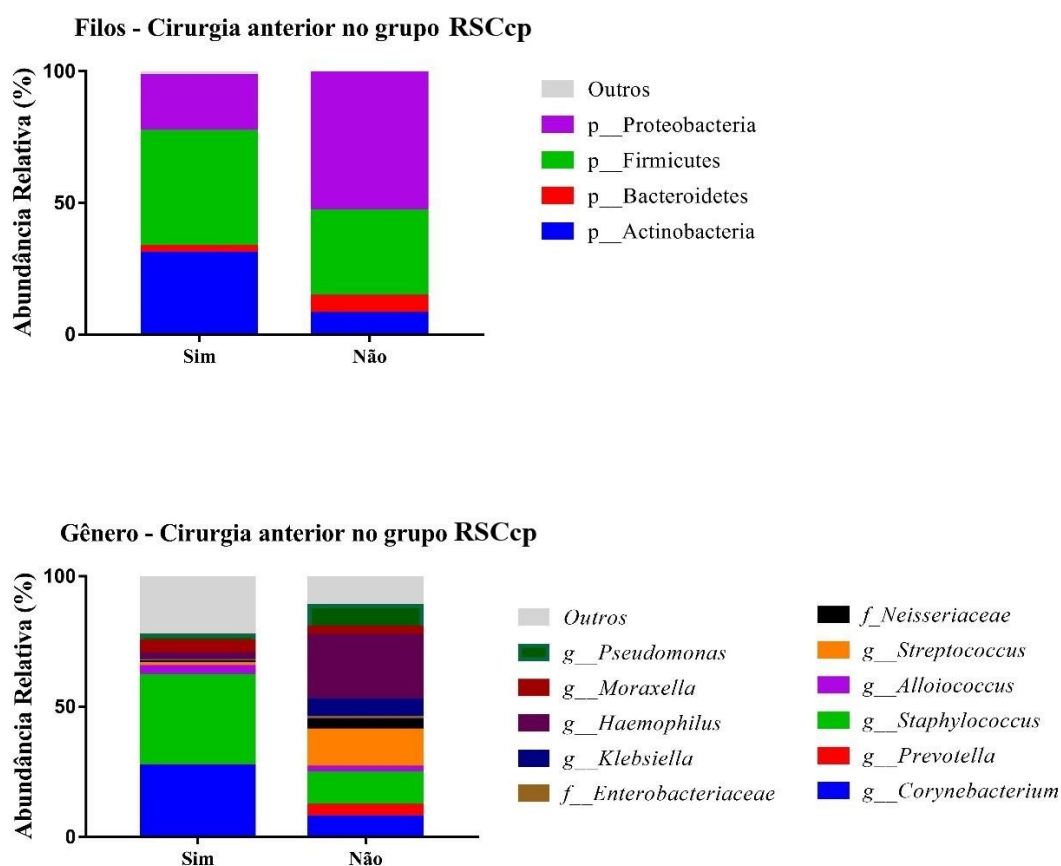


Figura 12: Principais filos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) que já haviam sido submetidos a procedimento cirúrgico.

Asma

A abundância de filos e gêneros nos pacientes do grupo RSCcp em relação à presença de asma pode ser observada na Figura 13. O principal filo observado nos participantes com asma foi Proteobacteria (42,1%), seguido de Firmicutes (40,1%), enquanto que nos participantes que não tinham asma o principal filo observado foi Proteobacteria (40,2%), seguido por Firmicutes (32,1%). Em relação aos principais gêneros, o principal gênero observado no grupo com presença de asma foi *Staphylococcus* (28,2%), seguido por *Haemophilus* (21,6%). No grupo sem asma, o principal gênero observado foi *Corynebacterium* (15,2%), seguido por *Pseudomonas* (13,2%),

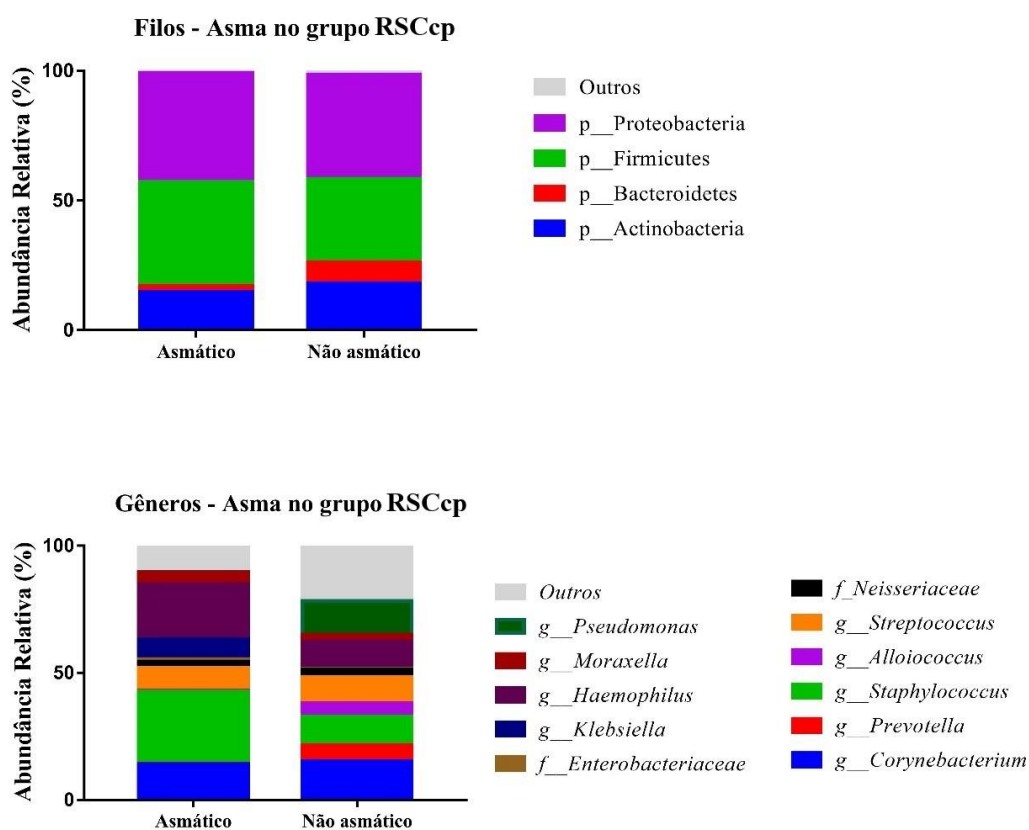


Figura 13: Principais filos e gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) que apresentavam asma

Tabagismo

A abundância de filós nos pacientes do grupo RSCcp em relação ao tabagismo pode ser observada na Figura 14. O principal filo observado nos participantes fumantes foi Proteobacteria (78,35%), seguido de Bacteroidetes (11,85%), nos participantes ex-fumantes o principal filo observado foi Firmicutes (33,6%), seguido por Proteobacteria (31,10%) e nos participantes que nunca fumaram o principal filo observado foi Firmicutes (45,71%), seguido de Proteobacteria (43,86%).

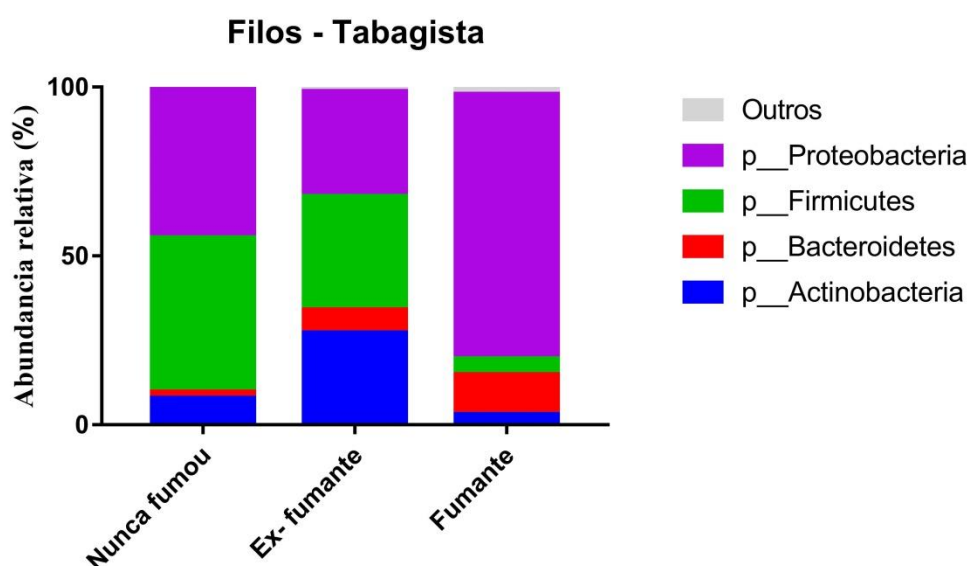


Figura 14: Principais filós encontrados nos participantes com rinosinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação ao tabagismo

A abundância de gêneros nos pacientes do grupo RSCcp em relação ao tabagismo pode ser observada na Figura 15. O principal gênero observado nos participantes fumantes foi *Haemophilus* (48,75%), seguido de *Neisseria* (14,20%), nos participantes ex-fumantes o principal filo observado foi *Corynebacterium* (25,07%), seguido por *Staphylococcus* (19,03%) e nos participantes que nunca fumaram o principal filo observado foi *Staphylococcus* (25,90%), seguido de *Streptococcus* (14,20%).

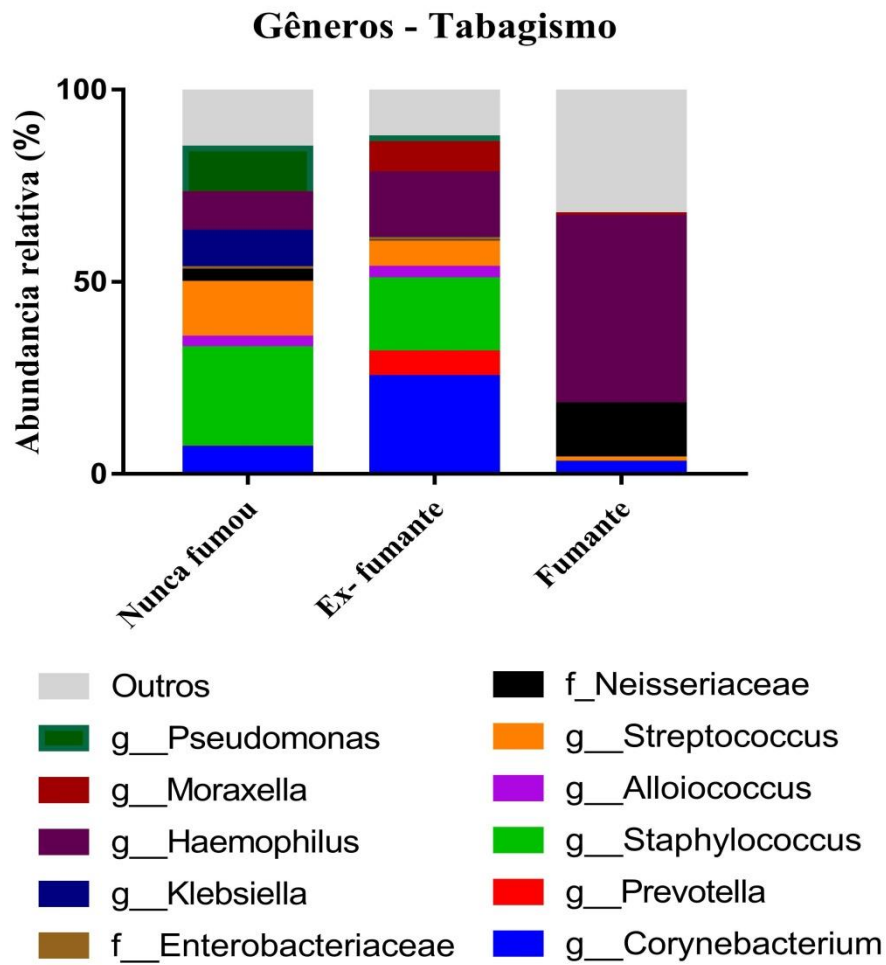


Figura 15: Principais gêneros encontrados nos participantes com rinossinusite crônica com polipose (RSCcp) em relação ao tabagismo

6. DISCUSSÃO

Estudos da microbiota intestinal demonstram a importância do equilíbrio da comunidade microbiana na manutenção de uma mucosa saudável e como a disbiose – uma perturbação deste balanço, pode contribuir para inflamação por meio de uma série de mecanismos^(4, 58, 59). Nas vias aéreas, o desbalanço do microbioma também se mostra um fator importante em doenças das vias inferiores, como em doenças obstrutivas pulmonares⁽⁶⁰⁾. A tentativa de caracterizar disbiose nas vias aéreas superiores está alinhada com conceitos fisiopatológicos modernos que levam em consideração o papel relevante que comunidades microbianas apresentam na homeostase do corpo humano.

As vias aéreas superiores, região anatômica responsável inicialmente por filtrar o ar inspirado do ambiente, são regiões aquecidas e umidificadas, características que as torna bastante susceptíveis para o crescimento de microrganismos. Os seios paranasais estão em contato com esta via, deste modo estão sujeitos a abrigar uma comunidade microbiana, assim como diversas outras superfícies corpóreas. Estudos baseados em cultura muitas vezes não conseguem demonstrar a presença de microrganismos residentes em cavidades paranasais saudáveis. Entretanto até 70% da flora das superfícies corpóreas podem não ser cultiváveis, sendo necessário técnicas moleculares de detecção para demonstrar a presença de uma flora residente^(61, 62). Estudos moleculares demonstraram a presença de microrganismos em seio esfenoidal, maxilar e etmoidal saudáveis^(38, 42). Neste estudo, de forma análoga, ao se utilizar uma técnica molecular de detecção, demonstra-se a presença uma flora bacteriana em meato médio saudável em 16 participantes. A afirmação de que os seios paranasais são estéreis^(63, 64) em condições de normalidade talvez mereça ser confrontada mais vezes com desenhos de estudo robustos

e técnicas moleculares. As novas metodologias parecem não corroborar o pensamento de ausência de flora residente nos seios paranasais. Até sítios anatômicos tidos definitivamente como estéreis, como o sistema nervoso central, estão sendo confrontados com as novas modalidades de detecção^(65, 66).

O microbioma encontrado no grupo sem rinosinusite apresentou dominância dos filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, com abundâncias relativas respectivamente de 50,4%, 33,2% e 15,3%. Este achado está em concordância com a metanálise de Wagner Mackenzie et al. que encontrou estes mesmos três filos dominantes ao reunir 5 estudos prévios de cavidade nasossinusal saudável⁽³¹⁾. Os autores chamam atenção para um estudo prévio com alta abundância de *Cyanobacteria* (>40% de abundância relativa)⁽³⁶⁾. De forma análoga, não encontramos a presença destes seres. Os autores da metanálise ressaltam que a diferença no relato de *Cyanobacteria* é provavelmente decorrente de metodologias diferentes em processamentos de sequenciamento e em base de dados taxonômicos, ressaltando a importância de se padronizar os protocolos em estudos de microbioma nasossinusal.

Analisando com uma resolução filogenética maior, encontrou-se neste estudo a dominância dos gêneros *Corynebacterium* e *Staphylococcus*, com abundâncias relativas respectivamente de 48,6% e 21,1% no grupo controle. Estes achados são similares a Hoggard et al. em 2017 cujos 29 controles também foram dominados por estes mesmos 2 gêneros, ficando a abundância relativa dos gêneros *Streptococcus*, *Moraxella* e *Haemophilus* em níveis menores. O grupo controle de Gan et al. em 2019 também apresentou como maiores abundâncias relativas os *Corynebacterium* (20,35%) e *Staphylococcus* (18,03%). Interessante ressaltar em nosso achado o grau de inflexão que a curva de prevalência cumulativa destes dois gêneros descreve na figura 6 no grupo controle. Com uma prevalência combinada de cerca de 70% nos indivíduos com seios

saudáveis, pode-se inferir que trata-se de dois grupos taxonômicos típicos nesta coorte de participantes. Esta alta prevalência sugere relevância no papel comensal destes seres no meato médio.

Todos estes achados são consistentes com anos de estudos baseados em culturas de via aérea⁽⁶⁷⁾. Estudos com detecção molecular envolvendo os demais sítios anatômicos da via aérea corroboram a presença destes grupos, principalmente em comunidades da nasofaringe onde encontra-se representação significativa de *Corynebacterium*, *Propionibacterium* e *Staphylococcus*⁽⁶⁸⁾. A semelhança maior com a nasofaringe talvez seja pelo fato de secreções do meato médio drenarem para esta região. Nas demais áreas, como orofaringe, laringe e pulmão há presença significativa de *Prevotella*⁽⁶⁸⁾, gênero com abundância relativa baixa nos estudos da cavidade nasossinusal, característica também corroborada pelos achados em nossos controles. Interessante ressaltar que o microbioma pulmonar em indivíduos saudáveis parece se assemelhar mais ao microbioma da cavidade oral do que nasossinusal. A ocorrência já documentada de microaspirações em indivíduos saudáveis associado ao fato de o fluxo salivar normalmente ser maior do que o fluxo de secreções nasais poderia explicar este achado⁽⁶⁷⁾.

Os filos mais representativos dos pacientes com rinosinusite com polipose nasal deste estudo: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*, também apresenta concordância com achados prévios de outros autores. A ordem decrescente de abundâncias relativas em publicação de Gan et al. em 2019, que incluiu apenas pacientes com polipose nasal, mostram os mesmos filos nestes indivíduos: *Firmicutes* (48,15%), *Actinobacteria* (27,78%), *Proteobacteria* (16,20%) e *Bacteroidetes* (3,42%)⁽⁵²⁾. O padrão de filos é semelhante a metanálise de Wagner Mackenzie et al. de 2017⁽³¹⁾, e também a diversos outros estudos posteriores a esta publicação^(39, 49, 50, 69), mesmo não se estratificando os pacientes quanto a presença de pólipos nasais.

Ao se considerar os gêneros na RSCcp, este estudo encontrou em ordem decrescente de abundância relativa *Staphylococcus*, *Haemophilus* e *Corynebacterium*, mas com depleção significativa destes últimos na comparação com os controles (tabela 3). Uma depleção do mesmo gênero na RSC também foi encontrada em estudos recentes de Hoggard et al. 2017, Mahdavinia et al. 2018 e Gan et al. 2019^(49, 52, 69). Entretanto, a metanálise de Wagner Mackenzie et al. que reuniu estudos até 2016, relata associação entre *Corynebacterium* e rinosinusite crônica. Esta aparente discordância pode ter ocorrido devido a alguns fatores, dentre eles diferenças metodológicas e heterogeneidade da rinosinusite crônica. A principal plataforma de sequenciamento utilizada pelos estudos contidos na metanálise foi 454 GS-FLX Roche/Life Sciences ao passo que nos estudos mais recentes há preponderância do uso de plataformas *Illumina*. Entretanto, o uso de diferentes plataformas não parece ter influência nos resultados biológicos, apesar de relatos em diferenças na análises de amostras^(70, 71). No estudo de Hoggard et al. cujo resultado evidencia depleção de alguns gêneros na RSC, entre eles *Corynebacterium*, o grupo de rinosinusite era composto por casos de doença extensa e bilateral com indicação cirúrgica, na maior parte contendo pólipos nasais além de prevalência significativa de asma⁽⁴⁹⁾. O estudo de Gan et al. 2019 incluiu apenas indivíduos com polipose nasal em seu grupo de casos, encontrando depleção significativa de *Corynebacterium* e *Dolosigranulum* na RSCcp⁽⁵²⁾. Entretanto, a presença ou não de pólipos teve influência limitada em alguns cenários, segundo Hoggard et al. apenas 7% da variabilidade nas comunidades poderia ser atribuída a presença de polipose nasal em seu estudo, enquanto asma poderia ser responsável por 7,8% da variabilidade das comunidades⁽⁴⁹⁾. Corroborando a limitação da influência de pólipos Lal et al. em 2017 e Mahdavinia et al. 2018 demonstram depleção significativa de *Corynebacterium* também em indivíduos com rinosinusite crônica sem polipose nasal^(69, 72).

O gênero *Corynebacterium*, grupo de bacilos gram-positivos, é formado por diversas espécies relevantes do ponto de vista médico⁽⁴⁸⁾. Alguns membros aparentam ter comportamento comensal na pele e via aérea^(48, 73). Há ainda estudo implicando *C. tuberculostearicum* na patogênese de RSC⁽³⁵⁾. Entretanto, outras espécies parecem ser benéficas, como demonstrado por atividade anti-pneumocócica exibida pelo *C. accolens* nasal⁽⁷⁴⁾. Além disso, estudo prévio mostrou que uma abundância relativa aumentada do gênero *Corynebacterium* no momento da cirurgia endoscópica endonasal estava associada a um desfecho melhor do procedimento⁽⁷⁵⁾. Observa-se ainda que perfis de microbiota com certo domínio de *Corynebacterium spp* parecem conferir efeito protetor em crianças contra infecções respiratórias diversas⁽⁷⁶⁾. Estes achados corroboram a hipótese da presença de espécies ou cepas benéficas para as comunidades microbianas da via aérea.

O gênero com a maior abundância relativa no grupo RSCcp, ocupado por *Staphylococcus*, não causa surpresa. Apesar de conter espécies com atividade comensal e ocupar posição relevante nos controles, outros integrantes com potencial virulento, como *Staphylococcus aureus*, já foram implicadas em diversos aspectos da patogênese das RSC. Os estudos baseados em cultura apontam como uma das espécies mais encontradas, em concordância com o achado de seu gênero utilizando as técnicas moleculares⁽⁷⁷⁾. Diversas investigações de seu papel na formação de biofilmes, produção de superantígenos e evasão do sistema imune tentam elucidar o seu papel nas RSC^(78, 79). Já se demonstrou que o comportamento virulento de *Staphylococcus aureus*, pode se modificar na presença de espécies de *Corynebacterium*. O *S. aureus* exposto a *C. striatum* se comporta de maneira a refletir atitude comensal, ao exibir aumento de adesividade epitelial, e cursa com diminuição de virulência, ao reduzir atividade de hemolisina⁽⁸⁰⁾. A administração nasal de espécies de *Corynebacterium* foi capaz de erradicar *S. aureus* em

71% dos pacientes, ao passo que a administração de soro ou inoculação com *S. epidermidis* não demonstrou a mesma eficácia⁽⁸¹⁾. Há possibilidade do *S. aureus* exercer um papel duplo na cavidade nasossinusal, ligando e desligando genes que conferem virulência conforme o microambiente em que se insere.

Existem várias métricas de diversidade alfa, de forma geral esta abordagem se refere a quais e quantos OTUs ou grupos taxonômicos existem dentro da mesma amostra ou dentro de um ambiente em particular, fornecendo um parâmetro da biodiversidade dentro da amostra⁽²⁸⁾. A diversidade beta avalia amostras distintas, expressa uma comparação de comunidades entre amostras diferentes⁽²⁸⁾. Há tendência em se encontrar uma redução na diversidade das comunidades bacterianas na RSC em relação aos indivíduos saudáveis. No entanto, a diversidade alfa não apresenta diferença estatisticamente significativa em alguns estudos de microbioma nasossinusal^(51, 52, 82). Isto ocorreu, de forma análoga, nas análises de diversidade alfa deste estudo, mesmo aplicando diferentes métricas de diversidade e riqueza, como Chao1, índices de Shannon e Simpson, além da contagem de OTUs, não houve significância estatística (Tabela 4 e Figura 7). A análise de diversidade beta entre os 2 grupos e para características como asma e tabagismo também não mostrou diferença com significância estatística. Tal achado pode ser reflexo de número amostral pequeno, mas também pode indicar que abordagem com tais métricas não reflitam características aberrantes de comunidades disbióticas nasossinusais. Há proposição de abordagens que evoluam, além de descrições de diversidade, análises de fragmentação das comunidades, predição funcional e discriminação linear para descoberta de biomarcadores⁽⁸³⁾. O emprego destas novas abordagens pode revelar diferenças subjacentes e relevantes, não contempladas pelos índices de diversidade.

A presença de asma e intolerância a aspirina são condições associadas a pior prognóstico dos pacientes com RSC, habitualmente estão ligadas a quadros com piores escores de qualidade de vida, formação de pólipos nasais de forma recidivante e pior controle de doença ao longa da vida. A exploração da microbiota com técnicas moleculares nestes subgrupos pode fornecer intuições relacionadas a mecanismos que colaboram para o pior desempenho do tratamento destes indivíduos. A variação na composição das comunidades de RSC de parece sofrer influência maior da presença de asma do que a presença de pólipos⁽⁴⁹⁾. Neste estudo encontrou-se *Staphylococcus* e *Haemophilus* com as maiores abundâncias relativas nos pacientes asmáticos (Figura 13). Embora esta associação não apresente significância estatística, o aumento de espécies patogênicas no gênero *Staphylococcus* com a concomitante queda de germes comensais (ex. *Corynebacterium*) poderia a princípio colaborar para dificuldades no tratamento destes indivíduos. A investigação de como a asma poderia influenciar as comunidades microbianas e, de forma análoga, como os microrganismos modulam a resposta imune pode contribuir de forma significativa para novas estratégias de tratamento neste subgrupo de pacientes.

Indivíduos com intolerância a aspirina tipicamente apresentam RSC com padrão tecidual apresentando infiltrado com eosinófilos e caráter recidivante, necessitando muitas vezes de cirurgias de repetição. A presença de eosinofilia tecidual e grau de inflamação da mucosa sinusal não apresentou associação específica com a abundância relativa média de determinado gênero em estudo recente, mas riqueza e diversidade decresceram com aumento de eosinofilia tecidual e grau de inflamação mucosa⁽⁸⁴⁾.

Há descrição de ampla série de filotipos associados a um estado de disbiose da mucosa nasal, com comunidades aberrantes apresentando principalmente *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Fusobacterium*. Encontrou-

se gêneros semelhantes no grupo RSCcp quando estratificados por presença de intolerância a aspirina e cirurgias sinusais prévias. Estas duas condições podem representar indivíduos com estado basal de inflamação tecidual mais elevado, com potencial para abrigar algum microbioma típico. No entanto, tentativa prévia de se associar a dominância específica de determinado grupo taxonômico com características fenotípicas e endótipos de RSC não encontrou um padrão específico de comunidade⁽⁴⁹⁾.

O contato com irritantes nasais, como poluição e tabagismo são de forma intuitiva potenciais fatores que poderiam contribuir para disbiose bacteriana nasossinusal. Estudo transversal que avaliou o efeito do cigarro no microbioma do meato médio encontrou diferença com significância estatística no nível gênero para pacientes com RSCsp⁽⁸⁵⁾. Entretanto, para pacientes com polipose e apenas no nível filo, composições diferentes de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* e *Proteobacteria*, foram encontradas em indivíduos que nunca fumaram em comparação com tabagistas e ex-tabagistas na investigação citada. Estes mesmos grupos taxonômicos são encontrados nos tabagistas e ex-tabagistas de nossa amostra (Figura 14), exceto por *Fusobacteria*. Apesar de diversos estudos avaliarem o impacto do tabagismo no microbioma, revisão recente ressalta que uma explicação adequada do impacto do cigarro na microbiota da via aérea ainda precisa ser estabelecida⁽⁸⁶⁾. Os efeitos verdadeiros do tabagismo se encontram em fase de investigação exploratória e dependentes de pesquisa básica na área.

A limitações impostas na resolução filogenética pelo sequenciamento de áreas curtas do genoma restringem conclusões a cerca das comunidades bacterianas em estudos de microbioma. A identificação da proporção das espécies, principalmente nos gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium* poderia fornecer uma melhor compreensão do balanço destas comunidades. A depleção de *Corynebacterium* na RSCcp precisa ser analisada com cautela, mas pode refletir um papel protetor de algumas espécies deste

gênero. De forma análoga a substituição por espécies com alto potencial virulento, como *S. aureus* poderia ser avaliada com melhora da acurácia de identificação de cada microrganismo. Os sequenciamentos de porções maiores do genoma com plataformas diferentes visando identificação das espécies já estão sendo utilizados em estudos de microbioma nasossinusal⁽⁸⁷⁾. Outra estratégia descrita recentemente visando melhorar a resolução filogenética é a associação pareada de PCR quantitativo, sequenciamento de regiões curtas e novos primers⁽⁸⁸⁾.

O caráter exploratório de grande parte das pesquisas de microbioma nasossinusal deve migrar para análises funcionais das comunidades e como estas se relacionam com a imunologia do hospedeiro, esta abordagem pode elucidar mecanismos importantes na patogênese das RSC. Avaliação concomitante de produtos do metabolismo do microbiota pode influenciar a fisiologia do hospedeiro, moldar a dinâmica das comunidades e estão envolvidas tanto em estados de saúde quanto de doença⁽⁸⁹⁾.

Estudos de microbioma precisam ser reprodutíveis e comparáveis. A falta de padronização de coleta e de extração de ácidos nucleicos, além de escolha de primers e regiões a serem amplificadas, associados a uso de plataformas distintas de sequenciamento podem contribuir para resultados distintos. A metodologia empregada neste estudo se baseou em padronização internacional, ainda em fase de publicação, o que possibilita a comparação com outros centros e pode contribuir para uma caracterização mais fidedigna do microbioma nasossinusal.

7. CONCLUSÃO

O microbioma do meato médio dos pacientes com rinosinusite com polipose nasal avaliados pelo estudo apresentam predomínio dos gêneros *Staphylococcus*, *Haemophilus* e *Corynebacterium*.

O microbioma do meato médio nos participantes controles avaliados pelo estudo apresenta predomínio dos gêneros *Corynebacterium* e *Staphylococcus*.

Encontrou-se depleção significativa de *Corynebacterium* nos pacientes com rinosinusite com polipose nasal na comparação com os controles.

As métricas de diversidade: Chao1, índice de Simpson, índice de Shannon e distâncias de Bray-Curtis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Os filos com maiores abundâncias relativas nos participantes com rinosinusite crônica com polipose nasal e asma foram *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Em relação aos gêneros, as maiores abundâncias relativas foram *Staphylococcus* e *Haemophilus*.

QUESTIONÁRIO CONTROLE – ANEXO A**Etiqueta****Controle****Data:** _____

Obrigado por aceitar fazer parte deste estudo. A informação abaixo é importante e nos ajudará a gerenciar melhor os pacientes com problemas de sinusite no futuro. A pesquisa é totalmente voluntária. Responder ou não a pesquisa não afetará o atendimento médico que recebe. Os seus dados serão tratados com o maior sigilo. Por favor, responda a todas as perguntas da melhor forma possível. Informe seu médico se há alguma coisa que você não entende ou que você não possa responder

Questões culturais

1. Por favor, indique a sua origem racial (opcional) _____
2. Em que país você nasceu? _____
3. Em que país seus pais nasceram? Mãe Pai _____
4. Em que país você viveu a maior parte de sua vida? _____

História de Doença Nasossinusal – Por favor marque

1. Você já foi diagnosticado como tendo sinusite?
 - Não
 - Sim
2. Você normalmente tem problemas de sinusite? (Selecione um e indicar frequência em caso afirmativo)
 - Não
 - Sim
 - Uma vez em um ano 2 vezes / ano 3 vezes / ano
 - 4-6 vezes / ano Mais de 6 vezes / ano Quase o tempo todo
3. Você está atualmente enfrentando algum dos seguintes sintomas de sinusite? (Assinale todas que se aplicam)
 - Dores de cabeça ou dor facial / pressão / plenitude
 - Corrimento nasal (a partir da parte da frente do nariz)
 - Corrimento pós-nasal (a partir da parte de trás do nariz em direção a sua garganta)
 - Congestão nasal ou dificuldade em respirar pelo nariz
 - Redução de capacidade de cheirar coisas
 - Nenhum dos sintomas acima
4. Há quanto tempo você tomou seu último (por favor responda para cada um dos três grupos de drogas)
 - Antibióticos dias atrás semanas atrás meses atrás
 - Comprimidos corticosteroides (como a prednisolona) dias atrás semanas atrás meses atrás
 - Sprays de corticosteroides ou lavagens (Busonid, Noex, Nasonex, Avamys, Pulmicort) dias atrás semana atrás meses atrás

- Por favor, também listar qualquer outra medicação que você tomou durante o último mês:

- _____
- _____
- _____
- _____

5. Você já operou (cirurgia) seu nariz antes?

- Sim Não

6. Quantas cirurgias (no ou através do nariz) você já fez no passado? _____

Detalhes de cirurgias de nariz anteriores (se houver):

7. Qual das seguintes condições que você tem? (Assinalar se Sim ou Não)

- Asma Sim Não
- Diabetes Sim Não
- A fibrose cística Sim Não
- doença do refluxo Sim Não
- Aspirina hipersensibilidade / alergia Sim Não
- Alguma alergia a algum medicamento (por favor indique)

Outras doenças: _____

8. Você tem outras reações alérgicas, por exemplo ao pólen, poeira ou animais? (Por favor indique)

9. Você fuma? (Por favor selecione e complete os espaços em branco conforme necessário)

Nunca fumei

Ex Fumante – última vez que fumei _____ atrás

Atualmente Fumo _____ (número de cigarros) por dia por _____ anos

10. Você está exposto a quaisquer produtos químicos / fumo / fumante passivo/ substâncias tóxicas em seu trabalho ou ambiente diário?

- Sim Não Não tenho certeza

11. Há quanto tempo você apresentou sua última gripe, resfriado ou outras infecções de via aérea superior?

- 1-2 semanas
- 2-4 semanas
- mais de um mês
- mais de 2 meses

12. Você apresenta sintomas de refluxo ou azia? Sim Não

E você toma comprimidos para controlar isso? Sim Não

Obrigado por completar o questionário.

ANEXO B

QUESTIONÁRIO RSC – ANEXO B

ETIQUETA	
Nome:	_____
RGHC:	_____
Data Nasc:	_____
Data:	_____

RSC	<input type="checkbox"/> sNP
	<input type="checkbox"/> wNP

Obrigado por aceitar fazer parte deste estudo. A informação abaixo é importante e nos ajudará a gerenciar melhor os pacientes com problemas de sinusite no futuro. A pesquisa é totalmente voluntária. Responder ou não a pesquisa não afetará o atendimento médico que recebe. Os seus dados serão tratados com o maior sigilo. Por favor, responda a todas as perguntas da melhor forma possível. Informe seu médico se há alguma coisa que você não entende ou que você não possa responder.

Questões culturais

1. Por favor, indique a sua origem racial (opcional) _____
2. Em que país você nasceu? _____
3. Em que país seus pais nasceram? Mãe Pai _____
4. Em que país você viveu a maior parte de sua vida? _____

Perguntas sinusite

2. Há quanto tempo você tem problemas de sinusite? _____ Anos _____ Meses

3. Com que frequência você tem problemas com sinusite? (Escolha um)

- Uma vez em um ano 2 vezes / ano 3 vezes / ano
 4-6 vezes / ano Mais de 6 vezes / ano Quase o tempo todo

4. Seus problemas com sinusite são geralmente associados com? (Escolha um)

- Alergia Ambos (Alergia + Infecção)
 Infecção respiratória superior Nenhum deles

5. Quando foi a última vez que utilizou (por favor responda para cada um dos três grupos de drogas)

Antibióticos _____

Corticosteroides (por exemplo Prednisona ou prednisolona) _____

Sprays de esteroides / irrigações (por exemplo Noex, Budecort, Busonid, Nasonex, Avamys, Pulmicort) _____

Indique igualmente qualquer outro medicamento que você tenha tomado durante o último mês: _____

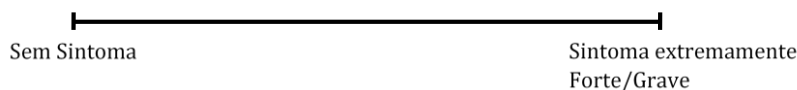
Por favor, indicar a gravidade dos seus sintomas atuais, marcando abaixo com uma Barra (|) ou um Xis (X) em algum lugar ao longo da escala na linha de 10 centímetros abaixo, referente a cada um dos seus sintomas.

O início da escala indica que você não tem sintomas presentes, enquanto o mais à direita, no final da extremidade, indica que o sintoma é extremamente grave.

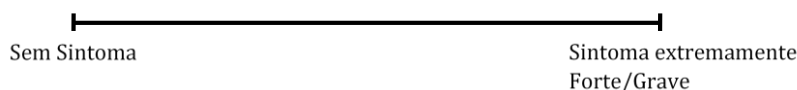
Obstrução nasal ou congestão



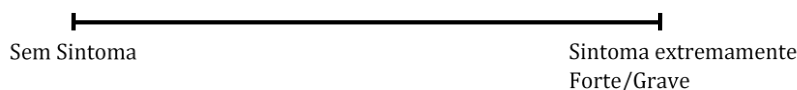
Corrimento nasal (a frente do nariz)



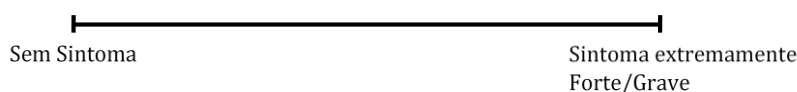
Gotejamento pós-nasal (secreção/muco descendo na parte de trás do nariz, descendo pela parte de trás da garganta)



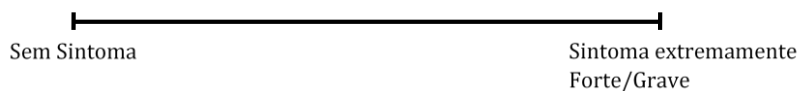
Espirros



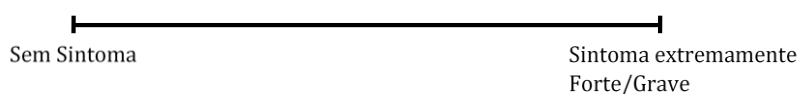
Dor de cabeça / dor ou pressão facial



Alteração (ou redução) no sentido do olfato



Sintomas combinados - Se você colocar todos os seus sintomas nasais juntos, como você os classificaria?



Questionário: Avaliação de Resultados Nasossinusais – 22 itens**Nome:****Data:**

Abaixo, você encontrará uma lista de sintomas e consequências sociais/emocionais de seu problema nasal. Nós gostaríamos de saber mais sobre estes problemas e agradeceríamos por você responder as seguintes questões da melhor forma que puder. Não existem respostas certas ou erradas e apenas você pode nos dar esta informação. Por favor, quantifique seus problemas e como eles têm se apresentado nas últimas **duas semanas**. Obrigado por sua participação.

A: Observe os sintomas abaixo numerados de 1 a 22. Em seguida, use a escala ao lado para avaliar a gravidade do seu problema e a frequência com que ocorre. Para terminar, circule o número correspondente à **quão ruim** você se sente →

	Nenhum Problema	Problema muito leve	Problema leve ou discreto	Problema moderado	Problema grave	Problema gravíssimo	5 itens mais importantes
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 ou coriza	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
4. Tosse	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
5. Sensação de secreção ou Catarro descendo pela parte de trás do seu nariz	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
6. Catarro grosso no nariz (muco espesso no nariz)	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
7. Abafamento no ouvido (entupimento do ouvido)	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 ou pressão no rosto	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 no meio da 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 de manhã	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
15. Cansaço/fadiga ao longo do dia	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
16. Produtividade diminuída	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
17. Concentração diminuída	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
18. Frustrado/impaciente/irritado	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
19. Triste	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
20. Constrangido	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
21. Percepção do olfato(cheiro) ou do gosto	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>
22. Nariz trancado/entupido	0	1	2	3	4	5	<input type="checkbox"/>

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

TOTAL GERAL: _____

ANEXO C

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: **Microbioma Nasossinusal**: estudo multicêntrico internacional

Pesquisador principal: **Richard L Voegels**

Departamento/Instituto - **Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia –
“Disciplina de Otorrinolaringologia”**

Convidamos você a participar de uma pesquisa que acreditamos ser de grande importância para melhorar o nosso entendimento da rinossinusite crônica (SINUSITE CRONICA). Esperamos um dia oferecer um tratamento melhor para esta doença.

No entanto, antes de decidir se deseja ou não participar, é preciso ter certeza de que você entende o motivo de estarmos realizando essa pesquisa. Estamos, portanto, fornecendo-lhe as informações abaixo. Por favor, leia com atenção e certifique-se de fazer qualquer pergunta que deseje. Você não tem que tomar uma decisão imediata.

A participação é voluntária

A participação em qualquer projeto de pesquisa é voluntária. Se você não deseja participar, você não é obrigado. Se você decidir participar e mais tarde mudar de ideia, você está livre para se retirar do projeto, em qualquer fase, sem fornecer uma razão. **Sua decisão não afetará o seu tratamento de rotina, o seu relacionamento com aqueles que o tratam, ou a sua relação com o Hospital.**

Para entender o estudo

A pesquisa é sobre o quê?

A rinossinusite crônica (ou Sinusite Crônica) é a inflamação ou inchaço do tecido dos seios da face que muitas vezes resulta em sintomas de dor de cabeça e dor facial, nariz tampado ou congestionado, secreção nasal (muco) e gotejamento pós-nasal. A causa desta condição não é clara e no momento os tratamentos que temos são limitados. Este estudo tem como objetivo ajudar a compreender os mecanismos que causam esta doença.

Por que a pesquisa está sendo feita?

Doenças do nariz, tais como sinusite crônica, podem trazer um aborrecimento muito grande. Estes distúrbios podem ser vistos em diferentes formas na população em geral e há múltiplos fatores que contribuem para a sua gravidade. Neste estudo usaremos um cotonete para coletar muco do nariz de pessoas com sinusite crônica e de pessoas sem sinusite crônica e fazer uma comparação. Poderemos estudar as bactérias que podem ser prejudiciais e aquelas que podem ser uma proteção para o nariz.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados.

Se você decidir participar, precisará responder a um questionário sobre sua saúde e sobre medicações que usa regularmente ou recentemente. Iremos colher com um Cotonete secreção (muco) de dentro do seu nariz. A coleta ***não causa dor, não há riscos para sua saúde, nem efeitos colaterais*** com este procedimento. Alguns dados de exames que você já fez no hospital poderão ser utilizados para complementar o estudo, com total sigilo.

Benefícios esperados para o participante

A pesquisa não irá trazer um benefício imediato diretamente ao participante e seu tratamento não será modificado. Entretanto, no futuro os pacientes podem se beneficiar do melhor entendimento sobre as sinusites que este estudo pode trazer. Novos tratamentos e abordagens podem surgir baseados no conhecimento gerado por nossa pesquisa.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa

Esta pesquisa não requer acompanhamento especial, sua rotina de tratamento no hospital e suas consultas de retorno permanecerão inalteradas, sem qualquer custo extra de comparecimento ao hospital.

Garantias

Lembramos mais uma vez que a participação é completamente **voluntária**. Você tem total liberdade de se retirar em qualquer fase da pesquisa, **sem qualquer penalização. Seu tratamento não será afetado, seu relacionamento com a equipe médica e com o Hospital das Clínicas não será prejudicado.** Você receberá uma via do termo de consentimento. Não haverá qualquer custo para você caso decida participar deste estudo.

O material biológico – secreção nasal – obtido para esta pesquisa será analisado por técnicas modernas e não será armazenado para novo estudo futuro, uma vez que a pequena quantidade de material obtida deve ser inteiramente avaliada, não sendo possível a ocorrência de “sobras” ou excesso para estudo futuro

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas.

O principal investigador é o **Dr Richard L Voegels** que pode ser encontrado no endereço Rua Ovídio Pires de Campos 155, sexto andar, ambulatório de Otorrinolaringologia.

O investigador executante é Daniel Lorena Dutra, que pode ser encontrado no mesmo endereço e local além de nas sextas feiras no Pronto Socorro de Otorrinolaringologia no mesmo endereço, quarto andar. Telefone(s): 2661-6581 e-mail: daniel.dutra@hc.fm.usp.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5o andar – tel: (11) 2661- 6442 ramais 16, 17, 18, ou (11) 2661-7585; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Microbioma nasossinusal”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dr. Richard L Voegels ou pessoa por ele delegada – pesquisador Daniel Lorena Dutra sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo.

Data / /

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO)
DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

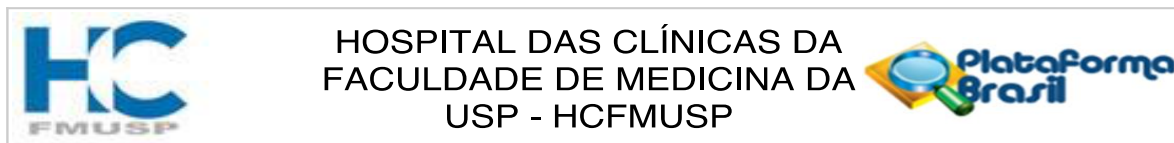
A

1. NOME:
2. DOCUMENTO DE IDENTIDADE No :
3. SEXO : M F
4. DATA NASCIMENTO:/...../.....
5. ENDEREÇO No
- APTO: BAIRRO:
- CIDADE..... CEP:..... TELEFONE:
 DDD (.....)

B

1. RESPONSÁVEL LEGAL
2. NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....
3. DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....
4. SEXO: M F
5. DATA NASCIMENTO.:/...../.....
6. ENDEREÇO: No
- APTO: BAIRRO:
- CIDADE: CEP:
- TELEFONE: DDD (.....).....

ANEXO D

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Microbioma Nasossinusal: Estudo multicêntrico internacional

Pesquisador: RICHARD LOUIS VOEGELS

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 1

CAAE: 46421415.8.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.137.409

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo prospectivo multicêntrico internacional aprovado no país de origem que pretende caracterizar o microbioma existente no meato médio de pessoas com rinossinusite e indivíduos saudáveis. Na instituição HCFMUSP, será objeto de estudo de doutorado do aluno Daniel Lorena Dutra, sob orientação do Dr. Richard Voegels

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar o microbioma na região do meato médio de indivíduos saudáveis e de indivíduos com sinusite crônica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos são baixos, pois a pesquisa coletará material da região do meato médio, através de exame com nasofibrosκόpio flexível. Não caracteriza um procedimento agressivo e de risco. O material coletado terá a pesquisa de material genético de bactérias residentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, pois a caracterização da flora bacteriana residente em indivíduos saudáveis e em portadores de sinusite pode esclarecer mecanismos fisiopatológicos e constituir informação relevante para o progresso do conhecimento e aperfeiçoamento de tratamento. Para a universidade, trata-se de relevante oportunidade de inserção internacional.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.137.409

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos forma apresentados dentro das recomendações

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

SAO PAULO, 03 de Julho de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Microbioma Nasossinusal: Estudo multicêntrico internacional

Pesquisador: RICHARD LOUIS VOEGELS

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 3

CAAE: 46421415.8.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.311.792

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A forma tradicional de detecção de bactérias se amparou durante muitos anos em técnicas que envolviam o cultivo destes microrganismos em meios específicos. Esta dependência estava sujeita a um viés, a competição entre organismos em determinado meio enriquecido favorece a dominância de um ou mais organismos que têm as taxas de crescimento mais altas, o que não representa a diversidade real presente na amostra. A evolução dos métodos de sequenciamento de DNA revolucionou a forma de detecção de bactérias, eliminando este problema. Este avanço está permitindo uma maior compreensão da complexidade do conjunto de micróbios, chamada de microbiota, que habitam o corpo humano, tanto em condições de plena saúde, como em condições patológicas. Pesquisas recentes têm tentando determinar a real população de micróbios vivendo em determinados sítios anatômicos através do conteúdo genômico destas populações. O termo microbioma é definido como o conteúdo genômico da microbiota. Atualmente, cooperação multi-institucional está sendo realizada para se determinar o microbioma de diversas regiões anatômicas de indivíduos saudáveis, como o The Human Microbiome Project. Este grande projeto não contempla, no entanto o meato médio, importante sítio anatômico de drenagem dos seios

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.311.792

paranasais. De forma concomitante, o microbioma de diversas condições patológicas necessita de esclarecimento, bem como a determinação da sua composição levando-se em consideração fatores associados a estas condições. Ampliar o conhecimento da microbiota ajudará a determinar o papel destes organismos na homeostase normal e nos fenótipos de doenças, como na rinossinusite crônica. Além disso, estudos comparativos de microbioma proporcionarão informação importante para uma melhor seleção de antimicrobianos e permitirão avaliar a eficácia de tais tratamentos. Soluções médicas inovadoras na otorrinolaringologia, como o uso de probióticos, são também possibilidades que dependerão do amplo conhecimento da microbiota das superfícies mucosas e seus mecanismos de interação com o hospedeiro.

Hipótese:

Diminuição da diversidade microbiana nos pacientes com rinossinusite crônica quando comparado aos controles

Metodologia:

1. Participantes e Questionário. Cinquenta pacientes serão recrutados no ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sendo divididos em 2 grupos, um com trinta (n igual a 30) indivíduos com diagnóstico de rinossinusite crônica e outro com vinte (n igual a 20) saudáveis. Estes pacientes serão submetidos a um questionário sobre diversos aspectos de sua saúde, inclusive medicações utilizadas, antecedentes pessoais e comorbidades, incluindo asma e alergias. Os pacientes com rinossinusite crônica serão assim classificados levando-se em consideração a definição do EPOS 2012 (do inglês, European Position Paper on Rhinosinusitis).
2. Coleta das Amostras. Haverá coleta de material do meato médio/etmóide anterior através de swab nasal (Copan Diagnostics Inc, swab número 503CS01), guiado por endoscopia e protegido de contaminação da fossa nasal e vestíbulo nasal. Os swabs serão fornecidos pela entidade centralizadora do estudo (University of Adelaide). O material coletado será resfriado até o armazenamento definitivo, criopreservação a -80°C na Unidade de Criopreservação da FMUSP. A análise do material coletado através do sequenciamento de DNA será realizada no exterior, University of Adelaide, Austrália, bem como toda análise de bioinformática necessária para avaliação dos dados brutos resultantes. O transporte até o local de análise será realizado

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.311.792

mantendo-se as condições de criopreservação. Cooperação de diversos centros de pesquisa do mundo, através da coleta de swab, está sendo feita e os dados destas amostras também comporão o desfecho final do estudo. 3. Processamento das Amostras. Para extração do DNA, as pontas dos swabs serão descongeladas, cortadas em pequenos pedaços e colocadas em solução enzimática tamponada por uma noite, em seguida homogeneizadas. O DNA extraído será armazenado a -80C até o sequenciamento.

4. Sequenciamento do DNA. Reação em Cadeia da Polimerase para iniciadores (em inglês, primers) da subunidade ribossômica 16s de múltiplas bactérias e fungos será realizada, seguida do sequenciamento em sequenciador Illumina (Illumina Inc, San Diego, CA). Os dados brutos derivados serão analisados através de bioinformática para se determinar as bactérias e fungos da amostra

Critérios de Inclusão/ Exclusão:

Critério de inclusão:

Grupo controle: Inclusão de qualquer paciente desde que a amostra seja coletada de forma adequada.
Grupo com rinossinussite crônica: Inclusão de qualquer paciente com rinossinussite crônica desde que se caracterize com pólipos ou sem pólipos na endoscopia nasal.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos pacientes (Ambos os grupos):

- Menores de 18 anos (e/ou);
- Gestantes (e/ou);
- Que tenham recebido antibioticoterapia oral no último mês (e/ou);
- Que tenham recebido corticoesteroides orais no último mês (e/ou).

Grupo controle: Os pacientes não podem ter qualquer sintoma nasossinusal ou ter qualquer alteração visibilizada na endoscopia nasal.

Grupo com rinossinussite crônica: Excluídos ainda pacientes com tumores nasossinusais, além daqueles critérios acima citados.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 1.311.792

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo primário deste estudo é caracterizar melhor o microbioma do meato médio de pacientes saudáveis e aqueles com rinossinusite crônica utilizando tecnologia de sequenciamento de DNA.

Objetivo Secundário:

Não Consta

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constam no projeto cadastrado na Plataforma Brasil:

Riscos:

Sem qualquer risco, swab nasal com técnica de coleta estéril, indolor.

Benefícios:

A pesquisa não irá trazer um benefício imediato diretamente ao participante e seu tratamento não será modificado. Entretanto, no futuro os pacientes podem se beneficiar do melhor entendimento sobre as sinusites que este estudo pode trazer. Novos tratamentos e abordagens podem surgir baseados no conhecimento gerado por nossa pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não se aplica.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 1.311.792

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Em relação ao documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_528615.pdf", datado em 10/07/2015, seguem as considerações:

1.1. Solicita-se que seja apresentado um orçamento financeiro mais detalhado, que especifique TODOS os recursos, fontes e destinação, podendo-se citar, por exemplo, o custo por procedimentos e análises que serão realizadas no estudo.

RESPOSTA: Novo detalhamento realizado e inseridos através da Plataforma Brasil e acréscimo dos seguintes arquivos:

1. "Email_custos_Estudo_Microbioma.pdf" e 2. "Email_original_em_Ingles_custos.pdf" Detalhamento no campo "Outras Informações" do item "Orçamento" da Plataforma Brasil: Custos dos swabs, tubos de criopreservação, extração e sequenciamento de DNA, análise de bioinformática todos por conta da Instituição estrangeira (University of Adelaide) - representa cerca de 90% do total. Conforme solicitado, resulta em um custo de cerca de R\$ 740,00 por amostra. Custos nacionais apenas com o transporte do material até a Austrália (cerca de \$1,000 dólares americanos) e matérias básicas de consumo listados no orçamento - representa cerca de 10% do total, serão realizados com recursos próprios. Custos de execução no Brasil de todas as etapas é altíssimo. A oportunidade atual neste formato de custeio é ímpar, pois o trabalho será realizado com baixo custo, preservando assim recursos nacionais, aliado a provável(eis) artigo(s) de alto impacto e de internacionalização da pesquisa nacional e da Universidade brasileira. O custo nacional será de cerca de 10% apenas, ficando 90% a cargo da Universidade de Adelaide.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. O cronograma não está adequado, pois informa que o estudo já teve início. Solicita-se esclarecimento e, caso necessário, adequação do cronograma com relação à data de início do estudo, dado que este ainda se encontra em análise no Sistema CEP/CONEP até a presente data (Resolução CNS nº 466 de 2012, item XI.2.a e Norma Operacional CNS/MS nº 001 de 2013, item 3.4.9).

RESPOSTA: Novo cronograma foi adequado, novas datas foram instituídas e inseridos na Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 1.311.792

2. Em relação ao TCLE, intitulado "Termo de Consentimento Livre.pdf", seguem as considerações:

2.1. Solicita-se descrever no TCLE os procedimentos que serão utilizados na pesquisa, com o detalhamento dos métodos a serem utilizados, como por exemplo, quais questionários serão aplicados, qual a quantidade e como a amostra será colhida, em qual laboratório será realizada a coleta das amostras (Item IV.3.a da Resolução CNS nº 466 de 2012). Além disso, é necessário esclarecer se o questionário terá perguntas sobre a saúde de um modo geral, medicações em uso, antecedentes pessoais, comorbidades, se tem asma e alergias, e se o material será coletado de uma ou de ambas as narinas, que o cotonete será introduzido de maneira suave, bem como esclarecer sobre a profundidade da introdução e quantas vezes será introduzido. Ademais, solicita-se incluir no TCLE nome e endereço do local onde as amostras serão analisadas.

RESPOSTA: TCLE DESTACADO itens 4 e 7.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Na página 2 de 5, lê-se: "A coleta não causa dor, NÃO HÁ RISCOS para sua saúde, nem efeitos colaterais com este procedimento" (Destaque nosso). Para o Sistema CEP/CONEP não existe pesquisa livre de riscos. Sendo assim, solicita-se que sejam descritos os POSSÍVEIS desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, podendo-se citar os riscos inerentes à manutenção de sigilo e confidencialidade durante a coleta e uso dos dados, bem como o desconforto durante a coleta (Itens II.22 e IV.3.b da Resolução CNS nº 466 de 2012). Uma vez que nenhum procedimento é livre de risco, de modo adicional, solicita-se inserir no TCLE a explicitação da garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa e a garantia do direito a assistência integral gratuita devido a danos diretos/ indiretos e imediatos/ tardios, pelo tempo que for necessário (Itens IV.3.h, II.3.1 e II.3.2 da Resolução CNS nº 466 de 2012). Como exemplos de desconfortos podem ser enumerados: espirro, tosse, cócegas nas narinas, lacrimejamento, entre outros que podem estar relacionados com a profundidade da inserção do swab. Como conduta poderia ser incluída a interrupção momentânea da introdução de cotonete e a orientação para respirar profundamente.

RESPOSTA: (item 4).TCLE DESTACADO.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3. O item 3 da Carta Circular CNS nº 039 de 2011 ressalta que os dados do prontuário são de propriedade única e exclusiva do participante de pesquisa, que forneceu tais informações em uma

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 1.311.792

relação de confidencialidade entre médico e paciente, para realização do seu tratamento e cuidados médicos e não para utilização de tais dados em pesquisas. Portanto, solicita-se descrever no TCLE que é necessária a anuência do participante da pesquisa para o acesso e uso dos seus dados de prontuário por pessoas não obrigadas ao sigilo profissional quando sob sua responsabilidade.

RESPOSTA: Nova redação do TCLE, adequação feita no parágrafo terceiro do item 4 do TCLE DESTADO.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.4 Considerando que os dados pessoais serão identificados, solicita-se que sejam indicados os procedimentos que garantam o sigilo, a confidencialidade e a segurança dos dados do participante (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e)

RESPOSTA: Nova redação, adequação do TCLE no parágrafo quarto do item 4.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.5 Na página 4 de 5, Campo de Assinatura, lê-se: "Assinatura do participante/REPRESENTANTE LEGAL" (Destaque nosso). Diante da informação destacada acima, solicita-se esclarecimento quanto a se o projeto de pesquisa recrutará participante de pesquisa considerado "mentalmente incapaz". Caso necessário, adicionalmente, solicita-se adequação do campo de assinatura e dos critérios de exclusão/inclusão do projeto de pesquisa.

RESPOSTA: Acrescido critério de exclusão de mentalmente incapaz e realizado adequação do TCLE e demais documentos.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.6 Solicita-se informar no TCLE que todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável/pessoa por ele delegada e pelo participante/responsável legal (Item IV.5.d da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Última frase do TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.7 Solicita-se informar no TCLE o horário de funcionamento do CEP responsável pelo estudo. Para melhor informar o participante da pesquisa, solicita-se incluir no TCLE uma breve descrição do que é o CEP e qual sua função no estudo.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.311.792

RESPOSTA: Parágrafo quarto do item 8 do TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.8 Solicita-se incluir no TCLE que, quando necessário, será garantido o ressarcimento, descrevendo o modo como será realizado, das despesas do participante da pesquisa e de seu acompanhante com o estudo. Salienta-se que os itens ressarcidos não são apenas aqueles relacionados a transporte e alimentação, mas a todo E QUALQUER gasto tido pelo participante em função da participação no estudo (Itens II.21 e IV.3.g da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Itens 6 e 7 do TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Solicita-se declaração assinada de que todos os pesquisadores que tiverem acesso aos dados garantem a manutenção de sigilo e confidencialidade destes, e, ainda, a garantia de que todos os dados serão utilizados apenas para os fins da pesquisa (Resolução CNS 466/2012, itens III.2.i e IV.3.e).

RESPOSTA: Novo arquivo (TERMO DE CONFIDENCIALIDADE E SIGILO) adicional em anexo assinado pelos pesquisadores garantindo o sigilo, confidencialidade e garantia para fins de pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_528615.pdf	16/09/2015 20:08:59		Aceito
Outros	Respostas_Ordenadas.pdf	16/09/2015 20:08:24	Daniel Lorena Dutra	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_sem_destaque.pdf	16/09/2015	Daniel Lorena Dutra	Aceito

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.311.792

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sem_destaque.pdf	20:05:34	Daniel Lorena Dutra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DESTACADO.pdf	16/09/2015 20:04:51	Daniel Lorena Dutra	Aceito
Outros	Email_original_em_Ingles_custos.pdf	16/09/2015 00:27:11	Daniel Lorena Dutra	Aceito
Outros	Email_custos_Estudo_Microbioma.pdf	16/09/2015 00:24:09	Daniel Lorena Dutra	Aceito
Outros	Termo_de_Confidencialidade.pdf	16/09/2015 00:08:17	Daniel Lorena Dutra	Aceito
Outros	Traduzido - Aprovação Ética.pdf	10/07/2015 03:02:13		Aceito
Outros	E-mail de HC-FMUSP - Microbiome Study Etica Aprovada.pdf	10/07/2015 03:01:03		Aceito
Outros	E-mail de HC-FMUSP Traduzido etica aprovada.pdf	10/07/2015 03:00:15		Aceito
Outros	E-mail de HC-FMUSP - Microbiome Study.pdf	10/07/2015 02:58:53		Aceito
Outros	HREC14TQEHLMH222 Final Approval.pdf	10/07/2015 02:57:49		Aceito
Outros	REGISTRO ONLINE0001.pdf	18/06/2015 10:51:27		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO0001.pdf	18/06/2015 10:49:40		Aceito
Outros	Questionario Rinossinusite Cronica.docx	02/06/2015 14:34:22		Aceito
Outros	Questionario Controel.docx	02/06/2015 14:33:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Microbioma 1.pdf	02/06/2015 14:26:00		Aceito

Situação do Parecer:

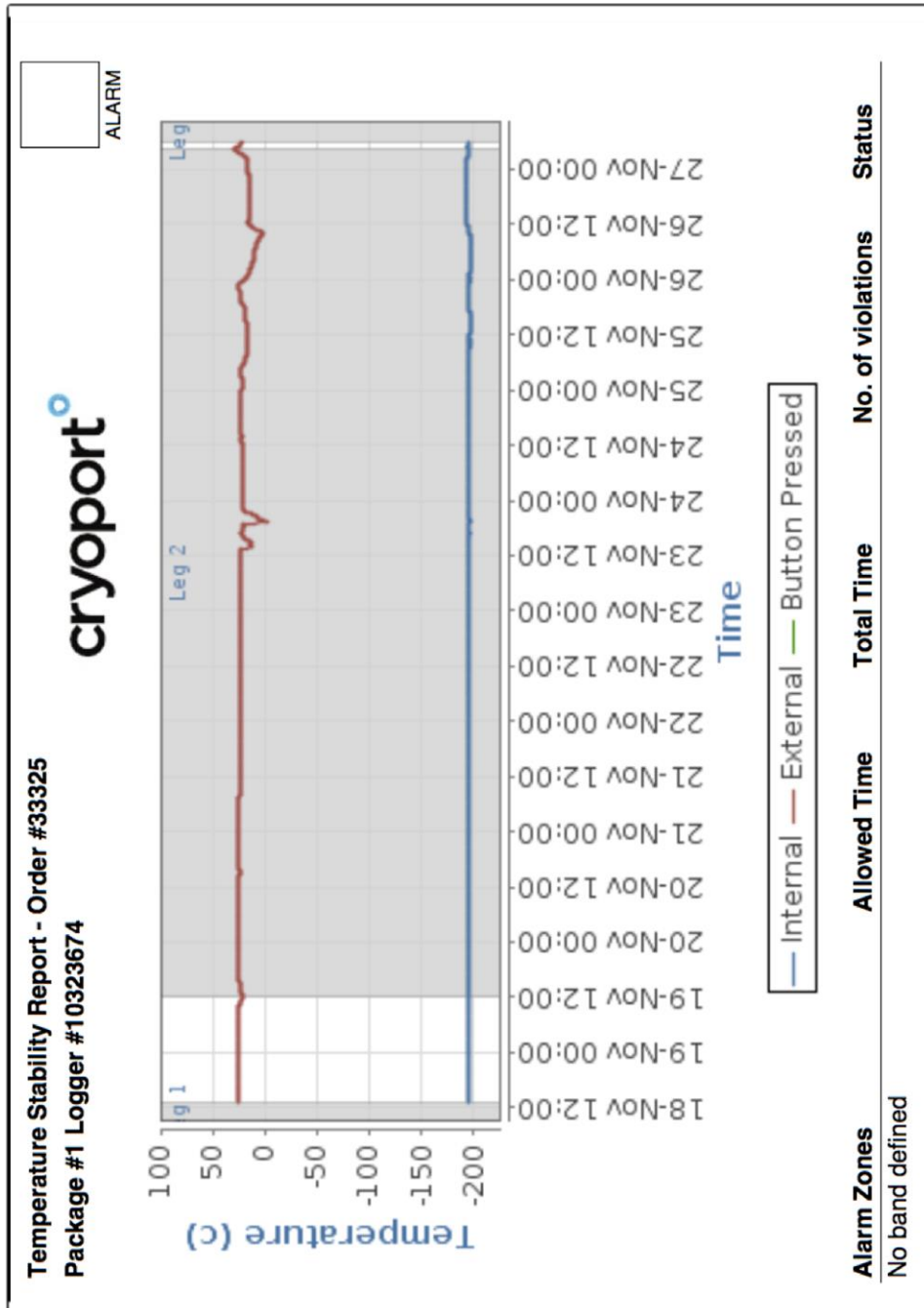
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

ANEXO E – MONITORAMENTO DA TEMPERATURA DE TRANSPORTE DAS AMOSTRAS



8. REFERÊNCIAS

1. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome research*. 2009;19(12):2317-23.
2. Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, Watson M, Katancik J, Garcia N, et al. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(3):1012-22.
3. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med*. 2014;20(2):159-66.
4. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2369-79.
5. Skonieczna-Zydecka K, Marlicz W, Misera A, Koulaouzidis A, Loniewski I. Microbiome-The Missing Link in the Gut-Brain Axis: Focus on Its Role in Gastrointestinal and Mental Health. *J Clin Med*. 2018;7(12).
6. Quigley EMM. The Gut-Brain Axis and the Microbiome: Clues to Pathophysiology and Opportunities for Novel Management Strategies in Irritable Bowel Syndrome (IBS). *J Clin Med*. 2018;7(1).
7. Shukla SD, Budden KF, Neal R, Hansbro PM. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin Transl Immunology*. 2017;6(3):e133.
8. Abdel-Haq R, Schlachetzki JCM, Glass CK, Mazmanian SK. Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *J Exp Med*. 2019;216(1):41-59.
9. Mezouar S, Chantran Y, Michel J, Fabre A, Dubus J-C, Leone M, et al. Microbiome and the immune system: From a healthy steady-state to allergy associated disruption. *Human Microbiome Journal*. 2018;10:11-20.
10. Halawi AM, Smith SS, Chandra RK. Chronic rhinosinusitis: epidemiology and cost. *Allergy and asthma proceedings*. 2013;34(4):328-34.
11. Pilan RR, Pinna FR, Bezerra TF, Mori RL, Padua FG, Bento RF, et al. Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. *Rhinology*. 2012;50(2):129-38.

12. Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond.* 2004;58(2):187-201.
13. Halderman AA, Lane AP. Organism and Microbiome Analysis: Techniques and Implications for Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngol Clin North Am.* 2017;50(3):521-32.
14. Drancourt M. Microbe discovery: lessons from the past. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(3):189-90.
15. Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of theoretical biology.* 1965;8(2):357-66.
16. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, NY).* 1995;269(5223):496-512.
17. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science (New York, NY).* 2001;291(5507):1304-51.
18. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics.* 2008;9:387-402.
19. Prescott SL. History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Human Microbiome Journal.* 2017;4:24-5.
20. Lederberg JM, AT. Ome sweet omics: a genealogical treasury of words. *Scientist.* 2001;15(8).
21. Whipps JM LK, Cooke RC. Mycoparasitism and plant disease control In: Burge N, editor. *Fungi in Biological Control Systems*: Manchester University Press; 1988. p. 176.
22. Huss J. Methodology and Ontology in Microbiome Research. *Biological theory.* 2014;9(4):392-400.
23. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 2012;489(7415):250-6.
24. Enaud R, Vandenborgh L-E, Coron N, Bazin T, Prevel R, Schaefferbeke T, et al. The Mycobioime: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Microorganisms.* 2018;6(1):22.

25. Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM, et al. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature medicine*. 2015;21(10):1228-34.
26. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(20):6955.
27. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(9):2761-4.
28. Tyler AD, Smith MI, Silverberg MS. Analyzing the human microbiome: a "how to" guide for physicians. *The American journal of gastroenterology*. 2014;109(7):983-93.
29. Kim M, Morrison M, Yu Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of microbiological methods*. 2011;84(1):81-7.
30. Anderson M, Stokken J, Sanford T, Aurora R, Sindwani R. A systematic review of the sinonasal microbiome in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(3):161-6.
31. Wagner Mackenzie B, Waite DW, Hoggard M, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. Bacterial community collapse: a meta-analysis of the sinonasal microbiota in chronic rhinosinusitis. *Environ Microbiol*. 2017;19(1):381-92.
32. Lee JT, Frank DN, Ramakrishnan V. Microbiome of the paranasal sinuses: Update and literature review. *American journal of rhinology & allergy*. 2016;30(1):3-16.
33. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59.
34. Stephenson MF, Mfuna L, Dowd SE, Wolcott RD, Barbeau J, Poisson M, et al. Molecular characterization of the polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;39(2):182-7.
35. Abreu NA, Nagalingam NA, Song Y, Roediger FC, Pletcher SD, Goldberg AN, et al. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculo*stearicum enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci Transl Med*. 2012;4(151):151ra24.
36. Aurora R, Chatterjee D, Hentzleman J, Prasad G, Sindwani R, Sanford T. Contrasting the microbiomes from healthy volunteers and patients with chronic rhinosinusitis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;139(12):1328-38.

37. Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2012;122(2):467-72.
38. Ramakrishnan VR, Feazel LM, Gitomer SA, Ir D, Robertson CE, Frank DN. The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PLoS One*. 2013;8(12):e85507.
39. Cope EK, Goldberg AN, Pletcher SD, Lynch SV. Compositionally and functionally distinct sinus microbiota in chronic rhinosinusitis patients have immunological and clinically divergent consequences. *Microbiome*. 2017;5(1):53.
40. Bassiouni A, Cleland EJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald PJ. Sinonasal microbiome sampling: a comparison of techniques. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123216.
41. Vickery TW, Kofonow JM, Ramakrishnan VR. Characterization of Sinus Microbiota by 16S Sequencing from Swabs. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2017;1616:23-38.
42. Ramakrishnan VR, Gitomer S, Kofonow JM, Robertson CE, Frank DN. Investigation of sinonasal microbiome spatial organization in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(1):16-23.
43. Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy*. 2014;69(4):517-26.
44. Paju S, Bernstein JM, Haase EM, Scannapieco FA. Molecular analysis of bacterial flora associated with chronically inflamed maxillary sinuses. *J Med Microbiol*. 2003;52(Pt 7):591-7.
45. Stressmann FA, Rogers GB, Chan SW, Howarth PH, Harries PG, Bruce KD, et al. Characterization of bacterial community diversity in chronic rhinosinusitis infections using novel culture-independent techniques. *Am J Rhinol Allergy*. 2011;25(4):e133-40.
46. de Steenhuijsen Piter WAA, Jochems SP, Mitsi E, Rylance J, Pojar S, Nikolaou E, et al. Interaction between the nasal microbiota and *S. pneumoniae* in the context of live-attenuated influenza vaccine. *Nature Communications*. 2019;10(1):2981.
47. Leal SM, Jr., Jones M, Gilligan PH. Clinical Significance of Commensal Gram-Positive Rods Routinely Isolated from Patient Samples. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(12):2928-36.
48. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(10):3152-8.

49. Hoggard M, Biswas K, Zoing M, Wagner Mackenzie B, Taylor MW, Douglas RG. Evidence of microbiota dysbiosis in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2017;7(3):230-9.
50. Kuhar HN, Tajudeen BA, Mahdavinia M, Heilingoetter A, Ganti A, Gattuso P, et al. Relative abundance of nasal microbiota in chronic rhinosinusitis by structured histopathology. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018;8(12):1430-7.
51. Koeller K, Herlemann DPR, Schuldt T, Ovari A, Guder E, Podbielski A, et al. Microbiome and Culture Based Analysis of Chronic Rhinosinusitis Compared to Healthy Sinus Mucosa. *Front Microbiol.* 2018;9:643.
52. Gan W, Yang F, Tang Y, Zhou D, Qing D, Hu J, et al. The difference in nasal bacterial microbiome diversity between chronic rhinosinusitis patients with polyps and a control population. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019.
53. Kosugi EM, Chen VG, Fonseca VM, Cursino MM, Mendes Neto JA, Gregorio LC. Translation, cross-cultural adaptation and validation of SinoNasal Outcome Test (SNOT): 22 to Brazilian Portuguese. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011;77(5):663-9.
54. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH, Smith TL, Alt JA, Baroody FM, et al. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. *International Forum of Allergy & Rhinology.* 2016;6(S1):S22-S209.
55. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7(5):335-6.
56. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):5069-72.
57. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic acids research.* 2017;45(W1):W180-W8.
58. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology.* 2013;138(1):1-11.
59. Frank DN, Zhu W, Sartor RB, Li E. Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends Microbiol.* 2011;19(9):427-34.
60. Han MK, Huang YJ, Lipuma JJ, Boushey HA, Boucher RC, Cookson WO, et al. Significance of the microbiome in obstructive lung disease. *Thorax.* 2012;67(5):456-63.

61. Karunasagar A, Jalastagi R, Naik A, Rai P. Detection of bacteria by 16S rRNA PCR and sequencing in culture-negative chronic rhinosinusitis. 2018;128(10):2223-5.
62. Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, et al. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infect Dis.* 2013;13:210.
63. Albu S, Florian IS. Bacteriology of normal frontal sinuses. *Am J Otolaryngol.* 2013;34(4):327-30.
64. Larson DA, Han JK. Microbiology of sinusitis: does allergy or endoscopic sinus surgery affect the microbiologic flora? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;19(3):199-203.
65. Branton WG, Ellestad KK, Maingat F, Wheatley BM, Rud E, Warren RL, et al. Brain Microbial Populations in HIV/AIDS: α -Proteobacteria Predominate Independent of Host Immune Status. *PLOS ONE.* 2013;8(1):e54673.
66. Roberts RCF, C. B.; Walker, C. K. The human brain microbiome; there are bacteria in our brains!. 2018 Neuroscience Meeting; November 6th, 2018; San Diego, CA: Society of Neuroscience; 2018.
67. Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol.* 2017;10(2):299-306.
68. Hanshew AS, Jetté ME, Rosen SP, Thibeault SL. Integrating the microbiota of the respiratory tract with the unified airway model. *Respir Med.* 2017;126:68-74.
69. Mahdavinia M, Engen PA, LoSavio PS, Naqib A, Khan RJ, Tobin MC, et al. The nasal microbiome in patients with chronic rhinosinusitis: Analyzing the effects of atopy and bacterial functional pathways in 111 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(1):287-90 e4.
70. Hahn A, Sanyal A, Perez GF, Colberg-Poley AM, Campos J, Rose MC, et al. Different next generation sequencing platforms produce different microbial profiles and diversity in cystic fibrosis sputum. *Journal of microbiological methods.* 2016;130:95-9.
71. Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, et al. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC microbiology.* 2017;17(1):194.
72. Lal D, Keim P, Delisle J, Barker B, Rank MA, Chia N, et al. Mapping and comparing bacterial microbiota in the sinonasal cavity of healthy, allergic rhinitis, and chronic rhinosinusitis subjects. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2017;7(6):561-9.

-
73. Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, et al. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environ Microbiol*. 2016;18(7):2130-42.
74. Bomar L, Brugger SD, Yost BH, Davies SS, Lemon KP. *Corynebacterium accolens* Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. *mBio*. 2016;7(1):e01725-15.
75. Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(2):334-42.e1.
76. Esposito S, Principi N. Impact of nasopharyngeal microbiota on the development of respiratory tract diseases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2018;37(1):1-7.
77. Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. 2012;122(2):467-72.
78. Bezerra TFP, Pádua FGdM, Ogawa AI, Gebrim EMMS, Saldiva PHN, Voegels RL. Biofilme em rinossinite crônica com polipose nasossinusal: estudo piloto %J *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2009;75:788-93.
79. Vickery TW, Ramakrishnan VR, Suh JD. The Role of *Staphylococcus aureus* in Patients with Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis. *Current allergy and asthma reports*. 2019;19(4):21-.
80. Ramsey MM, Freire MO, Gabriliska RA, Rumbaugh KP, Lemon KP. *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to *Corynebacterium* Species. *Front Microbiol*. 2016;7:1230.
81. Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS, et al. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *The Journal of hospital infection*. 2000;44(2):127-33.
82. Cleland EJ, Bassiouni A, Vreugde S, Wormald PJ. The bacterial microbiome in chronic rhinosinusitis: Richness, diversity, postoperative changes, and patient outcomes. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(1):37-43.
83. Wagner Mackenzie B, Waite DW, Hoggard M, Taylor MW, Biswas K, Douglas RG. Moving beyond descriptions of diversity: clinical and research implications of bacterial imbalance in chronic rhinosinusitis. *Rhinology*. 2017;55(4):291-7.

84. Rom D, Bassiouni A, Eykman E, Liu Z, Paramasivan S, Alvarado R, et al. The Association Between Disease Severity and Microbiome in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2019;129(6):1265-73.
85. Ramakrishnan VR, Frank DN. Impact of cigarette smoking on the middle meatus microbiome in health and chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(11):981-9.
86. Huang C, Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *Journal of translational medicine*. 2019;17(1):225.
87. Earl JP, Adappa ND, Krol J, Bhat AS, Balashov S, Ehrlich RL, et al. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome*. 2018;6(1):190.
88. Wagner Mackenzie B, Baker J, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. Detection and quantification of *Staphylococcus* in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019.
89. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nature reviews Microbiology*. 2018;16(7):410-22.