

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

LORENA NASCIMENTO GIRARDI MADEIRA

**ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DO BIOFILME NA MUCOSA NASAL DAS
CRIANÇAS RESPIRADORAS ORAIS POR MEIO DA CITOLOGIA NASAL**

BELO HORIZONTE

2023

LORENA NASCIMENTO GIRARDI MADEIRA

**ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DO BIOFILME NA MUCOSA NASAL DAS
CRIANÇAS RESPIRADORAS ORAIS POR MEIO DA CITOLOGIA NASAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora em Medicina.

Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

Linha de pesquisa: Distúrbios do Trato Respiratório (respirador oral).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge Andrade Pinto

Professores colaboradores: Dr. Giorgio Walter Canonica e Enrico Hefller (Humanitas Research Hospital - IT)

BELO HORIZONTE

2023

Madeira, Lorena Nascimento Girardi.
M181a Análise da prevalência do biofilme na mucosa nasal das crianças respiradoras orais por meio da citologia nasal [recursos eletrônicos]. / Lorena Nascimento Girardi Madeira. - - Belo Horizonte: 2023. 147f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Jorge Andrade Pinto.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Biofilmes. 2. Citologia. 3. Respiração Bucal. 4. Criança. 5. Rinomanometria. 6. Dissertação Acadêmica. I. Pinto, Jorge Andrade. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 90



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA - CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DO BIOFILME NA MUCOSA NASAL DAS CRIANÇAS
RESPIRADORAS ORAIS POR MEIO DA CITOLOGIA NASAL**

LORENA NASCIMENTO GIRARDI MADEIRA

Tese defendida em 09 de maio de 2023 como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente e aprovada pela Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação supramencionado da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes Professores Doutores: Jorge Andrade Pinto – Orientador (UFMG), Dirceu Solé (UNIFESP), Nelson Augusto Rosário Filho (UFPR), Leticia Paiva Franco (UFMG) e Cláudia Ribeiro de Andrade (UFMG).

Belo Horizonte, 09 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por Jorge Andrade Pinto, Professor do Magistério Superior, em 10/05/2023, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Nelson Augusto Rosário Filho, Usuário Externo, em 10/05/2023, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Leticia Paiva Franco, Subchefe de departamento, em 10/05/2023, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Cláudia Ribeiro de Andrade, Professora do Magistério Superior, em 10/05/2023, às 19:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Dirceu Solé, Usuário Externo, em 12/05/2023, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador 2289672 e o código CRC 0A18FF50.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof.^a Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitora de Pós-Graduação: Prof.^a Isabela Almeida Pordeus

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Fernando Marcos dos Reis

Faculdade de Medicina:

Diretora da Faculdade de Medicina: Prof.^a Alamanda Kfouri Pereira

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: Prof.^a Cristina Gonçalves Alvim

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof.^a Eli Iola Gurgel Andrade

Departamento de pediatria:

Chefe do Departamento de Pediatria : Prof.^a Mônica Versiani N. P. de Queiroz

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente : Prof.^a Roberta Maia de Castro Romanelli

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente : Prof.^a Débora Marques de Miranda

Ao Dhenis, meu amor.
Pelo exemplo, inspiração, incentivo e suporte.
Sem você não teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Andrade Pinto por ter escutado com paciência e disposição minhas ideias de pesquisa. Por aceitar ser meu orientador. Por ter me auxiliado em momentos decisivos. Por sugerir alternativas realizáveis que me inspiraram confiança e me mostraram o caminho a seguir. Pela experiência e pela serenidade.

Aos Prof. Dr. Canonica e Dr. Heffler por terem me recebido e me orientado como *Fellow*. Tal experiência gerou o motivo de investigação desta tese de doutorado. Pela colaboração ao longo do caminho.

Às Professoras Dras. Letícia Paiva Franco e Cláudia Ribeiro de Andrade e ao Professor Dr. Sérgio Veloso Brant Pinheiro que, generosamente, ofereceram sugestões (durante o meu exame de qualificação) para a melhoria de minha pesquisa.

A toda a equipe do Ambulatório Respirador Oral (HC-UFMG) pela receptividade e ajuda. Em especial às Dras. Letícia Paiva Franco e Helena Maria Gonçalves Becker, pelo acolhimento, auxílio e suporte. Sempre levarei comigo seus exemplos de dedicação, competência e alegria.

À Marina Melo por aceitar ser a examinadora 2 em minha pesquisa. À Fernanda Filgueiras pela parceria.

Às crianças e seus pais que carinhosamente participaram da pesquisa.

Aos familiares que me incentivaram. Em especial aos meus pais por serem meu amparo, minha segurança e meu suporte. Por acreditarem em mim e por não medirem esforços para me auxiliar no que fosse possível.

À Clarinha, minha filha, por me contagiar com sua alegria. Por me fazer compreender que imprevistos acontecem e, assim, mostrar-me o quão valioso é saber me adaptar. Por me ensinar sobre simplicidade e persistência. Pelo amor incondicional.

Ao Dhenis pelo amor, paciência, companheirismo, apoio e ajuda.

RESUMO

Introdução: Biofilmes são aglomerados de microrganismos associados a uma superfície e incorporados a uma matriz polimérica extracelular. Têm sido descritos em inúmeras patologias, como as rinosinusites crônicas (RC). Sua presença está relacionada ao aumento da sobrevivência de microrganismos e à RC de pior prognóstico, sendo importante a sua detecção rotineira. A RC é uma das principais causas da respiração oral. Crianças respiradoras orais apresentam perdas significativas na qualidade de vida, geram gastos socioeconômicos importantes e podem ter alterações no crescimento e no desenvolvimento, que podem persistir até a vida adulta. A citologia nasal realizada pela microscopia óptica na coloração May-Grünwald-Giemsa (MGG) representa uma técnica útil, barata e de fácil aplicação para a detecção de biofilmes nesta população.

Objetivo: Identificar a prevalência de biofilmes por meio da citologia nasal em crianças atendidas no Ambulatório do Respirador Oral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG).

Métodos: Os participantes deste estudo foram submetidos a teste alérgico cutâneo com bateria padrão, citologia nasal, rinomanometria anterior, fibronasolaringoscopia e avaliação pela equipe multidisciplinar. A citologia nasal foi colhida por meio da aplicação de um swab estéril na porção média do corneto inferior. O material coletado foi transferido para uma lâmina de vidro, secou ao ar livre e foi corado pelo método MGG. As lâminas foram lidas por dois examinadores independentes e cegos entre si para identificar a presença de biofilme na amostra colhida. A análise estatística incluiu testes de comparação (Mann Whitney, Qui-quadrado) e o teste de concordância *Kappa*, que foi utilizado para avaliar a concordância entre os dois examinadores. As análises foram realizadas no software IBM SPSS versão 25 e com nível de significância de 5%.

Resultados: Foram incluídas 67 crianças respiradoras orais, com idade entre 5 e 12 anos (mediana: 8 anos), sendo 45 (67,2%) do sexo masculino. Houve alta concordância quanto à identificação do biofilme entre os dois examinadores independentes ($p < 0,0001$). Devido à alta concordância, após sorteio, considerou-se os resultados encontrados pelo examinador 2. A prevalência de biofilme foi de 47,8% ($n=32$). Os pacientes que apresentaram biofilme na mucosa nasal eram mais novos, com mediana da idade: 8 (7 – 10); $p = 0,047$. A presença de biofilme esteve associada à diminuição do fluxo nasal medido pela rinomanometria anterior, com uma porcentagem de fluxo nasal menor nos pacientes com biofilme (mediana 47%), quando comparados àqueles sem o biofilme (mediana 79%); valor $p 0,01$. Em relação à

gravidade da obstrução do fluxo nasal, observou-se que os pacientes com a presença de biofilme apresentaram obstrução mais grave quando comparados àqueles sem o biofilme ($p = 0,021$).

Conclusão: A citologia nasal mostrou ser um teste tecnicamente simples, barato, reprodutível e capaz de detectar o biofilme em crianças respiradoras orais. As crianças mais novas apresentaram maior prevalência de biofilme na mucosa nasal. Além disso, nas crianças em que foi identificado o biofilme, observou-se menor fluxo nasal e uma obstrução mais grave quando comparadas àquelas sem a presença do biofilme. Esses achados podem estar relacionados ao desenvolvimento de um microbioma nasal insalubre, o que poderia favorecer o surgimento e o desenvolvimento do biofilme.

Palavras-chave: biofilme; citologia nasal; respiração oral; criança; rinomanometria; microbioma.

ABSTRACT

Introduction: Biofilms are clusters of microorganisms associated with a surface and incorporated into an extracellular polymeric matrix. They have been described in numerous pathologies, such as chronic rhinosinusitis (CRS). Their presence is related to increased microbial survival and worse prognosis of CRS, making routine detection important. CRS is one of the main causes of mouth breathing. Children who breathe through their mouth have significant losses in quality of life, generate significant socioeconomic costs, and may have alterations in growth and development that can persist into adulthood. Nasal cytology performed by optical microscopy using May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining represents a useful, inexpensive, and easy-to-apply technique for detecting biofilms in this population.

Objective: To identify the prevalence of biofilms by nasal cytology in children treated at the Oral Breathing Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (HC/UFGM).

Methods: Participants in this study underwent standard battery skin prick tests, nasal cytology, anterior rhinomanometry, fibronasolaryngoscopy, and evaluation by a multidisciplinary team. Nasal cytology was collected by applying a sterile swab to the middle portion of the inferior turbinate. The collected material was transferred to a glass slide, air-dried, and stained by the MGG method. The slides were read by two independent and blinded examiners to identify the presence of biofilm in the collected sample. Statistical analysis included comparison tests (Mann Whitney, chi-square) and the Kappa concordance test, which was used to assess the agreement between the two examiners. The analyses were performed using IBM SPSS version 25 software, with a significance level of 5%.

Results: A total of 67 mouth-breathing children, aged 5 to 12 years (median: 8 years), were included in the study, with 45 (67.2%) being male. There was high concordance between the two independent examiners in identifying biofilm ($p < 0.0001$). Due to high concordance, the results found by examiner 2 were considered after random selection. The prevalence of biofilm was 47.8% ($n=32$). Patients with biofilm on the nasal mucosa were younger, median age: 8 (7 – 10); $p = 0.047$. The presence of biofilm was associated with decreased nasal flow measured by anterior rhinomanometry, with a lower nasal flow percentage in patients with biofilm (median 47%) compared to those without biofilm (median 79%); p -value 0.01. Regarding the severity of nasal flow obstruction, it was observed that patients with biofilm had more severe obstruction compared to those without biofilm ($p = 0.021$).

Conclusion: Nasal cytology was shown to be a technically simple, inexpensive, reproducible test capable of detecting biofilm in mouth-breathing children. Younger children had a higher prevalence of biofilm on the nasal mucosa. Furthermore, in children in whom biofilm was identified, a lower nasal flow and more severe obstruction were observed compared to those without biofilm. These findings may be related to the development of an unhealthy nasal microbiome, which could favor the emergence and development of biofilm.

Keywords: biofilm; nasal cytology; mouth breathing; child; rhinomanometry; microbiome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ELISA – "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*"; ou ensaio imunoenzimático.

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

HC/UFMG – Hospital das Clínicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

MGG – May-Grünwald-Giemsa

MPE – Matriz Polimérica Extracelular

Pa – Pascal

PAS: Ácido Periódico Schiff.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PECs – Polissacarídeos extracelulares

QS – *quorum sensing*

RAA – Rinomanometria Anterior Ativa

SEM – microscopia eletrônica de varredura

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

v.p – valor previsto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	O respirador oral: revisão da literatura	20
2.2	O Biofilme: conceito, características, métodos de detecção e impactos nas doenças de vias aéreas superiores.....	45
2.3	Artigo: “The prevalence of biofilms in children’s upper airway: a systematic review”	74
3	OBJETIVOS	96
3.1	Objetivo geral	96
3.2	Objetivos específicos	96
4	MÉTODOS	97
4.1	Aspectos éticos	97
4.2	Delineamento	98
4.3	Local do estudo.....	98
4.4	População em estudo.....	98
4.5	Critérios de inclusão.....	99
4.6	Critérios de exclusão.....	99
4.7	Definições	99
4.7.1	<i>Síndrome do Respirador Oral:</i>	99
4.7.2	<i>Rinite crônica:</i>	99
4.8	Exames específicos	100
4.8.1	<i>Avaliação clínica hipertrofia amigdaliana:</i>	100
4.8.2	<i>Avaliação hipertrofia de adenoide – fibronasolaringoscopia:</i>	100
4.8.3	<i>Rinometria anterior ativa:</i>	101
4.8.4	<i>Citologia nasal e identificação do biofilme:</i>	103
4.8.5	<i>Teste alérgico cutâneo:</i>	106
4.9	Protocolo do estudo.....	107
4.10	Análise estatística.....	108
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
5.1	Artigo original: Analysis of biofilm prevalence on the nasal mucosa of oral-breathing children	112
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	124

ANEXOS.....	125
Anexo I – Resolução que regulamente Teses de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.....	125
Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento	126
Anexo III: Ficha de atendimento no Ambulatório Respirador Oral do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais.....	137

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são aglomerados de microrganismos (bactérias ou fungos) associados à superfície e incorporados a uma matriz polimérica extracelular. Têm sido descritos em inúmeras patologias tais como rinosinusites, otites e polipose nasal¹.

Estima-se que mais de 90% das bactérias vivem em biofilme² e que, no mínimo, 65% de todas as infecções bacterianas em seres humanos estejam relacionadas à sua presença³. Logo, a sua identificação *in vivo* tem importantes implicações diagnósticas e terapêuticas¹.

A importância clínica do biofilme consiste no aumento da sobrevivência de microrganismos, pois confere resistência aos antimicrobianos, desinfetantes e detergentes; levando a uma maior dificuldade na erradicação de patógenos ou, ainda, no tratamento de dispositivos médicos implantados contaminados¹. Existem inúmeras teorias que explicam a resistência aos antimicrobianos proporcionada pelos biofilmes^{4,5,6}, que serão abordadas dentro um dos capítulos desta tese de doutorado.

Tem-se verificado que a presença de biofilmes não ocorre apenas em doenças infecciosas, mas também em doenças inflamatórias e imuno-mediadas. Estudos revelam que são encontrados mais frequentemente em hipertrofia de adenoides, polipose nasal, rinosinusite crônica^{1,4}. Inclusive, sugere-se que quanto maior for o grau de obstrução nasal, mais frequente é o seu surgimento, afinal, a falta de ventilação na cavidade nasal favorece o surgimento de infecções, propiciando, por sua vez, o surgimento de biofilmes^{1,4}

Sabe-se que as funções da cavidade nasal são condicionamento do ar inspirado (filtração, umidificação e aquecimento), olfato e defesa^{8,9}. Inúmeras condições podem alterar essas funções, como a respiração oral que permite que o ar inspirado vá diretamente às vias respiratórias baixas, o que pode causar hiper-reatividade das vias aéreas e inflamação bronquial crônica⁸.

Classifica-se como respirador oral o indivíduo que substitui o processo correto de respiração – padrão nasal – por um padrão de substituição oral ou misto, por um período maior que 6 meses^{8,10}. A respiração oral pode ser consequência de várias afecções de base, dentre elas doenças inflamatórias como rinites alérgicas, mas pode ser também consequência de fatores mecânicos (como hiperplasias adenoamigdalíneas), malformações congênitas com deformidades craniofaciais, lesões tumorais, etc^{8, 10, 11}.

Tendo em vista que, como supracitado, foi verificado que quanto maior o grau de obstrução nasal mais frequentemente é encontrado o biofilme^{1, 4}, postulou-se, na presente pesquisa, que os biofilmes estarão frequentemente presentes nos pacientes respiradores orais,

o que pode ser, inclusive, uma das causas de dificuldade terapêutica.

Observa-se que alguns pacientes respiradores orais, mesmo após a correção das causas obstrutivas, não apresentam melhora significativa na respiração oral. Assim, verificar se os pacientes respiradores orais possuem biofilme na mucosa nasal abre inúmeras possibilidades, dentre elas avaliar se essa seria uma possível causa da não melhora e, assim, propor novas medidas terapêuticas, abordando, inclusive, o tratamento dos biofilmes durante o processo terapêutico do paciente respirador oral.

Durante os últimos 20 anos, avanços tecnológicos e na pesquisa científica têm propiciado novas formas de diagnóstico e tratamento em diversas doenças⁷. Devido à sua natureza e às consequências prejudiciais, os biofilmes têm sido estudados em diversas patologias¹. No entanto, as pesquisas ocorrem por meio de técnicas complexas e caras (por exemplo, microscópio eletrônico ou microscopia confocal a laser), impedindo a aplicação na prática clínica e em condições de grande prevalência; tais como as patologias nasais¹.

Vários estudos têm demonstrado a importância da citologia nasal em auxiliar na compreensão dos mecanismos patofisiológicos de doenças agudas e crônicas, além de permitir a identificação de novas entidades patológicas^{12, 13}. Na infância, especialmente, é um método diagnóstico de grande auxílio por ser minimamente invasivo, proporcionando um seguimento clínico mais objetivo na faixa etária pediátrica¹².

Alguns pesquisadores têm demonstrado que os biofilmes podem ser identificados por meio da citologia nasal, com avaliação no microscópio óptico, especialmente usando a coloração May-Grünwald-Giemsa (MGG)^{1,4,7,14}. De acordo com essa técnica, quando os biofilmes aparecem na coloração ciano, associado à presença de bactérias ou esporos de fungos, encontram-se as "manchas infecciosas", que são a expressão do biofilme pela microscopia óptica⁴.

Inúmeras razões contribuem para aumentar o interesse na citologia nasal como método diagnóstico, entre elas, a simplicidade da técnica citológica e a ausência de invasividade, o que torna possível repetir o exame durante o seguimento e monitorização do paciente. Inclusive, é uma técnica que pode ser executada em qualquer idade⁴.

No entanto, apesar de todas as características mencionadas anteriormente, muitos centros ainda não utilizam a citologia nasal de forma rotineira⁷, principalmente com esse objetivo – identificação de biofilme.

Além disso, são escassas as pesquisas que avaliam a presença de biofilmes em crianças respiradoras orais. Quando a investigação dessa associação é feita por meio da citologia

nasal¹³ os estudos são praticamente inexistentes.

A possibilidade de identificar a presença de biofilme em respiradores orais com uma técnica simples e barata, como a citologia nasal, abre caminhos para aplicações diagnósticas e terapêuticas mais precisas, propiciando melhor compreensão e manejo do respirador oral com menos custos e intervenções desnecessárias.

Este volume é uma produção para defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Minas Gerais. Em cumprimento à Resolução 03/2010 de 05/02/2010 do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (disponível em: http://ftp.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude_crianca/Arquivos%202013/resolucao_03_2010_regulamenta_formato_de_teses_e_dissertacoes.pdf). 2010 (Anexo I), a presente tese foi organizada sob a forma de artigos.

O primeiro artigo, intitulado “*O Respirador Oral: revisão da literatura*”, consiste em uma revisão da literatura sobre o paciente respirador oral, cujo objetivo foi sumarizar e discutir os achados relevantes da literatura até o momento.

O segundo artigo, intitulado “*O Biofilme: conceito, características, métodos de detecção e impactos nas doenças de vias aéreas superiores*”, consiste em uma revisão de literatura sobre o biofilme, suas características, quais são os principais métodos de detecção existentes. Neste artigo também foi feita uma breve revisão das implicações da existência do biofilme nas doenças vias aéreas superiores e no paciente respirador oral.

O terceiro artigo, intitulado “*The prevalence of biofilms in children’s upper airway: a systematic review*” é uma revisão sistemática, realizado em colaboração com os Professores Giorgio Walter Canonica e Enrico Heffler, Humanitas Research Hospital (Milão, Itália). Os critérios estabelecidos pelo “Guia Metodológico *Cochrane* para Revisões Sistemáticas de Intervenções” foram observados para a sua realização. O protocolo de pesquisa foi submetido e aceito na plataforma do Registro Internacional de Revisões Sistemáticas Prospectivas (PROSPERO) sob o número CRD42022320168. Por serem inexistentes as revisões sistemáticas que avaliam a análise de prevalência do biofilme nas doenças de vias aéreas superiores, este foi o objetivo desse artigo inédito. Tal artigo foi submetido à revista *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*.

Os resultados originais do estudo são reportados em um artigo intitulado “*Analysis of biofilm prevalence on the nasal mucosa of oral-breathing children*”.

As referências bibliográficas estão listadas ao final de cada sessão, dispostas em ordem de citação e seguem as normas de Vancouver, conforme orientado pela já mencionada resolução 03/2010 de 05/02/2010 (Anexo I).

REFERÊNCIAS

- 1 Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, Quaranta N. Assessment of biofilm by nasal cytology in different forms of rhinitis and its functional correlations. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2013;45(1):25-9
- 2 Nazzari E, Torretta S, Pignataro L, Marchisio P, Esposito S. Role of biofilm in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34(3):421-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2261-1>
- 3 Singh P, Mehta R, Agarwal S, Mishra P. Bacterial biofilm on the sinus mucosa of healthy subjects and patients with chronic rhinosinusitis (with or without nasal polyposis). *J Laryngol Otol* 2015;129(1):46-9. DOI: <https://doi.org/10.1017/S002221511400303X>
- 4 Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, Mosca A, Quaranta N. Nasal cytology: the “infectious spot”, an expression of a morphological-chromatic biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(9):1105-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1198-x>
- 5 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-22. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- 6 Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(2):114-22. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- 7 Heffler E, Landi M, Caruso C, Fichera S, Gani F, Guida G et al. Nasal Cytology: Methodology with application to clinical practice and research. *Clin Exp Allergy* 2018;48(9):1092-106. DOI: <https://doi.org/10.1111/cea.13207>
- 8 Yamaguchi H, Tada S, Nakanishi Y, Kawaminami S, Shin T, Tabata R et al. Association between mouth breathing and atopic dermatitis in Japanese children 2–6 years old: A population-based cross-sectional study. *PLoS One* 2015;10(4):e0125916. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125916>
- 9 Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 2006;34(3):252-69. DOI: DOI: 10.1080/01926230600713475
- 10 Barros JRC, Becker HMG, Pinto JA. Avaliação de atopia em crianças respiradoras bucais atendidas em centro de referência. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(6):458-64. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0021-75572006000800011>
- 11 Długaszewska J, Leszczynska M, Lenkowski M, Takarska A, Pastusiak T, Szyfter W. The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016;273(8):1989-94. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3650-5>

- 12 Pipolo C, Bianchini S, Barberi S, Landi M, D'Auria E, Fuccillo E et al. Nasal cytology in children: scraping or swabbing? *Rhinology* 2017;55(3):242-50. DOI: <https://doi.org/10.4193/rhin16.287>
- 13 Gelardi M, Marseglia GL, Licari A, Landi M, Dell'Albani I, Incorvaia C et al. Nasal cytology in children: recent advances. *Ital J Pediatr* 2012;38:51. DOI: <https://doi.org/10.1186/1824-7288-38-51>
- 14 Gelardi M. *Atlante di Citologia Nasale per la diagnosi differenziale delle rinopatie*. 2ed. Milano: Edi Ermes srl; 2012.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O respirador oral: revisão da literatura

INTRODUÇÃO

Classifica-se como respirador oral, o indivíduo que substitui o padrão nasal de respiração por um padrão oral ou misto¹⁻⁶, por um período maior que 6 meses^{1-3,7,8}. De um modo geral, a respiração exclusivamente oral é rara, havendo na maioria das vezes o padrão misto^{2,6,9,10}. Por este motivo, alguns autores acreditam que o uso do termo respirador oral é inadequado e deve, portanto, ser substituído pelo termo: respirador nasal insuficiente⁹.

Enquanto a respiração, como processo motor, depende de um automatismo controlado pelo sistema nervoso central, a execução do ato de respirar pode ter várias interferências, iniciando-se pelas estruturas mais periféricas que canalizam o fluxo de ar¹¹.

O padrão nasal é o processo correto de respiração^{1,9}. A presença de qualquer obstáculo no sistema respiratório, especialmente na região nasal e/ou faríngea, ocasiona a obstrução nasal, obrigando o paciente a respirar pela boca^{9,12,13}, isto é, a utilizar a cavidade oral como um conduto passivo na respiração¹². Assim, a respiração oral é um mecanismo adaptativo^{4,15}.

Sabe-se que a resistência do ar através do conduto nasal é importante para a formação adequada das cavidades nasais¹¹. Como a respiração oral não favorece esse efeito formativo, surgem inúmeras consequências negativas nos aparelhos envolvidos na respiração e, também, ocorrem mudanças miofuncionais com a modificação do eixo corporal, alterando toda a dinâmica do corpo⁵ e, até mesmo, alterações sensoriais¹⁴. A língua e a mandíbula se deslocam para baixo e para trás (em relação à base do crânio), gerando uma inclinação anterior na cabeça. Essas modificações posturais podem interferir no crescimento da mandíbula e dos dentes¹², proporcionando significativas mudanças na arcada dentária e nas estruturas osteoesqueléticas da face^{12,16}. No respirador oral, a inclinação anterior da cabeça é a principal mudança postural para facilitar o fluxo de ar através da boca^{17,18}.

A etiologia da respiração oral é multifatorial^{13,19} e complexa²⁰ e ocorre como consequência de várias afecções de base, dentre elas fatores mecânicos (alterações de septo nasal, hiperplasias adenoamigdalíneas), doenças inflamatórias (rinites alérgicas), malformações congênitas com deformidades craniofaciais, lesões tumorais^{1,5,19,21-25} e, até mesmo, alterações comportamentais (hábitos orais inadequados)⁷ e fatores genéticos²⁰.

Dentre as afecções inflamatórias, a rinite alérgica merece destaque^{1,21}, uma vez que é

uma das causas mais frequentes de respiração oral²¹, afetando cerca de 10 a 30% da população geral¹. Além disso, sua incidência está aumentando mundialmente¹.

O diagnóstico da ocorrência da respiração oral na infância é essencialmente clínico^{2,12}. Deve-se combinar uma rigorosa e cuidadosa anamnese, seguida de um exame físico minucioso, com atenção especial às possíveis alterações morfológicas e congênitas¹².

Exames complementares geralmente são realizados para avaliar o grau de obstrução das vias aéreas e aprofundar no diagnóstico diferencial das causas da respiração oral e, assim, direcionar e individualizar a abordagem terapêutica².

O diagnóstico e a abordagem precoce da respiração oral são fundamentais para minimizar suas consequências². A instalação crônica da respiração oral, durante a fase de crescimento de uma criança, afetará não somente o desenvolvimento normal do esqueleto facial, mas interferirá também, de forma significativa, na saúde geral. Portanto, é necessário a atuação de uma equipe multidisciplinar, evitando, dessa forma, desordens consequentes a uma respiração oral crônica¹².

Tabela 1: Principais etiologias da respiração oral

Hiperplasias adenoamigdalíneas
Rinites alérgicas
Alterações de septo nasal
Malformações congênitas com deformidades craniofaciais
Lesões tumorais
Alterações comportamentais
Fatores Genéticos

Tabela 2: Equipe necessária para o acompanhamento do paciente respirador oral

Alergologista
Fisioterapeuta
Fonoaudiólogo
Nutricionista
Odontologista
Otorrinolaringologista
Pneumologista
Terapeuta ocupacional

PREVALÊNCIA, CLASSIFICAÇÃO E ETIOLOGIA DA RESPIRAÇÃO ORAL

A prevalência da respiração oral na infância é difícil de ser determinada², havendo grandes diferenças percentuais que podem ser justificadas por uso variado de critérios e de

diferentes métodos⁹.

Além disso, até o momento, existem poucos estudos com relatos da prevalência da respiração oral na infância^{9,19}. Os que mencionam, estimam uma prevalência entre 5 e 75%^{2, 6, 7,9,13,20}, variando de acordo com o método de análise^{2, 19}. Estima-se que, no Brasil, a respiração oral afete 26.6 a 53.3% das crianças em idade escolar^{19, 33, 34}.

Cerca de 80% das crianças respiradoras orais possuem alteração na postura corporal¹⁷. Alguns estudos referem que a respiração oral é mais comum no sexo masculino^{4,17}. Isso pode ser explicado pelo fato de que as crianças do sexo masculino apresentam um menor calibre da via aérea e por serem mais acometidas pela rinite alérgica^{4,17}, quando comparadas com crianças do sexo feminino da mesma idade.

A respiração oral pode ser classificada em orgânica ou funcional de acordo com a presença ou não de uma causa obstrutiva que justifique este padrão respiratório^{2,6}. O respirador oral funcional é comumente observado em pacientes com alterações neurológicas, assim como naqueles que já tiveram sua causa obstrutiva resolvida, mas, que apesar disto, ainda mantém por hábito a respiração através da boca^{2, 23}.

Os pacientes que apresentam alterações anatômicas que obstruem a passagem do ar pelo nariz e/ou pela faringe são chamados de respiradores orais orgânicos, por exemplo, aqueles apresentam rinite alérgica e hiperplasia adenotonsilar².

Ainda, existem autores que classificam separadamente dos pacientes funcionais os respiradores orais devido às alterações neurológicas. Nesse caso, para esses autores, existem três classificações⁶.

A obstrução de vias aéreas superiores, nas suas diversas localizações, constitui, então, a principal causa da respiração oral, variando sua prevalência de acordo com a idade do indivíduo².

Em recém-nascidos, as alterações anatômicas de origem congênita predominam, sendo a atresia de coanas uma importante causa nesta faixa etária². Em lactentes e pré-escolares há o predomínio de causas adquiridas, como a hiperplasia adenoamigdaliana e rinosinusites². A rinoconjuntivite alérgica é uma importante causa de padrão de respiração oral no escolar e adolescente².

Fatores importantes para o desenvolvimento da respiração oral são o desmame precoce³¹ e o uso prolongado de chupetas^{31,32} e mamadeiras³¹. Estima-se que 27% das crianças usuárias de chupeta, entre 2 a 5 anos de idade, desenvolverão algum tipo de má oclusão³³. Entre crianças, a prevalência de mordida aberta anterior varia de 17 a 96%, a mordida cruzada posterior apresenta taxas de 27 a 88%, mas para crianças sem hábitos de sucção não nutritiva

com chupetas, essas taxas chegam a apenas 11%³³.

A presença de sobressaliência dos incisivos é diagnosticada em 52% dos usuários de chupeta e quase 33% dos não usuários³³. Em contraste, entre as crianças que não usam chupeta, apenas 3% apresentam má oclusão³³. No entanto, a prevalência de algumas mudanças na oclusão, como a mordida aberta anterior, pode diminuir com a idade, indicando que a má oclusão tem o potencial de autocorreção com eliminação do estímulo, particularmente se o hábito de sucção não nutritiva for interrompido por volta de 2 e 3 anos de idade³².

Do ponto de vista do desenvolvimento craniofacial, o uso da chupeta por um longo tempo (mais de 2 anos) e com alta frequência (um “uso diário”), tem sido associada a algumas alterações de oclusão, como mordida aberta anterior e mordida cruzada posterior^{35,36,54}.

Alguns autores relatam que o uso de chupetas ortodônticas, que são achatadas, na tentativa de simular o mamilo do seio materno e, assim, manter a pressão necessária da língua no palato e obter uma vedação labial mais aceitável^{33,36,37}, permitem desenvolvimento fisiológico da face e a redução dos efeitos deletérios do uso de chupetas convencionais³⁶, também conhecidas como mamilo “cereja”, que tem um tronco que fica em formato de bola³³.

No entanto, algumas meta-análises^{35,36} ressaltam que falta uma definição adequada para o que seria uma chupeta funcional ou ortodôntica, e que as chupetas ortodônticas parecem causar menos mordida aberta anterior do que as convencionais³⁶, mas, ainda assim, geram prejuízos, não anulando ou impedindo o desenvolvimento da mordida cruzada posterior³⁵. Logo, parece que a má oclusão está mais relacionada ao tempo de uso do que ao desenho da chupeta^{33,37}.

Até o momento, há insuficiência de fortes evidências disponíveis para apoiar a hipótese de que o uso de chupetas ortodônticas é capaz de prevenir traços de má oclusão quando comparados às convencionais, e que mais estudos e novos dados sobre os efeitos das chupetas ortodônticas são necessários na literatura para fundamentar o argumento^{33,36,37}.

De toda forma, é praticamente consenso que os efeitos deletérios do uso de chupetas, seja ortodôntica ou convencional³⁸, está diretamente relacionado à duração (maior que 24 – 36 meses) e frequência^{32,33,35,36,38,39} (maior que 4 – 6h por dia)³⁶, bem como à predisposição individual, condicionada pelos fatores genéticos^{6,38}.

A criança que recebe o aleitamento materno natural, e não por mamadeira, sobretudo nos primeiros meses de vida, tem maior possibilidade de ser uma respiradora predominantemente nasal durante a vida¹⁹.

A amamentação é a primeira e talvez a experiência mais crítica para desenvolvimento facial⁴⁰. Ao contrário da alimentação com mamadeira, durante a amamentação, os bebês

puxam a mama profundamente para dentro da boca e a mama se expande e molda o palato duro por meio de pressões e ondas peristálticas repetidas⁴⁰. A amamentação requer compressão da mandíbula, o que ajuda a desenvolver melhor os músculos masseteres, quando comparado com o aleitamento por meio da mamadeira⁴⁰.

Durante a amamentação, ocorre um movimento intenso dos lábios, da língua, da mandíbula, da maxila e das bochechas, com efeitos benéficos para o desenvolvimento motor oral do bebê⁴¹.

Os movimentos da mandíbula envolvidos na extração do leite da mama fornecem estímulos importantes para o crescimento da região articular temporomandibular e, conseqüentemente, incentiva o crescimento e desenvolvimento harmonioso da região facial⁴¹.

Os músculos envolvidos na amamentação, especialmente o masseter, são os mesmos músculos que mais tarde (6 meses em diante) realizarão a mastigação. Portanto, a mastigação continua o processo de estimulação dos músculos orofaciais que começaram com a sucção no peito⁴¹.

Em suma, a postura labial e lingual adequada, a respiração nasal adequada e o correto diâmetro transversal do palato estão relacionados à amamentação natural^{24,39}. Por outro lado, outras formas de sucção, como aquelas envolvidas na mamadeira e no uso de chupeta, produzem diferentes estímulos, que podem comprometer o desenvolvimento motor oral e a posição e força das estruturas estomatognáticas, com um impacto prejudicial nas funções orais, incluindo a mastigação⁴¹.

Estudos demonstraram que o aleitamento materno exclusivo teve uma correlação inversa com a mordida cruzada anterior, posterior e má oclusões⁴⁰ e que quanto mais tempo as crianças foram amamentadas, mais se observou o efeito protetor para tais alterações, tornando-se menos provável que a criança apresentasse má oclusão⁴⁰.

É importante salientar que a ausência de má oclusão na dentição decídua é um fator prognóstico favorável para o desenvolvimento de uma boa oclusão na dentição mista e permanente; por outro lado, a má oclusão na dentição decídua geralmente persiste na dentição mista e permanente²⁴.

Fica, portanto, evidente que o estímulo ao aleitamento materno exclusivo até os 6 meses de idade⁴² e complementar até os 2 anos ou mais deve ser estimulado como medida protetora para o desenvolvimento de má oclusão oral⁴², bem como deve ser desestimulado o uso de chupetas e mamadeira, uma vez que favorecem, futuramente, o desenvolvimento de má oclusão oral.

O PADRÃO FISIOLÓGICO: A RESPIRAÇÃO NASAL NA INFÂNCIA

A cavidade nasal é a câmara de comunicação entre o ar ambiente e o sistema respiratório. É constituída por uma complexa geometria tridimensional que permite o transporte de ar entre o ambiente e os pulmões²⁷.

O caminho de passagem do ar se estreita na válvula nasal e se alarga na medida que atinge a seção média das conchas nasais. Posteriormente à válvula nasal, a superfície interna é revestida por células epiteliais ciliadas, que são ricas em células caliciformes, que produzem muco²⁷.

O nariz é revestido por epitélio pseudoestratificado que repousa sobre uma membrana basal, separando-a de camadas submucosas mais profundas^{27,28}. Esse epitélio colunar pseudoestratificado e ciliado é observado em todas as passagens condutoras do trato respiratório²⁷. A submucosa contém glândulas mucosas, seromucosas e serosas^{27,28}, que complementam a secreção das células caliciformes²⁷.

As veias da lâmina própria formam sinusoides cavernosos de paredes finas, também chamados de corpos cavernosos²⁷. São as pequenas artérias, arteríolas e anastomoses arteriovenosas que determinam o fluxo sanguíneo regional e os vasos de capacitância (veias e sinusoides cavernosos) que estabelecem a patência nasal, que é controlada pelo sistema nervoso simpático²⁸.

Respirar é um ato reflexo. Durante a inspiração, o ar entra no corpo através das narinas (sem esforço e com fechamento simultâneo da cavidade oral), onde é aquecido e umedecido. Os cílios protegem o trato respiratório contra danos que poderiam ser causados por um corpo estranho²¹. Esse aumento da atividade da área nasal estimula os tecidos do nariz, seios da face e da circulação paranasal, gerando uma influência favorável no crescimento das estruturas ósseas adjacentes^{21,25}.

Após ocorrer a entrada do ar na cavidade nasal, a parte posterior da língua entra em contato com o palato mole, a ponta da língua entra em contato com a face lingual dos incisivos inferiores e sobe para as cristas palatinas²¹. O osso hioide se eleva acima do nível da borda inferior da mandíbula. O ar inspirado segue pela faringe, laringe e traqueia até chegar aos brônquios e, uma vez nos pulmões, ocorre a troca gasosa entre oxigênio e dióxido de carbono²¹.

O fluxo aéreo nasal dominante alterna-se habitualmente entre as narinas^{2,26}, sendo este processo conhecido como ciclo nasal^{2,11,27,28}, que é mediado por mudanças no ingurgitamento dos vasos de capacitância da submucosa nos cornetos médios e inferiores^{27,28}. Tudo isso

contribui para a diminuição da velocidade do fluxo de ar e cria condições de fluxo turbulento que contribuem para moldar as estruturas nasais¹¹. A magnitude da resistência nasal alterna entre as duas narinas a cada 2 a 4 horas em 60 a 70% dos indivíduos saudáveis²⁸.

A resistência nasal é maior durante a infância, diminui com a idade e é controlada, principalmente, por ingurgitamento vascular nos cornetos médios e inferiores²⁸.

Os recém-nascidos são respiradores nasais obrigatórios nos primeiros meses de vida porque, anatomicamente, toda a extensão da língua está em contato com o palato duro e mole, e a epiglote é superior ao véu palatino, logo, a laringe tem um posicionamento alto em relação à cavidade oral, o que causa dificuldade para a respiração oral.^{43, 44} Essa característica é benéfica, uma vez que permite que a amamentação seja concomitante à respiração. Por outro lado, obstruções nasais nessa faixa etária podem levar a quadros graves de desconforto respiratório^{43, 44}

Inúmeras são as causas de obstrução nasal nos recém-nascidos podendo, inclusive, ser de causa multifatorial. É extremamente importante o pediatra estar atento para realização diagnóstica e programar as intervenções adequadas de forma precoce.

Tabela 3: Principais causas de respiração oral em recém-nascidos

Congênitas

Atresia de coanas, Estenose congênita da abertura piriforme, Cisto de ducto nasolacrimal, Massas nasais da linha média (Ex.:glioma)

Neoplasias

Teratoma, Hemangioma, Hamartoma, Lipoma, Linfagioma,Neurofibroma,etc

Infecciosas

Infeções de vias aéreas superiores ex.: vírus sincicial respiratório

Corpo estranho

Traumas/iatrogenia

Ex.: Hematoma septal, deslocamento septal, rinite medicamentosa, uso prolongado de CPAP ou de tubo nasogástrico

Síndromes

Ex.: Fibrose Cística, Katargener, Trissomia do 21

Inflamações

Ex.: rinite neonatal idiopática

Maternas

Ex.: Estímulo estrogênico, uso de medicamentos (metildopa, antidepressivos tricíclicos, opiáceos, propranolol)

Adaptado de: Gnagi SH, Schraff SA (2013).⁴³

Em crianças maiores, além da óbvia diferença de tamanho da cavidade nasal em relação aos adultos e a consequente maior resistência ao fluxo aéreo, observa-se maior variabilidade dessa resistência decorrente da imaturidade do controle vasomotor da mucosa nasal na faixa etária pediátrica². Desta forma, o ciclo nasal na infância não está bem estabelecido como nos adultos², embora se saiba que a função respiratória normal se faz por via nasal desde o nascimento^{15,29} e assim deve ser pelo resto da vida, mesmo com a maior resistência à passagem de ar inalado pela via aérea nasal²⁹.

Em crianças sem distúrbios respiratórios, a respiração nasal leva ao correto crescimento craniofacial e ao desenvolvimento adequado da interação com outras funções, como mastigação e deglutição^{19,30}.

Já é de conhecimento geral que a cavidade nasal tem papel fundamental na condução, aquecimento, umidificação e filtração do ar inspirado^{2,7,22, 29,31,45}, sendo importante fonte de proteção para as cavidades paranasais, auriculares²⁹ e vias aéreas inferiores^{2,7,27,29}, otimizando, assim, as trocas pulmonares^{11,27}.

Contrariamente, quando o ar entra pela boca e vai diretamente ao trato respiratório inferior, pode causar hiper-reatividade das vias aéreas e inflamação brônquica crônica⁷, além de conferir maior suscetibilidade a infecções^{2,11}.

Outras importantes funções da respiração nasal adequada são a percepção de odores^{2,11}, ressonância do ar e fonação, além da função auditiva². Ao se respirar pela boca, inibi-se os nervos aferentes nasais (nervo autonômico e simpático trigeminal), que atuam na regulação da profundidade da respiração e do calibre das vias aéreas^{4,46}. O bloqueio nasal resulta, portanto, no aumento da resistência nasal e diminuição da complacência pulmonar, o que afeta a expansão torácica, proporcionando uma ventilação alveolar inadequada^{4,46,47}, além do enfraquecimento dos músculos respiratórios⁴⁷.

Percebe-se, portanto, que a respiração nasal propicia qualidade ao ar inspirado, protege as vias aéreas e favorece o posicionamento correto dos órgãos fonoarticulatórios, garantindo bom desempenho das funções estomatognáticas^{3,29} e quimiossensoriais.

Quando se realiza a inalação por meio da cavidade nasal, os compostos voláteis inalados são transportados para as terminações nervosas quimiossensoriais intranasais que dão origem às sensações de olfato e trigeminais¹¹.

Um exemplo da importância das sensações de olfato pode ser observado nos recém-nascidos. É por meio desse mecanismo que conseguem sentir o cheiro do leite, chegar à mama e reconhecer o odor do cuidador para identificação, consolo e conservação de energia¹¹.

Além das funções supracitadas, relacionadas à respiração nasal, o fato de o sistema olfatório estar intimamente ligado às regiões do cérebro límbico, que medeiam a emoção, a memória e o comportamento, sugere-se que a respiração nasal pode até mesmo moldar a atividade elétrica rítmica em áreas límbicas, com efeitos correspondentes nas funções cognitivas²⁶. Assim, a respiração serve mais do que apenas fornecer oxigênio ao corpo; também pode organizar a atividade da população neuronal nas regiões do cérebro para orquestrar comportamentos complexos associados à sensação orofacial²⁶. No entanto, esse aspecto ainda não é bem compreendido e necessita de mais estudos²⁶.

PADRÃO DE RESPIRAÇÃO ORAL NA INFÂNCIA E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Fisiologicamente, a respiração oral ocorre quando o organismo identifica uma elevada resistência nasal ao fluxo aéreo^{2,29} ou quando há necessidade de aumento da demanda de oxigênio, como é observado durante o esforço físico². A respiração oral surge, então, como um mecanismo compensatório diante de uma respiração nasal ineficiente^{2, 25, 29, 48, 49}, podendo, com o passar do tempo, transformar-se em hábito e não mais em necessidade^{2, 22}, ou seja, as vias aéreas superiores estão desobstruídas, mas a criança continua com a respiração viciosa pela boca²⁹. Logo, a respiração oral em crianças não está, necessariamente, associada a uma obstrução severa ao fluxo de ar pelo nariz²⁸.

Sabe-se que o Sistema Estomatognático é composto por estruturas relacionadas às funções vitais (respiração, sucção, mastigação e deglutição) e sociais (fonação e articulação). Estruturas diretamente interligadas e relacionadas à sobrevivência¹⁴. Assim, alterações em qualquer uma delas geram um efeito em cadeia, o que pode acarretar desequilíbrio geral desse sistema, com impactos no desenvolvimento e na qualidade de vida do indivíduo¹⁴.

Nesse sentido, inúmeros estudos mostram que esta mudança no padrão respiratório, aparentemente benigna¹¹, tem efeitos em cascata imediatos^{4, 11, 46}, prejudicando múltiplas funções fisiológicas e comportamentais¹¹.

Embora o efeito da obstrução nasal sobre o crescimento facial e dental seja controverso, em função do critério muitas vezes subjetivo utilizado para definir a respiração oral^{20, 29}, grande parte da literatura demonstra relação direta da obstrução nasal com as alterações do crescimento facial, da fala, auditiva, sensoriais, além de distúrbios alimentares, alterações posturais, dificuldades escolares, apatia e distúrbios do sono, que interferem de forma significativa na qualidade de vida^{2,3,9,11, 14,17,20,29,30, 50- 55}

CARACTERÍSTICAS DO RESPIRADOR ORAL

Todas as alterações características do paciente respirador oral ocorrem devido à necessidade respiratória adaptativa.

O Respirador Oral: alterações faciais e posturais

As alterações posturais na criança respiradora oral ocorrem devido a um mecanismo compensatório. A obstrução ou estreitamento do espaço aéreo faríngeo leva à projeção da cabeça para frente, para melhorar a trajetória do fluxo de ar para o trato respiratório inferior, o que causa adaptações posturais^{17, 52, 56}.

A criança ao nascer, apresenta uma conformação craniofacial característica, estando o crânio já bem desenvolvido. No entanto, a face é relativamente pequena em relação ao crânio apresentando proporção craniofacial de 8:1 nesta faixa etária. Com o crescimento da criança, atinge proporções de 4:1 aos 5 anos e 2:1 na fase adulta². Este é um dos motivos pelos quais não se consegue prever ao observar um recém-nascido, como será seu rosto quando adulto. Acredita-se que por volta dos 12 anos de idade, 90% do crescimento craniofacial já se tenha completado, havendo pouca possibilidade de modificações a partir de então^{2, 30}.

Como o crescimento facial tem uma velocidade maior nos primeiros anos de vida, o modo respiratório neste período tem importante contribuição para o desenvolvimento adequado das estruturas e funções⁵⁷. Portanto, a respiração, quando não fisiológica e conduzida pela boca, tende a provocar mudanças nas estruturas faciais e cervicais, que pode se estender ao tronco e membros⁵⁷.

O crescimento ósseo do crânio é influenciado pelo crescimento dos tecidos moles, que contêm as informações genéticas para tal. O tamanho e forma do esqueleto facial são também influenciados pela ação dos tecidos relacionados interna e externamente a ele². Deste modo, o crescimento do complexo ósseo-craniofacial está diretamente associado às funções dos músculos craniofaciais, destacando-se os movimentos de cabeça, postura, mastigação, deglutição, fala, expressões faciais e mímicas; além das funções respiratórias, visuais, olfatórias e auditivas^{2, 6}. Portanto, fatores que interferem com as funções dos músculos faciais na infância podem afetar também a conformação da face^{2, 28}, inclusive na vida adulta^{2, 58}, além de gerarem inúmeras outras consequências negativas para a criança.

Estudos experimentais em macacos^{2, 58}, demonstraram que o nariz é uma importante área para o crescimento facial normal^{2, 59}. A partir de uma obstrução nasal induzida

experimentalmente, os animais mantinham suas bocas abertas e protruíam suas línguas durante todo o tempo. Esta tentativa de manter a via aérea aberta através da boca foi associada a uma maior atividade dos músculos da face e da língua. Observou-se ainda que, mesmo um ano após a resolução da obstrução nasal, alguns animais ainda mantinham a respiração oral. No entanto, essa resposta não foi uniforme entre os animais^{2, 59}.

Logo, a respiração oral em humanos também pode apresentar uma variedade de sintomas, compreendendo desde uma aparência normal a importantes irregularidades esqueléticas e dentárias. A obstrução nasal seria apenas o fator desencadeante, mas as consequências seriam advindas dos desvios de recrutamento muscular² consequente da obstrução nasal.

A postura anterior da cabeça é uma estratégia adotada por crianças com respiração oral para facilitar e acelerar o fluxo de ar⁵². Se essa posição for adotada por tempo prolongado, pode causar aumento da tensão dos músculos extensores da cabeça, alongando os músculos infra-hióideos. Com isso, cria-se uma tração inferior e posterior do osso hioide que faz, como consequência, que a mandíbula seja puxada na direção de retração e depressão⁵². Assim, a posição anterior da cabeça causa protração e rotação dos ombros, elevação e abdução das escápulas, depressão da região torácica anterior e deslocamento para frente de todo o corpo¹⁷. Tudo isso leva à diminuição da atividade do diafragma e à hipoatividade da musculatura abdominal, dificultando o sinergismo entre estes dois músculos⁴.

Cabe reforçar que o equilíbrio da parte inferior do crânio depende dos músculos mastigatórios e da região hioidea. Portanto, a análise do Sistema Estomatognático não pode ser separada de seu relacionamento com as estruturas da cabeça e do pescoço, mas deve ser avaliado como um todo^{5, 15}.

Além disso, alguns estudos relatam que o uso excessivo dos músculos da cabeça, pescoço e cintura escapular pode desencadear fraqueza muscular secundária e promover assimetria do ombro, que são sinais de alterações nas curvaturas da coluna vertebral¹⁷, indicativas, por exemplo, de escoliose.

É prudente mencionar que as alterações posturais supracitadas também podem ser encontradas em crianças respiradoras nasais, não sendo exclusiva dos respiradores orais. No entanto, ocorrem em menor frequência nos respiradores nasais, quando comparada às crianças respiradoras bucais¹⁵.

É importante ressaltar que os respiradores orais tem mais chance de manter as alterações posturais na vida adulta, enquanto os respiradores nasais conseguem reverter a alteração postural com medidas corretivas ao longo do crescimento¹⁵.

Para Krakauer *et al*¹⁵ as crianças respiradoras nasais com alterações posturais maiores de 8 anos melhoram sua postura à medida que crescem, enquanto crianças com respiração oral da mesma idade mantêm o padrão corporal desorganizado compatível com as posturas encontradas quando menores. Por esse motivo, sugerem que é inadequado usar a palavra patológico para definir as alterações posturais de crianças com respiração oral até os 8 anos de idade. No entanto, ressaltam que se esse padrão respiratório persistir por além dessa idade, pode-se causar alterações estruturais no eixo corporal¹⁵

Dessa forma, medidas corretivas posturais e para retorno da respiração nasal devem ser feitas antes dos 08 anos de idade, com o intuito de evitar tais alterações¹⁵ que podem persistir, inclusive, pela vida adulta.

Pacientes com o hábito da respiração oral mantêm a boca constantemente aberta. Dessa forma, como a língua não fica em contato constante com o palato duro, não ocorre o estímulo à expansão da maxila⁶⁰, favorecendo a formação do palato ogival. Além disso, a arcada dentária superior tende a se deslocar para frente e para dentro, provocando mordidas cruzadas²³. Portanto, como a língua se posiciona de forma inadequada, ela deixa de exercer a função modeladora o que pode favorecer o desenvolvimento de más oclusões em crianças respiradoras orais^{61, 72}.

Assim, o mecanismo de compensação postural ocorre da seguinte forma: pela falta de fluxo aéreo nasal, a pressão da língua no palato é reduzida, desviando a mandíbula para baixo e para trás em relação à base do crânio, onde os músculos abaixadores da mandíbula exercem sobre ela uma tração muscular para trás, a cada inspiração²⁹. Devido a este abaixamento mandibular, os dentes superiores são privados de seu suporte muscular e pressão lateral. A partir desta relação instável entre forças musculares externas e internas sobre a boca, o músculo bucinador causa uma pressão no arco maxilar, resultando em estreitamento, associando o comprometimento respiratório às deformidades dentofaciais^{29, 30}, craniofaciais^{2,11,30, 40} e posturais^{2,11,17,24,30,52,56}, percebidas, principalmente, por mudanças na posição da cabeça em relação ao pescoço³⁰, como já mencionado anteriormente.

As alterações mais frequentes encontradas nos respiradores orais são língua com dorso elevado e a ponta abaixada, língua no assoalho oral ou interposta anteriormente entre as arcadas, lábio inferior espesso e evertido, hiperfunção do músculo mental, flacidez de lábios, língua e bochechas, deglutição atípica, assimetrias faciais, respiração ruidosa, aumento da altura da face, atresia maxilar, má oclusão, postura aberta de lábios e palato ogival e estreito⁶².

Em indivíduos geneticamente predispostos, tudo isso pode resultar em acentuação do crescimento vertical da face e retrognatia, mandíbulas mais obtusas, palatos mais altos e

estreitos e maior propensão em desenvolver mordidas cruzadas posteriores^{12,30,50,51}

Todas as manifestações mencionadas caracterizam a “síndrome da face longa”, alteração comumente encontrada em crianças respiradoras orais^{10,11,15,19,28,50,63}, também chamada de face adenoideana^{20,24,28}.

Portanto, algumas crianças respiradoras orais podem ser identificadas por características faciais típicas, dentre elas: boca entreaberta, lábio superior curto e lábio inferior volumoso e evertido, lábios separados e ressecados, graus variáveis de face estreita, nariz achatado, orifícios nasais pequenos e mal desenvolvidos, língua hipotônica, volumosa, que repousa no assoalho oral e olheiras profundas^{12,23}.

A tabela a seguir, sintetiza as alterações dentárias mais frequentes encontradas nos respiradores bucais e o mecanismo correspondente²³:

Tabela 4: Alterações dentárias mais frequentes encontradas nos respiradores orais e o mecanismo correspondente

Alteração	Mecanismo
Mordida cruzada	Estreitamento maxilar
Mordida aberta anterior	Falta de pressão do lábio superior sobre os incisivos e rompimento do equilíbrio de forças mantenedoras da oclusão oral
Palato ogival	Ausência da expansão da maxila pela pressão da língua

O respirador oral e alterações na respiração

Embora também faltem estudos metodologicamente padronizados que correlacionem as alterações posturais de todo o corpo (e não apenas da cabeça) com a respiração oral⁵², muitos autores advogam a favor dessa relação, uma vez que os músculos são organizados em cadeias miofasciais, logo, há um esforço físico constante dos músculos inspiratórios acessórios⁶⁴, como o escaleno, o esternocleidomastóideo e o trapézio superior⁵⁷, o que poderia comprometer outros segmentos posturais⁶⁴, causando um desequilíbrio muscular progressivo^{46, 57}. Este padrão é perpetuado pela diminuição da atividade do diafragma e hipotonicidade da musculatura abdominal^{46, 47}.

O uso da musculatura acessória na inspiração gera um aumento do consumo energético e a uma ventilação pulmonar inadequada⁴⁶. Portanto, os pacientes respiradores orais também desenvolvem comprometimento no diafragma por causa de sua inatividade e falta de sinergismo com os músculos abdominais^{46, 47}, resultando em menor expansibilidade torácica.

Estas adaptações provocam prejuízo na ventilação pulmonar^{4, 46}, com conseqüente reflexo na capacidade ao exercício⁴.

Alguns pesquisadores relacionam valores espirométricos abaixo do previsto com características de distúrbio obstrutivo em pacientes respiradores orais⁶⁴, principalmente naqueles que possuem rinite alérgica como causa da respiração oral⁶⁵. Diante disso, espera-se que essas crianças apresentem tosse ou relatem cansaço durante a prática de atividades físicas⁶⁴.

A função pulmonar também pode ser prejudicada pela falta de filtragem, da umidificação e do aquecimento do ar, quando inalado pela boca¹³. Durante a respiração oral, pode ocorrer troca ineficiente de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂), uma vez que pode haver diferentes níveis de concentração de óxido nítrico (NO). É importante recordar que a respiração nasal é essencial para a produção de NO⁵⁹, uma vez que o NO é produzido, predominantemente, nos seios da face localizados na via nasal⁵⁹. O óxido nítrico inalado pela respiração nasal mostrou aumentar eficiência de troca de oxigênio e aumento de oxigênio no sangue em 18%, melhorando a capacidade dos pulmões de absorver oxigênio⁵⁹.

Como um potente vasodilatador, o NO chega aos pulmões e é usado nos capilares dos alvéolos, expandindo os vasos e aumentando a troca de O₂ e CO₂, sendo vital para a manutenção todos os órgãos do corpo^{13,59}. Portanto, a concentração insuficiente de NO na respiração oral proporciona dificuldades na absorção de O₂ durante as trocas gasosas¹³. Uma grande quantidade de ar que entra pela respiração oral também pode atrapalhar a transferência de O₂ do pulmão para a hemoglobina¹³. Assim, respiradores bucais tem uma concentração sanguínea de oxigênio menor em relação aos respiradores nasais^{23,59}. Essa baixa concentração de oxigênio no sangue tem sido associada ao desenvolvimento de hipertensão e insuficiência cardíaca⁵⁹.

O respirador oral e a função cognitiva

Outro importante prejuízo da respiração oral pode ser observado na função cognitiva¹³. O grau de trocas de oxigênio no córtex pré-frontal é maior durante a respiração oral do que durante a respiração nasal, o que aumenta a carga de oxigênio nesse tipo de respiração, quando comparada à respiração nasal¹³. Tudo isso pode resultar em diferentes padrões de ativação cerebral. Especificamente, o aumento da ativação pré e pós-central foi observado na respiração oral quando comparada à respiração nasal. Assim, sugere-se que os diferentes padrões de respiração podem levar a diferentes conectividades cerebrais funcionais¹³. Cabe mencionar que poucos estudos elucidam isso¹³ e que foram realizados predominantemente em

adultos, sendo escassos, na faixa etária pediátrica.

O Respirador Oral e prejuízos na fala

Outra alteração relacionada à respiração oral ocorre na fala, que pode se alterar devido à flacidez da musculatura facial, posicionamento incorreto da língua como consequência da má oclusão imposta por condições estruturais da cavidade oral e/ ou por deficiências no crescimento e desenvolvimento faciais³.

Assim, é comum que crianças respiradoras orais possuam fala ininteligível, mesmo quando já era para ter uma fala clara, o que prejudica a relação entre seus pares, o que pode acarretar, inclusive, em dificuldade de socialização; além da alfabetização³. Isso pode ocorrer devido à maior predisposição às infecções de vias aéreas superiores, que gera mau funcionamento da tuba auditiva e flutuação da audição, interferindo na capacidade de percepção dos sons³.

O Respirador Oral e infecções

Em se tratando de maior susceptibilidade às infecções, observa-se maior vulnerabilidade à otites^{3,40} e à outras infecções de vias aéreas superiores¹⁹. Um estudo de coorte revelou que o risco de otite média com efusão é 2,4 vezes maior em respiradores bucais do que em respiradores nasais⁷.

Isso ocorre porque o ar que entra pela boca não é umidificado, aquecido e filtrado, criando uma porta de entrada para agentes agressores, pois não há barreiras imunológicas naturais contra eles, causando maior frequência de infecções das vias aéreas superiores¹⁹.

Além de todas as consequências supracitadas, a respiração oral pode estar associada a doenças periodontal e ao aumento de amígdalas⁷. Por sua vez, a doença periodontal está associada a doenças crônicas de pele, como urticária crônica, púrpura pigmentada e prurigo nodular crônico⁷. Alguns estudos também demonstraram associação da respiração oral com asma e dermatite atópica^{7, 66} e maior propensão a cáries⁶⁷, embora essa a relação entre cárie e respiração oral seja controversa na literatura⁶⁶.

O Respirador Oral e o estado nutricional

Existem poucos estudos relacionando as alterações nutricionais nos pacientes respiradores orais, sendo, portanto, uma importante investigação a ser feita com o intuito, inclusive, de incluir o nutricionista na equipe multiprofissional de acompanhamento dos

pacientes com a Síndrome do Respirador Oral.

Observa-se que, geralmente, as crianças respiradoras orais têm preferência por alimentos pastosos, comem de boca aberta¹⁹, não mastigam o suficiente e engolem o alimento quase inteiro⁶⁸. Assim, para facilitar a passagem do alimento, a criança tende a ingerir grandes quantidades de líquido durante as refeições⁶⁸. Além disso, se cansam e não comem o suficiente ou, às vezes, comem muito e rápido ou várias vezes ao dia, o que explica a magreza ou a obesidade nessas crianças²⁹.

A preferência por alimentos mais fluidos acontece por uma preferência e seleção de alimentos de menor consistência, que não exijam força mastigatória e que possam ser deglutidos rapidamente para poder respirar^{14, 68}. Por outro lado, a presença da obstrução nasal além de alterar a detecção do gosto salgado dos alimentos, prejudicando o prazer da criança em se alimentar⁵³, gera alterações no olfato – seja hiposmia ou anosmia – uma vez que o fluxo aéreo não atinge o teto da fossa nasal⁶⁸. Como o olfato tem estreita ligação com o apetite, crianças respiradoras orais podem apresentar perda do apetite⁶⁸ e no prazer de se alimentar.

O Respirador Oral e distúrbios do sono, hormonais, sensoriais e comportamentais

Há grande relação da respiração oral com distúrbios do sono em crianças. A alteração no padrão do sono ocorre por fatores físicos, como dificuldade para respirar, ou hormonais, como secreção inadequada de GH.

Algumas crianças que respiram pela boca e apresentam apneias obstrutivas noturnas podem apresentar retardo do crescimento pômbero-estatural, pois a irregularidade do sono parece ser a causa da diminuição da liberação noturna do hormônio do crescimento⁶⁸. Sabe-se que a liberação do hormônio de crescimento (GH) pelo hipotálamo durante o sono ocorre na terceira fase do sono NREM, fase caracterizada por ondas lentas de grande amplitude, conhecida como sono profundo⁴⁴.

Assim, com alterações na homeostase do sono, ocorre a alteração na secreção do GH, hormônio que em condições fisiológicas é responsável pelo crescimento. Além disso, níveis noturnos de GH baixos, pode estar relacionado à falta de apetite e à disfagia, que resultam em ingestão calórica baixa, hipoxemia noturna, acidose noturna e aumento do consumo energético após o aumento do trabalho de respiração⁴⁴.

As crianças que respiram pela boca costumam babar no travesseiro enquanto dormem e apresentam alterações no comportamento, como sono agitado, irritabilidade, enurese noturna, dificuldade de concentração, ansiedade e impaciência. Podem também apresentar queda no rendimento escolar e baixa aptidão esportiva^{19, 68}.

Todas as alterações supracitadas podem afetar o processamento sensorial (função neurológica capaz de organizar e modular a informação recebida pelos sentidos - paladar, olfato, visão, audição, tato, movimento, gravidade e posição corporal)³¹.

Sabe-se que o processamento sensorial permite o ser humano selecionar as informações relevantes e responder de forma adequada ao ambiente, o que possibilita a realização das tarefas diárias^{14,31}. Logo, o processamento sensorial desempenha um papel importante nas funções executivas do indivíduo, porque, para se realizar uma ação motora, a informação sensorial anterior é obrigatória³¹.

A ideação, o planejamento e a execução de uma ação motora são funções do sistema nervoso central (SNC), denominadas práxis, que dependem diretamente da modulação sensorial plena para seu bom funcionamento³¹. Assim, uma falha no processamento sensorial pode trazer distúrbios da modulação sensorial, assim como distúrbios de discriminação e práxis³¹. De forma mais clara, após o registro sensorial, a informação é transduzida por estímulos eletroquímicos para a condução neuronal. Posteriormente, ocorre a modulação sensorial, onde são analisadas as características físicas do estímulo quanto à intensidade, frequência, duração e especificidade. Em seguida, o estímulo é discriminado a partir de análises perceptivas, quanto as qualidades espaciais e temporais e, por fim, ocorre o processo de planejamento e organização do comportamento, que corresponde a ideação, planejamento e execução de uma ação motora, função executiva do Sistema Nervoso Central conhecida como praxia¹⁴.

Considerando que a infância é uma fase da vida importante para formação cognitiva, motora e social do indivíduo, qualquer mudança no desempenho de suas atividades pode levar a consequências na formação do seu papel social e ocupacional, interferindo na qualidade de vida^{31, 14}. Muitas crianças com alterações sensoriais se beneficiariam, também, de um trabalho de um terapeuta ocupacional, para realizar a tentativa de Integração Sensorial e reduzir os prejuízos decorrentes dos transtornos sensoriais¹⁴.

Assim, as crianças com respiração oral podem apresentar declínio nas atividades de vida diária, educacionais e de lazer ocasionado pelos comprometimentos respiratórios, motores e sensoriais que geram uma redução no nível de funcionalidade, por conta da agitação, desatenção, distúrbios do sono, dificuldade em realizar atividades que requerem esforço físico e alteração postural de acordo com a progressão do quadro¹⁴.

É importante ressaltar que, apesar da instalação geralmente precoce e contínua dos danos respiratórios, os respiradores bucais se adaptam a essa situação e não percebem o impacto gerado na qualidade de vida e déficits no desempenho funcional³¹.

CONCLUSÃO

Diante de todo o exposto, percebe-se que dependendo da duração, da idade de início, da intensidade e de fatores genéticos e biológicos associados, a respiração oral pode ocasionar inúmeros prejuízos que compreendem mudanças estruturais, funcionais, posturais e, até mesmo, mudanças comportamentais^{3,17,25,29,51,58,59} como o sono não reparador, a irritabilidade, cefaleia, dificuldades na concentração e no aprendizado, perda de memória e, até mesmo, hiperatividade e enurese noturna^{2,18, 24,59, 69}.

É evidente que a Síndrome do Respirador Oral é um problema de saúde pública⁷⁰. Faz-se urgente a detecção precoce das crianças respiradoras orais, para que a atuação multidisciplinar seja instituída planejada e instituída³, objetivando-se o benefício ao paciente, minimizando os impactos pessoal, físico, psicológico e social.⁹

Por meio da atuação da equipe multidisciplinar, é possível realizar um planejamento e determinar o momento oportuno para cada intervenção, evitando-se gastos desnecessários e abreviando o tempo e a duração do tratamento⁶¹.

Em geral, tratando a causa da respiração oral no tempo apropriado é possível obter a melhora, e até mesmo o desaparecimento, de algumas das condições advindas do processo de respiração oral⁵⁹. No entanto, a persistência das alterações respiratórias e posturais pode levar a importantes comorbidades e a perdas na qualidade de vida das crianças².

É extremamente importante o acompanhamento do desenvolvimento do respirador oral, tendo-se como meta a melhora na qualidade de vida e a minimização dos efeitos negativos decorrentes da síndrome³.

Muitas condições relacionadas à Síndrome do Respirador Oral são mais fáceis de corrigir no estágio inicial, quando os processos naturais de crescimento das crianças são intensos⁷¹. Por exemplo, espera-se que, com o crescimento, ocorra a correção natural (autocorreção) das alterações craniofaciais^{24, 56}, bem como das demais comorbidades associadas.

Por outro lado, outras alterações atuam diretamente no cérebro da criança, que está em formação. Com isso, prejuízos na função cognitiva, sono inadequado com hipóxia e distúrbios metabólicos gerados podem ser, muitas vezes, irreversíveis.

Por tudo isso, é imprescindível conhecer os fatores de risco para o desenvolvimento da respiração oral, reconhecer os sinais de alerta e orientar as famílias para obter acompanhamento e tratamentos precoces.

É importante realizar a medicina personalizada, para propor para o paciente o melhor

tratamento possível para o caso dele e, assim, gerar os melhores benefícios em termos de qualidade de vida e longevidade.

REFERÊNCIAS

- 1 Barros JR, Becker HM, Pinto JA. Avaliação de atopia em crianças respiradoras bucais atendidas em centro de referência. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(6):458-64. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0021-75572006000800011>
- 2 Ribeiro ML. (2012). Validação do questionário de qualidade de vida e avaliação do bem-estar subjetivo de crianças respiradoras orais [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina; 2012. Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente.
- 3 Hitos SF, Arakaki R, Solé D, Weckx, LLM. Oral breathing and speech disorders in children. *J Pediatr (Rio J)* 2013;89(4):361-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2012.12.007>
- 4 Okuro RT, Morcillo AM, Sakano E, Schivinski CIS, Ribeiro MAGO, Ribeiro JD. Exercise capacity, respiratory mechanics and posture in mouth breathers. *Braz J Otorhinolaryngol* 2011;77(5):656-62. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1808-86942011000500020>
- 5 Godoy P, Niitsuma LEM, Caromano FA. Avaliação funcional fisioterapêutica do respirador bucal. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR* 2000;4(2):111-20.
- 6 Abreu RR, Rocha RL, Lamounier JA, Guerra ÂFM. Prevalência de crianças respiradoras orais. *J Pediatr (Rio J)* 2008;84(5):467-70. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0021-75572008000600015>
- 7 Yamaguchi H, Tada S, Nakanishi Y, Kawaminami S, Shin T, Tabata R et al. Association between mouth breathing and atopic dermatitis in Japanese children 2–6 years old: A population-based cross-sectional study. *PLoS One* 2015;10(4):e0125916. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125916>
- 8 Costa Junior EC, Sabino HAC, Miura CS, Azevedo CB, Menezes UP, Valera FCP et al. Atopy and adenotonsillar hypertrophy in mouth breathers from a reference center. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79(6):663-7. DOI: <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20130123>
- 9 Menezes VA, Leal RB, Pessoa RS, Pontes RMES. Prevalence and factors related to mouth breathing in school children at the Santo Amaro project-Recife, 2005. *Brazil J Otorhinolaryngol* 2006;72(3):394-8. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)30975-7](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)30975-7)
- 10 Basheer B, Hegde KS, Bhat SS, Umar D, Baroudi K. Influence of mouth breathing on the dentofacial growth of children: a cephalometric study. *J Int Oral Health* 2014;6(6):50-5. PMID: 25628484
- 11 Trabalon M, Schaal B. It takes a mouth to eat and a nose to breathe: Abnormal oral respiration affects neonates' oral competence and systemic adaptation. *Int J Pediatr.* 2012;2012:709538. DOI: 10.1155/2012/709538.

- 12 Motonaga SM, Berte LC, Anselmo-Lima WT. Respiração bucal: causas e alterações no sistema estomatognático. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2000;66(5):373-9. DOI: 10.1590/S0034-72992000000500004
- 13 Jung JY, Park CA, Lee YB, Kang CK. Investigation of functional connectivity differences between voluntary respirations via mouth and nose using resting state fMRI. *Brain Sci* 2020;10(10):704. DOI: 10.3390/brainsci10100704.
- 14 Lima ACD, Albuquerque RC, Cunha DA, Lima CAD, Lima SJH, Silva HJ. Relação do processamento sensorial e sistema estomatognático de crianças respiradoras orais. *CoDAS* 2022;34(2). DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1782/20212020251>
- 15 Krakauer LH, Guilherme A. Relationship between mouth breathing and postural alterations of children: a descriptive analysis. *Int J Orofacial Myology* 2000;26(1):13-23. PMID: 11307345
- 16 Huang YS, Guilleminault C. Pediatric obstructive sleep apnea and the critical role of oral-facial growth: Evidences. *Front Neurol* 2012;3:184. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00184>
- 17 Šidlauskienė M, Smailienė D, Lopatienė K, Čekanauskas E, Pribušienė R, Šidlauskas M. Relationships between malocclusion, body posture, and nasopharyngeal pathology in pre-orthodontic children. *Med Sci Monit* 2015;21:1765-73. DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.893395>
- 18 Lofstrand-Tideström B, Thilander B, Ahlqvist-Rastad J, Jakobsson O, Hultcrantz E. Breathing obstruction in relation to craniofacial and dental arch morphology in 4-year-old children. *Eur J Orthod* 1999;21(4):323-32. DOI: <https://doi.org/10.1093/ejo/21.4.323>
- 19 Felcar JM, Bueno IR, Massan ACS, Torezan RP, Cardoso JR. Prevalência de respiradores bucais em crianças de idade escolar. *Cien Saude Colet* 2010;15(2):427-35. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232010000200020>
- 20 Zhao Z, Zheng L, Huang X, Li C, Liu J, Hu Y. Effects of mouth breathing on facial skeletal development in children: A systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health* 2021;21(1):1-14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01458-7>
- 21 Francesco RC, Passerotti G, Paulucci B, Miniti A. Respiração oral na criança: repercussões diferentes de acordo com o diagnóstico. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004;70(5):665-70. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-72992004000500014>
- 22 Parra Y. El paciente respirador bucal una propuesta para el estado Nueva Esparta 1996-2001. *Acta Odontol Venez* 2004;42(2):97-106.
- 23 Cintra CF, Castro FFM, Cintra PPV. As alterações oro-faciais apresentadas em pacientes respiradores bucais. *Rev Bras Alerg Imunopatol* 2000;232:24-29
- 24 Paolantonio EG, Ludovici N, Saccomanno S, La Torre G, Grippaudo C. Association

- between oral habits, mouth breathing and malocclusion in Italian preschoolers. *Eur J Paediatr Dent* 2019;20(3):204-8.
- 25 Sousa JB, Anselmo-Lima WT, Valera FC, Gallego AJ, Matsumoto MA. Cephalometric assessment of the mandibular growth pattern in mouth-breathing children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005;69(3):311-317.
- 26 Zelano C, Jiang H, Zhou G, Arora N, Schuele S, Rosenow J, Gottfried JA. Nasal respiration entrains human limbic oscillations and modulates cognitive function. *J Neurosci* 2016;36(49):12448-67.
- 27 Elad D, Wolf M, Keck T. Air-conditioning in the human nasal cavity. *Resp Physiol Neurobiol* 2008;163(1-3):121-7.
- 28 Rappai M, Collop N, Kemp S, Shazo R. The nose and sleep-disordered breathing: what we know and what we do not know. *Chest* 2003;124(6):2309-23.
- 29 Branco A, Ferrari GF, Weber SAT. Alterações orofaciais em doenças alérgicas de vias aéreas. *Rev Paul Pediatr* 2007;25(3):266-70.
- 30 Juliano ML, Machado MAC, Carvalho LBC, Zancanella E, Santos GMS, Prado LBF et al. Polysomnographic findings are associated with cephalometric measurements in mouth-breathing children. *J Clin Sleep Med* 2009;5(6):554-61.
- 31 Lima AC, Cunha DA, Albuquerque RC, Costa RNA, Silva HJ. Sensory changes in mouth breathers: systematic review based on the PRISMA method. *Rev Paul Pediatr* 2019;37(1):97-103.
- 32 Nihi VSC, Maciel SM, Jarrus ME, Nihi FM, Salles CLFD, Pascotto RC et al. Pacifier-sucking habit duration and frequency on occlusal and myofunctional alterations in preschool children. *Braz Oral Res* 2015;29(1).
- 33 Medeiros R, Ximenes M, Massignan C, Flores-Mir C, Vieira R, Porporatti AL et al. Malocclusion prevention through the usage of an orthodontic pacifier compared to a conventional pacifier: a systematic review. *Eur Archiv Paediatr Dent* 2018;19(5):287-95.
- 34 Kuroishi RCS, Garcia RB, Valera FCP, Anselmo-Lima WT, Fukuda MTH. Deficits in working memory, reading comprehension and arithmetic skills in children with mouth breathing syndrome: analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J* 2015;133(2):78-83.
- 35 Schmid KM, Kugler R, Nalabothu P, Bosch C, Verba C. The effect of pacifier sucking on orofacial structures: a systematic literature review. *Prog Orthod* 2018;19(1):1-11.
- 36 Caruso S, Nota A, Darvizeh A, Severino M, Gatto R, Tecco S. Poor oral habits and malocclusions after usage of orthodontic pacifiers: an observational study on 3–5 years old children. *BMC Pediatr* 2019;19(1):1-9.

- 37 Lima AADSJ, Alves CMC, Ribeiro CCC, Pereira ALP, Silva AAM, Silva LFGE et al. Effects of conventional and orthodontic pacifiers on the dental occlusion of children aged 24–36 months old. *Int J Paediatr Dent* 2107;27(2):108-19.
- 38 Corrêa CC, Bueno MDRS, Lauris JRP, Berretin-Felix G. Interference of Conventional and Orthodontic Nipples in System Stomatognathic: Systematic Review. *CoDAS* 2016;28(2):182-9.
- 39 Majorana A, Bardellini E, Amadori F, Conti G, Polimeni A. Timetable for oral prevention in childhood—developing dentition and oral habits: a current opinion. *Prog Orthod* 2015;16(1):1-3.
- 40 D'Onofrio L. Oral dysfunction as a cause of malocclusion. *Orthod Craniofac Res* 2019;22(51):43-8.
- 41 Pires SC, Giugliani ERJ, Silva FC. Influence of the duration of breastfeeding on quality of muscle function during mastication in preschoolers: a cohort study. *BMC Public Health* 2012;12(1):1-6.
- 42 Peres KG, Cascaes AM, Peres MA, Demarco FF, Santos IS, Matijasevich A et al. Exclusive breastfeeding and risk of dental malocclusion. *Pediatr* 2105;136(1):e60-e67.
- 43 Gnagi SH, Schraff SA. Nasal obstruction in newborns. *Pediatr Clin* 2013;60(4):903-22.
- 44 Morais-Almeida M, Wandalsen GF, Solé D. Crescimento e respiradores orais. *J Pediatr* 2019;95:S66-S71.
- 45 Izuhara Y, Matsumoto H, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Murase K., Ito I et al. Mouth breathing, another risk factor for asthma: the Nagahama Study. *Allergy* 2016;71(7):1031-6.
- 46 Corrêa EC, Bérzin F. Mouth Breathing Syndrome: cervical muscles recruitment during nasal inspiration before and after respiratory and postural exercises on Swiss Ball. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;2(9):1335-43.
- 47 Cunha RA, Cunha DA, Assis RB, Bezerra LÂ, Silva HJ. Evaluation of respiratory muscle strength in mouth breathers: clinical evidences. *Int Archiv Otorhinolaryngol* 2014;18(3):289-93.
- 48 Stuck BA, Czajkowski J, Hagner AE, Klimek L, Verse T, Hörmann K et al. Changes in daytime sleepiness, quality of life, and objective sleep patterns in seasonal allergic rhinitis: a controlled clinical trial. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(4):663-8.
- 49 Ucar FI, Ekizer A, Uysal T. Comparison of craniofacial morphology, head posture and hyoid bone position with different breathing patterns. *Saudi Dent J* 2012;24(3-4):135-41.
- 50 Bresolin D, Shapiro PA, Shapiro GG, Chapko MK, Dassel S. Mouth breathing in

- allergic children: its relationship to dentofacial development. *Am J Orthod* 1983;83(4):334-40.
- 51 Grippaudo C, Paoloantonio EG, Antonini G, Saulle R, La Torre G, Deli R. Association between oral habits, mouth breathing and malocclusion. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2016;36(5):386-94.
 - 52 Neiva PD, Kirkwood RN, Mendes PL, Zabjek K, Becker HG, Mathur S. Postural disorders in mouth breathing children: a systematic review. *Braz J Phys Ther* 2018;22(1):7-19.
 - 53 Pellegrini G, Veleiro RVB, Gomes ICD. A percepção do gosto salgado em indivíduos com e sem obstrução nasal. *Rev CEFAC*, 2005;7(3):311-7.
 - 54 Zicari AM, Albani F, Ntrekou P, Rugiano A, Duse M, Mattei A et al. Oral breathing and dental malocclusions. *Eur J Paediatr Dent* 2009;10(2):59-64.
 - 55 Zhao Z, Zheng L, Huang X, Li C, Liu J, Hu Y. Effects of mouth breathing on facial skeletal development and malocclusion in children: A systematic review and meta-analysis. *Res Sq* 2020;2:1-21.
 - 56 Cuccia AM, Lotti M, Caradonna D. Oral breathing and head posture. *Angle Orthod* 2008;78(1):77-82
 - 57 Milanesi JM, Borin G, Corrêa ECR, Silva AMT, Bortoluzzi DC, Souza JA. Impact of the mouth breathing occurred during childhood in the adult age: Biophotogrammetric postural analysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011;75(8):999-1004.
 - 58 Yamada T, Tanne K, Miyamoto K, Yamauchi K. Influences of nasal respiratory obstruction on craniofacial growth in young *Macaca fuscata* monkeys. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1997;111(1):38-43.
 - 59 Jefferson Y. Mouth breathing: adverse effects on facial growth, health, academics, and behavior. *Gen Dent* 2010;58(1):18-25.
 - 60 Berwig LC, Silva AMT. Análise quantitativa do palato duro de respiradores orais: revisão de literatura. *Rev Soc Bras Fonoaudiol* 2011;16(4):483-7.
 - 61 Rodrigues HOSN, Faria SR, Paula FSG, Motta AR. Ocorrência de respiração oral e alterações miofuncionais orofaciais em sujeitos em tratamento ortodôntico. *Rev CEFAC* 2005;7(3):356-62.
 - 62 Cattoni DM, Fernandes FDM, Di Francesco RC, Latorre MDRDDO. Características do sistema estomatognático de crianças respiradoras orais: enfoque antroposcópico. *Pró-Fono Revista de Atualização Científica* 2007;19(4):347-51.
 - 63 Souki BQ, Pimenta GB, Souki MQ, Franco LP, Becker HM, Pinto JA. Prevalence of malocclusion among mouth breathing children: do expectations meet reality? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73(5):767-73.

- 64 Uhlig SE, Marchesi LM, Duarte H, Araújo MTM. Association between respiratory and postural adaptations and self-perception of school-aged children with mouth breathing in relation to their quality of life. *Braz J Phys Ther* 2015;19(3):201-10.
- 65 Ribeiro EC. Avaliação espirométrica de crianças portadores de respiração bucal antes e após intervenção fisioterapêutica. *Fisioterapia Brasil* 2009;4(3):163-7.
- 66 Lee DW, Kim JG, Yang YM. Influence of mouth breathing on atopic dermatitis risk and oral health in children: A population-based cross-sectional study. *J Dent Sci* 2021;16(1):178-85.
- 67 Castilho RL, Matsumoto LH, Castilho GL, Weber SAT. The interface between dentistry and respiratory sleep disorders in children. *Sleep Sci* 2020;13(4):220-3.
- 68 Cunha DA, Silva GAP, Silva HJ. Repercussões da respiração oral no estado nutricional: por que acontece. *Arq Int Otorrinolaringol* 2011;15(2):223-30.
- 69 Mota-Veloso I, Ramos-Jorge J, Freitas LRP, Ferreira FO, Ramos-Jorge ML, Paiva SM et al. The prevalence of malocclusion is higher in schoolchildren with signs of hyperactivity. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2021;159(5):653-9.
- 70 Pacheco MCT, Fiorott BS, Finck NS, Araújo MTMD. Craniofacial changes and symptoms of sleep-disordered breathing in healthy children. *Dental Press J Orthod* 2015;20(3):80-7.
- 71 Prabhakar RR, Saravanan R, Karthikeyan MK, Vishnuchandran C. Prevalence of malocclusion and need for early orthodontic treatment in children. *J Clin Diagn Res* 2014;8(5):ZC60-1.
- 72 Imbaud TCS, Mallozi MC, Domingos VBTC, Solé D. Frequência de rinite e alterações orofaciais em pacientes com má oclusão dentária. *Rev Paul Pediatr* 2016;34(2):184-8.

2.2 O Biofilme: conceito, características, métodos de detecção e impactos nas doenças de vias aéreas superiores.

INTRODUÇÃO

Sabe-se que os microrganismos podem existir em três formas: a) no estado planctônico (flutuante, livres e individualizados), b) em microcolônias e c) em biofilmes. Essas três formas de existência diferem entre si em termos de estrutura, fisiologia, bioquímica e, também, na biologia molecular¹.

Já está bem estabelecido que 99% dos microrganismos encontrados na natureza vivem na forma de biofilmes e apenas 1% vive na forma planctônica.^{2, 3} Estipula-se que 65% de todas as infecções bacterianas em seres humanos envolvam o biofilme^{2, 3, 4, 5} tais como a rinossinusite crônica e a amigdalite⁶. Além disso, não é raro a presença dele em contaminações de dispositivos médicos implantados⁷, tais como tubos endotraqueais⁸, cateteres, próteses e válvulas cardíacas⁹.

As bactérias frequentemente envolvidas em infecções associadas ao biofilme incluem tanto patógenos Gram-positivos, como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus*; quanto gram negativos, por exemplo: *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.^{10, 11} Em uma formação de biofilme, pode haver tanto uma única espécie bacteriana quanto associações polimicrobianas envolvendo várias bactérias, fungos ou vírus.¹²

As infecções por biofilme bacteriano têm se tornado uma ameaça à saúde pública¹², por ser uma forma complexa de resistência, o que dificulta o tratamento de inúmeras doenças.

Devido a atual importância de compreender melhor essa forma de existência, este artigo de revisão explora o biofilme e suas características, seus métodos de detecção existentes e suas implicações nas doenças vias aéreas superiores.

O QUE É O BIOFILME

Biofilmes são aglomerados de microrganismos (bactérias ou fungos) associados à superfície e incorporados a uma matriz polimérica extracelular (MPE).^{9, 12, 13, 14, 15} Hoje, sabe-se que a maioria dos biofilmes contém 15% ou menos de células bacterianas, sendo o restante de sua composição correspondente à MPE.^{16, 17}

A matriz polimérica extracelular é composta majoritariamente por polissacarídeos

(polímeros ricos em carboidratos) e proteínas; além de lipídios, sacarídeos e ácidos nucleicos. Também podem estar presentes populações bacterianas mortas.^{1,18}

A MPE é de fundamental importância na formação e manutenção do biofilme, não apenas por ser o principal componente desta forma de existência, mas porque ela protege os microrganismos contidos em seu interior dos fatores ambientais externos, do sistema imunológico do hospedeiro e dos antimicrobianos.¹²

A tabela a seguir sintetiza as principais funções da matriz polimérica extracelular no biofilme e elucida a complexidade desta estrutura.

Tabela 1: Principais funções da Matriz Polimérica Extracelular (MPE) no biofilme

Função	Relevância para o biofilme	Principais componentes da MPE envolvidos
Adesão	Propicia o início da colonização microbiana em superfícies abióticas e bióticas	Polissacarídeos, proteínas, DNA
Agregação de células bacterianas	Favorece a ligação entre as células e reconhecimento de uma célula a outra	Polissacarídeos, proteínas, DNA
Coesão do biofilme	Capacidade dos microrganismos de se unirem e se manterem juntos. Assim, torna-se possível o compartilhamento de nutrientes e informações; além de favorecer a proteção contra fatores ambientais adversos e preservar a integridade do biofilme.	Polissacarídeos, proteínas, DNA
Retenção de água	Manutenção de um microambiente altamente hidratado, favorecendo uma adaptação a ambientes externos secos.	Polissacarídeos hidrofóbicos
Barreira protetora	Concede resistência às defesas não específicas e específicas do hospedeiro durante a infecção, e confere tolerância a vários agentes antimicrobianos (por exemplo, desinfetantes e antibióticos).	Polissacarídeos e proteínas
Adsorção de compostos orgânicos	Captura e retenção de compostos orgânicos, favorecendo o acúmulo de nutrientes no microambiente.	Polissacarídeos hidrofóbicos e proteínas
Atividade enzimática	Permite a digestão de macromoléculas ao biofilme para aquisição de nutrientes. Favorece a degradação de estruturas da matriz polimérica extracelular,	Proteínas

permitindo a liberação de células de biofilmes.

Troca de informação genética	Favorece a troca de genes entre as células bacterianas	DNA
-------------------------------------	--	-----

Adaptado de: Flemming HC, Wingender J (2010) *Microbiol* 8, 623–633

Os processos fisiológicos que governam a formação do biofilme são geneticamente programados e dependentes de uma variedade de estímulos, incluindo a privação de nutrientes, estresses ambientais físicos e fatores do hospedeiro.^{9,13,14 15,19,20,21,22} Assim, não existe uma estrutura única de biofilme que seja comum a todas as bactérias e/ou fungos e, com isso, uma mesma cepa bacteriana, por exemplo, pode formar diferentes biofilmes se aderida a diferentes superfícies /ou a diferentes estímulos.^{11, 16,23,24}

Ainda em relação a expressão genética, ressalta-se que as bactérias que vivem no interior de um biofilme expressam genes que aquelas que vivem na forma planctônica não são capazes de expressar.²⁵

O conhecimento sobre biofilmes ampliou consideravelmente nas últimas 5 décadas como consequência do desenvolvimento tecnológico, que incluem novos aparelhos de imagem, novos métodos bioquímicos e novas ferramentas de biologia do ecossistema molecular. Agora é possível obter uma visão geral e mais detalhada da estrutura do biofilme.¹⁹ Além disso, ainda é possível obter uma compreensão mais profunda da fisiologia celular em seu interior, bem como da variação genotípica e fenotípica entre a comunidade do interior do biofilme.^{16, 19}

No entanto, a maioria das atuais técnicas de pesquisa e de estudo do biofilme são complexas e caras, o que dificulta o amplo uso deste conhecimento na prática clínica.^{4,16}

Um conhecimento profundo e menos dispendioso sobre o biofilme é um desafio médico, mas um ponto chave no tratamento de inúmeras doenças. Tal conhecimento deve envolver métodos de detecção do biofilme, modos de tratamento eficazes após a sua instalação e, também, as formas de inibir a sua formação.¹⁷

FORMAÇÃO DO BIOFILME

A formação do biofilme é um processo de várias etapas que se inicia com a adesão

microbiana em uma superfície biótica (por exemplo: alguma mucosa) ou abiótica (por exemplo, algum dispositivo médico implantado).^{17,19,20,26,27}

Após a adesão, tais microrganismos reúnem fontes de nutrientes, multiplicam-se e se tornam envolvidos por uma complexa matriz polimérica formada por diversos compostos, dentre eles proteínas, lipídios, sacarídeos e ácidos nucleicos.^{11,27, 28}

Esse processo de formação da matriz polimérica extracelular, que resulta em uma fixação “irreversível” e mais firme das bactérias à superfície, seria a segunda etapa no processo de formação do biofilme.²⁰ Neste segundo estágio, a MPE atua como mecanismo de proteção, favorecendo um crescimento celular mais rápido.^{20, 29}

No terceiro estágio ocorre o “desenvolvimento da arquitetura do biofilme” com o surgimento inicial da complexa estrutura tridimensional.^{20,27}

Neste momento, já é possível ocorrer o *quorum sensing* em seu interior (fenômeno que será explicado no próximo item).¹¹

No quarto estágio, há a maturação de toda a estrutura do biofilme, ocorrendo o aumento do tamanho e, também, da complexidade de sua arquitetura.²⁰

Por fim, o quinto estágio é a “dispersão de células individuais do biofilme”, na qual as bactérias deixam o biofilme para reentrar no estágio planctônico,²⁰ causando infecções agudas nos pacientes.^{18,20} Tal dispersão ocorre ou por falta de nutrientes ou por superpopulação.¹¹

É importante mencionar que todos estes estágios podem coexistir em uma mesma superfície.²⁰

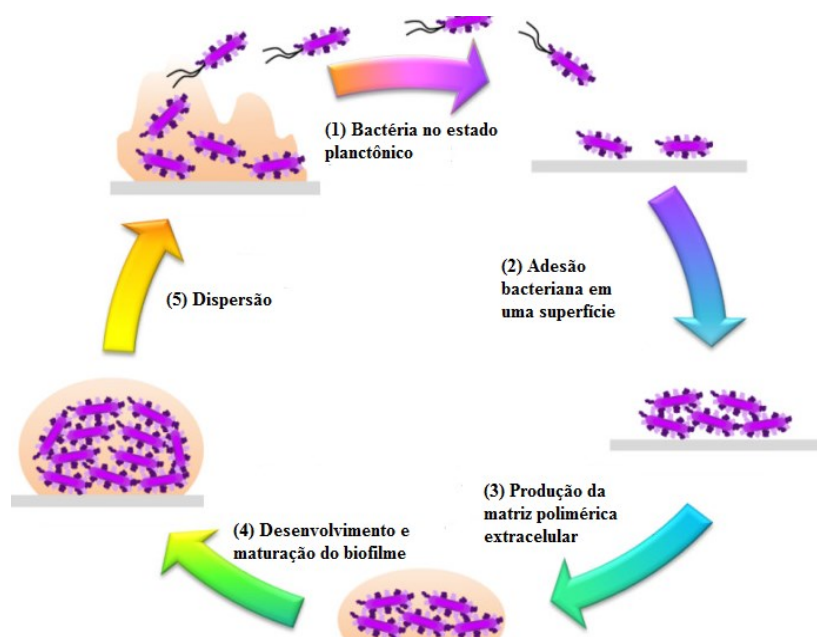


Figura 1: Estágios de formação do biofilme.

Adaptado de Sahli, Célia *et al.*,2022

O INTERIOR DO BIOFILME

A natureza do biofilme é variável, pois depende do tipo (ou tipos) de microrganismos e, também, das condições ambientais.¹¹

Dentro de um biofilme, as bactérias comunicam entre si pela produção de moléculas sinalizadoras; um fenômeno chamado *quorum sensing* (QS). O QS é extremamente importante, porque acelera a expressão gênica bacteriana, aumentando sua virulência e patogenicidade. Também ajuda na transformação de DNA ou na transconjugação de plasmídeos de um organismo para outro, facilitando e aumentando a resistência aos antibióticos entre os diferentes microrganismos presentes.^{11,27}

A cascata de sinalização de QS ocorre por meio da produção de moléculas sinalizadoras.²⁷ Quando a concentração destas moléculas atinge um determinado nível, considera-se que o "quórum" foi alcançado e, assim, as células bacterianas começam a responder ao sinal, alterando seu comportamento coletivo.³⁰

Desta forma, elas são capazes de coordenar e modificar inúmeros processos fisiológicos; tais como a atividade metabólica, a produção de substâncias poliméricas extracelulares, a aquisição de nutrientes, a transferência de material genético entre as células, a mobilidade, a resistência aos antibióticos, a virulência e a síntese de metabólitos secundários.^{2,31,32,33}

Internamente ao biofilme, existem canais de água bem desenvolvidos que transportam fluidos e nutrientes. Tais canais atuam como um sistema circulatório primitivo para a entrega de nutrientes, como o oxigênio, e para a remoção de produtos metabólicos residuais.^{34,35}

Na microcolônia presente no interior do biofilme, as células mais superficiais são as mais ativas metabolicamente. Já as células mais interiorizadas são menos ativas, podendo, inclusive, permanecerem dormentes, sendo um núcleo para regeneração e recolonização após o tratamento com antibióticos.^{10,34}

Logo, as células superficiais podem ser eliminadas com o uso dos antimicrobianos, mas as células mais internas não, caracterizando-se, portanto, como núcleo de regeneração capaz de multiplicar e debilitar novamente o hospedeiro³⁴. Além disso, esses núcleos de regeneração podem embolizar, entrar na corrente sanguínea e causar febre, condições sépticas ou colonizar outro local; gerando um novo sítio de infecção.^{2,34}

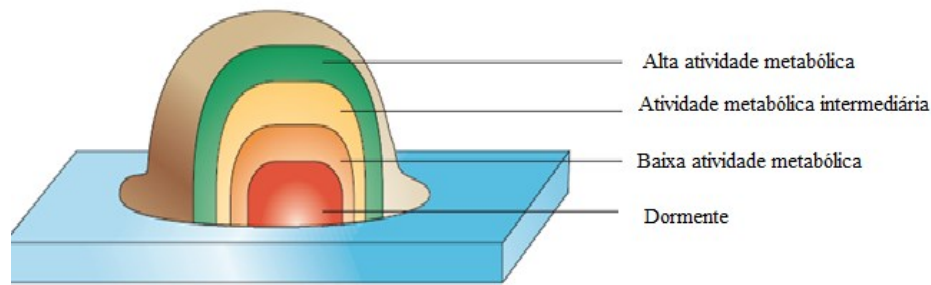


Figura 2: Atividade metabólica das células no interior do biofilme.

(Adaptado de Davies, D. 2003)

BIOFILME E RESISTÊNCIA MICROBIANA

Conforme supracitado, não existem biofilmes idênticos entre si. Portanto, determinados mecanismos de resistência microbiana podem ocorrer em um biofilme e não ocorrer em outro. Nesta seção, serão mencionados mecanismos gerais de resistência microbiana, presentes na grande maioria dos biofilmes.

Existem inúmeras teorias que explicam a resistência aos antimicrobianos proporcionada pelos biofilmes.^{11,36} Uma delas sugere que as células em seu interior se diferenciam em um estado fenotipicamente tolerante aos antibióticos porque possuem uma resposta geneticamente programada para crescer em superfícies.^{36,37}

Outra teoria postula que a matriz polimérica extracelular confere um atraso na penetração dos antimicrobianos, uma vez que a MPE confere impermeabilidade a grandes moléculas, por exemplo, os aminoglicosídeos.³⁶ Além disso, algumas enzimas existentes na MPE poderiam degradar os antibióticos, reduzindo a sua eficácia.¹¹

Uma terceira explicação encontra-se no fato de que alguns microrganismos inseridos no biofilme apresentariam um crescimento anormal; mais lento. Estas células em crescimento mais lento não seriam tão suscetíveis aos antimicrobianos como as células em crescimento mais rápido.^{36,37}

Finalmente, por meio de trocas genéticas, as bactérias no interior do biofilme poderiam realizar a troca de material genético, favorecendo uma maior diversidade genética e, conseqüentemente, um aumento na resistência antimicrobiana.^{4,18}

Estudos indicam que embora uma bactéria possa ser cultivada em laboratório e demonstrar suscetibilidade aos antimicrobianos comuns quando testada *in vitro*, quando se encontra em condições *in vivo* e na forma de biofilme, esta mesma bactéria torna-se mais resistente, conferindo dificuldade na erradicação da doença no hospedeiro.¹⁸

Assim, ao se pesquisar a eficácia de um antimicrobiano para determinado microrganismo *in vitro*, deve-se atentar para a realização de técnicas antimicrobianas eficazes em um modelo de biofilme adequado, pois a eficácia contra patógenos planctônicos tem pouco valor preditivo para a eficácia contra biofilmes.^{28,38} A sensibilidade antimicrobiana a um determinado microrganismo vivendo em forma planctônica é totalmente diferente (geralmente maior) do que um microrganismo vivendo em forma de biofilme.²⁸

MÉTODOS DE DETECÇÃO DO BIOFILME

Considerando a complexidade e a heterogeneidade da estrutura do biofilme, existem várias formas de identificá-lo e de estudá-lo.^{39,40}

A maioria das técnicas são caras, insuficientes na avaliação de comunidades polimicrobianas e requerem habilidades específicas que são encontradas em poucos centros de pesquisa e não podem ser aplicadas rotineiramente na prática clínica ou em doenças com alta prevalência, como as rinites crônicas.^{18,41}

Existem várias técnicas *in vitro* para o estudo do biofilme em laboratórios. Tais técnicas tentam mimetizar os ambientes relevantes para a sua formação, mas ainda não simulam com perfeição o ambiente real em que o biofilme se formou. Também existem modelos teóricos computacionais ou matemáticos, mas esses modelos são menos complexos que o sistema de biofilme de interesse e não conseguem simular com exatidão as situações reais na área da saúde.⁴²

Até o momento, não há um método considerado padrão ouro, ou universal, para o estudo e a identificação do biofilme.⁴⁰ Para a escolha do método, o objetivo exato de pesquisa deve estar claro, pois ele deverá ser levado em consideração.²⁸

Existem diversos aspectos do biofilme que podem ser pesquisados e que servem como “alvos” diferentes. Tais aspectos influenciarão significativamente na escolha do método de pesquisa; por exemplo, um dos objetos de estudo pode ser a matriz polimérica extracelular e seu grau de amadurecimento. Outro foco investigativo pode ser o número total de células bacterianas no interior do biofilme e o número efetivo de “bactérias vivas” dentro dele²⁸. Ainda, pode-se ter como alvo de pesquisa a espécie bacteriana ou fúngica encontrada em seu interior.⁴³

Cada uma das técnicas utilizadas nas diversas pesquisas sobre esse tema possui vantagens e desvantagens e permitem a avaliação de um aspecto peculiar do biofilme²⁸ deixando, muitas vezes, outros aspectos sem avaliação. Por exemplo, os métodos de imagem

podem descrever bem a morfologia do biofilme bacteriano, mas oferecem pouca informação quanto às espécies presentes, a expressão gênica ou o fenótipo.¹⁸

As publicações sobre biofilme microbiano pouco discutem e comparam as principais técnicas de avaliação desta forma de interação ecológica. Portanto, como supracitado, não há um único método que permita uma análise completa do biofilme, ou seja, a quantificação da matriz polimérica extracelular, a detecção de bactérias viáveis, a aferição da espessura e da rugosidade do biofilme e de sua elasticidade. Por isso, para se ter uma análise completa, muitas vezes é necessária a associação de mais de um método de pesquisa.^{19,28,43}

Descreverei a seguir, de forma sucinta, algumas das diversas técnicas existentes para pesquisa e estudo do biofilme.

Dispositivos de cultivo do biofilme: Este é um dos métodos mais utilizados laboratorialmente, com aplicações, principalmente, no âmbito industrial e no desenvolvimento de tecnologias para tratamento de água e controle de bioincrustação em sistemas de tubulações e de outros equipamentos que entram em contato com a água.²²

São testes *in vitro* usados para avaliar a capacidade de formação de biofilme a partir de um isolado bacteriano.²⁰ Alguns dos dispositivos existentes podem, inclusive, estudar as condições de desenvolvimento do biofilme e os fatores externos que influenciam na sua formação.¹⁹

Existem várias técnicas de cultivo.^{20, 24} A título de exemplo, o dispositivo *Calgary* é uma destas técnicas. Ele consiste em uma placa com múltiplos pinos de silicone, que fornecem uma superfície para o crescimento do biofilme e uma estrutura tridimensional para a sua formação. Tal método é amplamente utilizado para estudar a formação, a estrutura e a dinâmica dos biofilmes, bem como para avaliar a eficácia de agentes antimicrobianos e terapias para o seu controle.²²

Dispositivos de medição da massa no biofilme: Utilizados para determinar a quantidade de biomassa presente no biofilme, o que é um importante parâmetro para avaliar seu crescimento e desenvolvimento.^{19,44}

Vários são os métodos capazes de medir a massa do biofilme. Eles podem ser físicos, químicos, biológicos ou moleculares; a depender do princípio em que se baseiam.^{19,44}

Método químico: Método que utiliza de corantes ou fluorocromos que se ligam ou se adsorvem nos componentes do biofilme. Logo, são baseados em reações químicas que ocorrem com esses componentes; tais como proteínas, açúcares e ácidos nucleicos.^{19,29} Essa reação química permite a aferição daquele componente marcado pelo corante.¹⁹

São inúmeras as técnicas disponíveis, algumas específicas para determinados tipos de

bactérias; por exemplo, 1,9-dimetil metileno azul (DMMB) que é específico para detecção de biofilme de *Staphylococcus aureus*, mas existem outras colorações com uso mais amplo, por serem capazes de identificar a formação de biofilme em mais de uma espécie bacteriana.²⁸

Um dos métodos químicos mais utilizados para medir a massa do biofilme é a coloração com cristal violeta. Nesse método, o biofilme é cultivado em uma placa de cultura e, em seguida, corado com cristal violeta, que se adere a ele. O excesso de corante é lavado e, em seguida, o biofilme é dissolvido em etanol para liberar o corante, que é medido por espectrofotometria (técnica que permite analisar a interação das ondas de luz com a matéria, fornecendo informações sobre a composição e estrutura dos materiais). A leitura da absorbância é proporcional à quantidade de biomassa presente no biofilme.⁴⁵

Embora existam vários métodos químicos, a maioria deles não é padronizada, o que resulta em uma ampla variedade de protocolos de coloração, dificultando a comparação de resultados entre diferentes estudos.¹⁹

Um exemplo de aplicação é na detecção de biofilmes em superfícies de próteses dentárias. Neste caso, a prótese é imersa em uma solução de cristal violeta por um determinado período. Em seguida é lavada para remover o excesso de corante e observada sob um microscópio. A presença da coloração indica a presença de biofilme na superfície da prótese.⁴⁶ Além disso, o método químico também pode ser usado em outras áreas, como em indústrias alimentícias para avaliar a presença de biofilmes em superfícies de equipamentos.

Métodos físicos: Técnicas que se baseiam nas propriedades físicas do biofilme, como sua massa ou sua resistência elétrica, obtendo a biomassa total a partir de medições de peso seco ou úmido ou da impedância elétrica.^{19,29}

Existem várias técnicas para se calcular a biomassa do biofilme¹⁹, por exemplo, a espectrometria de massa,²⁸ que é uma técnica capaz de identificar e quantificar os componentes da matriz extracelular que compõem o biofilme.

Para realizar a análise de espectrometria de massa, o biofilme é coletado e submetido a uma série de etapas de preparação da amostra, como extração e purificação dos componentes da matriz extracelular. A amostra preparada é então submetida à ionização por uma fonte de ionização. Os íons resultantes são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e detectados em um espectrômetro de massa.⁴⁷ O espectro resultante fornece informações sobre a composição e a estrutura dos componentes do biofilme.

São técnicas complexas e caras, que requerem equipamentos avançados e pessoal qualificado.^{28,29}

Costumam ser empregadas em análise de umidade do solo, monitoramento bacteriano

de fontes de água potável e na indústria alimentícia.²⁹

Métodos biológicos: Métodos que se baseiam em propriedades biológicas do biofilme, como a presença de células vivas e sua atividade metabólica.²⁹ Assim, se concentram na cultura e contagem de microrganismos em amostras biológicas, objetivando a identificação e caracterização dos mesmos.²⁹

São várias as técnicas que estudam os sistemas biológicos. Um exemplo comum na área da saúde é a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC), técnica microbiológica que quantifica e estima a viabilidade celular.²⁹

Este procedimento parte de um biofilme maduro que é transferido para um meio líquido. Posteriormente, a amostra é colocada em uma série de tubos contendo soluções salinas estéreis, cada uma com uma diluição diferente. Em seguida, são colocados em placas de Petri contendo um meio de cultura adequado para o crescimento bacteriano. As placas são incubadas em uma temperatura apropriada e, após um determinado período de tempo, as colônias são contadas. A contagem das colônias é então usada para calcular a concentração de bactérias na amostra original.²⁹ A quantidade de UFCs por mL de amostra é calculada multiplicando o número de colônias encontradas por um fator que leva em conta a diluição da amostra.²⁹

A técnica de UFC é amplamente utilizada em várias áreas para quantificar a presença de microrganismos viáveis em amostras, por exemplo, avaliando a segurança e qualidade de alimentos, da água, de produtos farmacêuticos e às amostras clínicas (sangue, urina etc.).

Embora não seja uma técnica complexa, ela é demorada e trabalhosa, com grandes possibilidades de erros durante a realização da transferência e da contagem celular.²⁹ Além disso, apenas uma baixa porcentagem de bactérias são cultiváveis. Isso ressalta a necessidade de outros métodos de cultura para a visualização, quantificação e identificação das bactérias.⁴³

Método molecular: A técnica molecular é baseada na identificação de moléculas específicas produzidas pelo biofilme, como proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, fornecendo informações indiretas sobre sua massa.⁴⁸

Um exemplo de abordagem é a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar e detectar sequências específicas de ácidos nucleicos dos microrganismos presentes. No biofilme, este método permite identificar de forma eficiente a presença de sequências genéticas específicas relacionadas a espécies bacterianas individuais. Assim, a quantidade de produtos amplificados pode ser utilizada como uma estimativa da quantidade de microrganismos presentes no biofilme.^{28,48}

Tem como vantagem a identificação de bactérias que não são cultiváveis

laboratorialmente.¹⁸ No entanto, para a detecção do biofilme, não é raro o resultado falso positivo, uma vez que é um exame muito sensível podendo, inclusive, detectar DNA bacterianos oriundos de contaminação da amostra.^{28,49}

Esta técnica requer o conhecimento prévio das bactérias existentes que são formadoras de biofilme. Além disso, é um método caro e a execução não é simples, necessitando de uma equipe treinada.^{28,29}

Um exemplo de aplicação deste método é a detecção de biofilme bacteriano em implantes mamários, em que a amostra é coletada diretamente do implante ou da cápsula que se forma ao redor do implante. O DNA é extraído da amostra e, em seguida, é realizada a PCR com sequenciadores específicos para a identificação dos microrganismos de interesse, o que permite tratar a infecção com antibióticos específicos.²⁹

Microscopia: Técnicas em que modalidades de imagem são utilizadas para detectar a formação de biofilme, bem como a viabilidade celular.^{19,29} Também são ferramentas importantes para avaliar as propriedades da biomassa, pois permitem descrever a organização espacial do biofilme e suas heterogeneidades.¹⁹

Várias técnicas microscópicas com fundamentos diferentes estão atualmente disponíveis⁴³ e serão descritas a seguir:

Microscopia óptica: Técnica que fornece a visualização da formação do biofilme, de sua estrutura e composição.^{19,29}

Embora exija coloração, o preparo da amostra geralmente é simples e barato, o que representa uma importante vantagem desta técnica.^{31,40}

Dentre os métodos mais econômicos estão a coloração com hematoxilina e eosina^{31, 40} com ácido periódico-Schiff, coloração de Brown e Brenn (Gram).^{1, 19, 29} e a May Grūwald Giemsa (MGG), conforme descrito por Gerladi e colaboradores.³⁶

Um exemplo de aplicação da microscopia óptica na detecção de biofilmes seria na análise de amostras teciduais ou de mucosas, por exemplo, na mucosa nasal de pacientes com infecções recorrentes de vias aéreas superiores.³⁶

Utilizando-se da coloração de MGG como exemplo, por meio da passagem de um swab estéril na mucosa nasal do paciente, com posterior transferência para uma lâmina de vidro, a amostra é fixada e corada. Na coloração de MGG todos os componentes da mucosa nasal – desde componentes celulares até células inflamatórias, bactérias, fungos, esporos e secreção mucosa – são facilmente tingidos.³⁶ Além disso, as “manchas infecciosas” – expressão dos biofilmes – aparecerão com a típica coloração ciano, indicando, inclusive, o grau de maturidade daquele biofilme, de acordo com a intensidade da coloração. Logo, quanto

mais maduro o biofilme, mais intensa é a cor ciano, chegando muitas vezes a aproximar-se do roxo.^{36,40,41,50}

Microscopia Confocal de Varredura a Laser: Técnica que utiliza um feixe de laser para obter imagens tridimensionais de amostras biológicas, com alta resolução espacial e axial. Assim, permite visualizar a estrutura tridimensional dos biofilmes e a distribuição dos microrganismos em seu interior.^{11,43}

Nesta técnica, a luz refletida pela amostra escaneada pelo feixe de laser é capturada por um detector, que converte o sinal em uma imagem digital em escala de cinza. As imagens de diferentes planos focais são combinadas para criar uma imagem tridimensional da amostra.^{11,43}

A microscopia confocal de varredura a laser pode ser utilizada com corantes fluorescentes, que permitem que os pesquisadores visualizem componentes específicos da amostra, tais como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, permitindo a identificação de vários parâmetros do biofilme.^{20,29,51}

Na área das ciências biomédicas, a microscopia confocal é amplamente utilizada para obter imagens tridimensionais de alta resolução de tecidos biológicos. Para isso, é comum marcar as células ou tecidos com sondas fluorescentes, que emitem luz quando excitadas por uma fonte de laser.⁵²

As amostras biológicas são frequentemente coradas com corante fluorescente específico para que a luz fluorescente do ponto iluminado seja coletada na objetiva e transformada por um fotodiodo em sinal elétrico processado por um computador. Assim, a reconstrução óptica de todas as informações dos pixels é montada, produzindo uma imagem tridimensional de alto contraste e alta resolução.^{6,7,19,18,28,29}

Essa técnica é especialmente útil para analisar tecidos fixos ou vivos *in situ*, permitindo uma análise detalhada da estrutura e da função celular.⁵²

Ressalta-se que, além de um método caro, necessita de pessoal treinado. Além disso, é um método demorado (geralmente leva-se mais de 3 horas para obtenção da imagem)⁴⁰ Portanto, é predominantemente usada em pesquisas, tendo pouca utilidade na prática clínica.

Microscopia eletrônica: As técnicas de microscopia eletrônica, de forma geral, baseiam-se na dispersão e absorção de elétrons em uma superfície, produzindo uma imagem em 3D, possibilitando a obtenção de informações detalhadas sobre a composição do biofilme em diversas resoluções.^{19,20,29,43}

No entanto, para a avaliação das amostras biológicas é necessário um alto vácuo para evitar a dispersão do feixe de elétrons pela interação com as moléculas do ar. Isso significa

que as amostras biológicas precisam ser desidratadas para remover a água e outros líquidos e devem fixadas em um material sólido. A fixação geralmente é feita com um agente químico, como o glutaraldeído ou o formaldeído, que ajuda a preservar a estrutura das amostras.⁴³

Depois de fixadas, as amostras são desidratadas com uma série de solventes orgânicos, como acetona ou etanol. Em seguida, elas são revestidas por um material condutor, geralmente com uma fina camada de ouro, platina ou carbono, para evitar o acúmulo de carga elétrica na superfície da amostra, o que pode distorcer a imagem.⁴³

No que se refere ao processo de desidratação, sabe-se que ele reduz significativamente o volume total da matriz polimérica extracelular, podendo levar ao colapso da matriz, à compressão das células e, assim, à distorção da arquitetura;⁵³ não sendo raro o aparecimento de artefatos técnicos.²⁰

No que tange à aplicabilidade desta técnica, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é usada para obter imagens de seções ultrafinas de amostras biológicas, enquanto a microscopia eletrônica de varredura (SEM) é utilizada para obter imagens de superfícies de amostras biológicas, que podem ser coradas com corantes específicos para realçar a visibilidade de determinadas estruturas.²⁰

A microscopia eletrônica é mais bem aproveitada quando o biofilme se encontra em estágio inicial de formação. Os biofilmes que já são maduros se encontram em um estágio mais avançado de formação, já com a proliferação de microrganismos em seu interior. Isso torna inviável a obtenção de informações sobre a espessura do biofilme ou de sua estrutura tridimensional porque as imagens obtidas ficam focadas apenas na camada superior.²⁹

Por fim, é uma técnica que, além de cara, requer uma complexa preparação da amostra (que é facilmente danificável), o que resulta em artefatos que prejudicam a avaliação.^{19,29} Além disso, a fixação do material é difícil e é um desafio diferenciar entre muco, coágulos e biofilmes.⁴⁰

Microscopia de força atômica: Técnica que permite a visualização e a análise de amostras biológicas em escala nanométrica. Baseia-se na deflexão de uma ponta metálica que se move sobre a superfície do alvo. A deflexão da ponta é registrada por uma alavanca óptica usando um feixe de laser à medida que a ponta metálica faz uma varredura pela amostra. Utilizando-se a deflexão registrada, pode-se medir a topologia e as propriedades do material de uma superfície líquida ou gasosa.^{19,29,54}

Essa técnica fornece imagens tridimensionais, detalhes estruturais do biofilme e, além disso, é capaz de demonstrar forças de interação entre microrganismo-superfície e de coesão do biofilme.^{19,29,55}

A microscopia de forças atômicas é particularmente útil para a análise de amostras biológicas porque não requer preparação especial ou fixação. Além disso, é capaz de operar em condições próximas das condições biológicas normais, o que permite a análise de amostras em seu estado natural. Também permite a análise em tempo real da dinâmica do biofilme, como a adesão, a divisão e a formação de estruturas tridimensionais. No entanto, é uma técnica cara e complexa.⁵⁴

Combinação de diversas categorias: Quando mais de um método de detecção e estudo do biofilme é utilizado, a fim de abranger mais detalhes sobre ele.

Extração da matriz polimérica extracelular: Por meio de métodos físicos (p.ex. vaporização, aquecimento e centrifugação de alta velocidade) e com o uso de reagentes químicos (p.ex.: etanol, formaldeído, ajustes no pH) é possível realizar a extração da matriz polimérica extracelular (MPE). Esses métodos são úteis para entender a composição química e a estrutura da MPE, além de sua relação com a adesão e a formação do biofilme.^{19,29}

Não há consenso sobre qual o melhor método para a extração da matriz polimérica extracelular. Assim, a seleção do método dependerá das espécies bacterianas formadoras do biofilme e, também, da complexidade da matriz.^{19,29}

A extração de MPE é rotulada como uma combinação de diferentes categorias devido à necessidade de um microscópio analisar a matriz polimérica extracelular, uma vez extraída. Uma aplicação prática seria para a avaliação de agentes antimicrobianos. Ao isolar e caracterizar as diferentes frações da MPE, é possível entender como esses agentes interagem com ela e como isso afeta a adesão e a formação do biofilme. Isso pode levar ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ou aprimoramento dos existentes.²⁹

Cabe ressaltar que o processo de extração pode ser complexo e trabalhoso, exigindo muitas etapas, incluindo a remoção do biofilme das superfícies onde ele se desenvolveu. Além disso, os métodos de extração da MPE podem afetar a integridade dos biofilmes e a composição da MPE, levando a resultados imprecisos. Finalmente, a extração da MPE pode ser cara e exigir equipamentos especializados.⁵⁶

Anticorpos de componentes anti-matriz polimérica extracelular: Método em que há a produção de anticorpos contra componentes específicos da matriz polimérica extracelular do biofilme.

Este método se baseia na capacidade dos biofilmes em produzir e secretar polissacarídeos extracelulares, que servem como base para a produção de anticorpos para os componentes específicos do biofilme.²⁹

Este método é considerado uma combinação de diversas categorias de técnicas de

detecção do biofilme, porque envolve diferentes etapas e técnicas de análise, incluindo microbiologia, bioquímica e imunologia.

De forma resumida, por meio de técnicas microbiológicas e bioquímicas, na etapa inicial é feita a coleta da amostra e a incubação em meio líquido contendo um substrato para a produção de polissacarídeos extracelulares (PECs). Em seguida, há a extração de PECs, que serão usadas para produzir anticorpos para os componentes do biofilme. Por fim, os anticorpos são usados para detectar a presença de biofilme em amostras coletadas de superfícies ou sistemas de água suspeitos de contaminação. Isso é feito por meio de um ensaio imunológico, como um ensaio de ELISA ("*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*"). Assim, se o biofilme estiver presente na amostra, o anticorpo se ligará aos seus componentes, produzindo um sinal positivo no ensaio.²⁹

É um método caro, que necessita de equipe treinada em sua execução e interpretação.²⁹

Espectroscopia de Infravermelho: Neste método, a radiação infravermelha é utilizada, promovendo a vibração das ligações químicas dos componentes do biofilme²⁹. Cada componente vibra de uma forma diferente, em frequências características, resultando em um espectro único para cada amostra. Existem várias técnicas para a aquisição de espectros e para a análise de dados.²⁹

A espectroscopia de infravermelho pode ser usada para detectar biofilmes em vários substratos, incluindo superfícies metálicas, plásticos, tecidos e até em ambientes aquáticos. A técnica é rápida, não destrutiva e pode fornecer informações precisas sobre a composição e estrutura dos biofilmes.²⁹

Um exemplo de aplicação deste método é a avaliação do paciente com feridas crônicas. O exsudato da ferida é removido e colocado sob o espectrômetro, com o objetivo de identificar, ao longo do tempo, as diferentes proteínas e bactérias presentes conforme a evolução da ferida.²⁹

É um método rápido, mas exige pessoal treinado na obtenção das amostras e na interpretação dos resultados. Além disso, não permite a visualização direta da estrutura espacial do biofilme, o que pode limitar a compreensão das interações entre os microrganismos e seu ambiente.²⁹

O quadro a seguir é um resumo das principais técnicas de obtenção de biomassa biofilme utilizadas atualmente, com as suas principais vantagens, desvantagens e aplicações.

Tabela 2: Principais técnicas utilizadas na identificação e estudo do biofilme

Técnica	Objetivo/Método em que se baseia	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
1) Dispositivos de cultivo de biofilme	- Avaliar a capacidade de formação de biofilme a partir de um isolado bacteriano cultivado laboratorialmente	- Simula o ambiente natural - Fácil reprodução - Potencial de pesquisa de novos tratamentos	- Não é possível a execução em larga escala - Nem todos os microrganismos são cultiváveis - Possibilidade de contaminação - Custo relativamente alto	- Tratamento de água - Segurança alimentar - Estudar resistência e sensibilidade aos antimicrobianos
2) Dispositivos de medição de massa	<i>Químico</i> Determinar a quantidade de biomassa presente no biofilme por meio de corantes ou fluorocromos	- Tecnicamente simples - Facilmente reprodutível - Versatilidade (vários produtos químicos existentes)	- Falta de padronização nas técnicas de coloração - Alguns produtos potencialmente tóxicos - Custo relativamente elevado (a depender do corante)	- Prevenção e tratamento de infecções em dispositivos (ex próteses dentárias) - Prevenção de contaminação em superfícies na indústria alimentícia - Tratamento de água
	<i>Físico</i> Determinar a quantidade de biomassa	- Não requer preparação da amostra	- Técnicas complexas	- Monitor fontes de

	presente no biofilme por meio do peso seco ou úmido ou da impedância elétrica de componentes do biofilme	- Não requer a adição de corantes - Alta especificidade	- Custo elevado - Exige equipe altamente treinada - Alguns métodos podem ser demorados	água potável - Indústria alimentícia (monitoramento de equipamentos) - Indústria farmacêutica (monitorar qualidade dos medicamentos)
<i>Biológico</i>	Determinar a quantidade de biomassa presente do biofilme a partir das propriedades biológicas, como a presença de células vivas e sua atividade metabólica	- Tecnicamente simples - Alta especificidade (capaz de detectar microrganismos específicos) - Baixo custo (quando comparado a outras técnicas de detecção da massa do biofilme)	- Demorado - Trabalhoso - Grande possibilidade de equívocos na análise - Necessidade de cultura – nem todos os microrganismos são cultiváveis <i>in vitro</i> - Requer treinamento	- Diagnóstico médico (detecção de patógenos) - Contaminação alimentar - Monitoramento ambiental
<i>Molecular</i>	Determinar indiretamente a quantidade de biomassa presente, a partir da identificação de moléculas específicas produzidas pelo biofilme, como proteínas,	- Alta sensibilidade (pode detectar quantidades muito pequenas de biofilme). - Possibilidade de automação - Pode ser aplicada em diferentes tipos de amostras	- Grande chance de falso positivo - Risco de contaminação - Complexa – exige equipe treinada - Cara	

		ácidos nucleicos e carboidratos			
3) Dispositivos de microscopia	<i>Óptica</i>	Fornece a visualização da formação do biofilme, sua estrutura e composição.	<ul style="list-style-type: none"> - Técnicas relativamente simples, rápidas e baratas - Podem ser realizadas em diferentes tipos de amostras - Podem identificar diferentes componentes do biofilme, como bactérias e matriz extracelular - Alta aplicabilidade clínica 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessita de coloração - Informações limitadas sobre a estrutura e composição (em comparação com outras técnicas) - Podem ser afetadas pela variabilidade na interpretação dos resultados por diferentes examinadores 	<ul style="list-style-type: none"> Identificação em amostras clínicas (ex: sangue, urina e mucosas) - Monitorar a eficácia de tratamentos antimicrobianos em biofilmes - Detecção de biofilmes em amostras ambientais (água, solo e sedimentos)
	<i>Confocal de varredura a laser</i>	Por meio de um feixe de laser obtém imagens tridimensionais de amostras biológicas, com alta resolução espacial e axial.	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a observação detalhada da estrutura, arquitetura e composição do biofilme - Possibilidade de combinar com outras técnicas, como a imunofluorescência, para identificar componentes específicos do biofilme. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cara (equipamento e manutenção) - Necessita pessoal altamente especializado e treinado para operar e interpretar os resultados - Há a possibilidade de danificar a amostra com o feixe de laser 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso predominante em pesquisas
	<i>Eletrônica</i>	Dispersão e absorção de elétrons em	<ul style="list-style-type: none"> - Observação do biofilme em alta 	<ul style="list-style-type: none"> - A preparação das amostras 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso predominante

		<p>uma superfície, produzindo uma imagem em 3D, possibilitando a obtenção de informações detalhadas sobre a composição do biofilme em diversas resoluções.</p> <p>Por meio da deflexão de uma ponta metálica que se move sobre a superfície do alvo, mede-se a topologia e as propriedades do material de uma superfície líquida ou gasosa</p>	<p>resolução e em grande detalhe</p> <ul style="list-style-type: none"> - Observação da estrutura interna do biofilme, incluindo células individuais e matriz extracelular - Visualização das amostras em escala nanométrica - Não requer preparação ou fixação - Estudo em condições próximas do ambiente natural e em tempo real - Capaz de mostrar forças de interação entre o microrganismo e a superfície 	<p>pode ser um processo complexo e trabalhoso</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alto custo - Requer equipamentos e treinamento especializados - Pouco útil em biofilmes maduros - Demorada (a depender do tamanho da área estudada). - Cara - Limitada a superfície, não fornecendo informações sobre o interior do biofilme - Interpretação dos resultados pode ser difícil, exigindo treinamento. 	<p>te em pesquisas</p> <p>- Uso predominante em pesquisas</p>
4) Combinação de vários métodos	<i>Extração da MPE*</i>	<p>Faz-se a extração da MPE por meio de métodos físicos e químicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Capaz de estudar as diferentes frações da MPE - Capaz de mostrar a interação microrganismo-ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> - Exige cuidados no armazenamento e manipulação da amostra - Cara - Trabalhosa (várias etapas) 	<p>- Uso predominantemente em pesquisas</p>
	<i>Anticorpos contra</i>	<p>Produção de anticorpos</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Específica aos 	<ul style="list-style-type: none"> - Trabalhoso e demorado 	<p>- Utilizada predominantemente em pesquisas</p>

<i>componentes da MPE</i>	para componentes específicos da MPE	componentes da matriz - Pode ser utilizada para diversos microrganismos - Pode ser usado em amostras pequenas	- Como forma anticorpos específicos, pode não ser capaz de identificar todos os componentes da MPE	temente em pesquisas
<i>Espectroscopia de infravermelho</i>	Utilização da radiação infravermelha para vibrar as ligações químicas dos componentes do biofilme, que vibrarão diferentemente, espectro único para cada componente.	- Não destrutiva - Analisa a composição química do biofilme	- Interpretação dos resultados complexa: requer treinamento e experiência - Dependente da qualidade da amostra	- Utilizada predominantemente em pesquisa

*MPE = Matriz Polimérica Extracelular

IMPACTO DO BIOFILME NAS DOENÇAS DE VIAS AÉREAS SUPERIORES

A existência dos biofilmes não é necessariamente patológica.^{20,57} Eles podem ser tanto benéficos quanto prejudiciais para a sociedade humana, dependendo de sua localização e das espécies envolvidas.⁵⁸

Na saúde, podem trazer prejuízos; no entanto, podem ser benéficos em outras áreas (como nos processos de tratamento de águas residuais ou no aumento da biodisponibilidade de nutrientes no solo).⁴²

Portanto, é necessário avaliar e identificar o que é um biofilme saudável e o que é um biofilme nocivo.^{20,57}

O conceito de biofilme patológico pode ser compreendido dentro do conceito de “disbiose”^{20,35,59}, que é um desequilíbrio microbiano por alteração na microbiota. Esse desequilíbrio pode contribuir para o desenvolvimento de uma doença, por exemplo; a rinossinusite crônica. Assim, o maior crescimento das bactérias patogênicas (sobre as bactérias comensais) prejudica o microbioma, favorecendo o surgimento da inflamação

crônica e, conseqüentemente, dos sintomas nasossinusais.⁵⁷

Embora a importância do microbioma no ambiente da mucosa nasossinusal e o papel que a disbiose desempenha na doença sejam cada vez mais reconhecidos, o que define um microbioma nasossinusal saudável ainda precisa ser mais bem explorado.^{20,59, 60}

Algumas superfícies, tais como os compartimentos tonsilar e as adenoides, predispõem à formação de biofilme patológico devido à estrutura do tecido críptico, da temperatura corporal inferior à fisiológica e à exposição direta e repetida a patógenos bacterianos respiratórios.²⁰ Além disso, alguns estudos sugerem que quanto maior o grau de obstrução da via aérea superior, maior a frequência do biofilme encontrado. Tal fato correlaciona-se com o microbioma mais insalubre, o que favorece a formação do biofilme.⁴¹

Os seios paranasais, o ouvido médio e o trato respiratório inferior, embora não sejam bacteriologicamente estéreis, normalmente não são infectados a não ser que ocorra a obstrução dos óstios, o comprometimento da depuração mucociliar ou o comprometimento da imunidade inata local. Tudo isso, como já mencionado, resulta em um ambiente permissivo para a formação do biofilme patológico²⁰ que, uma vez formado, contribui para um “microbioma insalubre”, promovendo a persistência da doença de duas maneiras:^{17,20}

1) servindo como um repositório para patógenos bacterianos que podem sair do biofilme na fase planctônica, causando infecção recorrente inclusive em tecidos vizinhos e favorecendo o desenvolvimento de novas doenças.^{17,20}

2) na interrupção de um microbioma saudável naquele local de instalação, promovendo, assim, a inflamação, mesmo na ausência de infecção evidente.^{17,20}

As infecções mediadas por biofilme são frequentemente crônicas, raramente resolvidas pelas defesas do hospedeiro, são resistentes à erradicação mesmo com antibióticos específicos, são caracterizadas por exacerbações agudas (ao serem focos de dispersão e nova colonização) e por uma comunidade microbiana que é muitas vezes difícil de definir e cultivar laboratorialmente.^{21,61}

Vários estudos demonstraram maior frequência de biofilme na via aérea superior de pacientes que apresentavam citologia inflamatória – presença de plasmócitos e eosinófilos – quando comparados com aqueles que não apresentavam citologia inflamatória. Tal fato reforça a associação da presença do biofilme com as doenças inflamatórias e como fator contribuinte para a inflamação recalcitrante.³¹

No que tange à resposta imunológica do hospedeiro, os biofilmes favorecem uma apresentação antigênica contínua que estimula a inflamação persistente por ser capaz de ativar a resposta imune inata. Isto favorece um maior dano epitelial e mitiga a eficácia do sistema

imunológico.³¹

A presença do biofilme em algumas doenças crônicas, como na rinosinusite crônica, faz com que os pacientes apresentem uma tendência a resultados clínicos ruins após cirurgia endoscópica nasossinusal, além de precisarem de mais visitas pós-operatórias e terem maiores chances de necessitar de vários cursos de antibióticos.^{31,40,59}

Uma explicação para esse desfecho consiste no fato de que o biofilme associado a doenças do trato respiratório superior é frequentemente polimicrobiano,²⁰ desafiando o paradigma de “uma doença, um agente infeccioso”.¹⁰

Os biofilmes polimicrobianos estão associados a maior gravidade da doença pré-operatória e ao pior resultado pós-cirúrgico devido às interações sociais que ocorrem entre as bactérias envolvidas; tais como a troca de material genético, o que confere resistência aos antibióticos.²⁰

Muitas vezes, para o tratamento de alguma infecção de via aérea superior em que há a presença de biofilme, altas concentrações antimicrobianas são necessárias para inativar os organismos que crescem em seu interior. Isso ocorre porque se observa um aumento na resistência aos antibióticos em até 1.000 vezes^{11,17,30} quando comparado a infecções causadas por agentes que vivem na forma planctônica, sendo muitas vezes necessária a remoção cirúrgica do biofilme para obtenção de um tratamento eficaz.^{17,34}

Em suma, as questões relacionadas ao prejuízo na saúde e a presença do biofilme nas doenças de vias aéreas superiores pode ser dividida nas seguintes categorias¹¹:

- 1) resistência, que leva a uma maior tolerância aos antibióticos comumente usados.
- 2) manutenção de doenças crônicas, o que favorece a modificação e aperfeiçoamento do biofilme para a sobrevivência em um determinado ambiente
- 3) falha do sistema imunológico do hospedeiro em destruir os biofilmes

Ressalta-se, ainda, que a carga e o custo de distúrbios inflamatórios, infecciosos e alérgicos envolvendo infecções de vias aéreas superiores estão aumentando mundialmente.⁶² A infecção causada por bactérias altamente resistentes aos antibióticos foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma de suas 10 principais prioridades de pesquisa. Globalmente, o número de mortes associadas à resistência aos antimicrobianos é estimado em 7 milhões por ano.³⁵

Diante de todo o exposto, percebe-se que diagnosticar a presença de biofilme de forma abrangente, simples e barata tem importantes implicações clínicas, diagnósticas e terapêuticas.^{18,36,41}

BIOFILME NO RESPIRADOR ORAL

Considera-se que infecções nasais são consequências da obstrução da cavidade nasal. Portanto, a obstrução nasal seria o primeiro passo para o desencadeamento de um processo inflamatório, que por sua vez é facilmente complicado por infecções.^{13 62}

Uma cavidade nasal obstruída retém secreções, o que favorece a colonização bacteriana e a consequente formação do biofilme¹³. Assim, os biofilmes não estão presentes apenas em doenças nasais infecciosas, mas também nas desordens imunomediadas e inflamatórias que geram obstrução nasal.¹³

Quanto maior o grau de obstrução nasal, maior a chance de o paciente possuir biofilme na mucosa nasal, afinal, a falta de ventilação na cavidade favorece o surgimento de infecções.¹³

Sabe-se que a respiração oral é uma adaptação à obstrução nasal. Portanto, espera-se que a presença de biofilme nessa população também seja mais frequente.

A presença do biofilme pode ser a causa das infecções crônicas e persistentes³⁷, uma vez que ele pode impedir o tratamento medicamentoso adequado¹³. Por sua vez, o tratamento insuficiente pode favorecer o desenvolvimento de hipertrofia da mucosa, o que reduz ainda mais a patência nasal, gerando um ciclo vicioso, dificultando o tratamento e prejudicando a qualidade de vida do paciente^{13,62}

Realizar rotineiramente a citologia nasal no paciente respirador oral pode ser uma forma objetiva de verificar se o tratamento proposto está adequado. A simplicidade da técnica citológica e por ser um exame minimamente invasivo, faz com que seja possível repetir o exame no seguimento do paciente, favorecendo a monitorização do tratamento³⁶.

Identificar se o biofilme está presente pode favorecer um tratamento mais adequado para o paciente, com melhoras clínicas importantes e, além disso, favorecer a redução dos impactos negativos da respiração oral na criança. Impactos que podem trazer sérios prejuízos na qualidade de vida com repercussões, inclusive, na vida adulta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de todo o exposto, fica clara a importância e necessidade de estudo do biofilme e a melhor compreensão de sua relevância em infecções crônicas, tais como as infecções de vias aéreas superiores.

Para o seu estudo é necessário o conhecimento das vantagens e limitações dos

diferentes métodos de pesquisa atualmente existentes, bem como a competência multidisciplinar dos pesquisadores para a escolha do método de detecção que será utilizado.

Embora existam estudos que busquem maneiras de destruir o biofilme ou inibir a sua formação, tratamentos específicos para ele ainda não estão disponíveis. Tais estudos abordam desde o impedimento da formação do biofilme, evitando sua instalação, até inibição da formação da matriz polimérica extracelular e destruição do biofilme por métodos físicos e/ou químicos.^{11,35}

Atualmente, a maioria dos métodos de remoção ou tratamento de biofilmes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (EUA) concentram o uso para dispositivos médicos implantados.⁶³

No entanto, conhecer se o biofilme está presente em determinada afecção é relevante, principalmente se for diagnosticado por meio de técnicas simples e baratas, pois isso serve como importante preditor de sintomas persistentes e, ainda, de falha terapêutica nas doenças de via aéreas superiores, inclusive da população pediátrica. Além disso, favorece a execução da medicina de precisão, com a individualização do paciente por meio de uma precisa caracterização da doença.

Portanto, conseguir identificar o biofilme *in vivo* tem importantes implicações diagnósticas e terapêuticas, seja na escolha e consideração de terapias antimicrobianas, seja no reconhecimento de infecções persistentes e recorrentes.⁴¹ Além da importância clínica, há grande relevância, também, para a saúde pública, quando se considera a prevenção de infecções hospitalares e a higiene ambiental.¹⁹

Técnicas de identificação do biofilme que permitam sua aplicação rotineira e com baixo custo, são de suma importância para averiguar o real impacto dessa forma ecológica de ormsobrevivência e para favorecer o tratamento individualizado, preciso e certo do paciente, reduzindo os impactos sociais e econômicos negativos oriundos das infecções crônicas.

REFERÊNCIAS

1. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen* 2008;16(1):23–9.
2. Galli J, Ardito F, Calò L, Mancinelli L, Imperiali M, Parrilla C, et al. Recurrent upper airway infections and bacterial biofilms. *J Laryngol Otol*. 2007;121(4):341–4.
3. Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial Biofilms in Surgical Specimens of Patients with Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005;115(4):578–82.
4. Mladina R, Poje G, Vuković K, Ristić M, Musić S. Biofilm in nasal polyps. *Rhinology* 2008;46(4):302–7.
5. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* 2008;3(9):1494–500.
6. Nistico L, Gieseke A, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Kerschner JE, Ehrlich GD. Fluorescence “in situ” hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa. *Auditory and vestibular Research* 2009;493:191–213.
7. Neu TR, Lawrence JR. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol* 2015;23(4):233–42.
8. Ferreira TO, Koto RY, Leite GFC, Klautau GB, Nigro S, Silva CB et al. Microbial investigation of biofilms recovered from endotracheal tubes using sonication in intensive care unit pediatric patients. *Braz J Infect Dis* 2016;20(5):468–75.
9. Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology (N Y)* 2003;149(2):353–62.
10. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* 2012;272(6):541–61.
11. Mirghani R, Saba T, Khaliq H, Mitchell J, Do L, Chambi L et al. Biofilms: Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. *AIMS Microbiol* 2022;8(3):239–77.
12. Anju VT, Busi S, Imchen M, Kumavath R, Mohan MS, Salim SA et al. Polymicrobial infections and biofilms: Clinical significance and eradication strategies. *Antibiotics* 2022;11(12):1731.
13. Kalan L, Grice EA. Fungi in the wound microbiome. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018;7(7):247–55.
14. Kaya E, Dag I, Incesulu A, Gurbuz MK, Acar M, Birdane L. Investigation of the Presence of Biofilms in Chronic Suppurative Otitis Media, Nonsuppurative Otitis

Media, and Chronic Otitis Media with Cholesteatoma by Scanning Electron Microscopy. *Scientific World J* 2013;2013:1–6.

15. Ferguson BJ, Stolz DB. Demonstration of Biofilm in Human Bacterial Chronic Rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2005;19(5):452–7.
16. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):623–33.
17. Anastasiadis P, Mojica KDA, Allen JS, Matter ML. Detection and quantification of bacterial biofilms combining high-frequency acoustic microscopy and targeted lipid microparticles. *J Nanobiotechnol* 2014;12(1):24.
18. Manciuola LG, Jeican II, Barbu Tudoran L, Albu S. Biofilms and inflammation in patients with chronic rhinosinusitis. *Med Pharm Rep* 2020;93(4):374.
19. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 2017;43(3):313–51.
20. Hamilos DL. Biofilm Formations in Pediatric Respiratory Tract Infection. *Curr Infect Dis Rep* 2019;21(2):6.
21. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 2013;62(1):10–24.
22. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R et al. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary biofilm device. *Biol Proced Online* 2006;8(1):194–215.
23. Hamilos DL. Biofilm Formations in Pediatric Respiratory Tract Infection Part 2: Mucosal Biofilm Formation by Respiratory Pathogens and Current and Future Therapeutic Strategies to Inhibit Biofilm Formation or Eradicate Established Biofilm. *Curr Infect Dis Rep* 2019;21(2):8.
24. Marín D, Pérez P, Teijeiro C, Paleček E. Methods for direct determination of mitomycin C in aqueous solutions and in urine. *Biol Proced Online* 1998;1(2):100–6.
25. Harvey RJ, Valerie J. Lund. Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research. *Rhinology* 2007;45(1).
26. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36(4):893–916.
27. Sionov RV, Steinberg D. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Microorganisms* 2022;10(6):1239.
28. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study

microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig* 2013;25(1):31–42.

29. Achinas S, Yska SK, Charalampogiannis N, Krooneman J, Euverink GJW. A Technological Understanding of Biofilm Detection Techniques: A Review. *Materials* 2020;13(14):3147.
30. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011;15(4):305–11.
31. Manciuola LG, Jeican II, Barbu Tudoran L, Albu S. Biofilms and inflammation in patients with chronic rhinosinusitis. *Med Pharm Rep* 2020;93(4):374.
32. Remis JP, Costerton JW, Auer M. Biofilms: structures that may facilitate cell–cell interactions. *ISME J* 2010;4(9):1085–7.
33. Danielsen KA, Eskeland O, Fridrich-Aas K, Orszagh VC, Bachmann-Harildstad G, Burum-Auensen E. Bacterial biofilms in patients with chronic rhinosinusitis: a confocal scanning laser microscopy study. *Rhinology J* 2014;52(2):150–5.
34. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):114–22.
35. Sahli C, Moya SE, Lomas JS, Gravier-Pelletier C, Briandet R, Hémadi M. Recent advances in nanotechnology for eradicating bacterial biofilm. *Theranostics* 2022;12(5):2383–405.
36. Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, Mosca A, Quaranta N. Nasal cytology: the “infectious spot”, an expression of a morphological-chromatic biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(9):1105–9.
37. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 1999;284(5418):1318–22.
38. Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Sietmann R, Lademann J et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 2012;7(1):Doc06.
39. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y. Real-Time TaqMan PCR for Quantifying Oral Bacteria during Biofilm Formation. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3827–30.
40. Hong SD, Dhong HJ, Chung SK, Kim HY, Park J, Ha SY. Hematoxylin and Eosin Staining for Detecting Biofilms: Practical and Cost-Effective Methods for Predicting Worse Outcomes After Endoscopic Sinus Surgery. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2014;7(3):193.
41. Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella M, Quaranta Nicola. Assessment of biofilm by nasal cytology in different forms of rhinitis and its functional correlations. *Eur Ann Allergy*

- Clin Immunol 2013;45:25–9.
42. Cámara M, Green W, MacPhee CE, Rakowska PD, Raval R, Richardson MC et al. Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2022;8(1):42.
 43. Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A. Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J Med Microbiol* 2010;59(1):1–7.
 44. Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods* 2005;63(3):287–95.
 45. Caixeta M, Braga A, Almeida D, Pinto O, Santana E, Naves P. Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enciclopédia Biosfera* 2019;16(29):1870–80.
 46. Bergamo VZ, Lana DFD, Pippi B, Guerreiro ICK, Fuentefria AM. Novas tendências de combate ao biofilme de *Candida* em próteses dentárias. *Clin Biomed Res* 2018;38(2):155–66.
 47. Schinkovitz A, Boisard S, Freuze I, Osuga J, Mehlmer N, Brück T et al. Matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry as a functional tool for the analysis and differentiation of complex phenolic mixtures in propolis: A new approach to quality control. *Anal Bioanal Chem* 2018;410(24):6187–95.
 48. Jardim Júnior EG, Lins SA, Jardim ECG, Ramos MMB, Aguiar RCMS, Ranieri RV. Detecção de microrganismos de infecções bucais: perspectivas e cuidados a serem seguidos. *Revista FUNEC Científica-Multidisciplinar* 2011;1–8.
 49. Xie Z, Thompson A, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms. *BMC Microbiol* 2011;11(1):93.
 50. Gellardi M. *Atlante di Citologia Nasale per la diagnosi differenziale delle rinopatie*. 2 ed. Milano: Edi. Ermes srl; 2012.
 51. Neu TR, Manz B, Volke F, Dynes JJ, Hitchcock AP, Lawrence JR. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol Ecol* 2010;72(1):1–21.
 52. Paddock SW. Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Mol Biotechnol* 2000;16(2):127–50.
 53. Akiyama H, Hamada T, Huh WK, Yamasaki O, Oono T, Fujimoto W et al. Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. *Brit J Dermatol* 2003;148(3):526–32.
 54. Alonso JL, Goldmann WH. Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sci* 2003;72(23):2553–60.

55. Palmer RJ, Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10(3):263–8.
56. Mahendran B, Lishman L, Liss SN. Structural, physicochemical and microbial properties of flocs and biofilms in integrated fixed-film activated sludge (IFFAS) systems. *Water Res* 2012;46(16):5085–101.
57. Wang JC, Moore CA, Epperson MV, Sedaghat AR. Association of the sinonasal bacterial microbiome with clinical outcomes in chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Int Forum Allergy Rhinol* 2020;10(4):433–43.
58. Highmore CJ, Melaugh G, Morris RJ, Parker J, Direito SOL, Romero M et al. Translational challenges and opportunities in biofilm science: a BRIEF for the future. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2022;8(1):68.
59. Megow A, Alsuliman Y, Bouras G, Menberu M, Vyskocil E, Vreugde S et al. Chitogel following endoscopic sinus surgery promotes a healthy microbiome and reduces postoperative infections. *Int Forum Allergy Rhinol* 2022;12(11):1362–76.
60. Paramasivan S, Bassiouni A, Shiffer A, Dillon MR, Cope EK, Cooksley C et al. The international sinonasal microbiome study: A multicentre, multinational characterization of sinonasal bacterial ecology. *Allergy* 2020;75(8):2037–49.
61. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006;24(1):25–9.
62. Varricchio A, La Mantia I, Brunese FP, Ciprandi G. Inflammation, infection, and allergy of upper airways: new insights from national and real-world studies. *Ital J Pediatr* 2020;46(1):18.
63. Bu F, Liu M, Xie Z, Chen X, Li G, Wang X. Targeted Anti-Biofilm Therapy: Dissecting Targets in the Biofilm Life Cycle. *Pharmaceuticals* 2022;15(10):1253.

2.3 Artigo: “The prevalence of biofilms in children’s upper airway: a systematic review”

The prevalence of biofilms in children’s upper airway: a systematic review

1. Target journal: Clinical Reviews in Allergy & Immunology

Authors: Lorena Nascimento Girardi Madeira¹, Fernanda Filgueiras Maciel², Letícia Paiva Franco², Helena Maria Gonçalves Becker², Enrico Heffler³, Giorgio Walter Canonica³, Jorge Andrade Pinto².

1.1 Introduction

Biofilms are surface-attached agglomerations of microorganisms (bacteria or fungi) embedded in an extracellular polymeric matrix. They have been described in several pathologies, especially in upper airway’s diseases, such as rhinosinusitis, otitis media, adenoid hypertrophy and nasal polyposis¹⁻⁴.

Biofilms were first described as microbial communities by Van Leeuwenhoek in the seventeenth century observing the microorganisms within the dental plaque by a simple light microscope⁵. However, the clinical significance of biofilm formation was not fully appreciated until the late twentieth century. Using sophisticated microscopy techniques, Costerton et al. (1987) demonstrated that most microorganisms were fixed to substrates and not in a dispersed form in suspension as previously thought⁵⁻⁶. Biofilms are clinically relevant due to their polysaccharide extracellular matrix that may increase the survival of microorganisms and induce resistance to antimicrobials, disinfectants and detergents, making biofilms difficult to eradicate or to treat^{1,3,7-8}. Biofilm-positive patients have been shown to be more likely to require surgical intervention, and presenting worse postoperative symptoms, persistent inflammation and recurrent infections^{2,9}.

At least 65% of all human bacterial infections are estimated to be associated with the presence of biofilms^{8,10}. Therefore, the *in vivo* identification of biofilms has diagnostic and therapeutic implications¹.

The resistance conferred by biofilms is not due to the genetics of antimicrobial resistance (e.g. lateral gene transfer via plasmids or mutational events), but to the ability that individual cells within the biofilm have to differentiate into a phenotypic state of antimicrobial tolerance^{3,4,11}. Other mechanisms also contribute to resistance, such as delayed penetration of

antimicrobials through the biofilm matrix or the abnormal growth of microorganisms within the biofilm¹¹.

The presence of biofilm is related to the worse prognosis of chronic diseases, playing an important role in the disease physiopathology¹². This is because biofilms may contribute to mucosa damage by increasing inflammatory cell numbers in the tissue and lead to recurrent and chronic infections, including those which are not responsive to culture-appropriate antibiotic therapy¹⁰.

Although the study of biofilms in the upper airways has been of interest to several researchers around the world, the prevalence of biofilm in the upper airways in children is still not well evaluated. This paper aims to estimate the prevalence/frequency of biofilms in upper airway in the pediatric population.

1.2 Methods

This study sought to identify the prevalence of biofilms in the upper airway of pediatric population through a systematic review of available publications. The design of the search strategy and the execution of the review were conducted from the establishment of the research question for prevalence studies, whose structure is shown in Table 1¹³.

Table 1. Formulation of the research question in the CoCoPop-S acronym format

Co (condition)	Biofilm prevalence
Co (context)	Upper airway diseases
Pop (population)	Children and teenagers
S (studies)	Clinical trials (randomized or not) and real-world studies (longitudinal observational studies, such as cohort studies, post-marketing studies or patient registries)

Source: prepared by the authors

Question: what is the prevalence of biofilms in upper airway infections in children and adolescents?

Search Strategy and Study Identification

The criteria of the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions methodological guide were followed to carry out this systematic review. The research protocol was submitted and accepted on the platform of the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) under the number CRD42022320168.

Eligibility Criteria

To carry out the systematic review, scientific publications from indexed databases were considered eligible. Congress abstracts and studies that did not assess the population of interest were excluded from the qualitative synthesis. No year or language restrictions were used in the selection of publications.

Systematic review

The search strategy was developed with the Descriptors in Health Sciences (DeCS), MeSH and Emtree, in order to identify the available publications. The search was performed in the MEDLINE databases via PubMed (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), EMBASE (Excerpta Medica dataBASE), Cochrane Library and LILACS (Latin American and Caribbean Health Science Literature). Additionally, a manual search was performed in all references of the included studies. The following words and other synonyms related to them were used in the search using the Boolean operators AND/OR: biofilms, upper airway, child, adolescent, preschool child, infant. The searches included studies published up to April 2022. The complete search strategies for each database are shown in Appendix (Table 2).

Selection of studies

The studies retrieved from the databases were grouped in the EndNote® software to exclude duplicates. After identifying the publications, all references were added to the Rayyan QCRI web application¹⁴ for the selection of eligible studies (Phase 1), carried out by two independent reviewers, who evaluated the title and abstract. Then, the full text was read (Phase 2). During Phase 1 and Phase 2 of study selection, reviewers were blinded to eliminate

selection bias. In cases of conflicts, these were resolved through consensus between the two reviewers.

Quality Assessment

The methodological quality of the studies included in the review were assessed using the tool developed by Hoy et al. (2012)¹⁵. In this tool, there are 10 domains to be evaluated in each study included, in which one must choose whether the risk of bias is high or low. In the last item of the questionnaire, a general summary of the study's bias is presented.

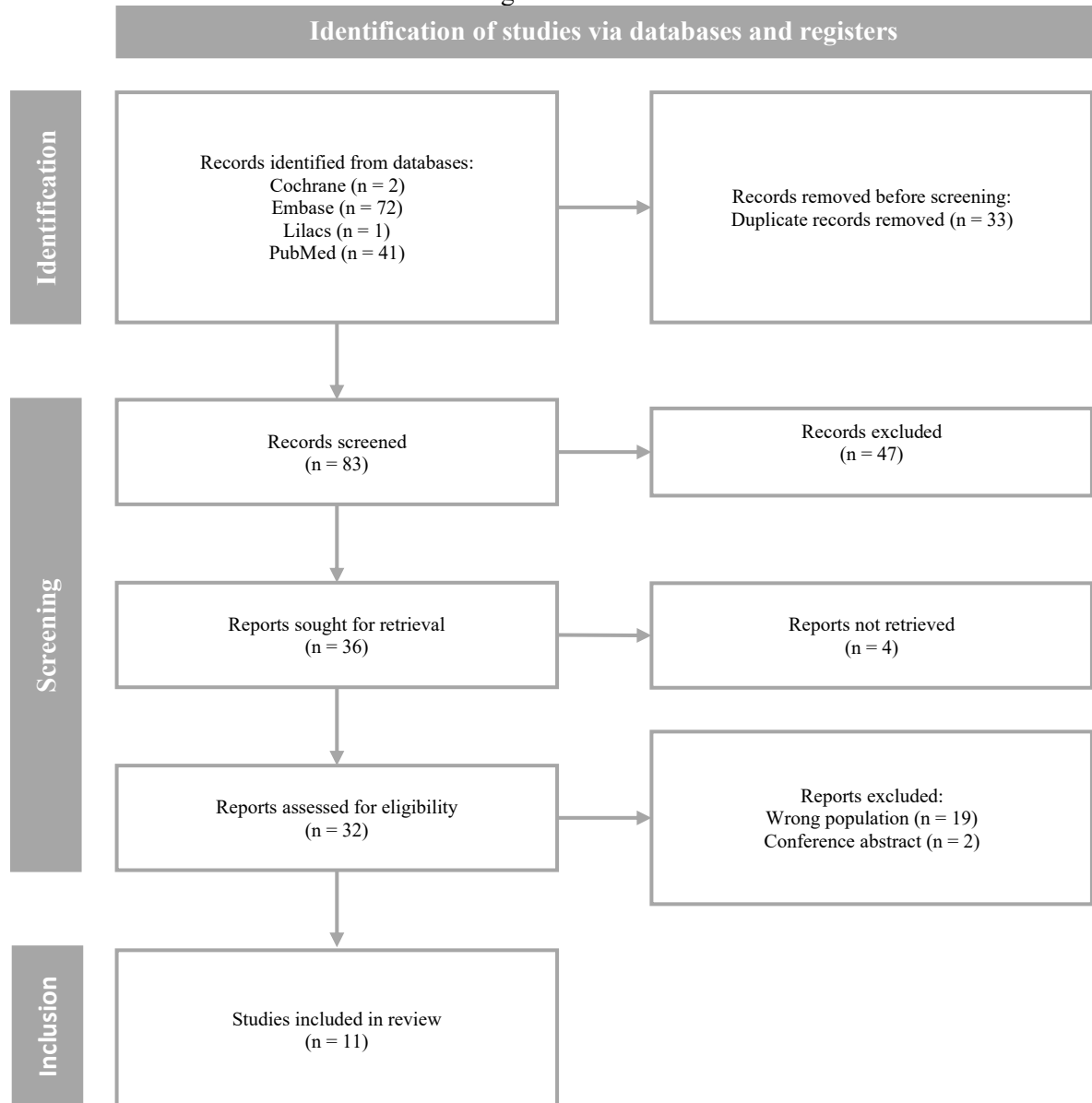
Ethical aspects

As this was not a study involving human beings, there was no need to submit to the Ethics and Research Committee (COEP), nor to sign the Free and Informed Consent Term, according to Resolution of the National Health Council - CNS 466/12.

1.3 Results

The search strategies retrieved 116 publications, which were grouped in the EndNote® reference manager to identify and remove duplicates, leaving 83 titles. After applying the eligibility criteria, 32 articles remained for full reading. Of these, 21 were excluded for not meeting the following eligibility criteria: conference abstract (n = 2) and absence of a numeric result that establishes the number of biofilms (positive or negative) in children (n = 19), as shown in Figure 1.

Figure 1. PRISMA flowchart with the results of the search for systematic review and selection of eligible studies



Source: Adapted from Page et al. 2021¹⁶

The search resulted in 11 publications included. Most were observational studies (n = 10) only one clinical trial reported the results of patients who had biofilms in the upper airway. The studies were carried out in diverse geographic locations. The characteristics of the selected studies are presented in Table 2.

Table 2. Characteristics of the sample population of the studies included in the systematic review.

Author (Year)	Study design	Study Country	Population	Positive/negative biofilm	Detection method	Biofilm Prevalence in upper airway diseases %*
Bayazian et al. (2018) ¹⁸	Cross-sectional study	Iran	Children with upper airway obstruction and adenoid hypertrophy	57/57	Scanning electron microscope	100,0%
Diaz et al. (2011) ²⁸	Prospective Observational Study	Argentina	Children with chronic inflammation of the tonsils with obstructive hypertrophy, persistent cervical adenopathy, and recurrent upper airway pathology	17/22	Fluorescence microscopy and confocal laser microscopy	77,28%
Drago et al. (2011) ²⁷	Prospective Observational Study	Italy	Children undergoing adenoidectomy and/or tonsillectomy	18/32	Spectrophotometry	56,3%
Galli et al. (2007) ²⁶	Prospective Observational Study	Italy	Hospitalized children	21/25	Spectrophotometry	84,0%

Hoang et al. (2009) ³¹	Prospective Observational Study	United states	Children with recurrent acute otitis media	6/6	Scanning electron microscope and laser confocal microscope	100%
Kosikowska et al. (2015) ²⁰	Retrospective Observational Study	Poland	Children with recurrent pharyngotonsillitis	159/164	Spectrophotometry	96,9%
Macchi et al. (2013) ¹⁹	Randomized Clinical Trial	Italy	Children with recurrent upper respiratory tract infections	35/75	Not described in the article	46,7%
Subtil et al. (2018) ¹⁷	Cross-sectional study	Portugal	Children undergoing adenoidectomy	17/62	Scanning electron microscope	27,4%
Tawfik et al. (2016) ²⁹	Retrospective Observational Study	Egypt	Children with otitis media with effusion associated with adenoid hypertrophy and children with adenoid hypertrophy without middle ear effusion	27/40	Scanning electron microscope	67,5%
Yano et al. (2013) ³⁴	Prospective Observational Study	Japan	Children with otitis media	70/74	Spectrophotometry	94,6%
Marsh et al. (2022) ³⁰	Cross-sectional study	Australia	Children with protracted bacterial bronchitis ,	56/144	Confocal Laser Microscopy	38.9%

			bronchiectasis or chronic suppurative lung disease who had undergone flexible bronchoscopy with bronchoalveolar lavage			
--	--	--	--	--	--	--

*Manually calculated from the rate of positive and negative cases provided by the studies.

The mean prevalence of biofilm in the upper airways found in this systematic review was 71.8% (with a standard deviation of 26.1%). The minimum prevalence value found was 27.4% in the study by Subtil et al. (2018)¹⁷, in which the rate of positive biofilms in the samples was 17 out of 62. The maximum prevalence value found was in the cross-sectional study by Bayazian et al. (2018)¹⁸, in which the rate of positive biofilms was 57 in 57 patients, resulting in a biofilm prevalence of 100%. Most of the included studies (n = 4) used the scanning electron microscope as a biofilm detection method, followed by spectrophotometry (n = 3), confocal laser microscopy (n = 3) and unreported (n = 1).

The evaluation of the methodological quality of the studies presented, in general, a moderate risk of bias. Among the ten observational studies, the overall summary of the risk of bias was assessed as moderate, because the studies were classified in domain 2 of external validity as high risk of bias. Only general summary of the clinical trial by Macchi et al. (2013)¹⁹ was classified as low risk of bias, as the study did not have any domains assessed as high risk. The full risk of bias assessment is presented in Table 4.

1.4 Discussion

Microbial colonization of the upper respiratory tract mucosa can be considered an important factor in the development of childhood diseases²⁰, such as upper respiratory tract infections. It is estimated that 65% of bacteria live in biofilm^{8,21}, which confers greater antimicrobial resistance, in addition to chronic and/or recurrent infections of more difficult treatment²²⁻²⁵.

In most of the selected studies, a high prevalence of biofilm in the children's upper airway was found, regardless of socioeconomic status. In Italian population Galli et al. (2007)²⁶ reported an estimated prevalence of 53.3% and Drago et al. (2011)²⁷ reported an estimated prevalence of 100% in adenoid samples and 60% in tonsil samples. In the study by Macchi et al. (2013)¹⁹, the prevalence found was slightly lower, but still close to 50%.

Likewise, studies conducted in developing countries also showed a high prevalence, such as 77.28% in the Argentine study out by Diaz et al. (2011)²⁸, 100% in the Iranian study out by Bayazian et al. (2018)¹⁸ and 35% - 100% (depending on the group analyzed) in a survey carried out in Egypt by Tawfik et al. (2016)²⁹.

Note that of the 11 studies included, 8 were carried out in developed countries. This may be related to the high cost of the main biofilm research and study techniques that are currently used^{20,30}.

Different study designs were included in our review, demonstrating the lack of methodological standardization of the articles found, which can generate a bias in the prevalence estimates. Although several observational studies have been considered, and such studies have the advantage of revealing real-life data, it cannot be inferred that the results represent the actual prevalence of biofilms in the upper airways of children. This is because the sample population of some studies is small, as in the case of the article by Hoa et al. (2009)³¹ in which only 6 children were included.

Moreover, there was also no standardization in the way upper airway material was collected for the analysis of biofilm presence. In the study by Marsh et al. (2022)³⁰, the prevalence of upper airway biofilm was indirectly obtained from the squamous cells found after bronchoalveolar lavage.

In the articles used, it can be seen that children included were those who were looked for medical care during an upper airway infection. Children who had upper airway infections but who did not search for specialized care were not evaluated. Healthy children were not evaluated either. All of this may have overestimated the prevalence of biofilm.

The main biofilm detection methods currently used are expensive and complex, such as confocal laser microscopy and electron microscopy^{3-4,8,30,32}. This can make it more difficult to obtain a large population sample and avoid clinical practice use, making the investigation possible for research purposes only.

Among the selected articles in this systematic review, none of them identified the presence of biofilm by simpler and less expensive methods, such as the one proposed by Gelardi et al. (2011)¹¹. Through optical microscopy, using the May-Gruwald-Giemsa stain, it is possible to identify “infectious spot” stained in cyan, which is what the biofilm represents in this stain and can be easily visualized by light microscopy^{1,11,33}.

The techniques used among the selected papers are electron microscopy and laser confocal microscopy. The spectrophotometric method was also used^{20,34}. This is a method that can be performed in different ways as there is no standardized protocol. This results in a wide variety of staining protocols, which makes it difficult to compare results between different studies³⁵.

The study with the largest population was that of Kosikowska et al.²⁰. In it, samples were collected from 164 children (between 2 and 5 years of age) with recurrent pharyngotonsillitis (5 or more episodes in the last 2 years) who underwent adenoidectomy. Nasopharyngeal samples were obtained from these children from the nasal swab before adenoidectomy and, also, the adenoids removed during surgery were cultured to investigate the

presence of *Haemophili influenzae*, bacteria commonly associated with upper airway infections and for living biofilm form²⁰. In addition, nasopharyngeal samples were obtained by nasal swab from 68 healthy children, who had only mild nasopharyngeal infections. In children submitted to adenoidectomy, biofilm production was detected in 64.6% samples that were colonized by *H. influenzae*.

Studies suggest that adenoids function as a reservoir of pathogenic bacteria that live in the biofilm state and that this favors recurrent infections of the upper airways²¹. Despite this, in the study by Kosikowska et al. (2015)²⁰, there was no statistically significant difference in the presence of biofilms in nasopharyngeal and adenoid samples in children undergoing adenoidectomy. In nasal swab samples obtained from healthy children, only colonization by *H. influenzae* was verified. The production of biofilm in the colonized samples was not verified.

Finally, because of the lack of methodological standardization of the studies included in this systematic review, it was impossible to stratify the children in terms of age, sex, upper airway disease, or even the degree of upper airway obstruction. Know the upper airway degree obstruction would be relevant since some studies suggests the greater the degree of upper airway obstruction, the greater the prevalence of biofilm¹.

1.5 Conclusion

A high prevalence of biofilm was found in the papers analyzed. However, in most of them, only sick children who sought medical care were included, which may have overestimated the prevalence.

In the analyzed articles, all biofilm research and study techniques were expensive and/or complex. Research using cheaper techniques would enable a larger sample, favoring a more real estimate of prevalence.

Although the presence of biofilm in the upper airways of children may favor recurrent or more difficult-to-treat infections, still few studies look for the prevalence of biofilm in the upper airways of children. In fact, no data reveal this prevalence in the Brazilian population, a country with a very heterogeneous population and with a high prevalence of upper airway infections in the pediatric population.

Funding:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest:

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, Quaranta N. Assessment of biofilm by nasal cytology in different forms of rhinitis and its functional correlations. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2013;45(1):25-9.
2. Jain R, Lee T, Hardcastle T, Biswas K, Radcliff F, Douglas R. The in vitro effect of xylitol on chronic rhinosinusitis biofilms. *Rhinology* 2016;54(4):323-8. DOI: 10.4193/Rhino15.380
3. Danielsen KA, Eskeland O, Fridrich-Aas K, Orszagh VC, Bachmann-Harildstad G, Burum-Auensen E. Bacterial biofilms in patients with chronic rhinosinusitis: a confocal scanning laser microscopy study. *Rhinology* 2014;52(2):150-5. DOI: 10.4193/Rhino13.053
4. Harvey RJ, Lund VJ. Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research. *Rhinology* 2007;45:3-13. Available from: https://www.rhinologyjournal.com/Rhinology_issues/598.pdf
5. Galli J, Ardito F, Calò L, Mancinelli L, Imperiali M, Parrilla C et al. Recurrent upper airway infections and bacterial biofilms. *J Laryngol Otol* 2006;121(4):341-4. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022215106003896>
6. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-64. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
7. Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* Biofilms in CF infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35:124-34. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12016-008-8079-9>
8. Mladina R, Poje G, Vukovi'c K, Ristic M, Musi'c S. Biofilm in nasal polyps. *Rhinology* 2008;46:302-7. Available from: https://www.rhinologyjournal.com/Rhinology_issues/716.pdf
9. Megow A, Alsuliman Y, Bouras G, Menberu M, Vyskocil E, Vreugde S et al. Chitogel following endoscopic sinus surgery promotes a healthy microbiome and reduces postoperative infections. *Int Forum Allergy Rhinol* 2022;12(11):1362-76. DOI: <https://doi.org/10.1002/alr.23001>
10. Singh P, Mehta R, Agarwal S, Mishra P. Bacterial biofilm on the sinus mucosa of healthy subjects and patients with chronic rhinosinusitis (with or without nasal polyposis). *J Laryngol Otol* 2014;129(1):46-9. DOI: 10.1017/S002221511400303X
11. Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, Mosca A, Quaranta N. Nasal cytology: The “infectious spot”, an expression of a morphological-chromatic biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:1105-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1198-x>
12. Heffler E, Landi M, Caruso C, Fichera S, Gani F, Guida G et al. Nasal cytology: Methodology with application to clinical practice and research. *Clin Exp Allergy* 2018;48(9):1092-106. DOI: <https://doi.org/10.1111/cea.13207>
13. Munn Z, Stern C, Aromataris E, Lockwood C, Jordan Z. What kind of systematic review

- should I conduct? A proposed typology and guidance for systematic reviewers in the medical and health sciences. *BMS Med Res Methodol* 2018;18:5. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12874-017-0468-4>
14. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—A web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* 2016;5:210. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
 15. Hoy D, Brooks P, Woolf A, Blyth F, March L, Bain C et al. Assessing risk of bias in prevalence studies: modification of an existing tool and evidence of interrater agreement. *J Clin Epidemiol* 2012;65(9):934-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2011.11.014>
 16. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;372:71. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
 17. Subtil J, Bajanca-Lavado MP, Rodrigues J, Duarte A, Reis L, Nogueira I et al. Cross-sectional study of adenoidal biofilms in a paediatric population and its clinical implications. *Otolaryngol Pol* 2018;73(1):1-5. DOI: 10.5604/01.3001.0012.5278
 18. Bayazian G, Sayyahfar S, Safdarian M, Kalantari F. Is there any association between adenoid biofilm and upper airway infections in pediatric patients? *Turk Pediatri Ars* 2018;53(2):71-7. DOI: <https://doi.org/10.5152/turkpediatriars.2018.6151>
 19. Macchi A, Castelnuovo P, Terranova P, Digilio E. Effects of sodium hyaluronate in children with recurrent upper respiratory tract infections: results of a randomised controlled study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013;26(1):127-35. DOI: <https://doi.org/10.1177/039463201302600112>
 20. Kosikowska U, Korona-Glowniak I, Niedzielski A, Malm A. Nasopharyngeal and adenoid colonization by *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in children undergoing adenoidectomy and the ability of bacterial isolates to biofilm production. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(18):e799. DOI: 10.1097/MD.0000000000000799
 21. Nistico L, Gieseke A, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Kerschner JE, Ehrlich GD. Fluorescence “in situ” hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa. In: Sokolowski, B. (eds) *Auditory and Vestibular Research. Methods in Molecular Biology*;493:191-213. Humana Press. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-523-7_12
 22. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig* 2013;25(1):31-42. DOI: 10.7416/ai.2013.1904
 23. Hong SD, Dhong HJ, Chung SK, Kim HY, Park JO, Ha SY. Hematoxylin and eosin staining for detecting biofilms: practical and cost-effective methods for predicting worse outcomes after endoscopic sinus surgery. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2014;7(3):193-7. DOI: <https://doi.org/10.3342/ceo.2014.7.3.193>
 24. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm

formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006;24(1):25-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02466-X](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02466-X)

25. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 2013;62(1):10-24. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
26. Galli J, Calò L, Ardito F, Imperiali M, Bassotti E, Fadda G et al. Biofilm formation by *Haemophilus influenzae* isolated from adeno-tonsil tissue samples, and its role in recurrent adenotonsillitis. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2007;27(3):134-8. PMID: 17883191
27. Drago L, De Vecchi E, Torretta S, Mattina R, Marchisio P, Pignataro L. Biofilm formation by bacteria isolated from upper respiratory tract before and after adenotonsillectomy. *Int J Immunogenet* 2011;120(5):410-6. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02846.x>
28. Diaz RR, Picciafuoco S, Paraje MG, Villegas NA, Miranda JA, Albesa I et al. Relevance of biofilms in pediatric tonsillar disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(12):1503-9. DOI: 10.1007/s10096-011-1249-3
29. Tawfik SAES, Ibrahim AA, Talaat IM, El-Alkamy SSAE, Youssef A. Role of bacterial biofilm in development of middle ear effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016;273:4003-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4094-2>
30. Marsh RL, Binks MJ, Smith-Vaughan HC, Janka M, Clark S, Richmond P et al. Prevalence and subtyping of biofilms present in bronchoalveolar lavage from children with protracted bacterial bronchitis or non-cystic fibrosis bronchiectasis: a cross-sectional study. *Lancet Microbe* 2022;3(3):e215-23. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00300-1](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00300-1)
31. Hoa M, Tomovic S, Nistico L, Hall-Stoodley L, Stoodley P, Sachdeva L et al. Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73(9):1242-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2009.05.016>
32. Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R et al. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 2006;8:194-215. DOI: <https://doi.org/10.1251/bpo127>
33. Gelardi M, Ciprandi G, Cassano M. Nasal cytology detects biofilms. *Med Pharm Rep* 2021;94(2):267-8. DOI: 10.15386/mpr-1990
34. Yano H, Yamazaki Y, Qin L, Okitsu N, Yahara K, Irimada M et al. Improvement rate of acute otitis media caused by *haemophilus influenzae* at 1 week is significantly associated with time to recovery. *J Clin Microbiol* 2013;51(11):3542-6. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01108-13>
35. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR et al. Critical review

on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 2017;43(3):313-51. DOI:
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

APPENDIX

Table 3. Evidence search strategies developed for each database.

Database	Search Strategy	Number of publications retrieved on 06/03/2023
Cochrane	#1 MeSH descriptor: [Biofilms] explode all trees #2 ("Biofilms"):ti,ab,kw OR ("Biofilm"):ti,ab,kw #3 ("Upper airway"):ti,ab,kw OR ("Upper-airway"):ti,ab,kw OR ("Upper airways"):ti,ab,kw OR ("Upper-airways"):ti,ab,kw OR ("Upper respiratory tract"):ti,ab,kw OR ("Upper respiratory tracts"):ti,ab,kw #4 MeSH descriptor: [Child] explode all trees #5 MeSH descriptor: [Adolescent] explode all trees #6 MeSH descriptor: [Child, Preschool] explode all trees #7 MeSH descriptor: [Infant] explode all trees #8 ("Child"):ti,ab,kw OR ("Children"):ti,ab,kw OR ("Adolescent"):ti,ab,kw OR ("Adolescents"):ti,ab,kw OR ("Adolescence"):ti,ab,kw OR ("Teens"):ti,ab,kw OR ("Teen"):ti,ab,kw OR ("Teenagers"):ti,ab,kw OR ("Teenager"):ti,ab,kw OR ("Youth"):ti,ab,kw OR ("Youths"):ti,ab,kw OR ("Adolescents, Female"):ti,ab,kw OR ("Adolescent, Female"):ti,ab,kw OR ("Female Adolescent"):ti,ab,kw OR ("Female Adolescents"):ti,ab,kw OR ("Adolescents, Male"):ti,ab,kw OR ("Adolescent, Male"):ti,ab,kw OR ("Male Adolescent"):ti,ab,kw OR ("Male Adolescents"):ti,ab,kw OR ("Child, Preschool"):ti,ab,kw OR ("Preschool Child"):ti,ab,kw OR ("Children, Preschool"):ti,ab,kw OR ("Preschool Children"):ti,ab,kw OR ("Infant"):ti,ab,kw OR ("Infants"):ti,ab,kw #9 ((#1 OR #2) AND #3) AND {OR #4-#8}	2
Embase	(((('upper respiratory tract'/exp OR 'upper airway':ti,ab,kw OR 'upper-airway':ti,ab,kw OR 'upper airways':ti,ab,kw OR 'upper-airways':ti,ab,kw OR 'upper respiratory tract':ti,ab,kw OR 'upper respiratory tracts':ti,ab,kw OR 'upper respiratory') AND ('biofilm'/exp OR 'biofilms':ti,ab,kw OR 'biofilm':ti,ab,kw)) AND ('child'/exp OR 'child':ti,ab,kw OR 'children':ti,ab,kw OR 'adolescent'/exp OR 'adolescent':ti,ab,kw OR 'adolescents':ti,ab,kw OR 'adolescence':ti,ab,kw OR 'teens':ti,ab,kw OR 'teen':ti,ab,kw OR 'teenagers':ti,ab,kw OR 'teenager':ti,ab,kw OR 'youth':ti,ab,kw OR 'youths':ti,ab,kw OR 'adolescents, female':ti,ab,kw OR 'adolescent, female':ti,ab,kw OR 'female adolescent':ti,ab,kw OR 'female adolescents':ti,ab,kw OR 'adolescents, male':ti,ab,kw OR 'adolescent, male':ti,ab,kw OR 'male adolescent':ti,ab,kw OR 'male adolescents':ti,ab,kw	72

	OR 'preschool child'/exp OR 'preschool child':ti,ab,kw OR 'children, preschool':ti,ab,kw OR 'preschool children':ti,ab,kw OR 'infant'/exp OR 'infant':ti,ab,kw OR 'infants':ti,ab,kw)) AND [embase]/lim	
Lilacs	(((((mh:("Biofilmes")))) OR ("Biofilms") OR ("Biofilm")) AND ((("Upper airway") OR ("Upper-airway") OR ("Upper airways") OR ("Upper-airways") OR ("Upper respiratory tract") OR ("Upper respiratory tracts")))) AND (((mh:("Criança")) OR ("Child") OR ("Children") OR ((mh:("Adolescente")) OR ("Adolescent") OR ("Adolescents") OR ("Adolescence") OR ("Teens") OR ("Teen") OR ("Teenagers") OR ("Teenager") OR ("Youth") OR ("Youths") OR ("Adolescents, Female") OR ("Adolescent, Female") OR ("Female Adolescent") OR ("Female Adolescents") OR ("Adolescents, Male") OR ("Adolescent, Male") OR ("Male Adolescent") OR ("Male Adolescents") OR ((mh:("Pré-Escolar")))) OR ("Child, Preschool") OR ("Preschool Child") OR ("Children, Preschool") OR ("Preschool Children") OR ((mh:("Lactente")))) OR ("Infant") OR ("Infants"))	1
PubMed	(((((("Biofilms"[Mesh]) OR ("Biofilms"[Text Word])) OR ("Biofilm"[Text Word])) AND ((((((("Upper airway"[Text Word]) OR ("Upper-airway"[Text Word]) OR ("Upper airways"[Text Word]) OR ("Upper-airways"[Text Word]) OR ("Upper respiratory tract"[Text Word]) OR ("Upper respiratory tracts"[Text Word])))) AND (((((((((((((((((((((((("Child"[Mesh]) OR ("Child"[Text Word]) OR ("Children"[Text Word]) OR ("Adolescent"[Mesh]) OR ("Adolescent"[Text Word]) OR ("Adolescents"[Text Word]) OR ("Adolescence"[Text Word]) OR ("Teens"[Text Word]) OR ("Teen"[Text Word]) OR ("Teenagers"[Text Word]) OR ("Teenager"[Text Word]) OR ("Youth"[Text Word]) OR ("Youths"[Text Word]) OR ("Adolescents, Female"[Text Word]) OR ("Adolescent, Female"[Text Word]) OR ("Female Adolescent"[Text Word]) OR ("Female Adolescents"[Text Word]) OR ("Adolescents, Male"[Text Word]) OR ("Adolescent, Male"[Text Word]) OR ("Male Adolescent"[Text Word]) OR ("Male Adolescents"[Text Word]) OR ("Child, Preschool"[Mesh]) OR ("Child, Preschool"[Text Word]) OR ("Preschool Child"[Text Word]) OR ("Children, Preschool"[Text Word]) OR ("Preschool Children"[Text Word]) OR ("Infant"[Mesh]) OR ("Infant"[Text Word]) OR ("Infants"[Text Word]))	41

Table 4. Risk of bias of the prevalence studies included in the systematic literature review

Item	% Complete agreement										
	Bayazian et al. (2018) ¹⁸	Diaz et al. (2011) ²⁸	Drago et al. (2011) ²⁷	Galli et al. (2007) ²⁶	Hoa et al. (2009) ³¹	Kosikowska et al. (2015) ²⁰	Macchi et al. (2013) ⁹ ¹	Subtil et al. (2018) ¹⁷	Tawfik et al. (2016) ²⁹	Yano et al. (2013) ³⁴	Marsh et al. (2022) ³⁰
External validity											
1. Was the study's target population a close representation of the national population in relation to relevant variables?	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	Yes (low risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)
2. Was the sampling frame a true or close representation of the target population?	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	Yes (low risk)	Yes (low risk)	No (high risk)	No (high risk)	Yes (low risk)	No (high risk)
3. Was some form of random selection	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	Yes (low risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)	No (high risk)

11. Summary
item on the
overall risk
of study bias

Moderat
e risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Moderate
risk of
bias

Low
risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Moderat
e risk of
bias

Source: Adapted from Hoy et al. 2012¹⁵

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a prevalência de biofilmes por meio da citologia nasal nos pacientes do Ambulatório do Respirador Oral, pertencente ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG).

3.2 Objetivos específicos

Comparar a prevalência de biofilme entre os respiradores orais:

- de acordo com o sexo e faixa etária
- com o grau de obstrução nasal, avaliado pela rinomanometria anterior com e sem hipertrofia de adenóides
- com indicação cirúrgica e sem indicação cirúrgica
- com rinite alérgica e não alérgica
- com e sem uso de medicamentos

4 MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais no dia 28 de Maio de 2020, sob o parecer 4.055.843, CAAE: 26083219.9.0000.5149.

Durante o período de desenvolvimento da pesquisa, foram fornecidas informações sobre o estudo aos pais e ou responsáveis dos pacientes selecionados e foi solicitado a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II). Para os pacientes já alfabetizados, foi fornecido o Termo de Assentimento (Anexo III). Além disso, todos foram informados que poderiam se retirar da pesquisa a qualquer momento sem prejuízos no atendimento.

Os riscos relacionados à pesquisa foram referentes aos desconfortos que poderiam ser gerados pela realização dos exames complementares, quais sejam: teste alérgico cutâneo, fibronasolaringoscopia, citologia nasal e rinomanometria.

Sabe-se que o teste alérgico cutâneo pode causar um pouco de desconforto, prurido no local da punção e, raramente, anafilaxia. Para minimizar tal risco, o procedimento foi realizado por alergologista do centro de referência do HC-UFMG em ambiente hospitalar, portanto, com recursos adequados para tratamento de reações anafiláticas. Além disso, a equipe médica do Ambulatório do Respirador Oral do HC-UFMG é treinada em tratar anafilaxia, diminuindo o risco do procedimento.

A fibronasofaringolaringoscopia é um procedimento rápido, mas pode acarretar incômodo e não requer sedação para sua realização. Para minimizar os riscos, foi realizada por otorrinolaringologistas capacitados e experientes. Além disso, o procedimento foi realizado com as crianças do colo do responsável para que elas se sentissem mais seguras e acolhidas.

Embora seja um exame tecnicamente simples e rápido, a citologia nasal pode causar um mínimo de desconforto e agitação durante o procedimento. Profissionais experientes realizaram o exame diminuindo esse risco.

A rinomanometria anterior pode causar mínimo desconforto. Para diminuí-lo, profissionais experientes realizaram o exame utilizando de recursos lúdicos apropriados para crianças.

Os resultados da pesquisa serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não. Os dados coletados ficarão sob responsabilidade dos pesquisadores, que garantirão o sigilo ao sujeito pesquisado e serão utilizados para os propósitos da pesquisa, assim como para a

Construção de base de dados para pesquisas futuras realizadas no Ambulatório do Respirador Oral do HC-UFMG.

4.2 Delineamento

Estudo observacional transversal

4.3 Local do estudo

Ambulatório do Respirador Oral, Hospital São Geraldo, localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, pertencente ao Hospital das Clínicas da UFMG.

Estabelecido em novembro de 2002, tal ambulatório conta com uma equipe multidisciplinar que envolve docentes e pesquisadores dos departamentos de otorrinolaringologia, alergia e imunologia, fonoaudiologia e odontologia; sendo um centro de referência para tratamento de pacientes pediátricos com 2 a 12 anos de idade na região metropolitana de Belo Horizonte.

Neste ambulatório, já foram avaliadas aproximadamente 2.000 crianças entre dois e doze anos, desde a sua fundação.

Rotineiramente são realizados anamnese e exame físico otorrinolaringológico, alergológico, odontológico e fonoaudiológico. Além disso, são realizados teste alérgico cutâneo, rinomanometria anterior ativa e fibronasolaringoscopia.

Paralelamente à atividade assistencial, é produzida uma ampla pesquisa científica, com o objetivo de melhor compreensão e manejo do respirador bucal.

4.4 População em estudo

Como se trata de um estudo inédito (até o momento não foi pesquisada a prevalência do biofilme na mucosa nasal nas crianças respiradoras orais por meio da citologia nasal), para cálculo da amostra foi utilizada a equação para estimação da proporção desconhecida, tendo como base o estudo piloto feito anteriormente e apresentado durante a banca de qualificação desta mesma pesquisa de doutorado. Foi considerando um nível de confiança de 95% e uma margem de erro de 1%, o que gerou o número amostral de 51 crianças.

Participaram deste estudo 67 crianças de 5 a 12 anos, atendidas no Ambulatório do Respirador Oral do HC/UFMG, com consultas agendadas durante o período de 20 de maio 2021 a 14 de julho de 2022.

4.5 Critérios de inclusão

a) Pacientes pertencentes ao Ambulatório do Respirador Oral do HC/UFMG, com idade entre 5 (cinco) e 12 (doze) anos; com consulta agendada durante o período supracitado e com quadro clínico compatível com Síndrome do Respirador Oral.

b) Assinatura do termo de consentimento esclarecido pelos responsáveis legais, concordando em participar do estudo.

4.6 Critérios de exclusão

a) Pacientes que foram diagnosticados como portadores de malformações faciais, síndromes genéticas, cromossomopatias ou causas de imunossupressão primárias ou secundárias;

b) Recusa dos responsáveis legais em assinar o termo de consentimento;

c) Recusa dos pacientes ou responsáveis legais na realização da citologia nasal

4.7 Definições

Lista-se a seguir as definições conceituais das principais condições clínicas incluídas no presente estudo.

4.7.1 *Síndrome do Respirador Oral:*

Considerou-se como respirador oral o paciente que apresentava a substituição do padrão nasal de respiração por um padrão oral ou misto, por um período maior que 6 meses.^{1,2,3,4}

4.7.2 *Rinite crônica:*

Considerou-se como rinite crônica o paciente que apresentava pelo menos dois sintomas nasais (rinorreia anterior, rinorreia posterior, obstrução nasal e/ou prurido nasal) por pelo menos uma hora diária, por um período mínimo de 12 semanas.^{5,6}

Dentro do grupo das rinites crônicas, várias são as formas possíveis de classificação.⁶ Detalhá-las foge ao escopo desta tese. Na presente pesquisa, a categorização dos pacientes em relação à rinite crônica foi apenas em dois grandes grupos: rinite alérgica e rinite não alérgica.

A rinite não alérgica também é uma definição ampla que inclui diferentes fenótipos e endótipos.^{5,6} Detalhar todos também foge ao escopo desta tese.

Foi classificado como portador de rinite crônica alérgica o paciente que apresentava as características de rinite crônica (mencionadas anteriormente) e teste cutâneo positivo para

algum dos aero-alérgenos, demonstrando a sensibilização alérgica.⁵

4.8 Exames específicos

4.8.1 Avaliação clínica hipertrofia amigdaliana:

A classificação amigdaliana foi feita segundo as imagens da Figura 1 (Brodsky, 1989).⁷

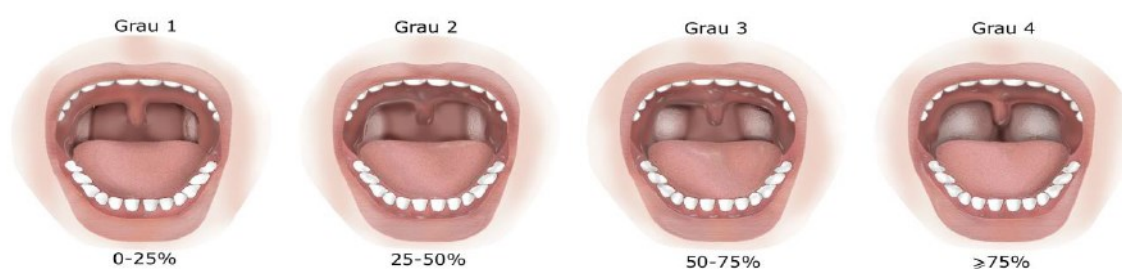


Figura 1 - Classificação do grau de hipertrofia amigdaliana. Khan, Kashfi e Ebrahimkhani (2003).⁸

4.8.2 Avaliação hipertrofia de adenoide – fibronasofaringoscopia:

A hiperplasia adenoideana foi avaliada por endoscopias realizadas com um nasofibrocópio flexível MACHIDA ENT IIP[®] de 3,2 mm. Durante a fibronasofaringoscopia foi avaliado o percentual de obstrução da rinofaringe pela tonsila faríngea na fossa nasal direita e esquerda.

A avaliação do grau de hipertrofia da adenoide foi baseada no grau de obstrução da rinofaringe, sendo graduada em seis níveis – padrão utilizado habitualmente no Ambulatório do Respirador Oral, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo III)

- 1-livre
- 2-Adenóide <60%;
- 3- Adenóide entre 60 e 69%;
- 4-Adenóide entre 70 e 79%;
- 5- Adenóide entre 80 e 89%;
- 6-Adenóide > ou = 90%.

4.8.3 Rinometria anterior ativa:

Na rinomanometria anterior ativa (RAA) foi aferido os valores da resistência nasal e do fluxo nasal inspiratório na pressão transnasal de 150 Pa.; segundo Zapletal et al.⁹

Todas as medidas foram obtidas em narina esquerda e direita, separadamente, durante a respiração normal com a boca fechada.

Antes de iniciar a avaliação, o procedimento foi explicado aos pacientes e responsáveis e realizada a higiene nasal. As medidas foram obtidas com o uso de adaptadores nasais, acoplados aos vestíbulos nasais, de tamanho adequado que por sua vez estavam conectados aos sensores de fluxo e pressão. O posicionamento dos adaptadores em relação à narina foi checado de forma minuciosa para evitar o vazamento de ar. Após o registro adequado de uma narina, os instrumentos foram invertidos para se registrar o lado contralateral.

Os exames foram realizados por avaliadores experientes com o uso do aparelho. Como a intenção era avaliar o grau de obstrução, considerou-se apenas os valores sem o uso de vasoconstritor nasal. O aparelho utilizado foi o rinomanômetro SRE 2000 N 010000300189 da *RHINOSCAN 0272CFB2* com *RHINOSTREAM 038CC5C3*.

A rinomanometria é denominada ativa quando os valores variação de pressão na entrada da narina são mensurados durante a respiração. Avalia-se simultaneamente, durante a respiração normal, a pressão (pelo transdutor de pressão) e o fluxo da cavidade nasal (pelo pneumotacógrafo), o que permite o cálculo da resistência nasal. Cada narina é mensurada separadamente. Quando o paciente respira ocorre movimentação do ar através do pneumotacógrafo e, então, o fluxo é determinado. Após o registro adequado de uma narina, os instrumentos são invertidos para se registrar o lado contralateral. A pressão transnasal é a diferença de pressão entre a pressão coanal e atmosférica.⁸⁻¹²

Nos equipamentos computadorizados, a relação entre pressão e fluxo é expressa por uma curva sigmoide e a resistência nasal é determinada por meio desses parâmetros utilizando-se a lei de Ohm ($\text{Resistência} = \text{Pressão} / \text{FN}$). Na aplicação da lei de Ohm deve-se assumir que o fluxo é laminar. Entretanto, isso só é possível em baixos fluxos, nos fluxos turbulentos a resistência é calculada pela relação entre a pressão e o quadrado do fluxo formando a curva do rinograma típica em sigmoide.¹⁰

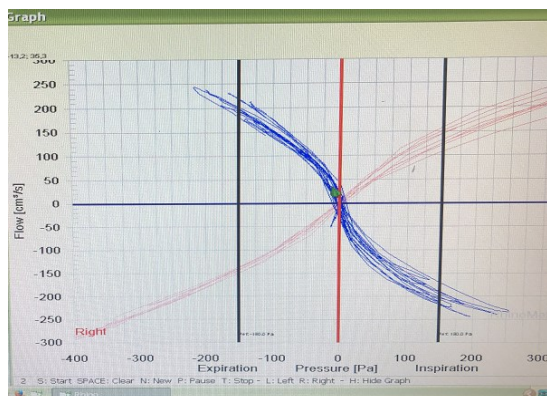


Figura 1: Exemplo de curva do rinograma (acervo pessoal).

A resistência é mensurada em um ponto determinado de pressão, devido a relação não linear entre as variáveis. Conforme o protocolo de cada pesquisa é empregado um valor de pressão que pode ser 75, 100 e 150 Pascal (Pa) com implicações práticas durante a realização do exame. Por suas características, a RAA, não pode ser realizada em pacientes com perfuração de septo, obstrução nasal total unilateral ou com excesso de secreção nasal.^{9, 10, 13}

Apesar da importância da avaliação objetiva, a padronização dos valores de resistência nasal da população pediátrica é pouco abordada, sendo que até o momento não existem estudos brasileiros de padronização das medidas da rinomanometria em crianças. Por isso, na presente pesquisa, seguiu-se o proposto por Zapletal e colaboradores, em estudo realizado na Tchecoslováquia obedecendo as seguintes fórmulas: sexo masculino ($1,64115 + 0,96143 \times \text{Logaritmo Neperiano de altura em cm}$), sexo feminino ($1,71609 + 0,9479 \times \text{Logaritmo Neperiano de altura em cm}$). Posteriormente, foi calculado o percentual de obstrução nasal ao dividirmos o FNIT pelo fluxo nasal total esperado de acordo com a altura, valor previsto (v.p.).⁹

O resultado da rinomanometria, verificado a partir do fluxo nasal inspiratório total (FNIT) foi classificado como normal, obstrução leve, moderada, grave e muito grave com base na seguinte avaliação:⁹

1. Patência normal: 77- 100% do v.p.
2. Obstrução leve: 66-76% do v.p.
3. Obstrução moderada: 55- 65% do v.p.
4. Obstrução grave: 44- 54% do v.p.
5. Obstrução muito grave: < 44% do v.p.

4.8.4 Citologia nasal e identificação do biofilme:

A citologia nasal foi executada durante a realização da rinoscopia anterior, com boa iluminação, por meio da aplicação de um swab estéril na porção média do corneto inferior, conforme proposto por Gelardi e colaboradores^{14,15}

O material coletado foi transferido para uma lâmina de vidro, secou ao ar livre e foi corado pelo método May-Grünwald Giemsa (MGG).

O método de coloração MGG é o mais utilizado na citologia nasal porque todos os componentes da mucosa nasal – desde componentes celulares até células inflamatórias, bactérias, fungos, esporos e secreção mucosa – são facilmente corados.¹⁴ Além disso, as “manchas infecciosas”, expressão dos biofilmes, aparecem com a típica coloração ciano.^{14,15}

Na presente pesquisa, foi utilizada a coloração tradicional MGG, que requer um tempo de preparo em torno de 30 minutos para propiciar colorações com alto padrão de qualidade.^{14,15}

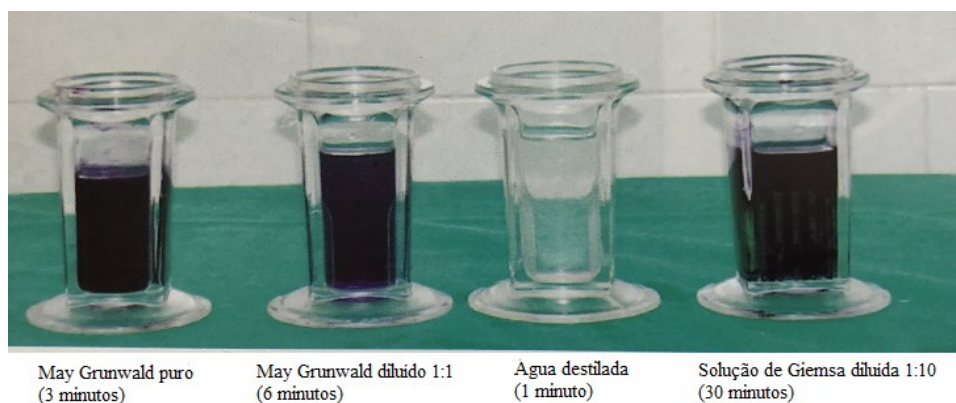


Figura 2: Coloração tradicional May Gruwald Giemsa. Adaptado de Gerlardi (2012)

As lâminas foram marcadas com as iniciais e o número do prontuário dos pacientes incluídos. Posteriormente analisadas por dois examinadores diferentes e em momentos diferentes. Os dois examinadores eram cegos entre si e cegos sobre a clínica e características do paciente no momento de análise ao microscópio.

Utilizou-se o microscópio Olympus® Cx31 e as lâminas foram lidas com uma ampliação de 1000x, com uso do óleo de imersão, para avaliar a presença do biofilme na amostra da mucosa nasal coletada.

A seguir, descreverei com mais detalhes a técnica de citologia nasal empregada nesta pesquisa:

TÉCNICA DE DETEÇÃO DO BIOFILME PELA MICROSCOPIA OPTICA – COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

Gelardi e colaboradores¹⁴ realizaram a citologia nasal de 1410 pacientes, por meio da rinoscopia anterior, com espelho nasal e boa iluminação. As amostras foram obtidas da porção média do corneto inferior usando uma cureta (Rhino-Probe®) e nos pacientes pouco colaborativos foi utilizado um swab nasal. Imediatamente após, a amostra foi transferida para uma lâmina de vidro, fixada por secagem em ar ambiente e corada pelo método do May-Grunwald Giemsa (MGG) (Carlo Erba®, Milão, Itália)¹⁴.

O método de coloração MGG é o mais utilizado na citologia nasal porque todos os componentes da mucosa nasal, desde componentes celulares até células inflamatórias, bactérias, fungos, esporos e secreção mucosa, são facilmente tingidos.¹⁴

No estudo em questão, os autores encontraram, repetidamente e em uma grande proporção de pacientes com rinite infecciosa, manchas cromáticas de tamanho variável, com margens irregulares e uma intensa coloração ciano.¹⁴

Tal coloração chamou atenção dos pesquisadores, uma vez que esta banda cromática não se enquadrava no espectro de cores da citologia nasal quando corada com MGG. A presença de bactérias ou esporos de fungos sugeria que essas manchas (as manchas infecciosas) poderiam ser a expressão microscópica do biofilme.^{14,16,17}

Para confirmar se de fato essas manchas infecciosas corresponderiam ao biofilme, foi realizada uma coloração com PAS (ácido periódico de schiff), que é específico para polissacarídeos. Isso se deveu ao conhecimento prévio de que 80% ou mais da composição do biofilme é de matriz polimérica extracelular (MPE), que possui uma composição majoritariamente polissacarídica.^{14,18,19}

Essa coloração foi invariavelmente positiva quando os microrganismos estavam presentes. Portanto, concluiu-se que as manchas infecciosas de fato correlacionavam-se ao biofilme^{16,20}

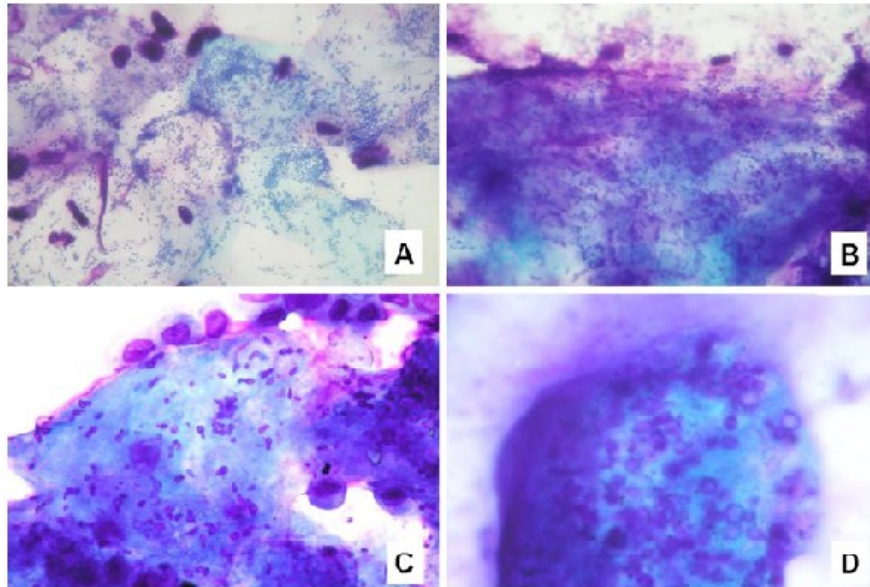


Figura 3: Mancha Infecciosa – expressão do biofilme. Adaptado de Gelardi e colaboradores (2011)

A a D: mancha infecciosa/ A e C: colônias bacterianas visíveis/ B e D: esporos fúngicos. Coloração MGG.
Ampliação 400x e 1000x

Cabe ressaltar que a mancha infecciosa permanece sempre no espectro da cor ciano, mas pode ter tonalidades variáveis. Isso provavelmente se deve à maturidade dos biofilmes. Logo, quando mais maduro o biofilme é, maior é a composição de polissacarídeos. Conseqüentemente, apresentará uma coloração mais intensa ^{14,15}

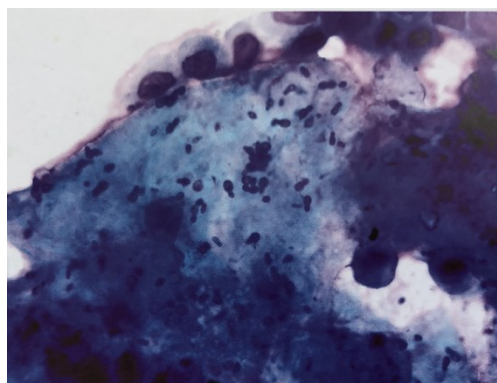


Figura 4: Mancha infecciosa. Adaptado de Gelardi (2012)

São visualizados bactérias e fungos envoltos pela camada corada em ciano

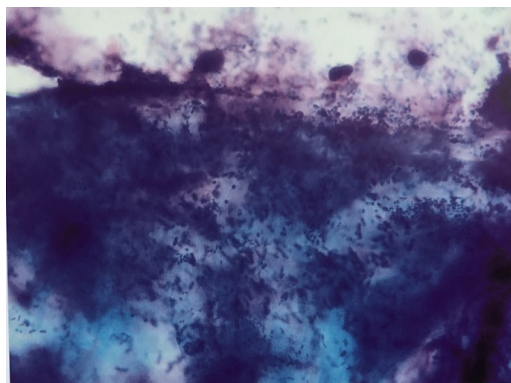


Figura 5: Mancha infecciosa. Adaptado de Gelardi (2012)

A maior intensidade cromática representa uma maior quantidade de matriz polimérica extracelular; logo, um biofilme mais maduro.

Por todo o supracitado, percebe-se que esta técnica de identificação do biofilme é simples, barata e facilmente realizável, sendo uma forma prática e reprodutível para a identificação do biofilme.^{16,20}

4.8.5 Teste alérgico cutâneo:

O teste alérgico cutâneo tem como objetivo diagnosticar rinites alérgicas. Ele foi executado por profissional experiente em sua realização. Utilizou-se um painel de extratos comercializados no Brasil, incluindo *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Felis domesticus*, *Canis familiaris*, *Periplaneta americana* e *Blatella germanica*. Foi utilizado um controle positivo (histamina 50%, acrescida de solução fisiológica e fenol 0,4%) e outro negativo (50% de glicerina, 50% de solução fisiológica e fenol 0,4%).

O resultado obtido foi calculado utilizando as médias aritméticas dos maiores diâmetros das pápulas e os diâmetros ortogonais em suas medianas. A leitura foi realizada 15 minutos após a puntura, sendo considerados positivos todos os testes cuja pápulas apresentaram médias de diâmetro, no mínimo, 3mm maiores que o controle negativo.



Figura 6: Teste alérgico cutâneo. (Acervo próprio)

4.9 Protocolo do estudo

A avaliação clínico-laboratorial de todos os participantes foi feita por pesquisadores treinados e consistiu de:

a) Realização de anamnese e exame físicos detalhados pela equipe multidisciplinar composta por: alergologista, otorrinolaringologista, odontologista e fonoaudiólogo.

b) Realização da citologia nasal por profissional treinado, coletado pela rinoscopia anterior.

c) Realização de fibronasolaringoscopia. Por ser um exame invasivo e desconfortável, nos pacientes com fibronasolaringoscopia recente (até 12 meses anteriores à inclusão no estudo) não foi realizado novo exame no dia da coleta da citologia nasal. Nos demais, a fibronasolaringoscopia foi realizado no mesmo dia da coleta da citologia nasal.

d) Realização de rinomanometria anterior no dia da coleta da citologia nasal ou em até 3 meses posteriores. Por dificuldades operacionais e técnicas (examinador experiente e funcionamento adequado do aparelho) e, também, de capacidade de compreensão e colaboração dos pacientes para a realização da rinomanometria anterior, não foi possível realizá-la em todos os pacientes incluídos no estudo.

e) Realização do teste alérgico cutâneo. Tal exame foi executado na maioria dos pacientes, no mesmo dia da coleta da citologia nasal. No entanto, naqueles pacientes com uso de anti-histamínico oral em até 7 dias anteriores à citologia nasal ou que por motivo desconhecido a histamina foi negativa no dia da coleta da citologia nasal, o exame foi repetido em até 6 meses.

f) Processamento da amostra colhida na citologia nasal. As lâminas foram marcadas com as iniciais e o número do prontuário dos pacientes incluídos. Posteriormente, foram coradas em até 15 dias após a coleta. Posteriormente, foram guardadas em caixas apropriadas para armazenamento de lâminas para que dois examinadores diferentes e cegos entre si

avaliassem, em momentos diferentes, a presença/ausência de biofilme nas amostras obtidas.

g) Análise da amostra colhida na citologia nasal pelo examinador 1: A leitura das lâminas pelo examinador 1 foi realizada ao longo do período de coleta das amostras. Após a etapa de coloração, o examinador retirou aleatoriamente as lâminas da caixa de armazenamento e fez a leitura cega, ou seja, sem correlacionar com os dados do paciente registrados em prontuário. O foco da leitura foi identificar a ausência/presença de biofilme nas amostras nasais obtidas.

Cabe ressaltar que o examinador 1 é a principal autora da presente pesquisa, portanto, foi a responsável também pela coleta de dados, realização do teste alérgico cutâneo e da citologia nasal em todas as suas etapas. No entanto, reforça-se que durante a leitura das lâminas a pesquisadora não acessou dados dos pacientes e tampouco dos sintomas apresentados por eles, minimizando assim qualquer chance de viés durante a leitura das lâminas.

h) Análise da amostra colhida na citologia nasal pelo examinador 2: A leitura das lâminas pelo examinador 2 foi realizada após o período de coleta das amostras. O examinador 1 entregou as lâminas ao examinador 2 em recipiente apropriado para o armazenamento e não forneceu qualquer informação sobre os pacientes e as amostras coletadas. O foco da leitura foi identificar a ausência/presença de biofilme nas amostras nasais obtidas.

Cabe reforçar que o examinador 2 é uma pesquisadora experiente em leitura de lâminas. Tal pesquisadora não faz parte da equipe atuante no Ambulatório do Respirador Oral do Hospital das Clínicas/UFMG e, por isso, foi absolutamente cega em todas as etapas da pesquisa, cabendo a ela avaliar exclusivamente a presença/ausência de biofilme nas amostras nasais obtidas.

Ressalta-se que em nenhum momento o examinador 2 teve acesso a quaisquer informações sobre os pacientes e tampouco a seus respectivos prontuários.

i) Armazenamento dos resultados: Os resultados obtidos foram registrados em planilha de Excel e armazenados para posterior análise estatística.

4.10 Análise estatística

As análises foram feitas considerando a natureza da variável. As que são qualitativas foram tratadas em tabelas de frequência com valores absolutos e relativos. As quantitativas passaram pelo teste de *Shapiro Wilk* e tiveram sua normalidade rejeitada sendo, portanto, apresentadas em forma de mediana e quartis.

O coeficiente de *Kappa* foi utilizado para avaliar a concordância de dois examinadores em relação a classificar o paciente com ou sem o biofilme.

Para associar a presença/ausência de biofilme com outras variáveis qualitativas, foi aplicado o teste Qui Quadrado.

Para comparar as variáveis quantitativas entre os que tem e não tem o biofilme, foi aplicado o teste de *Mann Whitney*.

As análises foram realizadas no software IBM SPSS versão 25 e com nível de significância de 5%.

REFERÊNCIAS

1. Barros JRC, Becker HMG, Pinto JA. Avaliação de atopia em crianças respiradoras bucais atendidas em centro de referência. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(6):458–64.
2. Ribeiro ML. Validação do questionário de qualidade de vida e avaliação do bem-estar subjetivo de crianças respiradoras orais [Tese de doutorado]. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
3. Yamaguchi H, Tada S, Nakanishi Y, Kawaminami S, Shin T, Tabata R et al. Association between Mouth Breathing and Atopic Dermatitis in Japanese Children 2–6 years Old: A Population-Based Cross-Sectional Study. *PLoS One* 2015;10(4):e0125916.
4. Costa EC, Sabino HAC, Miura CS, de Azevedo CB, de Menezes UP, Valera FCP et al. Atopy and adenotonsillar hypertrophy in mouth breathers from a reference center. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013;79(6):663–7.
5. Varricchio A, La Mantia I, Brunese FP, Ciprandi G. Inflammation, infection, and allergy of upper airways: new insights from national and real-world studies. *Ital J Pediatr.*2020;46(1):18.
6. Meng Y, Lou H, Wang Y, Wang X, Cao F, Wang K et al. Endotypes of chronic rhinitis: A cluster analysis study. *Allergy* 2019;74(4):720–30.
7. Brodsky L. Modern Assessment of Tonsils and Adenoids. *Pediatr Clin North Am* 1989;36(6):1551–69.
8. Khan ZH, Kashfi A, Ebrahimkhani E. A Comparison of the Upper Lip Bite Test (a Simple New Technique) with Modified Mallampati Classification in Predicting Difficulty in Endotracheal Intubation: A Prospective Blinded Study. *Anesth Analg* 2003;96(2):595–9.
9. Zapletal A, Chalupová J. Nasal airflow and resistance measured by active anterior rhinomanometry in healthy children and adolescents. *Pediatr Pulmonol* 2002;33(3):174–80.
10. Nathan R, Eccles R, Howarth P, Steisvag S, Togias A. Objective monitoring of nasal patency and nasal physiology in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(3):S442–59.
11. Lai VWS, Corey JP. The Objective Assessment of Nasal Patency. *Ear Nose Throat J* 1993;72(6):395–400.
12. Schumacher MJ. Rhinomanometry. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83(4):711–8.
13. Clement PA, Frans Gordts. Consensus report on acoustic rhinometry and rhinomanometry. *Rhinology* 2005;43(3):169–79.
14. Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, Mosca A, Quaranta N. Nasal cytology: the “infectious spot”, an expression of a morphological-chromatic biofilm. *Eur J Clin*

- Microbiol Infect Dis 2011;30(9):1105–9.
15. Gellardi M. Atlante di Citologia Nasale per la diagnosi differenziale delle rinopatie. 2ed. Milano: Edi. Ermes srl; 2012.
 16. Kalan L, Grice EA. Fungi in the Wound Microbiome. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2018;7(7):247–55.
 17. Gelardi M, Landi M, Ciprandi G. Nasal cytology: a Precision Medicine tool in clinical practice. *Clin Experim Allergy* 2018;48(1):96–7.
 18. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(9):623–33.
 19. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig* 2013;25(1):31–42.
 20. Gelardi M, Ciprandi G, Cassano M. Nasal cytology detects biofilm. *Med Pharm Rep* 2021;94(2):267–8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Artigo original: Analysis of biofilm prevalence on the nasal mucosa of oral-breathing children

Introduction

Biofilms are surface-attached agglomerations of microorganisms (bacteria or fungi) embedded in an extracellular polymeric matrix.^{1,2,3,4} They are important in a multitude of diseases, especially in those in which the mucosa is the main organ affected such as rhinosinusitis, nasal polyposis, adenoid hypertrophy and otitis media.¹

At least 65% of all human bacterial infections are estimated to be associated with the presence of biofilms.^{5,6} They are clinically relevant due to their polysaccharide extracellular matrix that may increase the survival of microorganisms and induce resistance to antimicrobials, disinfectants and detergents, making them difficult to eradicate or to treat.^{1,6,7,8}

Biofilm-positive patients have been shown to be more likely to require surgical intervention, and presenting worse postoperative symptoms, persistent inflammation and recurrent infections.^{2,9}

During the last 20 years, advances in technology and scientific research has enabled the development of new forms of diagnosis and treatment for several diseases.¹⁰ Biofilms have been studied in many pathologies due to their nature and negative effects.¹

However, studies rely on complex and costly techniques (for example, electron microscopy or confocal laser microscopy), preventing its use in the clinical setting and under high prevalence conditions such as nasal pathologies.^{1,11}

Some studies have shown that biofilms may also be identified via optical microscopy, especially by using May Grunwald-Giemsa (MGG) staining.^{1,10,11,12} According to this technique, biofilms are identified as cyan colored “infectious spots”.^{1,11}

Few studies assess the presence of biofilms in mouth breathing patients, and studies assessing the presence of biofilms in mouth breathing children using nasal cytology are virtually unknown.¹³

Nasal cytology is a useful, inexpensive, easy to use technique that enables a clear understanding and diagnosis based on the phenotypic characteristics of rhinitis.^{1,10,11} It is a valuable diagnostic technique to be used especially in children, since it is minimally invasive, allowing a more objective follow-up in pediatrics.¹⁴

However, despite all the above-mentioned characteristics, many centers do not use nasal

cytology routinely.¹⁰

Objective

To identify the prevalence of biofilms through nasal cytology in patients of the Mouth breather Respiratory Outpatient Clinic, belonging to the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais (HC/UFMG). Additionally, Comparing the prevalence of biofilm among mouth breathers: a) According to gender and age group b) c) With the degree of nasal obstruction, evaluated by anterior rhinomanometry with and without adenoid hypertrophy d) With surgical indication and without surgical indication e) With allergic and non-allergic rhinitis f) With and without medication use.

Patients and Methods

Children aged 5 to 12 years who were attended at the Mouth Breather Outpatient Clinic of HC/UFMG, with scheduled appointments during the period from May 2021 to July 2022, were included in the study. The children who were diagnosed with facial malformations, genetic syndromes, chromosomal abnormalities, primary or secondary immunosuppression causes, as well as those whose legal guardians refused to sign the consent form or undergo nasal cytology, were excluded from the study.

The clinical-laboratory evaluation of all participants was performed by trained researchers and consisted of:

a) Conducting a detailed medical history and physical examination by a multidisciplinary team composed of an allergist, otolaryngologist, dentist, and speech therapist.

b) Nasal cytology was performed by a trained professional during anterior rhinoscopy, with good illumination, by applying a sterile swab to the middle portion of the inferior turbinate, as proposed by Gelardi et al.^{11,12} The collected material was transferred to a glass slide, air-dried, and stained by the traditional May-Grunwald Giemsa (MGG) method.¹² The slides were marked with the initials and medical record number of the included patients. They were later analyzed by two different examiners at different times. The examiners were blinded to each other and blinded to the clinical and patient characteristics at the time of microscope analysis.

The reading of the slides by examiner 1 was performed throughout the period of sample collection. After the staining step, the examiner randomly removed the slides from the storage box and performed blind reading, without correlating with the patient data recorded in the medical records. The focus of the reading was to identify the absence/presence of biofilm in the nasal samples obtained.

Examiner 1 handed over the slides to examiner 2 in an appropriate container for storage and did not provide any information about the patients and the collected samples. It is important to mention that examiner 2 never had access to any information regarding the patients or their medical records during the entire process.

c) Fibronasolarinoscopy was performed on the same day as the collection of nasal cytology, except for those who had already undergone the exam in the 12 months prior to the day of the nasal cytology collection. The flexible nasofibroscope MACHIDA ENT IIP® with a diameter of 3.2 mm was used. Adenoid hypertrophy was classified as follows: 1-free, 2-Adenoid <60%; 3- Adenoid between 60 and 69%; 4-Adenoid between 70 and 79%; 5- Adenoid between 80 and 89%; 6-Adenoid \geq 90%.

d) Anterior rhinomanometry was performed on the day of nasal cytology collection or up to 3 months later. Due to operational and technical difficulties, as well as patient comprehension and cooperation, it was not possible to perform it in all patients included in the study. The device used was the SRE 2000 N 010000300189 rhinomanometer from RHINOSCAN 0272CFB2 with RHINOSTREAM 038CC5C3. The classification proposed by Zapletal and colleagues¹⁵ was followed, which consisted of: 1- Normal patency: 77-100% of v.p. 2- Mild obstruction: 66-76% of v.p. 3- Moderate obstruction: 55-65% of v.p. 4- Severe obstruction: 44-54% of v.p. 5-Very severe obstruction: <44% of v.p.

e) Prick Test was performed on most patients on the same day as the nasal cytology, except in those patients who had used oral antihistamines within 7 days prior to nasal cytology or in whom the histamine test was negative for unknown reasons, the test was repeated within 6 months. A panel of extracts commercially available in Brazil was used, including *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Felis domesticus*, *Canis familiaris*, *Periplaneta americana* and *Blatella germanica*. A positive control (histamine 50%, plus saline solution and phenol 0.4%) and a negative control (50% glycerin, 50% saline solution and phenol 0.4%) were used. The result was calculated using the arithmetic means of the largest diameters of the wheals and the orthogonal diameters at their midpoints. The reading was performed 15 minutes after the prick, and all tests whose wheals presented mean diameters at least 3mm larger than the negative control were considered positive.

f) Statistical analysis: The analyses were performed considering the nature of the variable. Qualitative variables were treated in frequency tables with absolute and relative values. Quantitative variables were tested for normality using the Shapiro-Wilk test and had their normality rejected, and were therefore presented as median and quartiles. The Kappa

coefficient was used to evaluate the agreement between two examiners in classifying the presence or absence of biofilm in patients. To associate the presence/absence of biofilm with other qualitative variables, the Chi-square test was applied.

Results

In the present study, 77 samples of nasal cytology were collected from patients. 10 were excluded from the research (7 insufficient samples, 3 children not classified as mouth breathers). Therefore, 67 mouth-breathing children were included, aged between 5 and 12 years, with a median age of 8 years. Of these children, 45 (67.2%) were male and 22 (32.8%) were female.

Table 1 - Demographic characteristics of research participants

Sex	Number of individuals	Age
Male	45 (67,2%)	8 (6 – 10)
Female	22 (32,8%)	10,5 (7,8 – 12)
Total	67 (100%)	8 (7- 11)

For examiner 1, the prevalence of biofilm was 50.7% (n=34). For examiner 2, the prevalence of biofilm was 47.8% (n=32).

To verify the agreement between the two examiners, a Kappa analysis was performed, which was found to be significant ($p < 0.0001$). Therefore, this result confirms the agreement, showing a high similarity between the examiners. Table 2 below shows the high agreement between the two examiners. Only 3% of the sample (2 cases) were classified differently by the examiners.

Table 2: Biofilm presence by examiner

Examiner 1	Examinador 2	
	Absence	Presence
Absence	33 (49,3%)	0 (0%)
Presence	2 (3%)	32 (47,7%)

Due to the high similarity, a draw was carried out and the results will be presented based on the prevalence found by examiner 2.

Of the 32 children who had biofilm in the nasal mucosa, 23 (71.9%) were male and 9 were female (28.1%). The result indicates that there is no predominance of either sex in either

group ($p=0.432$).

Table 3 - Association between biofilm presence and sex

Sex	Presence of biofilm	Absence of biofilm	P value*
Female	9 (28,1%)	13 (37,1%)	0,432
Male	23 (71,9%)	22 (62,9%)	

Chi-square test*

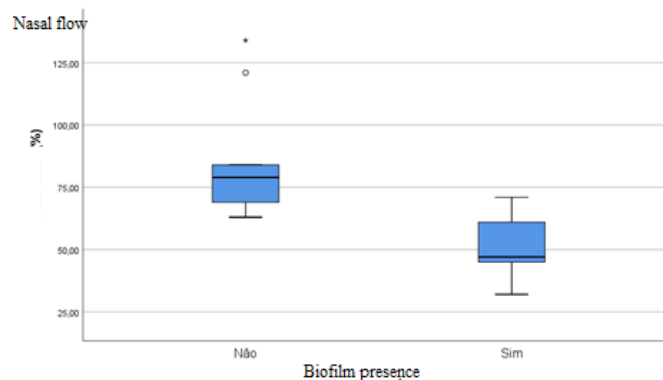
Among the etiologies of mouth breathing in the studied group were: adenoid hypertrophy 40%, tonsil hypertrophy 35.8%, rhinitis 94%, allergic rhinitis 69.5%, and septal deviation 22.4%.

It was observed that patients who had biofilm on the nasal mucosa were younger than those who did not have biofilm on the nasal mucosa ($p = 0.047$) (Table 4). In addition, patients with biofilm had a lower predicted nasal flow compared to the group without biofilm on the nasal mucosa ($p = 0.001$) (Table 4 and Figure 1).

Table 4 - Comparison of age and nasal flow variables in patients with and without biofilm presence.

	Overall	Biofilm presence		P value*
		No	Yes	
Median Age (years min-max)	8 (7 – 12)	9 (8 – 12)	8 (7 – 10)	0,047
Nasal Flow % (min-max)	67 (46 – 79)	79 (68 – 102,5)	47 (43,5 – 63,3)	0,001

Mann Whitney test*



Graph 1: Comparison of age and nasal flow variables in patients with and without biofilm presence

Regarding the decrease in nasal flow, it was observed that patients with the presence of

biofilm had more severe obstruction when compared to those without biofilm ($p = 0.021$). Thus, in the group of patients without biofilm, 55.6% have normal nasal patency. On the other hand, among those patients with biofilm, 40% have severe obstruction, as shown in the table below (Table 5).

Table 5 - Nasal obstruction severity according to the presence of biofilm

Nasal flow	Biofilm presence		Total	P value*
	No	Yes		
Normal patency	5 (55,6%)	0 (0%)	5 (26,3%)	0,021
Mild obstruction	3 (33,3%)	2 (20%)	5 (26,3%)	
Moderate obstruction	1 (11,1%)	2 (20%)	3 (15,8%)	
Severe obstruction	0 (0%)	4 (40%)	4 (21,1%)	
Very severe obstruction	0 (0%)	2 (20%)	2 (10,5%)	

There was no statistically significant association found between the presence of biofilm and the other variables studied (etiology of mouth breathing, passive smoking, surgical indication, and use of specific medications).

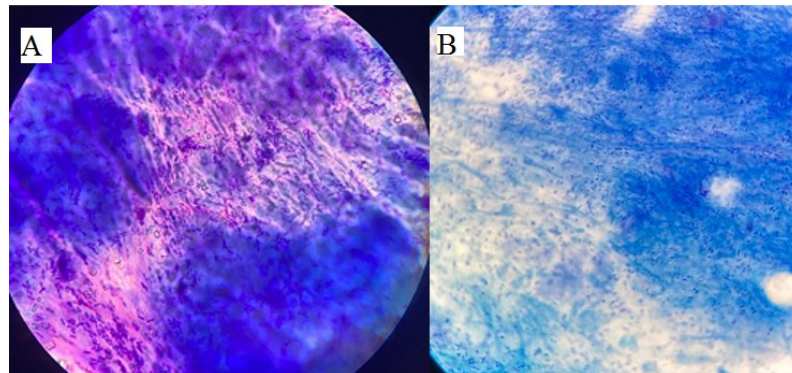


Figure 2: Infectious Spots - biofilm expression (Personal collection)
Infectious spots and visible bacterial colonies. MGG staining.
Magnification 1000x

Discussion

Nasal cytology is a minimally invasive, easy to perform, and inexpensive examination.^{1,10,16}

As previously shown by Gelardi and colleagues¹¹ nasal cytology using the May-Gruwald-Giemsma staining technique may be able to detect the presence of biofilm on the nasal mucosa. In the present study, the search for biofilm was performed by nasal cytology, as

proposed by the researchers.¹¹

The slides were analyzed under an optical microscope by two different, independent, and blinded examiners (also blind to which patient each sample belonged to). There was a high correspondence in the prevalence found by both, which was statistically significant, demonstrating that nasal cytology can be a good method for detecting biofilm on the nasal mucosa, as it is easy to perform, minimally invasive, reproducible, inexpensive, and with good clinical applicability.

As demonstrated in the systematic review entitled "The prevalence of biofilms in children's upper airway: a systematic review," conducted by the same group of researchers as this article (still awaiting official publication), the determination of the prevalence of biofilm in patients with upper airway diseases is done by expensive and complex research methods, which makes it difficult to conduct broad studies in the general population.

Nevertheless, in the aforementioned systematic review, it was observed that the prevalence of biofilm found in children with some upper airway disease is high, ranging from 35-100%, depending on the analyzed study.^{17,18,19,20,21,22} Although the biofilm research method in this study was different from those included in the aforementioned systematic review, the prevalence falls within the range already estimated by other researchers. It should be noted that in other studies, all biofilm research and study methods were complex and expensive, while in the present study, a simple and inexpensive method was used.

It is important to highlight that studies detecting the prevalence of biofilm on the nasal mucosa of children classified as mouth breathers through nasal cytology are, to date, nonexistent. In this study, a prevalence of 47.8% was found in this group using this technique.

Among the population included, there was a predominance of males (67.2%). This fact corresponds to existing data in the literature that there is a predominance of males among mouth-breathing children. This may be explained by the fact that they have a smaller airway caliber and are also more affected by allergic rhinitis when compared to same-aged female children.²³

However, in the present study, the results indicate that there is no difference in the prevalence of rhinitis between boys and girls ($p = 0.952$). In both groups, the prevalence is close to 70%.

It was observed that children who had biofilm on the nasal mucosa had a lower nasal flow (documented by anterior rhinomanometry). This demonstrates that the presence of biofilm may be decisive in worsening nasal breathing in this population.

This fact can be understood within the concept of dysbiosis, which is a microbial

imbalance caused by alterations in the microbiota that favors the growth of pathogenic bacteria over commensals.^{9,24,25} Therefore, a congested nose would have a more unhealthy microbiome, which favors the formation of biofilm.¹ However, further studies are needed to analyze the real impact of this on mouth-breathing children, since in the present research, associations between the presence of biofilm and worse clinical and/or surgical outcomes could not be detected.

Furthermore, within the concept of dysbiosis, it was observed that patients with more severe nasal obstruction had a higher prevalence of biofilm. This corresponds to what is found in the literature and is related to the fact that the more obstructed the nasal cavity, the healthier the microenvironment is.¹

It is noteworthy that although the worsening of nasal flow associated with the presence of biofilm was a statistically significant association ($p=0.021$), technical and operational difficulties prevented the anterior rhinomanometry from being performed in all subjects included in the research.

Hefller et al.¹⁰ emphasized the importance of discontinuing the use of oral and/or nasal corticosteroids for 7 days before collecting nasal cytology to obtain a clearer sample. Additionally, Goggin et al.²⁶ evaluated the effect of fluticasone, mometasone, and budesonide on *Staphylococcus aureus* biofilms and observed a significant reduction *in vitro* in biofilm biomass in the presence of steroids.

Moreover, topical nasal steroid preparations also contain non-therapeutic compounds known as excipients, such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in Pulmicort (Budesonide). Although excipients are not actively involved in treating the disease and are used only for preservation and stabilization of the active agent, some studies have shown their ability to reduce bacterial load.^{27,28}

In the present study, there was no correlation between corticosteroid use and the presence or absence of biofilm. This may be explained by the fact that a large proportion of patients classified as "using medication" reported irregular use of medications. For future research, we strongly suggest dividing patients into regular or irregular medication use, to potentially reveal clearer associations with the presence or absence of biofilm.

Regarding passive exposure to smoking, Elwany et al.²⁹ demonstrated the promotion of biofilm formation in the nasal mucosa of children who lived with smokers in the household. Although they pointed out the need for more (and larger) studies on this relationship, they concluded that increased duration of exposure to tobacco smoke increased the development of biofilm in the nasal mucosa of children.²⁹ In the present study, no statistically significant relationship was found between the presence/absence of biofilm and passive smoking,

necessitating further studies on this aspect.

Conclusion

We found that younger children had a higher prevalence of biofilm in the nasal mucosa. Additionally, in children where biofilm was identified, lower nasal flow and more severe obstruction were observed compared to those without biofilm presence. These findings may be related to the development of an unhealthy nasal microbiome, which could favor the emergence and development of biofilm.

The nasal cytology has proven to be a technically simple, inexpensive and a reproducible test.

The numerous harms that mouth breathing causes in children are already well known, with some of them persisting even into adulthood. Being able to detect biofilm in mouth breathers using a simple and inexpensive technique, such as nasal cytology, opens possibilities for more precise diagnostic and therapeutic approaches, providing improved understanding and management of mouth breathers at lower costs and unnecessary interventions.

REFERENCES

1. Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella M, Quaranta N. Assessment of biofilm by nasal cytology in different forms of rhinitis and its functional correlations. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2013;45:25–9.
2. Jain R, Lee T, Hardcastle T, Biswas K, Radcliff F, Douglas R. The in vitro effect of xylitol on chronic rhinosinusitis biofilms. *Rhinology J* 2016;54(4):323–8.
3. Danielsen KA, Eskeland O, Fridrich-Aas K, Orszagh VC, Bachmann-Harildstad G, Burum-Auensen E. Bacterial biofilms in patients with chronic rhinosinusitis: a confocal scanning laser microscopy study. *Rhinology J* 2014;52(2):150–5.
4. Harvey RJ, Valerie J. Lund. Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research. *Rhinology* 2007;45(1):3.
5. Singh P, Mehta R, Agarwal S, Mishra P. Bacterial biofilm on the sinus mucosa of healthy subjects and patients with chronic rhinosinusitis (with or without nasal polyposis). *J Laryngol Otol* 2015;129(1):46–9.
6. Mladina R, Poje G, Vuković K, Ristić M, Musić S. Biofilm in nasal polyps. *Rhinology* 2008;46(4):302–7.
7. Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial Biofilms in Surgical Specimens of Patients with Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005;115(4):578–82.
8. Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35(3):124–34.
9. Megow A, Alsuliman Y, Bouras G, Menberu M, Vyskocil E, Vreugde S et al. Chitogel following endoscopic sinus surgery promotes a healthy microbiome and reduces postoperative infections. *Int Forum Allergy Rhinol* 2022;12(11):1362–76.
10. Heffler E, Landi M, Caruso C, Fichera S, Gani F, Guida G et al. Nasal cytology: Methodology with application to clinical practice and research. *Clin Experim Allergy* 2018;48(9):1092–106.
11. Gelardi M, Passalacqua G, Fiorella ML, Mosca A, Quaranta N. Nasal cytology: the “infectious spot”, an expression of a morphological-chromatic biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(9):1105–9.
12. Gellardi M. *Atlante di Citologia Nasale per la diagnosi differenziale delle rinopatie*. 2 ed. Milano: Edi. Ermes srl; 2012.
13. Gelardi M, Marseglia GL, Licari A, Landi M, Dell’Albani I, Incorvaia C et al. Nasal cytology in children: recent advances. *Ital J Pediatr* 2012;38(1):51.
14. Pipolo C, Bianchini S, Barberi S, Landi M, D’Auria E, Fuccillo E et al. Nasal cytology in children: scraping or swabbing? *Rhinology J* 2017;55(3):242250.

15. Zapletal A, Chalupová J. Nasal airflow and resistance measured by active anterior rhinomanometry in healthy children and adolescents. *Pediatr Pulmonol* 2002;33(3):174–80.
16. Caruso C, Giancaspro R, Guida G, Macchi A, Landi M, Heffler E et al. Nasal Cytology: A Easy Diagnostic Tool in Precision Medicine for Inflammation in Epithelial Barrier Damage in the Nose. A Perspective Mini Review. *Frontiers in Allergy* 2022;3:768408.
17. Galli J, Calò L, Ardito F, Imperiali M, Bassotti E, Fadda G, et al. Biofilm formation by *Haemophilus influenzae* isolated from adeno-tonsil tissue samples, and its role in recurrent adenotonsillitis. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2007;27(3):134–8.
18. Drago L, Veechi E, Torretta S, Mattina R, Marchisio P, Pignataro L. Biofilm formation by bacteria isolated from upper respiratory tract before and after adenotonsillectomy. *APMIS* 2012;120(5):410–6.
19. Macchi A, Castelnuovo P, Terranova P, Digilio E, Alberto M. Effects of sodium hyaluronate in children with recurrent upper respiratory tract infections: results of a randomised controlled study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013;26(1):127-35.
20. Diaz RR, Picciafuoco S, Paraje MG, Villegas NA, Miranda JA, Albesa I et al. Relevance of biofilms in pediatric tonsillar disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30(12):1503–9.
21. Bayazian G, Sayyahfar S, Safdarian M, Kalantari F. Is there any association between adenoid biofilm and upper airway infections in pediatric patients? *Turk Pediatri Ars* 2018;53(2):71–7.
22. Tawfik SAES, Ibrahim AA, Talaat IM, El-Alkamy SSAER, Youssef A. Role of bacterial biofilm in development of middle ear effusion. *Eur Archiv Otorhinolaryngol* 2016;273(11):4003–9.
23. Šidlauskas M. Relationships between Malocclusion, Body Posture, and Nasopharyngeal Pathology in Pre-Orthodontic Children. *Med Sci Monitor* 2015;21:1765–73.
24. Hamilos DL. Biofilm Formations in Pediatric Respiratory Tract Infection. *Curr Infect Dis Rep.*2019;21(2):6.
25. Sahli C, Moya SE, Lomas JS, Gravier-Pelletier C, Briandet R, Hémadi M. Recent advances in nanotechnology for eradicating bacterial biofilm. *Theranostics* 2022;12(5):2383–405.
26. Goggin R, Jardeleza C, Wormald P, Vreugde S. Corticosteroids directly reduce *Staphylococcus aureus* biofilm growth: An in vitro study. *Laryngoscope* 2014;124(3):602–7.
27. Cherian LM, Cooksley C, Richter K, Ramezanpour M, Paramasivan S, Wormald PJ et al. Effect of commercial nasal steroid preparation on bacterial growth. *Int Forum Allergy Rhinol* 2019;9(7):766–75.

28. Al-Bakri AG, Othman G, Bustanji Y. The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents. *J Appl Microbiol* 2009;107(1):280–6.
29. Elwany S, Gamea MA, Talaat I. Passive smoking induces nasal biofilms in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2021;146:110755.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a prevalência do biofilme na mucosa nasal das crianças com a Síndrome da Respiração Oral, por meio da citologia nasal.

Os resultados demonstraram que a prevalência de biofilme foi de 47,8%. Esse valor encontra-se dentro dos valores encontrados em outros estudos realizados com técnicas mais complexas e caras.

Para aumentar a confiabilidade da técnica escolhida, dois examinadores diferentes, independentes e cegos avaliaram as amostras coletadas. O nível de correspondência foi significativo ($p < 0,0001$), demonstrando que a citologia nasal pode ser um bom método para a detecção do biofilme na mucosa nasal, visto que é de fácil realização, minimamente invasivo, reprodutível, barato e, além disso, com boa aplicabilidade clínica.

Outro resultado relevante foi a associação da presença do biofilme ao menor fluxo nasal e à obstrução nasal mais grave, demonstrando que a presença do biofilme pode ser determinante na piora da respiração nasal nessa população. Esses achados podem estar relacionados ao desenvolvimento de um microbioma nasal insalubre, o que poderia favorecer o surgimento e o desenvolvimento do biofilme.

São necessários mais estudos para avaliar os desfechos clínicos e cirúrgicos das crianças respiradoras orais com o biofilme presente na mucosa nasal.

O uso rotineiro da citologia nasal abre possibilidades para abordagens diagnósticas e terapêuticas mais precisas, proporcionando uma melhor compreensão e gerenciamento de respiradores orais, de forma individualizada, com custos mais baixos e intervenções desnecessárias.

ANEXOS

Anexo I – Resolução que regulamente Teses de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
E-MAIL: cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

RESOLUÇÃO 03/2010, de 05 de fevereiro de 2010

Regulamenta o formato de teses e dissertações do Programa

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da UFMG, no uso de suas atribuições, e considerando a necessidade de regulamentar o formato de teses e dissertações do Programa, RESOLVE:

Art. 1º - A tese de doutorado e a dissertação de mestrado poderão ser elaboradas no formato convencional e no formato de artigo.

Parágrafo único - O formato de artigo é considerado preferencial pelo colegiado do Programa, principalmente para o doutorado.

Art. 2º - O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente propõe o seguinte roteiro para elaboração da dissertação/tese no formato de artigo:

1. Introdução: duas a três paginas para contextualizar a dissertação/ tese e explicar sua estrutura cujos resultados serão apresentados sob formato de artigos;
2. Revisão da literatura: preferencialmente sob formato de artigo de revisão;
3. Objetivos: redigido da forma convencional (uma ou duas páginas);
4. Métodos: redigido da forma convencional e detalhado;
5. Resultados e discussão: sob a forma de artigo ou artigos;
6. Conclusão ou considerações finais: até cinco paginas.
7. Anexos/ Apêndices

Art. 3º - Outros aspectos de formatação:

1. Referências bibliográficas: serão apresentadas após cada sessão da dissertação/tese de acordo com as normas de Vancouver e conforme as recomendações específicas de cada periódico para os quais os artigos serão submetidos.
2. A dissertação de mestrado e a tese de doutorado poderão conter os textos escritos na língua inglesa, de acordo com esta resolução.

Art. 4º. Os casos omissos e especiais serão decididos pelo Colegiado de Pós-Graduação.

Art. 5º. Esta Resolução entra em vigor na data de sua aprovação.

Prof. Joel Alves Lamounier
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Saúde da Criança e do Adolescente

Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, responsável pelo(a) menor _____, afirmo estar ciente dos objetivos da pesquisa “ *A presença do biofilme na citologia nasal interfere na resposta aos corticoides tópicos nasais? Estudo dos pacientes respiradores orais com rinosinusite crônica, acompanhados no Ambulatório do Respirador Bucal do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Minas Gerais.*” e dou meu consentimento para que os procedimentos sejam realizados, os dados sejam coletados e que as informações de prontuário sejam analisadas.

As razões e motivos da realização desta pesquisa foram explicados de maneira clara e foram entendidos por mim. Estou ciente de que não sou obrigado (a) a dar essa autorização e, se o faço, não me sinto coagido(a) a fazê-lo. Além disso, sei que a não autorização não me trará nenhum prejuízo e nem ao menor pelo qual sou responsável no atendimento médico prestado.

(assinatura do responsável)

(assinatura pesquisador)

Belo Horizonte, _____ (data)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (responsáveis)

INTRODUÇÃO

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que será realizada no Ambulatório do Respirador Oral do Hospital das Clínicas da UFMG. Antes de decidir sobre a participação de seu (sua) filho(a), queremos que você conheça essa pesquisa.

Este documento é chamado de termo de consentimento livre e esclarecido, pois, seu consentimento só é válido se for dado após ter sido plenamente esclarecido sobre todos os aspectos relevantes do estudo, bem como riscos e benefícios que ele pode proporcionar. A equipe conversará com você sobre estas informações e você poderá fazer perguntas a qualquer momento.

Se entender o que foi explicado e concordar que seu (sua) filho(a) participe deste estudo, pediremos que assine duas vias deste documento. Uma via sua e nós guardaremos a outra.

Antes de decidir sobre a participação de seu filho(a) neste estudo, é necessário entender que:

- A participação é completamente voluntária;
- Você pode decidir que seu (sua) filho(a) deixe o estudo a qualquer momento sem que tenha qualquer perda ao acesso aos cuidados médicos e cuidados de rotina relacionados ao ambulatório de respiradores orais do Hospital das Clínicas da UFMG.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A rinossinusite crônica é uma das causas da respiração bucal e leva a significativas perdas na qualidade de vida e à gastos importantes. Sabe-se que muitos pacientes que tem rinossinusite crônica possuem biofilme na mucosa nasal.

Biofilmes são um “agrupamento” de microrganismos na mucosa do nariz, encobertos por uma “camada protetora”. A presença deles está relacionada ao aumento da sobrevivência desses microrganismos, ou seja, rinossinusites crônicas mais graves e mais difíceis de tratamento.

Assim, o objetivo é identificar quais pacientes respiradores orais e com rinossinusite crônica possuem biofilme na mucosa do nariz e verificar se isso acarreta em pior resposta ao tratamento proposto. Diante disso, proporcionar um tratamento mais direcionado e adequado ao paciente.

O QUE DEVO FAZER COMO PARTICIPANTE DESTES ESTUDO?

Primeira consulta do estudo (Consulta de triagem)

Na primeira consulta do estudo, faremos perguntas sobre a vida de seu(sua) filho(a), histórico médico, estado de saúde e exposição a fatores ambientais.

Seu(sua) filho(a) será avaliado(a) por uma equipe multidisciplinar que envolve docentes e pesquisadores dos departamentos de otorrinolaringologia, alergia e imunologia, fonoaudiologia, odontologia e fisioterapia. Será realizado anamnese (entrevista médica) e exame físico otorrinolaringológico e alergológico, teste alérgico cutâneo, rinomanometria anterior ativa, pico de fluxo inspiratório nasal (PFIN), citologia nasal e fibronasolaringoscopia. Também será solicitado exames de sangue (anti HIV) e outros que forem necessários, para afastar possíveis causas de imunodeficiência (“baixa imunidade”).

Outras consultas do estudo.

Durante outras consultas do estudo, os médicos farão perguntas adicionais sobre a saúde de seu(sua) filho(a) e exposições ambientais. Também será avaliado pelos profissionais da equipe multidisciplinar que ainda forem necessários para o melhor tratamento dele(a). Em toda consulta de retorno uma nova citologia nasal será realizada por meio da rinoscopia anterior, que é um procedimento que causa incômodo mínimo e de fácil execução.

Você também responderá aos questionários para verificarmos o uso correto do medicamento e a melhora da rinossinusite crônica de seu(sua) filho(a). Além disso, em todas as consultas será reforçado o uso correto da medicação.

Também pediremos que você leve às consultas de retorno os frascos (mesmos que vazios) do medicamento que seu(sua) filho(a) usa para tratar a rinossinusite, para verificarmos a duração da medicação de acordo com a dose preconizada para seu(sua) filho(a).

Se seu filho(a) não responder à medicação proposta

Caso seu(sua) filho(a) não melhore com o tratamento proposto, trocaremos a medicação e ele(ela) será excluído do estudo. No entanto, não haverá qualquer prejuízo para ele(a). Seu(sua) filho(a) continuará sendo acompanhado pela equipe multidisciplinar do respirador oral.

QUANTAS CRIANÇAS PARTICIPARÃO DESTES ESTUDO?

Participarão desse estudo 105 crianças.

POR QUANTO TEMPO SEU (SUA) FILHO(A) FICARÁ NO ESTUDO?

Ele(ela) ficará no estudo durante o período de um ano.

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

Riscos da coleta de sangue

A coleta de sangue pode causar um pouco de desconforto, tonteira, sangramento, mancha roxa ou inchaço no local onde a agulha entra no corpo, e raramente pode causar desmaios ou infecção. Um pequeno coágulo poderá se formar no local onde o sangue tenha sido coletado, ou poderá haver inchaço na área. Se ocorrerem hematomas, estes são temporários. Funcionários experientes do local (técnicos de pesquisa, laboratório e enfermeiras) realizarão coletas de sangue para diminuir este risco.

Riscos da fibronasolaringoscopia

A fibronasolaringoscopia é um exame feito pelo otorrinolaringologista, com ajuda de aparelhos dotados de câmera e uma iluminação especial. Durante o exame, a câmera penetra a cavidade nasal gerando imagem em um monitor, no qual é examinado as estruturas da laringe e da cavidade nasal, em busca de alterações.

Esse exame pode causar um pouco de desconforto e sangramento durante o procedimento. Otorrinolaringologistas experientes realizam o procedimento para diminuir esse risco. O procedimento é realizado com a criança do colo do responsável para que ela se sinta mais segura, facilitando a execução e diminuindo ainda mais os riscos.

Riscos da citologia nasal

A citologia nasal será realizada durante a fibronasolaringoscopia na primeira consulta e nas consultas de acompanhamento pelo exame do nariz com uma iluminação adequada, mas sem introdução de câmeras. Em ambas as situações será coletado raspados do nariz, utilizando uma cureta de plástico apropriada. O material coletado será transferido para uma lâmina de vidro.

Embora seja um exame com mínimo desconforto, indolor, pode causar agitação durante o procedimento. Profissionais experientes realizarão o exame diminuindo esse risco.

Riscos da rinomanometria

A rinomanometria é um exame indolor. Coloca-se um sensor na narina e solicita-se que

o paciente respire para aferir a pressão. Cada narina será mensurada separadamente. Após o registro adequado de uma narina, os instrumentos são invertidos para se registrar o outro lado.

Em geral, é um exame bem tolerado, mas pode causar um mínimo desconforto. Profissionais experientes realizarão o exame diminuindo esse risco.

Riscos do teste alérgico cutâneo

O teste é realizado no antebraço, onde é pingada uma gota dos extratos alergênicos e dos controles para validação do teste. É feita uma pequena e superficial puntura na pele no local da gota, e aguarda-se 15 minutos para a leitura do diâmetro da elevação da pápula.

O teste alérgico cutâneo pode causar um pouco de desconforto, coceira no local da puntura e raramente anafilaxia (reação alérgica grave). Profissionais experientes realizarão o exame diminuindo esse risco. Também é realizado em ambiente adequado para tratar quaisquer reações que possam surgir. A equipe médica é treinada em tratar anafilaxia, diminuindo o risco do procedimento.

HÁ BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Você receberá os resultados de todos os exames e procedimentos que forem realizados em seu(sua) filho(a). Esse conhecimento poderá ajudar você e seu médico a respeito das escolhas sobre o tratamento mais adequado para seu(sua) filho(a). Os conhecimentos obtidos por meio deste estudo poderão auxiliar os médicos a oferecerem no futuro melhores cuidados para respiradores orais com rinosinusite crônica.

Após o final do estudo, os resultados serão divulgados a todos os que possam se beneficiarem desse conhecimento.

E A CONFIDENCIALIDADE?

Os investigadores e o pessoal do estudo estão empenhados em assegurar a confidencialidade e a privacidade dos dados de seu(sua) filho(a), de acordo com as regras brasileiras. A equipe do estudo assinará um documento no qual se compromete a proteger suas informações. O nome dele(a) será substituído por um código numérico especial de identificação do participante (PID). O código será usado em todas as suas amostras e documentos do estudo para proteger a identidade dele(a). A conexão entre o código e o nome será guardada em local trancado, localizado no centro do estudo, e separado do prontuário. Os arquivos em papel também serão mantidos em local trancado dentro do centro da pesquisa. Os arquivos eletrônicos serão protegidos por senhas. O acesso a todas as informações ficará limitado às pessoas que

trabalham no estudo. Nenhum dado escrito ou publicado mencionará o nome de seu(sua) filho(a).

Pessoas que poderão analisar os registros não identificados incluem o Comitê de Ética da UFMG, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), o Ministério de Saúde do Brasil e outras agências regulatórias no país, bem como a equipe de estudo, monitores do estudo e representantes. Estes indivíduos e agências só poderão analisar os prontuários não identificados se o consentimento tiver sido dado por você, pelo médico do estudo e o investigador principal e se a permissão for obtida do Comitê de Ética da UFMG, com base nas normas do código de ética.

Quando o médico e a equipe do estudo concordarem, e cumprindo o Código de Ética do Conselho Federal de Medicina e as leis brasileiras que protegem os participantes de estudos, suas informações poderão ser vistas pelo Comitê de Ética do Ministério da Saúde, bem como por outras agências brasileiras que também garantem a proteção de seus direitos e segurança. Faremos todo o possível para manter a confidencialidade das informações de seu (sua) filho(a). No entanto, há sempre um risco de que as informações possam ser comprometidas.

O QUE ACONTECE SE MEU(MINHA) FILHO(A) SE LESIONAR OU SOFRER ALGUM DANO?

Não antecipamos que seu(sua) filho(a) se lesione ou sofra algum dano em consequência dos procedimentos que serão executados neste estudo. Se ele(ela) ficar lesionado(a) em consequência de participar neste estudo, os médicos darão o tratamento imediato e necessário.

Se ele(ela) sofrer algum dano pelos procedimentos feitos neste estudo, cuidados serão dados sem nenhum custo para você. Você não estará renunciando a nenhum dos direitos de seu(sua) filho(a) ao assinar este termo de consentimento.

QUAIS SÃO OS CUSTOS PARA MIM?

Não há nenhum custo para você, para a participação neste estudo. O centro de pesquisa será responsável por todas as despesas decorrentes de sua participação, exceto os custos para os cuidados de rotina previstos, ou seja, regulares para o tratamento da rinossinusite crônica de seu(sua) filho(a); tais como medidas de controle ambiental, medicamentos e transporte para consultas.

RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Você não receberá pagamentos pela participação de seu(sua) filho(a) nessa pesquisa.

QUAIS SÃO OS DIREITOS DE MEU (MINHA) FILHO(A) COMO PARTICIPANTE DE PESQUISA?

Participar neste estudo é completamente voluntário. Você poderá optar por não participar deste estudo ou sair do estudo a qualquer momento. Ele(a) será tratada da mesma maneira, não importando o que você decidir.

POR QUE O MÉDICO PODERIA RETIRAR MEU(MINHA) FILHO(A) DESTE ESTUDO ANTES DO FINAL?

O médico poderá precisar tirar você do estudo antes da conclusão pelos motivos listados abaixo. Se isto acontecer, nenhuma informação adicional será recolhida e nenhuma consulta de estudo ou testes laboratoriais serão feitos. As informações que você já havia nos informado permanecerão neste estudo.

1) O médico determinaria que a participação adicional seria prejudicial à saúde ou ao bem-estar. Neste caso, ele ou ela se comunicará imediatamente com a Comissão de Ética que tenha aprovado este estudo e avaliará a necessidade de adaptar ou suspender a sua participação no estudo. O Comitê de Ética é responsável por garantir a segurança e os direitos dos participantes da pesquisa.

2) O estudo é cancelado pelo Departamento de Proteção de Pesquisas Humanas, o Comitê de Ética da UFMG, a CONEP ou outras agências governamentais. Um Comitê de Ética é um comitê que cuida da segurança e dos direitos dos participantes da pesquisa.

3) Seu filho(a) não for capaz de comparecer às consultas do estudo.

4) Se seu(sua) filho(a) for diagnosticado como portadores de causas de imunossupressão, a saber: pacientes com imunodeficiência secundária a infecções, tais como infectados pelo HIV ou outras doenças crônicas, imunossupressão induzida por drogas e imunodeficiências primárias;

5) Se você ou seu(sua) filho(a) recusar a realizar os exames diagnósticos, a saber: teste alérgico cutâneo, citologia nasal, fibronasolaringoscopia, rinomanometria e exames de sangue para pesquisar imunodeficiências.

O QUE DEVO FAZER SE EU TIVER DÚVIDAS OU PROBLEMAS?

Se você tiver alguma dúvida sobre este estudo ou algum dano decorrente do estudo, entre em contato com:

Dra Lorena Nascimento Girardi Madeira ou Professor Jorge Andrade Pinto

Telefones: 31 3409 9111 ou 31 3409 9822 ou 31 31975431582

Endereço: Faculdade de Medicina da UFMG. Avenida Alfredo Balena 190 – 1º andar- Sala 166. Belo Horizonte – MG. CEP: 30130-100

Se quiser fazer qualquer pergunta sobre os direitos de seu(sua) filho(a) como participante de pesquisa, entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

Telefone: 31 3409-4592

Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar
– Sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte/MG CEP:31270-901

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Termo de assentimento para criança e adolescente (maiores de 8 anos e menores de 18 anos)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa *“A presença do biofilme na citologia nasal interfere na resposta aos corticóides tópicos nasais? Estudo dos pacientes respiradores orais com rinosinusite crônica, acompanhados no Ambulatório do Respirador Oral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.”* Seus pais (ou responsáveis) permitiram que você participe.

Queremos verificar a prevalência de biofilmes na mucosa nasal dos respiradores orais com rinosinusite crônica e observar se a presença desses biofilmes interfere na resposta aos corticoides tópicos nasais. Ou seja, queremos descobrir se os pacientes que possuem “bactérias protegidas por uma camada protetora” (os biofilmes) possuem o tratamento da rinosinusite crônica prejudicado.

As crianças que irão participar desta pesquisa têm de 2 a 12 anos de idade. Você não precisa participar se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita no/a Ambulatório do Respirador Oral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde as responderá a algumas perguntas breves para descobrir se podem participar do estudo. Também solicitaremos um exame de sangue (anti-HIV) para descartar essa doença e evitar que gere fatores de confusão na pesquisa. Outros exames para afastar outras causas de imunodeficiência poderão ser solicitados se houver alguma suspeita que você possui alguma imunodeficiência (“baixa imunidade”).

Se você concordar em participar deste estudo, você será acompanhado durante o período de um ano. Será realizado uma consulta presencial a cada três meses e será feito contato telefônico mensal para verificarmos se está usando a medicação corretamente e se está apresentando melhora da rinosinusite (será verificado tudo isso por meio de dois questionários que você responderá por telefone).

Você receberá orientações por escrito de como usar a medicação e nas consultas presenciais responderá os questionários para que possamos avaliar a melhora da rinosinusite e o uso correto da medicação.

Além disso, em todas as consultas será reforçado o uso correto do medicamento.

Também pediremos que você leve às consultas de retorno os frascos (mesmos que vazios) do medicamento que usa para tratar a rinosinusite, para verificarmos a duração da medicação de acordo com a posologia preconizada para você.

Todos os exames a serem realizados são considerados seguros, mas é possível ocorrer riscos como: um pouco de desconforto, tonteira, sangramento, mancha roxa ou inchaço no local

onde a agulha entra no corpo, e raramente pode causar desmaios ou infecção ou mesmo reação alérgica grave (teste alérgico). Funcionários experientes do local (técnicos de pesquisa, laboratório, médicos e enfermeiras) realizarão os exames para diminuir esse risco. A equipe médica é treinada em tratar reações alérgicas, diminuindo o risco do procedimento.

Mas há coisas boas que podem acontecer como:

Você receberá os resultados de todos os exames e procedimentos que forem realizados. Esse conhecimento poderá ajudar você e seu médico a respeito das escolhas sobre o tratamento mais adequado para você. Os conhecimentos obtidos por meio deste estudo poderão auxiliar os médicos a oferecerem no futuro melhores cuidados para respiradores orais com rinossinusite crônica.

Após o final do estudo, os resultados serão divulgados a todos os que possam se beneficiarem desse conhecimento.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar. Segue os telefones para contato:

Dra Lorena Nascimento Girardi Madeira ou Professor Jorge Andrade Pinto

Telefones: 31 3409 9111 ou 31 3409 9822 ou 31 31975431582

Endereço: Faculdade de Medicina da UFMG. Avenida Alfredo Balena 190 – 1º andar- Sala 166. Belo Horizonte – MG. CEP: 30130-100

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa “*A presença do biofilme na citologia nasal interfere na resposta aos corticóides tópicos nasais? Estudo dos pacientes respiradores orais com rinosinusite crônica, acompanhados no Ambulatório do Respirador Oral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.*”

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer.

Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar furioso.

Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Belo Horizonte, __de __de ____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Anexo III: Ficha de atendimento no Ambulatório Respirador Oral do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

AMBULATÓRIO DO RESPIRADOR ORAL – HC / UFMG

Nome: _____ DN _____ / _____ / _____

PROTOCOLO

OTORRINOLARINGOLOGIA					
RA cornetos	<input type="checkbox"/>	normais	<input type="checkbox"/>	alterados	
Septo	<input type="checkbox"/>	centralizado	<input type="checkbox"/>	com desvio	
Oro.AP Dir grau	_____		AP Esq grau	_____	
			<input type="checkbox"/>	trouxe Audio/impedancia	
Adenoide Dir	_____ %		Esq	_____ %	
			<input type="checkbox"/>	solicitada Polissonografia	
Oto Dir	<input type="checkbox"/>	normal	<input type="checkbox"/>	alterado	
			Esq	<input type="checkbox"/>	normal
				<input type="checkbox"/>	alterado
Conduta 1ª consulta: _____					

FONOAUDIOLOGIA					
<input type="checkbox"/>	Postura alterada	<input type="checkbox"/>	Tônus alterado		
Mastigação	<input style="width: 100%;" type="text"/>				
Deglutição	<input style="width: 100%;" type="text"/>				
VOZ	<input type="checkbox"/>	Neutra	<input type="checkbox"/>	Rouca	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	Equilibrada	<input type="checkbox"/>	Hipernasal	<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>	Soprosa	<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>	Hiponasal	<input type="checkbox"/>
CONDUTA/ Terapia <input style="width: 100%;" type="text"/>					
Retorno sugerido em: _____ (mês) / _____ (ano)					

FALA

- Normal
- Omissões/Substituições
- Articulação imprecisa
- Áspera
- Laringo-faríngea
- Sigmat. interdental
- Sigmat. lateral

ALERGIA					
DIAGNÓSTICO	<input type="checkbox"/>	Rinite	<input type="checkbox"/>	Asma	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	Derma. Atópica	<input type="checkbox"/>	Outros	_____
	<input type="checkbox"/>	Atópico	<input type="checkbox"/>	Ácaros	<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>	Baratas	<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>	Animais	<input type="checkbox"/>
			<input type="checkbox"/>	Fungos	<input type="checkbox"/>
TRATAMENTO <input style="width: 100%;" type="text"/>					

ORTODONTIA					
SAGITAL	VERTICAL	TRANSVERSAL	CONDUTA:	Retorno sugerido em:	
Classe I	<input type="checkbox"/>	Mordida normal	<input type="checkbox"/>	Normal	<input type="checkbox"/>
Classe II	<input type="checkbox"/>	Mordida aberta	<input type="checkbox"/>	Cruzado	<input type="checkbox"/>
Classe III	<input type="checkbox"/>	Mordida profunda	<input type="checkbox"/>		
				_____ (mês) / _____ (ano)	

RINO	Data _____ / _____ / _____	PATÊNCIA NASAL%		FNIT	PFIN	
		SEM	COM		SEM	COM
vasoconstr.						
	FN DIR					
	FN ESQ					

AMBULATÓRIO DO RESPIRADOR ORAL – HC / UFMG

PROCOLO N° SAME

--	--

DATA: ___/___/___

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Idade na 1ª consulta: _____

Sexo: Masculino Feminino

Endereço: _____

Cep: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefones de contato: _____

Escolaridade da criança: Manhã Tarde

Nenhuma 1º grau incompleto

Nome da mãe: _____

Idade: _____ Profissão: _____ Escolaridade:

Nenhuma 1º grau incompleto 1º grau completo

2º grau incompleto 2º grau completo 3º grau completo

Nome do pai: _____

Idade: _____ Profissão: _____ Escolaridade:

Nenhuma 1º grau incompleto 1º grau completo

2º grau incompleto 2º grau completo 3º grau completo

Acompanhante na 1ª. Consulta e observações: _____

Número do protocolo: _ _ _ _ Data: _ _ / _ _ / _ _

AVALIAÇÃO OTORRINOLARINGOLÓGICA

Sintomas relacionados

1. Seu filho / sua filha respira de boca aberta? (respiração oral) __
1-de dia 2-de noite 3-de dia e de noite 4-nega 9-não sabe informar
1-Sim 2-Não 9-Não sabe informar
2. Seu filho / sua filha está apresentando roncos à noite? __
3. Seu filho / sua filha apresenta pausas respiratórias / paradas da respiração durante o sono? (apnéia do sono) __
4. Seu filho / sua filha tem sono durante o dia? (sonolência diurna) __
5. Seu filho / sua filha tem o sono agitado? __
6. Seu filho / sua filha urina na cama à noite? (enurese noturna) __
7. Seu filho / sua filha range os dentes enquanto dorme? (bruxismo) __
8. Seu filho / sua filha acorda no meio do sono toda noite? __
9. Seu filho / sua filha "baba" durante o sono? (sialorréia) __
10. Seu filho / sua filha apresenta afundamento do tórax quando dorme? __
11. Seu filho / sua filha tem dificuldade para acordar de manhã? __
12. Seu filho / sua filha apresenta muita coriza clara e / ou espirros e / ou prurido nasal quando tem contato com poeira, mofo, cigarro e pêlos de animais / penas de aves? (hiperreatividade nasal) __
 *Seu filho / sua filha apresenta, com frequência:
 Prurido nasal? __
 Espirros? __
 Rinorreia? __
 Obstrução nasal/congestão? __
 Hiposmia? __
 Gotejamento pós nasal? __
 Síndrome alergia oral (eritema, agioedema de lábios, língua, palato após ingestão de frutas frescas / vegetais)? __
 Prurido ocular? __
 Hiperemia ocular? __
 Lacrimejamento? __
 Edema periorbitário? __
13. Seu filho / sua filha "chia o peito"? __
14. Seu filho / sua filha tosse com freqüência? __
15. Seu filho / sua filha tem muitas infecções repetidas, precisando de tratamento com antibióticos, como amigdalites, otites, sinusites? __

1-Sim 2-Não 9-Não sabe informar

_ _ _ _

16. Seu filho / sua filha tem dificuldade para escutar? Escuta mal? (hipoacusia) __

17. Seu filho/sua filha tem dificuldade para engolir alimentos sólidos, carne pex? __

18. Seu filho / sua filha fica rouco(a) com frequência? __

19.1 Seu filho / sua filha tem dificuldade para pronunciar as palavras? __

19.2 Seu filho / sua filha faz trocas de letras? __

19.3 Seu filho / sua filha já fez fonoterapia para linguagem? __

19.3.1 Por quanto tempo? _____

19.4 Quando seu filho/filha iniciou a fala?

 antes de 1 ano (balbucio) depois de 1 ano

20. Seu filho / sua filha queixa dor de cabeça com frequência? __

21. Seu filho / sua filha tem dificuldade de aprendizado na escola? __

*Na sua visão, os sintomas acima:

São perturbadores? __

Causam um sono ruim? __

Prejudicam as atividades diárias? __

Prejudicam as atividades escolares? __

*Alergia medicamentosa __ 1-Sim 2-Não 9-Não sabe informar

*Uso de medicamentos (lembrar de: bloq. alfa adrenérgicos, inibidores de ECA, aspirina, AINEs, descongestionantes tópicos, hormônios, ATBs, anti-histamínicos, corticoide tópico ou oral...)

*Outros diagnósticos (doença autoimune, doença hematológica, distúrbio neurológico, dermatite atópica, asma, ...)

*História familiar (atopia, asma, rinite, dermatite,...)

*Reside em casa ou apartamento? _____

O quarto tem cortinas, carpete, sofá/estofado, bichos de pelúcia?

Há animais em casa? Quais? _____

Há mofo em casa? __ 1-Sim 2-Não 9-Não sabe informar

Convivência com fumantes? __

Número do protocolo: _ _ _ _ Data: _ _ / _ _ / _ _

Peso _ _ , _ _ kg Altura _ , _ _ Z-score _____

Ectoscopia

1-Sim 2-Não 9-Não avaliado

22. Fascies típica adenoidiana _
 23. Olheira (sombreamento infraorbitário) _
 24. Saudação alérgica _
 25. Lábios entreabertos _
 26. Afundamento do tórax _

Otoscopia

1-brilhante e translúcida
 2-com líquido em ouvido médio
 4-com hiperemia radiada
 8-retraída
 16-opacificada
 32-com timpanosclerose
 64-com TV
 128-com perfuração central
 256-não avaliada

27. MT direita _ _ _
 28. MT esquerda _ _ _

Rinoscopia anterior

29. Septo do nariz _ 1-Septo centralizado 2-Desvio de septo 9-não visibilizado

para direita para esquerda

30. Corneto inferior direito _ 1-eutrófico 2-hipertrofiado 9-não avaliado

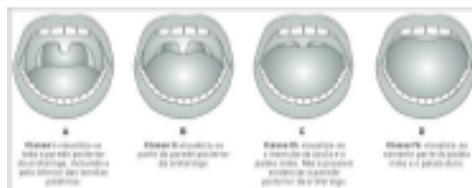
31. Corneto inferior esquerdo _

32. Mucosa nasal _ 1-normal 2-hiperemiada 3-pálida 8-congesta 16-polipóide 32-não avaliada

33. Secreção nasal à direita _ 1-absente 2-serosa
 34. Secreção nasal à esquerda _ 3-mucóide 4-mucopurulenta / purulenta 9-não avaliada

Oroscopia

35. Amígdala palatina dir. ___
 1-Amígdalas crípticas ou grau I
 2-Hipertrofia amigdaliana grau II
 3-Hipertrofia amigdaliana grau III
 4-Hipertrofia amigdaliana grau IV
 5-outros.....
 9-não avaliadas
36. Amígdala palatina esq. ___
37. Palato ogival ___ 1-Sim 2-Não 9-não avaliado
38. Mallampati modificado ___

**Endoscopia**

- Cavidade nasal direita 1-Sim 2-Não 9-Não visualizado
39. Mucosa nasal congesta ___
 40. Mucosa nasal hiperemiada ___
 41. Secreção mucóide em assoalho ___
 42. Secreção mucóide evidente em MM ___
 43. Secreção mucopur./purul. em assoalho ___
 44. Secreção mucopur./purul. evidente em MM ___
45. Óstio tubário___ 1-livre 2-obstruído 3-parcialmente obstruído 9-não avaliado
- Cavidade nasal esquerda 1-Sim 2-Não 9-Não visualizado
46. Mucosa nasal congesta ___
 47. Mucosa nasal hiperemiada ___
 48. Secreção mucóide em assoalho ___
 49. Secreção mucóide evidente em MM ___
 50. Secreção mucopur./purul. em assoalho ___
 51. Secreção mucopur./purul. evidente em MM ___
52. Óstio tubário___ 1-livre 2-obstruído 3-parcialmente obstruído 9-não avaliado

- # _____
53. Adenóide à dir. __ (__ __%)
 1-livre
 2-Adenóide <60%
 3-Adenóide entre 60 e 70%(excl)
 4-Adenóide entre 70 e 80%(excl)
 5-Adenóide entre 80 e 90%(excl)
 6-Adenóide > ou = 90%
54. Adenóide à esq. __ (__ __%)
 9-não avaliada
56. Orofaringe __
 1-Amígdalas não obstrutivas
 2-Amígdalas parecem obstrutivas
 9-não avaliadas
57. Laringe __
 1-Normal
 2-lesões nodulares
 4-sinais de RGE/RFL
 8-outros _____
 16-não avaliada

Audiometria

58. Ouvido direito __
 1-normal
 2-díscusia de transmissão
 3-DNS
59. Ouvido esquerdo __
 4-díscusia mista
 9-não realizada

Impedanciometria

60. Ouvido direito curva __
 1-Curva A
 2-Curva B
 3-Curva C
 4-inconclusivo
 9-não realizado
61. Ouvido esquerdo curva __
 Reflexos contra-lat presentes em:
 1-500Hz
 2-1000Hz
 4-2000Hz
 8-4000Hz
62. Sonda Ouvido direito / reflexo esq __
 16-ausentes em todas as freq.
 32-não realizada
63. Sonda Ouvido esquerdo / reflexo dir __

Teste cutâneo-alérgico para inalantes (pápula/eritema em mm)

64. Controle Negativo _____ / _____
65. Controle Positivo (histamina) _____ / _____
66. Der f _____ / _____
67. Der p _____ / _____
68. Blo t _____ / _____
69. Alt a _____ / _____
70. Asp f _____ / _____
71. Bla g _____ / _____
72. Per a _____ / _____
73. Barata mix _____ / _____
74. Can f _____ / _____
75. Fel d _____ / _____
76. Conclusão: resultado Positivo Negativo

Conclusão ORL

Respirador oral por:

Outros diagnósticos:

Conduta ORL:

AMBULATÓRIO DO RESPIRADOR ORAL				
1. Nome:			2. Data de nascimento / /	
3. Responsável:		4. Protocolo RO	5. Protocolo SAME	6. Sexo (1) Feminino (2) Masculino
7. Conduta da Fono	1ª Avaliação		Reavaliação 1	Reavaliação 2
	Data / /		Data / /	Data / /
	(1) Reavaliar PO/medicação (2) Terapia (3) Aguardar ORL (4) Não necessita terapia (5) Outra Qual: _____ Profissional responsável: _____		(1) Reavaliar PO (2) Terapia (3) Aguardar ORL (4) Não necessita terapia (5) Outra Qual: _____ Profissional responsável: _____	(1) Reavaliar PO (2) Terapia (3) Aguardar ORL (4) Não necessita terapia (5) Outra Qual: _____ Profissional responsável: _____
ANAMNESE				
8. Consistência atual dos alimentos: (1) Pastoso (2) Líquido (3) Sólido (4) Todas	9. Mastigação - Velocidade (1) Rápida (2) Normal (3) Lenta (9) Não sabe informar	10. Mastigação - Vedamento (1) Lábios abertos (2) Lábios fechados (9) Não sabe informar	11. Líquidos na refeição para auxílio do bolo (1) Sim (2) Não (9) Não sabe informar	12. Dor ATM (1) Sim (2) Não (9) Não sabe informar
13. Deglutição (1) Normal (2) Alterado. Como? (9) Não sabe informar	14. Seio (1) Sim (2) Não Até quando? _____ Exclusivo até? _____	15. Chupeta (1) Sim (2) Não Início: _____ Até quando? _____	16. Mamadeira (1) Sim (2) Não Início: _____ Até quando? _____	17. Dedo (1) Sim (2) Não Início: _____ Até quando? _____
18. Range / aperta dentes: (1) Sim (2) Não Início: _____ Até quando? _____	19. Omicofagia (1) Sim (2) Não Início: _____ Até quando? _____	20. Morde objetos? (1) Sim (2) Não Quais? _____ Início: _____ Até quando? _____	21. Fala: Alterações de fala (1) Sim (2) Não Quais? _____	
AVALIAÇÃO FONOAUDIOLÓGICA				
22. Ângulo nasolabial (1) 90° (2) Menor que 90° (3) Maior que 90°	23. Lábios - Aspectos morfológicos (1) Sem alterações (2) Alteração de coloração (3) Assimétrico (4) Cobrir menos 2/3 incisivos (5) Inferior com eversão () Outros:	24. Lábios - Postura habitual (1) Ocluídos (2) Ocluídos com tensão (3) Entresbertos (4) Ora abertos ora fechados (5) Abertos	25. Bochechas - Aspectos morfológicos (1) Sem alterações (2) Volumosas (3) Assimétricas (4) Marcas internas Outros:	26. Lábios - Mobilidade (1) Adequada (2) Inadequada
27. Bochechas - Mobilidade (1) Adequada (2) Inadequada	28. Língua - Mobilidade (1) Adequada (2) Inadequada	29. Lábios - Tensão (1) Normal (2) Aumentada (3) Diminuída	30. Bochechas - Tensão (1) Normal (2) Aumentada (3) Diminuída	31. Mental - tensão (1) Normal (2) Aumentada (3) Diminuída
32. Língua - Tensão (1) Normal (2) Aumentada (3) Diminuída	33. Língua - Aspectos morfológicos (1) Sem alterações (2) Marcas de dentes (3) Geográfica/fissurada Outros:	34. Língua - Posição habitual: (1) Não observável (2) No assoalho (3) Dorso alto (4) Anteriorizada	35. Frênulo (1) Normal (2) Anteriorizado (3) Curto (4) Curto e anteriorizado	36. Mandíbula - Postura habitual (1) Normal (2) Robaixada (3) Desviada para D (4) Desviada para E

37. Mandíbula - Abertura (1) Normal (2) Com desvio D (3) Com desvio E (4) Estalo (5) Crepitação	38. Mandíbula - Lateralização/ protrusão (1) Adequada (2) Inadequada Obs: _____	39. Masseter (1) Adequado (2) Assimetria tamanho (3) Assimetria contração	40. Tipo Facial (1) Curto (2) Médio (3) Longo	
41. Palato mole (1) Simétrico (2) Assimétrico		42. Palato duro (1) Normal (2) Largo (3) Alto/profundo (4) Estreito		
FUNÇÕES OROFACIAIS				
43. Respiração - Modo (1) Nasal (2) Oral (3) Oronasal	44. Mastigação - Mordida (1) Frontal (2) Lateral (3) Parte com a mão	45. Mastigação - Padrão (1) Bilateral alternada (2) Bilateral simultânea (3) Unilateral a D (4) Unilateral a E (5) Amassamento	46. Movimento: mandibulares na mastigação (1) Verticais (2) Verticais e rotatórios	
47. Mastigação - Volume: (1) Adequado (2) Grande (3) Pequeno	48. Tempo até deglutição final: (1) Normal (2) Lento (3) Rápido	49. Velocidade do ciclo mastigatório (1) Normal (2) Lento (3) Rápido	50. Postura de lábios na mastigação (1) Ocluídos (2) Abertos (3) Entreabertos	
51. Dor/estalos durante a mastigação (1) Sim (2) Não	52. Deglutição - Mov associados (1) Ausência de mov associados (2) Interposição de língua (3) Interposição de lábios (4) Mov. periorais (5) Mov. de mental (6) Mov. de cabeça	53. Postura de lábios na deglutição (1) Ocluídos (2) Abertos (3) Entreabertos	54. Ruído durante deglutição (1) Sim (2) Não	55. Sobras de alimentos (1) Sim Onde? _____ (2) Não
56. Fala (1) Adequada (2) Omissões (3) Substituições (4) Ceceo anterior (5) Ceceo lateral (6) Projeção anterior de língua (7) Salivação (8) Articulação travada (9) Velocidade - lenta (10) Velocidade - rápida (11) Desvio mandibular Outros: _____ SOMA: () ()		57. Voz Qualidade Vocal: G R B A S I Ressonância: () Equilibrada () Baixa () Hiponasal () Hipernasal Pitch: () Adequado () Agudo () Grave Loudness: () Adequado () Reduzido () Aumentado TMF: /s/ _____ seg /i/ _____ seg /u/ _____ seg /z/ _____ seg /z/ _____ seg /x/ _____ seg		
58. Escape aéreo no Espelho de Glatzel () Simétrico () Direita maior () Esquerda maior				
Outras informações:				
Av ORL:				
Av Orto:				
Reavaliação:				

