COLORACIONES HISTOLÓGICAS VS MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISION PARA DETECCIÓN DE BIOPELICULAS EN PACIENTES CON RINOSINUSITIS CRÓNICA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA SAMARITANA EN EL AÑO 2011.

Camilo Andrés Reyes Gelves*, Omar Alberto Gutiérrez Guauque**, Rafael Enrique Andrade°, Dimas Contreras Villa+

*Residente de otorrinolaringología Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, **Otorrinolaringólogo Instructor Universidad del Rosario, ° Patólogo Fundación Santa fe de Bogotá, + Patólogo Universidad Nacional de Colombia.

Histologic Staining or Transmission Electron Microscopy for Biofilm detection in patients with chronic rhinosinusitis at Hospital Universitario de la Samaritana of the year 2011.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

El presente trabajo de investigación fue finalizado el 31 de Enero de 2012 en la ciudad de Bogotá, Colombia y fue presentado en el XXXVI Congreso Nacional de Otorrinolaringología en Cali el 16 de Mayo de 2012.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

1. TITULO

COLORACIONES HISTOLÓGICAS Ó MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISION PARA DETECCIÓN DE BIOPELICULAS EN PACIENTES CON RINOSINUSITIS CRÓNICA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA SAMARITANA EN EL AÑO 2011.

2. AUTORES

- **Reyes Gelves Camilo Andres, Andrade Perez Rafael Enrique, Contreras Villa Dimas, Gutiérrez Guauque Omar Alberto.**

3. Vinculación Institucional

En el presente trabajo participaron de forma activa el Hospital Universitario de la Samaritana E.S.E y la Fundación Santa fe de Bogotá.

Reyes Gelves Camilo Andrés.

Facultad de Medicina, Universidad del Rosario - Hospital Universitario de la Samaritana.

Departamento de Otorrinolaringología.

Gutiérrez Guauque Omar Alberto.

Facultad de Medicina, Universidad del Rosario - Hospital Universitario de la Samaritana.

Departamento de Otorrinolaringología.

Andrade Pérez Rafael Enrique.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.

Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia

Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Fundación Santa fe de Bogotá.

Departamento de Patología.

Dimas Contreras Villa

Universidad Nacional de Colombia

Departamento de Patología.

LINEA DE INVESTIGACION

Patología crónica de nariz y senos paranasales.

Investigación Postgrado.

INVESTIGADORES

PRINCIPAL

DR. CAMILO ANDRES REYES GELVES

TELEFONO 3103432349, MAIL: camilor81@gmail.com

Residente Otorrinolaringología.

Hospital Universitario de la Samaritana

Servicio de Otorrinolaringología

TUTOR

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.

Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia

Mail: ogutierrez71@yahoo.com

DR. OMAR ALBERTO GUTIERREZ GUAUQUE

TELEFONO: MAIL: ogutierrez71@yahoo.com

Instructor Programa Otorrinolaringologia, Universidad del Rosario.

Hospital Universitario de la Samaritana

Servicio de Otorrinolaringología

DR. RAFAEL ANDRADE

Teléfono: 3102500586, MAIL: rafael.andrade@fsfb.org.com

Fundación Santa Fe de Bogotá.

Servicio de Patología .

DR. DIMAS CONTRERAS VILLA

Teléfono: 3006465302, MAIL: ddcontrerasv@gmail.com

Universidad Nacional de Colombia

Servicio de Patología.

"La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.

Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia

Mail: ogutierrez71@yahoo.com

AGRADECIMIENTOS

- Centro de Investigaciones y Epidemiología del Hospital Universitario de la Samaritana y la Fundación Santa fe de Bogotá.
- Dra. Jaidy Acosta, Servicio de Patología, Hospital Universitario de la Samaritana.
- Dra. Paula Esquinas, Servicio de Microscopia Electrónica de la Fundación Santa fe de Bogotá.
- Dr. Milciades Ibáñez, Estadístico, Universidad del Rosario.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

El presente trabajo lo dedico a mi esposa Vanessa Jaramillo Gutiérrez y a mi hija, Sofía Reyes Jaramillo por su apoyo incondicional y por ser el motor de mi vida.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Tabla de Contenido

1. TITULO 3
2. AUTORES 3
3. Vinculación Institucional 3
4. Lista de Tablas y Graficas. 10
5. Resumen 11
6. Introducción 12
7. Justificación 13
8. Planteamiento del Problema y Pregunta de Investigación: 14
9. Propósito 14
10. Objetivo General 14
11. Objetivos específicos 14
12. Marco teórico 15
   a) Que es una Biopelícula? 15
   b) Relación entre las Biopeliculas y la Rinosinusitis Crónica 19
   c) Métodos Diagnósticos utilizados para la detección de Biopeliculas. 21
13. Metodología 24
   a) Tipo y diseño general del estudio 24
   b) Población de referencia y muestra. 24
   c) Criterios de Inclusión: 24
   d) Criterios de Exclusión: 25
   e) Muestra: 25
   f) Definiciones operacionales de las variables 25
   g) Técnica de Recolección de la Información. 28

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

h) Materiales y Métodos 28

14. Procedimiento para garantizar aspectos éticos en las investigaciones con sujetos humanos y animales 34

15. Consideraciones Éticas 37

16. Análisis y control de Sesgos 41

17. Métodos Estadísticos y Plan de Análisis 43

18. Resultados 43

19. Discusión 55

20. Conclusiones 57

21. Referencias bibliográficas 58

22. Anexos 60

4. Lista de Tablas y Graficas.

Tabla 1 *Presencia de poliposis nasal asociada a la rinosinusitis crónica.* 43

Tabla 2 *Antecedentes patológicos de los pacientes incluidos en la muestra.* 43

Tabla 3 *Tratamiento antibiótico previo recibido por los pacientes.* 44

Tabla 4 *Instrumento para determinar el puntaje radiológico de Lund-Mackay* 45

Tabla 5 *Número de muestras tomadas por paciente.* 46

Tabla 6. *Concordancia entre MET y H-E de pacientes con rinosinusitis crónica en el hospital universitario de la samaritana en el 2011.* 53

Tabla 7. *Concordancia entre MET y el gram de pacientes con rinosinusitis crónica en el hospital universitario de la samaritana en el 2011* 53

Tabla 8. *Concordancia entre MET y la H-E para presencia extensiva en pacientes con rinosinusitis crónica en el hospital universitario de la samaritana en el 2011.* 54

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

5. Resumen

Objetivo: Determinar la concordancia entre la Microscopia de Luz vs Microscopia Electrónica de Transmisión para la detección de Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica

Diseño: Estudio de concordancia.

Materiales y Métodos: Analizamos 34 muestras de pacientes llevados a Cirugía Endoscópica Funcional por Rinosinusitis Crónica. Fueron procesadas para valoración mediante Microscopia de luz usando Hematoxilina-Eosina, Gram, Acido Peryódico de Schiff, Giemsa y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

Resultados: No se identificaron Biopelícula en ninguna de las muestras analizadas bajo Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), estos resultados son concordantes con los resultados obtenidos con las coloraciones histológicas Hematoxilina-Eosina (H-E), Gram, Giemsa y Acido Peryódico de Schiff (PAS), mostrando una concordancia absoluta con test de *Kappa* para resultados negativos del 100%.

Conclusión: Existe una alta concordancia entre los hallazgos observados entre la MET y la Microscopia de luz para los resultados negativos

Palabras clave: Biopeliculas, Sinusitis Crónica, Coloración y Etiquetado, Microscopia Electrónica.

Abstract

Objectives: Determine the concordance between light microscopy vs. Transmission Electron Microscopy for the detection of biofilms in patients with Chronic Rhinosinusitis

Materials and Methods: We analyzed 34 samples of patients who underwent Functional Endoscopic Surgery for Chronic Rhinosinusitis. These were processed for evaluation by light microscopy using Hematoxylin-Eosin, Gram, periodic acid-Schiff, Giemsa and Transmission Electron Microscopy (TEM).

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Results: Biofilm was not identified in any of the samples analyzed under transmission electron microscopy (TEM), these results are consistent with the results obtained with hematoxylin-eosin histological staining (HE), Gram, Giemsa and periodic acid-Schiff (PAS), showing an absolute concordance with *Kappa* test of 100% for negative results.

Conclusion: There is a high correlation between the findings observed between the TEM and light microscopy for the negative results

Clinical significance: Create a new tool for the diagnosis of Biofilms.

Keywords: Biofilms, Chronic Sinusitis, Staining and Labeling, Electron Microscopy.

6. Introducción

Un reporte reciente del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha estimado que el 65% de todas las enfermedades infecciosas están relacionadas a las Biopeliculas(1). A la fecha, las investigaciones en Biopeliculas en enfermedades como la Rinosinusitis Crónica sugieren que estas Biopeliculas contribuyen significativamente a la inflamación crónica y perpetuación del proceso infeccioso que es característico de esta enfermedad (2–4). Al mismo tiempo, estudios retrospectivos han demostrado que las Biopeliculas existen en el posoperatorio de pacientes con Rinosinusitis Crónica (4–7). Este mecanismo puede permitirle persistir a los patógenos de manera indefinida en la mucosa de los senos paranasales, y de esta manera fundar un proceso infeccioso e inflamatorio crónico, a pesar de un tratamiento antibiótico adecuado. Se ha considerado a la Rinosinusitis Crónica como una de las condiciones medicas crónicas más comunes y se estima que afecta entre un 14 a un 16% de la población en Norte América (2).

Los métodos diagnósticos establecidos en la literatura para la detección y el estudio de las Biopeliculas hacen referencia principalmente a la Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), la Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), la Microscopia Confocal de Barrido Láser (Confocal Scanning Electron Microscopy) y a métodos de Inmunohistoquímica como la Hibridación Fluorescente in situ (FISH) (1–3,8,9). Sin embargo, estos métodos tienen un alto costo y no son fácilmente accesibles a la mayoría de Hospitales del país.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

En la literatura se ha venido estudiando la detección de las Biopeliculas mediante la coloración con Hematoxilina-Eosina (1,4), la coloración Gram (10) y la coloración con Giemsa y Acido Peryodico de Schiff (PAS) (11), comparándolos con la Microscopia Electrónica y Microscopia Confocal de Barrido Láser. Sin embargo, no se ha comparado la efectividad de estas coloraciones histológicas entre sí, no se ha establecido con certeza la capacidad de las mismas para la detección de Biopeliculas, ni se han aplicado estos, o ningún otro método diagnostico para detectar Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica en nuestro país.

7. Justificación

Estableciendo el importante papel que juegan las Biopeliculas en la perpetuación del proceso infeccioso en la Rinosinusitis Crónica, cabe resaltar que no existe un tratamiento efectivo para la erradicación de las mismas. Las Biopeliculas han mostrado resistencia antibiótica hasta de 1000 veces superior a lo normal, por lo cual, la antibiótico terapia única, no es el tratamiento ideal para este tipo de patología. Sumando a esto, las múltiples reacciones adversas a los antibióticos, el incremento en la resistencia bacteriana, y el aumento en los costos, que en Estados Unidos, se ha estimado de hasta de 2.4 billones de dólares anuales; hace fundamental que se busquen métodos diferentes para el manejo de las Biopeliculas. Es importante detectar las Biopeliculas, no solo en una patología como la Rinosinusitis Crónica, sino también en otras patologías crónicas de cabeza y cuello, infecciones de las vías respiratorias bajas (Neumonía en fibrosis quística), traqueotomías, catéteres, uroepitelio (Infección Urinaria Recurrente), materiales de osteosíntesis entre otras, para así, buscar técnicas para el tratamiento, control y seguimiento de las mismas. En nuestro país, no se realizan estudios de rutina para la detección de Biopeliculas para ningún tipo de patología. En la literatura mundial, se han venido estudiando las Biopeliculas mediante Microscopia Electrónica de Transmisión y de Barrido, Microscopia Confocal de Barrido Láser y métodos de Inmunohistoquímica Fluorescente (FISH), sin embargo, la capacidad de ejecutar este tipo de estudios de manera rutinaria, es cada vez una opción más inaccesible para la mayoría de hospitales del país, por su escasa disponibilidad y alto costo. Esta es la razón por lo cual es fundamental buscar métodos diagnósticos de rutina, económicos, fiables y al

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

alcance de todos para la detección de las Biopeliculas, como las coloraciones histológicas propuestas, las cuales serán, en nuestro país, un nuevo instrumento diagnostico. Esto nos permitirá abrir campo a futuras investigaciones para el seguimiento y erradicación de las Biopeliculas mediante diferentes enfoques terapéuticos, como nos permitirá beneficiar a la población general, que padece de este tipo de padecimientos, secundarios a las infecciones por Biopeliculas.

8. Planteamiento del Problema y Pregunta de Investigación:

¿Son las Coloraciones Histológicas de rutina una alternativa diagnóstica a la Microscopia Electrónica de Transmisión para la detección de Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica?

9. Propósito

Demostrar que las coloraciones histológicas pueden ser utilizadas como una alternativa diagnóstica para la detección de Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica como opción a la Microscopia Electrónica de Transmisión. y de esta manera proponer un nuevo método diagnostico para la detección de Biopeliculas.

10. Objetivo General

- ✓ Determinar la concordancia entre los resultados obtenidos con las coloraciones Hematoxilina-Eosina, Gram, Giemsa y Acido Peryódico de Schiff vs la Microscopia Electrónica de Transmisión para la detección de Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica en el Hospital Universitario de la Samaritana en el año 2011.

11. Objetivos específicos

1. Describir los resultados obtenidos con las coloraciones H-E, Gram, Giemsa y Acido Peryódico de Schiff para la detección de Biopeliculas en muestras de mucosa nasal de pacientes con diagnóstico de Rinosinusitis crónica en el Hospital Universitario de la Samaritana en el año 2011.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

2. Describir el resultado obtenido con la Microscopia Electrónica de Transmisión para la detección de Biopeliculas en muestras de mucosa nasal de pacientes con diagnóstico de Rinosinusitis Crónica en el Hospital Universitario de la Samaritana en el año 2011.
3. Comparar los resultados **presencia y ausencia** de Biopeliculas obtenidos con las coloraciones H-E, Gram, Giemsa y Acido Peryodico de Schiff y los resultados **presencia y ausencia** de Biopelícula interobservador obtenidos con la Microscopia Electrónica de Transmisión para la detección de Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica en el Hospital Universitario de la Samaritana en el año 2011.
4. Comparar los resultados obtenidos como **presencia extensiva, presencia y ausencia** con las coloraciones H-E, Gram, Giemsa y Acido Peryodico de Schiff y con la Microscopia Electrónica de Transmisión para la detección de Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica en el Hospital Universitario de la Samaritana en el año 2011.

12. Marco teórico

a) Que es una Biopelícula?

Las Biopelículas son una comunidad estructuralmente y metabólicamente heterogénea organizada de bacterias adherida a la superficie mucosa o a un cuerpo extraño, situado en una extensa substancia extracelular polimérica (glicocalix) compuesto principalmente por polisacáridos, pero también conteniendo proteínas, y ácidos nucleícos, donde ocurren simultáneamente procesos aeróbicos y anaeróbicos en diferentes partes de la comunidad multicelular. El glicocalix es una mezcla de varias colonias bacterianas de varios fenotipos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Sirve de protección para las bacterias pero también funciona modulando el microambiente de las colonias a través de numerosos canales de agua por medio de procesos de señalización interbacteriana denominado *quórum sensing*.(2)

La matriz de la Biopelícula actúa como un sistema digestivo externo manteniendo enzimas extracelulares cerca a las células, permitiéndoles metabolizar biopolímeros disueltos, coloides y

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

sólidos. Esta matriz protege contra los mecanismos de defensa del organismo, algunos antibióticos, y a la radiación ultravioleta entre otros. La resistencia bacteriana observada en las Biopeliculas no parece ser genotípica, la cual esta mediada por plásmidos y transposones, ni a mutaciones consecuentes. En vez, es causada por estrategias multicelulares y/o a la habilidad de cada célula, contenida dentro de la Biopelícula, de diferenciarse a un estado fenotípico de protección que le permite tolerar la acción antibiótica. De hecho, las Biopeliculas están sujetas a cambio posterior a su exposición recurrente a agentes antibióticos, por lo tanto incrementando su resistencia (3).

Por otra parte, la formación de Biopeliculas favorece la resistencia bacteriana de los mecanismos de defensa de huésped, ya que la agregación bacteriana dentro la matriz de los Exopolisacáridos origina estructuras que son demasiado voluminosas para sufrir fagocitosis y reduce la vulnerabilidad bacteriana ante el sistema inmune humoral.

Las bacterias obtienen un gran beneficio de la formación de Biopeliculas; como protección a cambios del medio ambiente como humedad, temperatura, pH y exposición a rayos ultravioleta, al mismo tiempo concentrando nutrientes junto a la facilidad de excreción de productos de desecho (12). De la misma forma se ha estimado que las Biopeliculas carecen de susceptibilidad bacteriana, pudiendo exhibir resistencia antibiótica hasta de 1000 veces más que en forma planctónica(4).

Cualquier superficie, que este en contacto frecuente o continuo con agua, es cubierta, por una película compuesta de bacterias, la cual está sujeta a cambios en sus características y propiedades.

Cuando una bacteria en forma planctónica encuentra una superficie o interfase, se adhiere a esa interfase de una manera reversible, mientras “explora” el lugar para establecer si ofrece nutrientes u otras ventajas. Si el veredicto favorece un asentamiento permanente, se inicia un feedback positivo para la expresión de genes involucrados en la producción de matriz, en un lapso tan breve como de 12 minutos, y de esta manera, el proceso para la formación de Biopeliculas inicia (13).

Se describen las siguientes fases en la formación de Biopeliculas:

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

1. **Adhesión**: las bacterias se empiezan a fijar a superficies orgánicas e inorgánicas, posterior a un modo de adhesión reversible.
2. **Colonización y formación de microcolonias**: inicia una adhesión intercelular durante la segunda fase, la cual refleja el punto de partida para la formación de la estructura compleja de la Biopelícula. Durante esta fase, la transcripción de genes se lleva a cabo, la cual es esencial para la producción de los polisacáridos extracelulares. En la ausencia de este proceso, los genes serian reprimidos.
3. **Maduración**: este proceso requiere la presencia de señales comunicativas particulares, que son capaces de regular, dentro de la Biopelícula, la distribución de especies bacterianas individuales, expresión proteica de las células circundantes y expresión génica.

Las bacterias, posterior a ser atrapadas dentro de la matriz de Exopolisacáridos, regresan con algún grado de dificultad, a una forma planctónica, la cual se encuentra flotando en un liquido. Como consecuencia de esto, las bacterias liberadas se comportan como entidades planctónicas y pueden inducir síntomas de exacerbación clínica y/o pueden iniciar una nueva Biopelícula en localizaciones distantes al punto de partida (12).

Los Exopolisacáridos han sido designados la *"materia negra"* de la Biopelícula por su alto rango de biopolímeros. Los Exopolisacáridos contienen polisacáridos, proteínas, ácidos nucleícos y lípidos que son secretados por las células de la Biopelícula para encapsular e inmovilizar agregados microbianos. Estos Biopolímeros son los responsables para la apariencia macroscópica de las Biopeliculas. La capacidad para la formación de Biopeliculas es indispensable para la supervivencia de ciertos microorganismos, y ciertos mutantes que no pueden sintetizar Exopolisacáridos son severamente comprometidos o no son capaces de formar Biopeliculas en su forma madura. En resumen, no existe Biopelícula sin una matriz de Exopolisacáridos, los cuales hacen posible el estilo de vida los microorganismos, la cual es diferente de la forma planctónica.

La morfología resultante de la Biopelícula puede ser lisa y plana, rugosa o filamentosa. También puede variar en su grado de porosidad, teniendo una macrocolonia en forma de hongo con huecos rodeados por agua. Todas estas morfologías tienen el mismo efecto: inmovilizar transitoriamente las células en

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

la Biopelícula y permitir la existencia de una mezcla de microorganismos, con capacidad de interacción, permitiendo, a cierta escala, la **Biodiversidad.**

A continuación se enumeraran varias de las funciones de las Biopeliculas.

1. Adhesión: Permite los pasos iniciales en la colonización de las superficies bióticas por células planctónicas.
2. Agregación de células bacterianas: Forma puentes entre células, inmovilización temporal de poblaciones bacterianas, reconocimiento inter celular y formación de colonias celulares.
3. Cohesión de las Biopeliculas: Forma un red polimérica hidratada, mediante la estabilidad mecánica de las Biopeliculas.
4. Retención de agua: Mantiene una hidratación importante de la Biopelícula, evitando su deshidratación en ambientes despojados de agua.
5. Barrera de Protección: Confiere resistencia específica y no especifica contra las defensas del organismo durante procesos infecciosos, y le permite adquirir resistencia a múltiples antibióticos.
6. Absorción de compuestos orgánicos: Permite la acumulación de nutrientes del medio ambiente y la limpieza del mismo de los xenobioticos.
7. Absorción de iones inorgánicos: Promueve la formación de la matriz de polisacáridos.
8. Actividad Enzimática: Accede a la digestión de macromoléculas exógenas para la adquisición de nutrientes y la degradación de Exopolisacáridos estructurales, permitiendo la liberación celular de las Biopeliculas.
9. Fuente Nutricional: Da una fuente de Carbono, Nitrógeno y Fósforo para ser utilizada por la comunidad en la Biopelícula.
10. Intercambio de Información genética: Facilita la transferencia horizontal de genes entre las células de la Biopelícula.
11. Donación/Recepción de Electrones: Permite actividad de reducción en la matriz.
12. Exportación de los componentes celulares: Como parte del intercambio metabólico.
13. Unión de Enzimas: Acumulación, retención y estabilización enzimática.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Aproximadamente el 90% de la masa de las Biopeliculas es agua, el 10% restante está formado por la matriz extracelular (8.5%) y células (1.5%). Las bacterias en las Biopeliculas tienen un metabolismo disminuido asociado a la capacidad de la comunidad de desprender bacterias viables y colonizar nichos distantes, le han dado un interés importante al entendimiento de las Biopeliculas como perpetradoras de procesos infecciosos persistentes y recurrentes (14).

Los microorganismos infecciosos son liberados en forma de Biopeliculas y también como células planctónicas individuales. Lo que se espera es que las formas planctónicas sean destruidas por los antibióticos circundantes y fagocitos activados. Dado que las células planctónicas son destruidas y la Biopelícula no, a excepción de pequeños fragmentos de los mismos, no desarrolla unidades formadoras de colonias en los cultivos, y por lo tanto, los resultados de los cultivos son negativos. Para presentar un hecho de este escenario, en algunas situaciones, a pesar de presentar cultivos negativos, los pacientes muestran síntomas de infección bacteriana activa. Esto lo podemos ver en el caso de pacientes con Otitis Media con Efusión, donde los resultados de los cultivos son negativos, sin embargo, se ha demostrado que es un proceso bacteriano activo debido a la presencia de Biopeliculas en la mucosa del oído medio (12,13).

De esta manera, las Biopeliculas bacterianas parecen ser relevantes en los procesos infecciosos crónicos. Se ha estimado que le 65% de todas las infecciones bacterianas están asociadas a las Biopeliculas (1).

b) Relación entre las Biopeliculas y la Rinosinusitis Crónica

La **Rinosinusitis crónica** es caracterizada por la supuración persistente de los senos paranasales durando más allá de la fase aguda de infección. Se ha demostrado la severidad de la enfermedad mediante varios sistemas de puntaje, siendo uno de estos, la tabla de puntuación Escanográfica de Lund-Mackay. Sin embargo, aunque hay pacientes con una importante historia sugestiva de Rinosinusitis crónica, la mitad no tiene hallazgos escanográficos o endoscópicos de dicha patología. Por lo tanto, una verificación objetiva de un paciente con sospecha de Rinosinusitis crónica se debe realizar antes de iniciar un tratamiento antibiótico prolongado.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

La Rinosinusitis crónica es un proceso inflamatorio heterogéneo con una etiopatogenia poco comprendida. Muchos pacientes responden a terapia médica, sin embargo, una variedad de pacientes no responden a la misma y requieren de tratamiento quirúrgico, y por otra parte, a pesar de un procedimiento quirúrgico satisfactorio, muchos pacientes presentan persistencia de la sintomatología (15).

En el pasado se ha descrito el papel que juegan las Biopeliculas en la cronicidad del proceso inflamatorio de la mucosa de los senos paranasales (2,3,5–8,14,16–18).

En un estudio realizado en el 2010, se demostró un proceso inflamatorio persistente de la mucosa después de cirugía endoscopia de los senos paranasales asociado a la presencia de Biopeliculas (4). De la misma manera se ha demostrado la presencia de Biopeliculas bacterianas en pacientes con Rinosinusitis Crónica asociada a Poliposis Nasal. Este proceso inflamatorio crónico puede contribuir a causar daños en la mucosa nasal, aumentando el número de células inflamatorias y de esta manera resultando en un proceso hiperplasico.

Numerosos estudios han examinado los patógenos bacterianos asociados con la Rinosinusitis Crónica. Cuando se comparan con las bacterias asociadas a la Rinosinusitis Aguda, se aprecian importantes diferencias con respecto a la Rinosinusitis Crónica. En las Rinosinusitis Aguda se aprecian microorganismos como el *S. pneumoniae, H. influenzae, y la M. catarrhalis,* sin embargo en la Rinosinusitis Crónica se aprecia el *S. aureus,* el estafilococo coagulasa negativo, bacterias anaerobias y gram negativas (15).

La presencia de Biopeliculas está asociada con mayor severidad de la enfermedad en el preoperatorio y una pobre evolución posterior a la Cirugía Endoscópica Funcional en estudios retrospectivos (4) y prospectivos (7). En este estudio prospectivo, el 75% de pacientes que fueron positivos para Biopeliculas requirieron mayores controles, por ende mayor atención medica.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

c) *Métodos Diagnósticos utilizados para la detección de Biopeliculas.*

Una variedad de métodos diagnósticos han demostrado la presencia de Biopeliculas en la mucosa de los senos paranasales de animales, como de humanos. Los métodos que han sido descritos en la literatura son la *Microscopia Electrónica de Barrido y la Microscopia Electrónica de Transmisión* (1,2,8,9,16). Estos métodos nos dan información detallada de la arquitectura, estados del desarrollo y la naturaleza polimicrobiana de las Biopeliculas. Sin embargo, ambas técnicas están limitadas por la difícil fijación de las placas, la presencia de artefactos en el proceso de fijación, la lectura, y también en la dificultad para identificar diferentes especies.

El Microscopio Electrónico emplea electrones generados por un cañón eléctrico para formar imágenes de objetos diminutos, acelerados por un alto voltaje y focalizado por medio de lentes magnéticas.

El Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea ampliar. Una parte de los electrones repercuten o son atraídos por el objeto y otros lo traspasan formando una imagen ampliada de la muestra, la cual puede aumentar en un millón de veces. Las muestras para Microscopia Electrónica de Transmisión deben cortarse en capas finas, no mayores de un par de miles de angstrom.

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) la muestra es metalizada y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Se mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra mediante un detector, siendo capaz de mostrar figuras 3D, proyectados en una imagen de TV en blanco y negro. Su resolución, dependiendo del microscopio, oscila entre 3 y 20 nm. La luz es suplantada por un haz de electrones, los lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie.

La principal fortaleza de la Microscopia Electrónica de Barrido es que permite una alta magnificación, con detalles estructurales microscópicos. La Microscopia Electrónica de Transmisión por otro lado, puede darnos detalles ultra estructurales de las Biopeliculas, como la composición y la interacción de la matriz extracelular con la superficie y las células. La Microscopia Electrónica de Barrido tiene las

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

limitaciones en diferenciar entre moco, trombo o Biopelícula. La Microscopia Electrónica de Transmisión solamente permite una sección en 2 dimensiones del Biopelícula. Ambas tiene la desventaja que se requieren de muestras pequeñas para su análisis, por lo tanto predisponen a sesgos de muestra (2).

Otros métodos, son la Hibridación Fluorescente in situ (FISH) y la Microscopia Confocal Láser de Barrido (MCB). Ambos proporcionan una estructura tri-dimensional de las estructuras de las Biopeliculas e información con respecto a la naturaleza polimicrobiana de los Biopeliculas.

La Microscopia Confocal Láser de Barrido utiliza la luz de un láser monocromático la cual excita en la muestra lo que se llama *fluorescencia*. El contraste sólo muestra la *fluorescencia* y el fondo permanecerá completamente oscuro. Cualquier parte de la muestra que esté fuera de foco, será invisible. Por lo tanto, el enfoque en toda foto obtenida por este microscopía será perfecto. Aunque en Microscopia Confocal Láser de Barrido cada imagen simboliza un sólo plano de un espécimen que, en realidad, es tridimensional, si se retratan de forma sucesiva los distintos planos que integran la muestra, el microscopio puede hacer una reconstrucción completa del espécimen que lo muestre en sus tres dimensiones. Esta reconstrucción tridimensional podrá incluso ser rotada para estudiar la muestra desde un ángulo distinto a aquel desde el cual se retrató.

Únicamente el método FISH, puede identificar por lo menos UNA de las especias bacterianas presentes en las Biopeliculas, en un estudio en pacientes con Rinosinusitis Crónica donde se aislaron Biopeliculas, se demostró que contenía *Pseudomonas aeruginosa* (2).

La ventaja de la Microscopia Confocal Láser de Barrido (MCLB) con respecto a la Microscopia Electrónica, es que la MCLB posiblemente permite visualizar el espécimen sin necesidad de fijación o deshidratación de la muestra, por lo tanto minimizando las posibles alteraciones en la arquitectura de las Biopeliculas (8).

Estos estudios nos permiten detectar la presencia o ausencia de los Biopeliculas. No nos permiten detectar que tipo de bacteria predomina en la Biopelícula, a excepción del método de Hibridación

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Fluorescente in situ (FISH). Por lo tanto estos estudios en cierta medida no nos proporcionan beneficios con otros métodos convencionales.

Recientemente se ha descrito en la literatura la detección de Biopeliculas por medio de microscopia de luz con coloraciones convencionales como la Hematoxilina Eosina (1) y Giemsa en conjunto con el Acido Peryodico de Schiff (11). La Hematoxilina es un colorante natural, fue usada por primera vez en 1863. La tinción de **Hematoxilina**, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos Azul y Púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de **Eosina** que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color Rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Existen 2 métodos usados en los laboratorios de histopatología del *Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas* AFIP (Armed Forces Institute of Pathology). El método de Harris es un método usualmente utilizado en tejidos ortopédicos. El método de Mayer, es un procedimiento progresivo que solamente tiñe los núcleos. La intensificación del color azul se logra lavando las láminas bajo un chorro de agua corriente.

El Acido Peryódico de Schiff es una técnica colorimétrica que se utiliza en los preparados para microscopia óptica, permite la tinción de componentes celulares que contienen hidratos de carbono, por ejemplo algunas membranas celulares, células caliciformes en la mucosa del intestino, fibras reticulares que están rodeados por hidratos de carbono. El APS tiñe los proteoglicanos y polisacáridos. Las Biopeliculas son localizadas por una coloración azul-violácea de los Exopolisacáridos de la matriz de la Biopelícula.

La tinción de Giemsa es un método habitual para el examen de frotis sanguíneos, cortes histológicos y otro tipo de muestras biológicas. La coloración de Giemsa se emplea también para teñir frotis de sangre en el examen para protozoos. Sin embargo, este método de tinción permite también la tinción diferencial de zonas con un alto contenido de ADN, y concretamente de uniones A-T. Esto permite distinguir perfectamente en microscopio óptico el núcleo celular, los cromosomas durante la mitosis, y en algunos casos, incluso el ADN mitocondrial.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

13. Metodología

a) *Tipo y diseño general del estudio*

Estudio de concordancia diagnóstica.

b) *Población de referencia y muestra.*

Población Objetivo o Universo: Pacientes con diagnóstico clínico y paraclínico de Rinosinusitis Crónica, que no hayan respondido médico en los últimos 6 meses **previo a su vinculación en el estudio** en el Hospital Universitario de la Samaritana en el año 2011.

Población Accesible: Pacientes adultos (mayores de 18 y menores de 70 años) que asistan a consulta Otorrinolaringológica en el Hospital Universitario de la Samaritana entre Enero y Diciembre de el año 2011.

Población del estudio: Pacientes que cumplan con los criterios de inclusión y que carezcan de los criterios de exclusión.

c) *Criterios de Inclusión:*

- Paciente mayor de 18 años y menor de 70 años.
- Paciente con diagnóstico de Sinusitis Crónica según los parámetros de la Academia Americana de Otorrinolaringología y la Asociación Colombiana de Otorrinolaringología, que no hayan respondido al tratamiento médico convencional según los protocolos establecidos por la Asociación Colombiana de Otorrinolaringología en los últimos 6 meses, caracterizado por la persistencia de la sintomatología referida por el paciente.
- Rinorrea purulenta por el meato medio o escurrimiento posterior purulento detectada mediante endoscopia nasal o nasofibrolaringoscopia, asociado a síntomas de Rinosinusitis por más de 12 semanas, que no hayan respondido al tratamiento médico convencional según los protocolos establecidos por la Asociacion Colombiana de Otorrinolaringologia en los últimos 6 meses, caracterizado por la persistencia de la sintomatología referida por el paciente.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

- Hallazgos Escanográficos compatibles con Rinosinusitis, con sintomatología asociada por más de 12 semanas, que no hayan respondido al tratamiento médico convencional según los protocolos establecidos por la Asociación Colombiana de Otorrinolaringología en los últimos 6 meses, caracterizado por la persistencia de la sintomatología referida por el paciente.
- Pacientes que acepten y firmen el consentimiento informado.

d) Criterios de Exclusión:

- Paciente con diagnóstico de Rinosinusitis que esté recibiendo tratamiento antibiótico en el último mes.
- Paciente inmunosuprimido, diabético, con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), diagnostico positivo para el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) o algún tipo de terapia inmunosupresora.
- Mujeres embarazadas.

e) Muestra:

Para la concordancia observada (94.1% y 100%) y la obtenida con el coeficiente de Kappa (Kappa=1), para un tamaño de muestra de 34, la confiabilidad fue del 95% y un error tipo II o beta fue mayor del 30%.

f) Definiciones operacionales de las variables

Para las muestras de mucosa teñidas con Hematoxilina-Eosina, Giemsa, Gram y PAS, y visualizadas mediante **Microscopia de Luz** se registraron los valores de la siguiente manera:

Presencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Nominal Dicotómica. Presencia de cuerpos celulares bacterianos inmersos en una capa que cubre la superficie epitelial de la mucosa. Escala operacional 1.

Ausencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Nominal Dicotómica. Ausencia de cuerpos celulares bacterianos inmersos en una capa que cubre la superficie epitelial de la mucosa. Escala operacional 0.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Variable	Escala Operacional	Escala de Medición	Tipo de Variable
Presencia de Biopelícula	0 o 1	Cualitativa Nominal Dicotómica	Cualitativa

Presencia Extensiva de Biopelícula: Variable Cualitativa Ordinal Politómica. Se realizo la medida de la lámina propia y el epitelio columnar pseudoestratificado (mucosa respiratoria) y se clasifico como compromiso extensivo cuando hay compromiso de la mucosa *superior* al 50%. Escala operacional 2.

Presencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Ordinal Politómica. Se realizo la medida de la lámina propia y el epitelio columnar pseudoestratificado (mucosa respiratoria) y se clasifico como presente cuando hay compromiso de la mucosa *menor* del 50%. Escala operacional 1.

Ausencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Ordinal Politómica. Cuando no se evidenció compromiso de la mucosa. Escala operacional 0.

Variable	Escala Operacional	Escala de Medición	Tipo de Variable
Nivel de Presencia de Biopelícula	0, 1 o 2	Cualitativa Ordinal Politómica	Cualitativa

Para las muestras de mucosa valoradas mediante **Microscopía Electrónica de Transmisión** se registraron los valores de la siguiente manera:

Presencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Nominal Dicotómica. Presencia en la superficie de la mucosa de un conglomerado de bacterias en una capa de mucosa amorfa. Escala operacional 1.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Ausencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Nominal Dicotómica. Mucosa de superficie lisa con formas bacterianas aisladas y esporádicas. Escala operacional 0.

Variable	Escala Operacional	Escala de Medición	Tipo de variable
Presencia de Biopelícula	1 o 0	Cualitativa nominal Dicotómica	Cualitativa

Se realizo una exploración completa de la placa de histología a diferentes aumentos y se registraron los resultados de la siguiente manera.

Presencia Extensiva de Biopelícula: Variable Cualitativa Ordinal Politómica. Presencia en la superficie de la mucosa de un conglomerado de bacterias en una capa de mucosa amorfa, con compromiso superior al 50% de la mucosa. Escala operacional 2.

Presencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Ordinal Politómica. Presencia en la superficie de la mucosa de un conglomerado de bacterias en una capa de mucosa amorfa, con compromiso menor al 50% de la mucosa. Escala operacional 1.

Ausencia de Biopelícula: Variable Cualitativa Ordinal Politómica. Mucosa de superficie lisa con formas bacterianas aisladas y esporádicas, o ausencia de un conglomerado de bacterias en una capa de mucosa amorfa en cualquier cuadrante. Escala operacional 0.

Variable	Escala Operacional	Escala de Medición	Tipo de Variable
Nivel de Presencia de Biopelícula	0, 1 o 2	Cualitativa Ordinal Politomica	Cualitativa

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

g) ***Técnica de Recolección de la Información.***

Se identificaron los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión y sin criterios de exclusión, se diligenció un formulario con datos del paciente y se le asignó a cada paciente un valor numérico para su identificación.

1. Para la recolección de la información se identificaron los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión y no presentaran los criterios de exclusión, se revisaron las clasificaciones previamente descritas y se realizó elaboro un instrumento con las variables a medir y con las clasificaciones ya descritas en la literatura.
2. Se le asignó un valor numérico a cada paciente con el fin de que el patólogo quedara ciego ante cada muestra.
3. Se tomaron las variables observadas por dos patólogos en dos tiempos diferentes.
4. Una vez obtenidos los resultados, se generó una base de datos en Excel de Microsoft Office para la tabulación de los mismos.
5. Se registraron los resultados de todas las muestras en el paquete SPSS versión 15.0.
6. Una vez obtenidos los resultados se evaluaron las variables por el índice de concordancia Kappa.

h) ***Materiales y Métodos***

1. Se incluyeron pacientes que cumplieron con criterios de Rinosinusitis crónica de acuerdo a la Academia Americana de Otorrinolaringología y la Asociación Colombiana de Otorrinolaringología, que no hayan respondido al tratamiento médico convencional según los protocolos establecidos por la Asociación Colombiana de Otorrinolaringología antes de ser llevados a cirugía. Se excluyeron pacientes menores de 18 años, mayores de 70 años, pacientes con algún tipo de enfermedad autoinmune, inmunosupresión, que sufrieran de trastornos de la movilidad ciliar y que estuvieran recibiendo tratamiento antibiótico 1 mes previo a su cirugía.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

2. Se identificación el paciente con nombre y número de historia clínica, se anotaron sus datos demográficos, antecedentes médicos, sintomatología referida y hallazgos escanográficos de acuerdo al puntaje radiológico de Lund Mackay 0-4 ausente, de 5-9 leve, de 10-14 moderado, +15 severo (ver anexos).
3. El procedimiento se realizo en salas de cirugía con el paciente bajo anestesia general.
4. Todas las muestras se tomaron con pinza de Etomides de la mucosa macroscópicamente afectada del seno maxilar sin realizar manipulación previa con succión o lavado de la mucosa. Se practicó separación y marcación de la muestra
5. División de la muestra en dos partes.

1) Muestra número 1.
2) Muestra número 2.

6. Marcación de la mucosa de cada muestra tomada con Vicryl 5-0.

7. Protocolo para las coloraciones Hematoxilina – Eosina, Gram, Acido Peryodico de Schiff y Giemsa para la muestra número 1.

Coloración con Hematoxilina – Eosina.

1) Fijación con *Formol Bufferado.*

i. Los tejidos fueron fijados con Formol Bufferado al 10% los cuales pueden permanecer hasta 24 horas. La relación volumen de muestras/ volumen de formol recomendada es 1/ 10.

2) Inclusión en parafina.
3) Cortes con Micrótomo a 3 micras de tamaño.
4) Desparafinización en 3 baños de Xilol.
5) Deshidratación en 2 baños con alcohol al 95%.
6) Tinción con Hematoxilina-Eosina por 2 minutos.
7) Lavado con agua destilada.
8) Tornalizar con acido hidroclórico al 0.1% en etanol al 50%.
9) Lavado con agua destilada.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

10) Pases con acido clorhídrico.
11) Lavado con agua destilada.
12) Tinción con Eosina por 1 minuto.
13) Lavado con agua destilada.
14) Deshidratación con etanol al 95 y 100%
15) Aclaramiento de las muestras.
16) Montaje de la muestra sobre la lámina con laminilla sobre la misma, para su lectura.

Coloración Gram.

1) Fijación *Formol Bufferado.*

   Los tejidos fueron fijados con Formol Bufferado al 10% los cuales pueden permanecer hasta 24 horas. La relación volumen de muestras/ volumen de formol recomendada es 1/ 10.
2) Inclusión en parafina
3) Cortes con Micrótomo a 3 micras de tamaño.
4) Desparafinización en 3 baños de Xilol.
5) Deshidratación en 2 baños de alcohol al 95%.
6) Lavado con agua destilada
7) Solución de cristal violeta por 1 minuto.
8) Lavado con agua destilada.
9) Solución yodo de Gram x 1 minuto.
10) Lavado en agua destilada.
11) Solución alcohol acetona por 1 minuto.
12) Solución amarillo de metilo a acido pícrico por 2 minutos hasta obtener color amarillo.
13) Secado al medio ambiente.
14) Pasar por 3 baños de Xilol.
15) Aclarar y Montar sobre la lámina, con laminilla sobre la misma para su lectura.

Acido Peryódico de Schiff.

1) Fijación *Formol Bufferado*

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Los tejidos fueron fijados con Formol Bufferado al 10% los cuales pueden permanecer hasta 24 horas. La relación volumen de muestras/ volumen de formol recomendada es 1/ 10.

2) Inclusión en parafina
3) Cortes con Micrótomo a 3 micras de tamaño.
4) Desparafinización en 3 baños de Xilol.
5) Oxidación en solución acido peryódico durante 5 minutos.
6) Lavado con agua destilada.
7) Adición reactivo de Schiff de Coleman durante 15 minutos
8) Lavado con agua destilada.
9) Contraste con solución de hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
10) Lavado con agua destilada.
11) Deshidratación y aclaramiento con alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xileno, 2 cambios de 2 minutos cada uno.
12) Montaje sobre lámina y laminilla para su lectura.

Giemsa.

1) Fijación con *Formol Bufferado*.

Los tejidos fueron fijados con Formol Bufferado al 10% los cuales pueden permanecer hasta 24 horas. La relación volumen de muestras/ volumen de formol recomendada es 1/ 10.

2) Inclusión en parafina
3) Cortes con Micrótomo a 3 micras de tamaño.
4) Desparafinización en 3 baños de Xilol.
5) Lavado con agua destilada
6) Administración solución de trabajo de Giemsa por 10 minutos.
7) Deshidratación con alcohol absoluto por 3 cambios.
8) Aclaramiento con Xilol por 3 cambios
9) Montaje sobre lámina y laminilla para su lectura.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

1. Visualización de la Muestra No.1 con Microscopía óptica de luz marca Olympus ® a aumento de 10 a 100 x.
2. Estudio de la muestra de mucosa nasal de acuerdo al protocolo descrito.

   Protocolo para procesamiento de muestras para Microscopia Óptica de Alta Resolución y Microscopia Electrónica de Transmisión para la muestra numero 2.

1) Fijación en Glutaraldheido (GLH) al 2.5% en vial plástico de 1.5 mm con 10 veces el volumen que ocupa la muestra y refrigeración a 4°C por 4 hrs.
2) Lavado en agua destilada.
3) Post-Fijación con Tetroxido de Osmio al 1% durante 2 horas y protegido de la luz.
4) Lavado en agua destilada.
5) Contraste pre-inhibición con acetato de uranilo al 3%.
6) Deshidratación con alcohol al 50%, 70%, 90%, 100%
7) Inmersión con Mezcla 1:1 etanol absoluto: acetona 15 min.
8) Inhibición con Mezcla 1:1 etanol absoluto: acetona 15 min, Resina pura: 1 a 2 horas.
9) Inclusión en resina pura fresca.
10) Rotulación de los bloques con papel blanco y lápiz, corte- ubicación dentro de cada pozo para bloque.
11) Paso de las muestras del vial plástico al pozo correspondiente ayudándose de un palito, pasándolo por papel absorbente para retirar las sobras de resina.
12) Ubicación de la muestra en la parte superior del pozo, haciendo que quede la mayor superficie en la cara de corte del bloque.
13) Polimerización del molde en el horno, previamente calentado, a 70 ºC, de 16 a 24 horas.
14) Retiro del molde del horno y enfriamiento a temperatura ambiente por 10 min.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

15) Cortes con Ultra micrótomo manual marca Sorval®, semifinos a 1 micra de grosor y se tinción con azul de toluidina.

16) Corte Ultrafino de 100-200 nanómetros de grosor, se montan en rejillas de cobre y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo. Visualización de la Muestra No.2 con Microscopia óptica de alta resolución, corte semifino de material incluido en plástico (1 micra de grosos aprox.) de 10-100X.

17) Visualización de la Muestra No.2 con microscopio electrónico de transmisión marca HITACHI HU-12® con aumento de 1000 hasta 100.000x.

18) Determinación de la presencia Biopelícula de acuerdo a las variables descritas:

Ausencia de Biopelícula	0	Ausencia cuerpos celulares bacterianos inmersos en una capa que cubre la superficie epitelial de la mucosa
Presencia de Biopelícula	1	Presencia cuerpos celulares bacterianos inmersos en una capa que cubre la superficie epitelial de la mucosa

19) Determinación del compromiso de la mucosa. Se realizó la medida de la lámina propia y el epitelio columnar pseudoestratificado, esto corresponde a la mucosa. Se determino el compromiso de la mucosa de la siguiente manera:

Presencia Extensiva de Biopelícula	2	Compromiso de la mucosa superior al 50%,
Presencia de Biopelícula	1	Compromiso de la mucosa menor al 50%,
Ausencia de Biopelícula	0	Sin compromiso de la mucosa.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

14. Procedimiento para garantizar aspectos éticos en las investigaciones con sujetos humanos y animales

El protocolo de este trabajo fue evaluado y aprobado por el comité de investigación y el técnico científico del Hospital Universitario de la Samaritana y el comité de Científico de la Fundación Santa fe de Bogotá. Se ajusto completamente a los parámetros de la declaración de Helsinki y la **resolución no. 008430 de 1993 del ministerio de salud que regula en Colombia este tipo de investigaciones,** las cuales se incluye a continuación:

I. PRINCIPIOS BASICOS DECLARACION DEL HELSINKI

1. La investigación biomédica en seres humanos debe atenerse a principios científicos generalmente aceptados y debe basarse tanto en experimentos de laboratorio y con animales, realizados en forma adecuada, como en un conocimiento profundo de la literatura científica pertinente.

2. El diseño y la ejecución de cada procedimiento experimental en seres humanos deben formularse claramente en un protocolo experimental que debe enviarse a un comité independiente debidamente designado para su consideración, observaciones y consejos. Dicho comité debe ajustarse a las leyes y regulaciones del país en que se lleva a cabo la investigación.

3. La investigación biomédica en seres humanos debe ser realizada sólo por personas científicamente calificadas y bajo la supervisión de un profesional médico competente en los aspectos clínicos. La responsabilidad por el ser humano debe siempre recaer sobre una persona médicamente calificada, nunca sobre el individuo sujeto a la investigación, aunque él haya otorgado su consentimiento.

4. La investigación biomédica en seres humanos no puede realizarse legítimamente a menos que la importancia del objetivo guarde proporción con el riesgo inherente para la persona que toma parte en ella.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

5. Todo proyecto de investigación biomédica en seres humanos debe ir precedido de una minuciosa evaluación de los riesgos predecibles en comparación con los beneficios previsibles para el participante o para otros. La preocupación por el interés del individuo debe siempre prevalecer sobre los intereses de la ciencia y de la sociedad.

6. Siempre debe respetarse el derecho del participante en la investigación a proteger su integridad. Deben tomarse todas las precauciones del caso para respetar la vida privada del participante y para reducir al mínimo el impacto del estudio en la integridad física y mental del participante y en su personalidad.

7. Los médicos deben abstenerse de emprender proyectos de investigación en seres humanos a menos que tengan la certeza de que los peligros que entrañan se consideran previsibles. Los médicos deben interrumpir toda investigación si se determina que los peligros sobrepasan los posibles beneficios.

8. Al publicar los resultados de su investigación, el médico está obligado a mantener la exactitud de los resultados. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

9. En toda investigación en seres humanos, se debe dar a cada posible participante suficiente información sobre los objetivos, métodos, beneficios previstos y posibles peligros del estudio y las molestias que puede acarrear. Se le debe informar que es libre de abstenerse de participar en el estudio y que es libre de revocar en cualquier momento el consentimiento que ha otorgado para participar.

10. Al obtener el consentimiento informado para el proyecto de investigación, el médico debe ser especialmente cuidadoso para darse cuenta si en el participante se ha formado una condición de dependencia con él o si consiente bajo coacción. En ese caso el consentimiento informado debe obtenerlo un médico que no tome parte en la investigación y que tenga completa independencia de esa relación oficial.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

11. En el caso de incapacidad legal, el consentimiento informado debe obtenerse del tutor legal de conformidad con la legislación nacional. Cuando la incapacidad física o mental hace imposible obtener un consentimiento informado, o cuando el participante es menor de edad, un permiso otorgado por un pariente responsable reemplaza al del participante de conformidad con la legislación nacional.

12. Cuando el menor de edad está de hecho capacitado para otorgar su consentimiento, debe obtenerse además del consentimiento por parte del menor, el consentimiento otorgado por su tutor legal.

13. El protocolo de investigación debe siempre contener una declaración de las consideraciones éticas que van aparejadas y debe indicar que se cumple con los principios enunciados en la presente Declaración.

INVESTIGACION BIOMEDICA NO TERAPEUTICA EN SERES HUMANOS (Investigación biomédica no clínica)

1. En la aplicación puramente científica de la investigación médica realizada en un ser humano, es el deber del médico ser el protector de la vida y de la salud de esa persona en la cual se lleva a cabo la investigación biomédica.

2. Los participantes deben ser voluntarios, ya sea personas sanas o pacientes cuyas enfermedades no se relacionen con el diseño experimental.

3. El investigador o el equipo investigador debe interrumpir la investigación si a su juicio continuar realizándola puede ser perjudicial para la persona.

4. En la investigación en seres humanos, el interés de la ciencia y de la sociedad nunca debe tener prioridad sobre las consideraciones relacionadas con el bienestar de la persona.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

15. **Consideraciones Éticas**

Teniendo en cuenta eventos que involucran investigación en el campo de la medicina y específicamente en este caso que involucra seres humanos, para realizar cualquier investigación, es substancial tener en cuenta los parámetros preestablecidos para así, no atentar contra la integridad de los individuos como es este caso.

Es fundamental tener en cuenta los cuatro principios que plantea la bioética cuyo objetivo principal es preservar la dignidad de los individuos.

AUTONOMIA: La decisión de participar en investigación, esta únicamente en manos del paciente. Esta decisión se respeta por medio de un consentimiento informado.

NO MALEFICIENCIA: Hace referencia a que ningún proyecto de investigación, sin importar el fin, le hará daño al individuo sometido al estudio.

JUSTICIA: La información que se le suministre al participante debe ser completa, sin obviarse ningún detalle. El esfuerzo debe ser el máximo para que el paciente entienda toda la información suministrada.

BENEFICIENCIA: Todos los resultados obtenidos deben en un grado beneficiar a los participantes de la investigación a cualquier plazo e incluso estos deben poder beneficiar a otras poblaciones a posteriori.

Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia

ARTICULO 1. Las disposiciones de estas normas científicas tienen por objeto establecer los requisitos para el desarrollo de la actividad investigativa en salud.

ARTICULO 2. Las instituciones que vayan a realizar investigación en humanos, deberán tener un Comité de Ética en Investigación, encargado de resolver todos los asuntos relacionados con el tema.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

ARTICULO 3. Las instituciones, a que se refiere el artículo anterior, en razón a sus reglamentos y políticas internas, elaborarán su manual interno de procedimientos con el objeto de apoyar la aplicación de estas normas

ARTICULO 4. La investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan:

a) Al conocimiento de los procesos biológicos y sicológicos en los seres humanos.
b) A la prevención y control de los problemas de salud.
c) Al conocimiento y evaluación de los efectos nocivos del ambiente en la salud.
d) Al estudio de las técnicas y métodos que se recomienden o empleen para la prestación de servicios de salud.
e) A la producción de insumos para la salud.

DE LOS ASPECTOS ETICOS DE LA INVESTIGACION EN SERES HUMANOS

ARTICULO 5. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y su bienestar.

ARTICULO 6. La investigación que se realice en seres humanos se deberá desarrollar conforme a los siguientes criterios:

a) Se ajustará a los principios científicos y éticos que la justifiquen.
b) Contará con el Consentimiento Informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal con las excepciones dispuestas en la presente resolución.
c) Deberá ser realizada por profesionales con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano bajo la responsabilidad de una entidad de salud, supervisada por las autoridades de salud, siempre y cuando cuenten con los recursos humanos y materiales necesarios que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.
d) Se llevará a cabo cuando se obtenga la autorización: del representante legal de la institución investigadora y de la institución donde se realice la investigación; el Consentimiento Informado de los

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

participantes; y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética en Investigación de la institución.

ARTICULO 8. En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo, sujeto de investigación, identificándolo solo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

ARTICULO 9. Se considera como riesgo de la investigación la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio.

ARTICULO 10. El grupo de investigadores o el investigador principal deberán identificar el tipo o tipos de riesgo a que estarán expuestos los sujetos de investigación.

ARTICULO 14. Se entiende por Consentimiento Informado el acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

ARTICULO 15. El Consentimiento Informado deberá presentar la siguiente, información, la cual será explicada , en forma completa y clara al sujeto de investigación o, en su defecto, a su representante legal, en tal forma que puedan comprenderla.

a) La justificación y los objetivos de la investigación.
b) Los procedimientos que vayan a usarse y su propósito incluyendo la identificación de aquellos que son experimentales.
c) Las molestias o los riesgos esperados.
d) Los beneficios que puedan obtenerse.
e) Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
f) La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

ARTICULO 16. El Consentimiento Informado, del sujeto pasivo de la investigación, para que sea válido, deberá cumplir con los siguientes requisitos:

a) Será elaborado por el investigador principal, con la información señalada en el artículo 15 de ésta resolución.
b) Será revisado por el Comité de Ética en Investigación de la institución donde se realizará la investigación.
c) Indicará los nombres y direcciones de dos testigos y la relación que éstos tengan con el sujeto de investigación.
d) Deberá ser firmado por dos testigos y por el sujeto de investigación o su representante legal, en su defecto. Si el sujeto de investigación no supiere firmar imprimirá su huella digital y a su nombre firmará otra persona que él designe.
e) Se elaborará en duplicado quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o su representante legal.

PARAGRAFO PRIMERO. En el caso de investigaciones con riesgo mínimo, el Comité de Ética en Investigación de la institución investigadora, por razones justificadas, podrá autorizar que el Consentimiento Informado se obtenga sin formularse por escrito y tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador de la obtención del mismo.

PARAGRAFO SEGUNDO. Si existiera algún tipo de dependencia, ascendencia o subordinación del sujeto de investigación hacia el investigador que le impida otorgar libremente su consentimiento, éste deberá ser obtenido por otro miembro del equipo de investigación, o de la institución donde se realizará la investigación, completamente independiente de la relación investigador-sujeto.

PARAGRAFO TERCERO. Cuando sea necesario determinar la capacidad mental de un individuo para otorgar su consentimiento, el investigador principal deberá acudir a un neurólogo, siquiatra o sicólogo para que evalúe la capacidad de entendimiento, razonamiento y lógica del sujeto, de acuerdo con los parámetros aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la institución investigadora.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

PARAGRAFO CUARTO. Cuando se presuma que la capacidad mental de un sujeto hubiere variado en el tiempo, el Consentimiento Informado de éste o, en su defecto, de su representante legal, deberá ser avalado por un profesional (neurólogo, siquiatra, sicólogo) de reconocida capacidad científica y moral en el campo específico, así como de un observador que no tenga relación con la investigación, para asegurar la idoneidad del mecanismo de obtención del consentimiento, así como su validez durante el curso de la investigación.

PARAGRAFO QUINTO. Cuando el sujeto de investigación sea un enfermo psiquiátrico internado en una institución, además de cumplir con lo señalado en los artículos anteriores, será necesario obtener la aprobación

Clasificación del riesgo

El presente trabajo es una investigación con riesgo mínimo.

16. Análisis y control de Sesgos

En este estudio se contempla la posibilidad de presentar los siguientes sesgos y errores, motivo por el cual la siguiente tabla mostrará la estrategia empleada para control de sesgos.

Error o Sesgo Identificado	Descripción	Control del error o sesgo
Error de inferencia.	Mala interpretación de las conclusiones.	Correlacionar los resultados inter e intraobservador de las coloraciones histológicas y de la microscopia electrónica aplicando el test de Kappa.
Error de medición.	Cuando la forma de medida no está estandarizada	Se realizará una medición desde la lamina propia y el epitelio columnar pseudoestratificado y se clasificará el compromiso de la mucosa como presencia

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

		extensiva (>50%), presencia (50%) y ausencia para la microscopía de luz. Esta clasificación es basada en otro trabajo de investigación con publicación en la literatura mundial. (1)
Sesgo de información.	Derivado de diferencia de procedimientos parcializados mas a un grupo que a otro, que afecta así la validez y la inferencia de los resultados de un estudio.	Se establecerá el mismo tiempo para el estudio de las muestras tanto para la microscopia de luz con las coloraciones histológicas descritas como para la microscopia electrónica de transmisión.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

17. Métodos Estadísticos y Plan de Análisis.

En la descripción de las variables cualitativas se utilizaron distribuciones de frecuencias absolutas y relativas expresadas en porcentaje y en las variables cuantitativas medidas de tendencia central, el promedio y mediana y de dispersión, el rango y desviación estándar. Se midió la concordancia absoluta para positivos y negativos entre la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y las coloraciones histológicas Hematoxilina-Eosina, Gram, Giemsa y PAS observadas mediante microscopia de luz por medio de porcentaje. Se evaluó la concordancia entre la MET y las coloraciones histológicas, con el coeficiente de Kappa no ponderado (0 y 1) y su significancia a un nivel del 5% ($p<0.05$).

18. Resultados

Características demográficas

El grupo de estudio lo conformaron 21 pacientes con diagnóstico de Rinosinusitis crónica, con una media de edad de 38.09 años y una distribución por género de 10 hombres y 11 mujeres. El total de muestra de los pacientes fue de 34.

Características fenotípicas y clínicas

Tabla 1 ***Presencia de poliposis nasal asociada a la rinosinusitis crónica.***

Poliposis Nasal Asociada	No.	%
Presente	11	53%
Ausente	10	47%

Los antecedentes patológicos más frecuentes fueron rinitis alérgica y sinusitis crónica previamente tratada (Tabla 2), el antibiótico con mayor frecuencia fue la amoxicilina, los otros fueron menores del 10% (Tabla 3).

Tabla 2 ***Antecedentes patológicos de los pacientes incluidos en la muestra.***

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Antecedente	No.	%
Rinitis Alérgica	4	19.04
Sinusitis Crónica previamente tratada	4	19.04
Asma	3	14.28
Trauma Nasal	3	14.28
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)	1	4.7
Antecedentes Negativos	6	42.94

Tabla 3 ***Tratamiento antibiótico previo recibido por los pacientes.***

Antibiótico	No	%
Amoxicilina	15	71.43
Amoxicilina/Acido Clavulanico	2	9.52
Ampicilina/Sulbactam	1	4.72
Cefalexina	1	4.72
No recuerdan nombre del antibiótico	2	9.52

Habían dos pacientes con antecedente de Cirugía Endoscópica Funcional (CEF) previa, uno con antecedente de CEF y septoturbinoplastia y un paciente con antecedente de exodoncia. Siete pacientes

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

recibían Loratadina y siete habían usado Beclometasona inhalado en el pasado. Había cinco pacientes fumadores y dos pacientes con exposición al humo de leña.

Con respecto a la sintomatología preoperatoria, la media de los criterios mayores fue de 3.9/6 y la media de los criterios menores fue de 1.28/6. La media del puntaje radiológico de Lund-Mackay era de 13.38/24, el cual fue como moderado. Este puntaje se obtuvo determinando la ocupación de los senos paranasales del lado izquierdo y derecho (seno frontal, etmoidal anterior, etmoidal posterior y seno maxilar) y la ocupación del complejo ostiomeatal.

Tabla 4 ***Instrumento para determinar el puntaje radiológico de Lund-Mackay .***

Clasificación de Lund-Mackay		
Senos Paranasales	**Derecho**	**Izquierdo**
Maxilar 0, 1, 2		
Etmoidal Anterior 0, 1, 2		
Etmoidal Posterior 0, 1, 2		
Esfenoides 0, 1, 2		
Frontal 0, 1, 2		
Complejo Ostiomeatal 0*, 2*		
Total de Puntos		

Nota. 0 Sin Anormalidades, 1 Opacificación parcial, 2 Opacificación total, Complejo Ostiomeatal 0* No Ocluido, 2* Ocluido

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Se tomaron un total de 34 muestras. Todas las muestras fueron tomadas del seno maxilar. La tabla número 5 muestra el número de muestras tomadas por paciente.

Tabla 5 ***Número de muestras tomadas por paciente.***

No. Pacientes	No. Muestras
11	2
9	1
1	3

Hallazgos de Biopeliculas en Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

La MET identifico epitelio respiratorio con capas de moco organizado y detritus celulares. En algunas muestras se evidenciaron capas de cómo con bacterias aisladas, pero no organizadas en capas. Se evidenciaron abundantes células inflamatorias en la submucosa como Plasmocitos, Neutrófilo y Linfocitos en las muestras estudiadas (Figura Numero 1).

Ilustración 1 ***MET mucosa nasal de paciente con rinosinusitis crónica.***

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

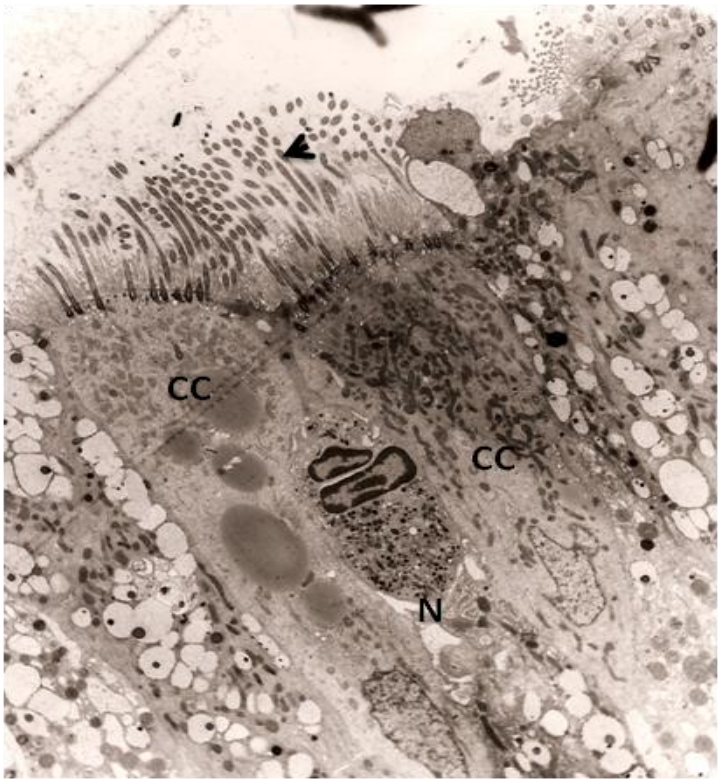


Ilustración 1. MET de una de nuestras muestras donde se muestran 2 células ciliadas (CC), con sus cilios intactos (cabeza de flecha) y un Neutrófilo (N) migrando entre ellas hacia la luz del epitelio.

Un caso fue probable para Biopelícula el cual se caracterizo por la presencia de epitelio completo con células ciliadas, presencia de una abundante capa de moco con células inflamatorias y bacterias aisladas, que no forman capas (Figura 2).

Ilustración 2 ***MET de paciente con probable biopelícula.***

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

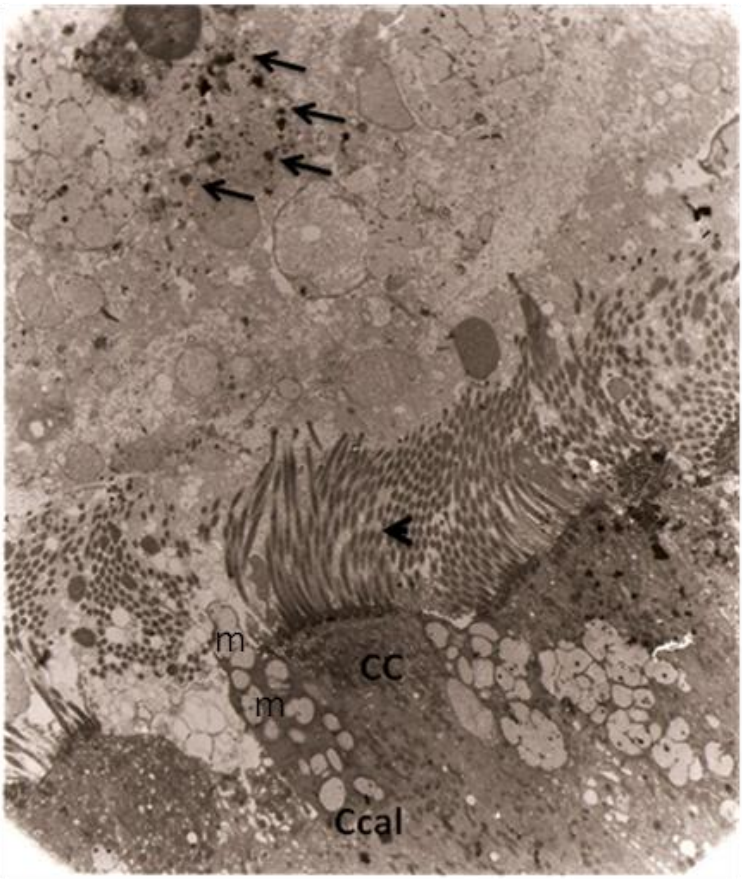


Ilustración 2. MET de uno de nuestros pacientes donde se observan las células ciliadas (CC) con sus cilios intactos (cabeza de flecha). También se observa una célula caliciforme (Ccal) con la presencia de mucina (m). Sobre los cilios, se observa una gran capa de moco con algunas bacterias (flechas) que no forman capas.

Hallazgos de Biopeliculas en microscopia de luz.

Los exámenes histopatológicos muestran películas nítidamente visibles con las coloraciones de Hematoxilina- Eosina (H-E). Las coloración más importantes para el examen de las películas de moco y la determinación de si eran o no Biopelículas, fue la Hematoxilina-Eosina (Figura 3).

Ilustración 3. ***Mucosa nasal teñida con H-E.***

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

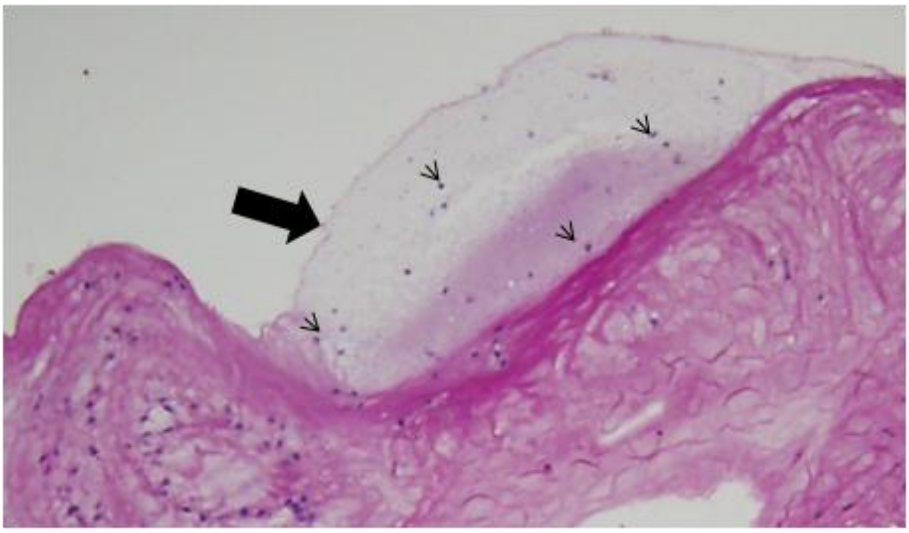
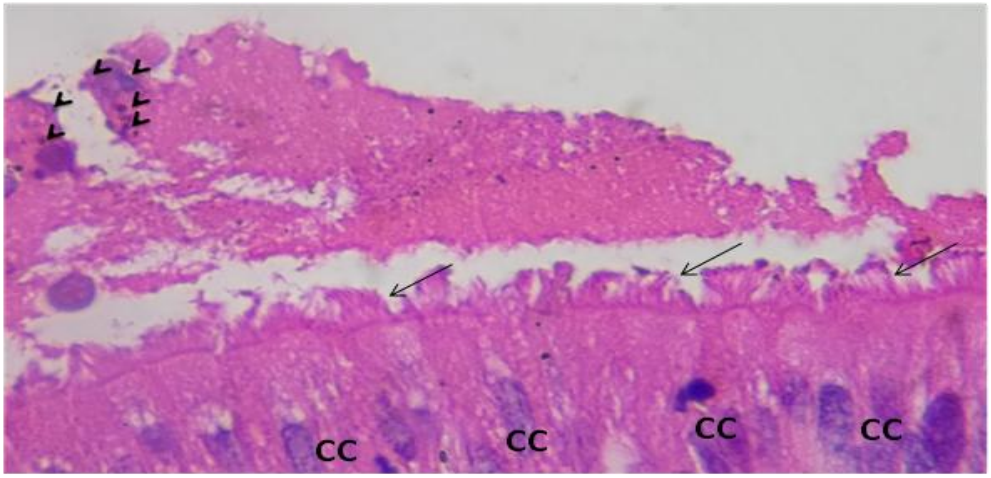


Ilustración 3. Se observa una gran película de moco (flecha negra) con algunas bacterias (cabezas de flecha) aisladas dentro de esta película de moco.

Uno de los caso fue probable para Biopelícula el cual se caracterizo por la presencia de una capa de moco sobre el epitelio respiratorio, con una moderada cantidad de bacterias de forma aislada (figura número 4). Este epitelio presentaba una importante reacción inflamatoria caracterizada por la presencia de abundantes plasmocitos.

Ilustración 4. *Caso probable para biopelícula.*



Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Ilustración 4. Tinción con H-E donde se evidencian las células ciliadas (CC), con sus cilios conservados (flechas). Sobre ellas una película de moco con abundantes bacterias acumuladas (cabeza de flecha).

Con la coloración Gram las Biopeliculas no son visibles. La coloración de Gram es muy específica para bacterias, y es imposible determinar las características del tejido, las cuales se observan mejor con Hematoxilina Eosina. Se observaron en algunos pacientes una gran cantidad de bacterias dentro del epitelio (figura número 5).

Ilustración 5. ***Tinción de gram.***

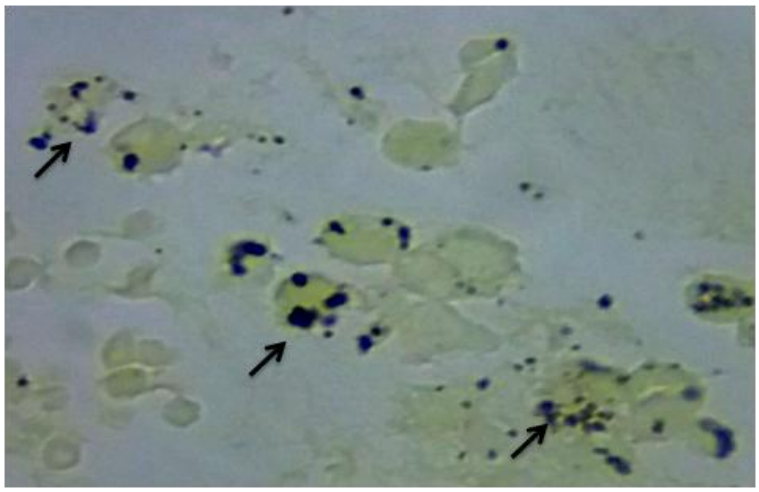


Ilustración 5. Tinción de Gram donde se observan abundantes bacterias en grupo, sin embargo, no es posible observar la película de moco.

Con las coloraciones PAS y Giemsa se aprecia la disposición en lámina de películas de moco, esto se debe a que los aminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas (aminoglucanos, glicoproteínas proteoglicanos) al hidratarse forman abundantes grupos polares (OH) que se repelen entre sí y tienen a desplazarse lateralmente tratando de evitar enfrentarse a los otros grupos polares descarga electrostática similar, como cuando se repelen dos imanes cuando se colocan los mismos polos uno enfrente del otro (figura número 6).

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Ilustración 6. ***Tincion PAS a 100x.***

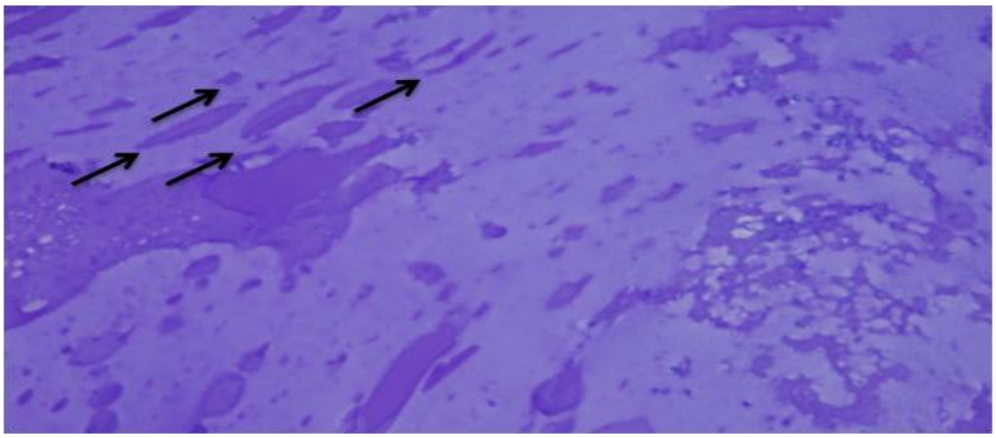


Ilustración 6. Se evidencia la capa de moco y la disposicion en lamina de la misma (flechas negras).

Las células del infiltrado inflamatorio son predominantemente los neutrófilos, en fase aguda o cuando hay abundantes bacterias; en etapa crónica los linfocitos- plasmocitos y macrófagos (histiocitos), y en infecciones agudas virales predominan los linfocitos.

En casos de reacciones alérgicas predominan los eosinófilos. En nuestros casos se encontró la existencia de combinaciones de los infiltrados.

Con la coloración de Giemsa son visibles los mastocitos, eosinófilos y el epitelio columnar con sus límites. Este último hallazgo no los sabíamos.

La tinción con ácido PAS también sirve para ver mejor los proteoglicanos, glucoproteínas y aminoglucanos, las células cebadas y las membranas basales.

La tinción con Giemsa también es efectiva para observar las células cebadas (mastocitos) que no se pueden diferenciar de los macrófagos o histiocitos con la Hematoxilina Eosina (figura número 7).

Ilustración 7. ***Tinción de giemsa.***

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

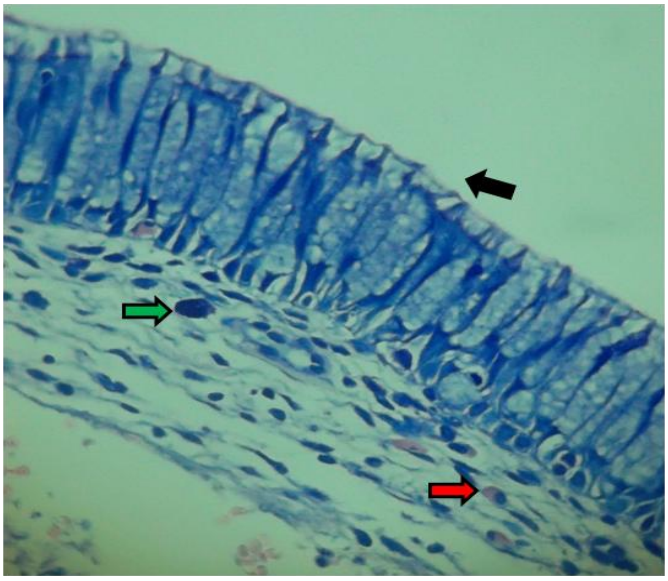


Ilustración 7. Muestra donde se evidencia un Mastocito (flecha verde) y un Plasmocito flecha roja. Observe el epitelio con sus cilios libre de la presencia de una película de moco o Biopelícula (flecha negra).

Concordancia entre la Microscopia Electrónica de Transmisión y Coloraciones histológicas con H-E, Gram, Giemsa y PAS, observadas en Microscopia de luz.

No se identificaron Biopelícula en ninguna de las muestras analizadas bajo Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), estos resultados son concordantes con los resultados obtenidos con las coloraciones histológicas Hematoxilina-Eosina (H-E), Gram, Giemsa y Acido Peryódico de Schiff (PAS), mostrando una concordancia absoluta para resultados negativos del 100%.

Hematoxilina-Eosina (H-E) y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

En los resultados entre la MET y la coloración H-E se encontró una concordancia observada del 100% para los casos negativos. Se presentó un caso probable para Biopelícula entre la MET y la H-E, el cual se manejo como Presencia de Biopelícula para la MET y la H-E, mostrando una concordancia significativa (Kappa=1, $p<0.001$) (tabla número 6).

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Tabla 6. ***Concordancia entre MET y H-E de pacientes con rinosinusitis crónica en el hospital universitario de la samaritana en el 2011.***

H-E		*MET*		*Total*
		+	-	1
+	Recuento	2	0	2
	% de H-E	100,0%	,0%	100,0%
	% de MET	100,0%	,0%	5,9%
-	Recuento	0	32	32
	% de H-E	,0%	100,0%	100,0%
	% de MET	,0%	100,0%	94,1%
Total	Recuento	2	32	34
	% de H-E	5,9%	94,1%	100,0%
	% de MET	100,0%	100,0%	100,0%

Gram y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

En los resultados entre la MET y la coloración Gram; se encontró una concordancia observada del 94.1% para los casos negativos, las dos muestras con casos probables de Biopeliculas para microscopia electrónica fueron definitivamente negativas para Gram (tabla número 7).

Tabla 7. ***Concordancia entre MET y el gram de pacientes con rinosinusitis crónica en el hospital universitario de la samaritana en el 2011.***

Gram	MET	Total

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

		+	-	1
-	Recuento	2	32	34
	% de Gram	5,9%	94,1%	100,0%
	% de MET	100,0%	100,0%	100,0%
Total	Recuento	2	32	34
	% de Gram	5,9%	94,1%	100,0%
	% de MET	100,0%	100,0%	100,0%

Giemsa y Microscopía Electrónica de Transmisión.

En los resultados entre la MET y la coloración Giemsa se encontró una concordancia observada del 94.1% para los casos negativos.

PAS y Microscopia Electrónica de Transmisión.

En los resultados entre la MET y la coloración PAS se encontró una concordancia observada del 94.1% para los casos negativos. Se obtuvieron resultados similares para las variables Presencia Extensiva, Presencia o Ausencia de Biopelícula. El análisis de estas muestras se llevo a cabo en diferente tiempo.

Resumen del procesamiento de los casos para las variables Presencia Extensiva, Presencia o Ausencia de Biopelícula.

H-E y MET para Presencia Extensiva, Presencia y Ausencia de Biopelícula

La concordancia observada entre la MET y la coloración H-E para las variables Presencia Extensiva, Presencia o Ausencia de Biopelícula fue del 100% para los casos negativos. Al mismo tiempo, se presento concordancia en dos muestras de un caso probable para Biopelícula entre la MET y la H-E (Tabla 8)

Tabla 8. ***Concordancia entre MET y la H-E para presencia extensiva en pacientes con rinosinusitis crónica en el hospital universitario de la samaritana en el 2011.***

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

H-Eext		METext		Total
		+	-	1
+	Recuento	2	0	2
	% de H-Eext	100,0%	,0%	100,0%
	% de METext	100,0%	,0%	5,9%
-	Recuento	0	32	32
	% de H-Eext	,0%	100,0%	100,0%
	% de METext	,0%	100,0%	94,1%
Total	Recuento	2	32	34
	% de H-Eext	5,9%	94,1%	100,0%
	% de METext	100,0%	100,0%	100,0%

Concordancia entre Gram, Giemsa con MET para Presencia Extensiva, Presencia y Ausencia de Biopelícula.

La concordancia entre los resultados entre la coloración Gram y Giemsa con MET, fue igual, mostrando una concordancia observada del 94.1% para los casos negativos.

PAS y MET para Presencia Extensiva, Presencia y Ausencia de Biopelícula

Al correlacionar los resultados entre la MET y la coloración PAS se encontró una concordancia observada del 94.1% para los casos negativos.

19. Discusión

Las Biopelículas son comunidades de bacterias adheridas a una superficie viva y/o inerte, la cual está

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

ubicada en una extensa substancia extracelular polimérica (glicocalix) compuesta principalmente por polisacáridos, pero también conteniendo proteínas y ADN(2). Están implicadas en la rinosinusitis crónica donde se ha visto que tienen la capacidad de perpetuar un proceso infeccioso e inflamatorio crónico, razón por la cual han sido centro de estudio en la fisiopatología de este padecimiento desde hace varios años (1–4,16). Los métodos descritos en la literatura para el diagnostico de Biopeliculas son engorrosos, tienen un alto costo y no son asequibles a la mayoría de hospitales del país. Recientemente, diversos autores han empleado diferentes métodos diagnósticos para la detección de Biopeliculas, los cuales se han basado en métodos de tinción histológica convencional (1,10,11,19) En el presente trabajo, se encontró una importante concordancia entre los resultados obtenidos mediante el estudio de las muestras de la mucosa de los senos paranasales con MET, H-E, Gram, Giemsa y PAS. Se descarto la presencia de Biopelícula en pacientes con Rinosinusitis Crónica en todos los estudios. Se identifico un caso probable encontrando concordancia de este caso entre los resultados obtenidos con MET y la H-E. No pretendíamos una identificación de especies bacterianas particulares, debido a que las Biopeliculas son consideradas el factor más importante para la patogénesis de la Rinosinusitis crónica (2,17). La identificación microbiológica de los diferentes agentes infecciosos requiere de cultivos o métodos de inmunohistoquimica (16,18).

Teniendo en cuenta el importante papel que juegan las Biopeliculas en la patogénesis de la rinosinusitis crónica, es fundamental buscar herramientas confiables, disponibles y económicas para la identificación de las Biopeliculas. En acuerdo con Hochstim et al (1), Tóth et al (10) Romain et al (19) consideramos que la amplia disponibilidad de H-E que existe a través de los diferentes laboratorios de patología, hace de este, un método fiable para descartar Biopeliculas. Con respecto a los hallazgos encontrados por Winther et al(11) consideramos que el Giemsa y el PAS podrían ser herramientas que ayudarían a descartar Biopeliculas, sin embargo, el Giemsa y el PAS, fallaron en detectar el caso que fue reportado como sospechoso con la H-E y la MET. A pesar que se tuvieron en cuenta los criterios diagnósticos para la detección de Biopeliculas descritos por Parsek-Singh y modificados por Hall-Stoodley et al (20), las muestras analizadas no cumplieron los criterios diagnósticos reportando ningún

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

resultado positivo para Biopelícula. Para la MET se tuvieron en cuenta los hallazgos descritos por Reese et al (21) para el diagnóstico de Biopeliculas, sin embargo, las muestras analizadas no cumplieron los criterios, como la organización de las bacterias en capas inmersas en una gran capa de polisacáridos extracelulares (exopolisacáridos). Es fundamental mencionar que se debe diferenciar entre colonización e infección. La colonización se caracteriza por la presencia de microorganismos, y la infección muestra un proceso patológico asociado a una respuesta inflamatoria. En las muestras analizadas, tanto en MET como en Microscopia de luz, evidenciamos una importante respuesta inflamatoria encontrando principalmente células plasmáticas. La presencia de polimorfo nucleares y células plasmáticas rodeando un agregado bacteriano incrementa considerablemente la sospecha de infección.

Aunque no existen tratamientos específicos hasta la fecha para erradicar las Biopeliculas, es muy importante que sean descartadas, debido a la significativa asociación que existe entre el tratamiento no exitoso y la persistencia de los síntomas en pacientes con rinosinusitis crónica (6,7,9,12,15–18).

20. Conclusiones

Este es el primer trabajo que se realiza en Colombia en cuanto al estudio de Biopeliculas en la mucosa de los senos paranasales. No existen métodos diagnostico de rutina en nuestro país, y los que existen, son costosos y no están al alcance de la mayoría de hospitales del país. Esta es la razón por la cual se considera necesario estudiar otras alternativas económicas y al alcance de todos. Nuestros resultados muestran una alta concordancia entre los hallazgos observados entre la MET y la microscopia de luz para los resultados negativos, por lo cual consideramos que la microscopía de luz es una herramienta útil para descartar la presencia de Biopeliculas. Los análisis fueron practicados por patólogos de amplia trayectoria y experiencia profesional y docente, igualmente con experiencia en microscopia electrónica y microscopia de luz.

Estos hallazgos muestran la relevancia de guiar investigaciones a futuro en esta área, para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, lo cual llevara al estudio y desarrollo de alternativas terapéuticas para

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

manejar pacientes con rinosinusitis crónica, así como para el tratamiento de otras patologías asociadas a Biopeliculas.

Consideramos que se necesitan estudios con un mayor tamaño de muestra y teniendo una población con resultados positivos para Biopelículas, así mismo, comparando la severidad de los síntomas y la presencia de Biopelículas.

21. Referencias bibliográficas

1. Hochstim CJ, Choi JY, Lowe D, Masood R, Rice DH. Biofilm detection with hematoxylin-eosin staining. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2010 may;136(5):453–6.

2. Suh JD, Ramakrishnan V, Palmer JN. Biofilms. Otolaryngol. Clin. North Am. 2010 jun;43(3):521–530, viii.

3. Kilty SJ, Desrosiers MY. Are biofilms the answer in the pathophysiology and treatment of chronic rhinosinusitis? Immunol Allergy Clin North Am. 2009 nov;29(4):645–56.

4. Hochstim CJ, Masood R, Rice DH. Biofilm and persistent inflammation in endoscopic sinus surgery. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 nov;143(5):697–8.

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

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

7. Singhal D, Psaltis AJ, Foreman A, Wormald P-J. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. Am J Rhinol Allergy. 2010 jun;24(3):169–74.

8. Psaltis AJ, Ha KR, Beule AG, Tan LW, Wormald P-J. Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. Laryngoscope. 2007 jul;117(7):1302–6.

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

10. Tóth L, Csomor P, Sziklai I, Karosi T. Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin-eosin and gram staining. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2011 oct;268(10):1455–62.

11. Winther B, Gross BC, Hendley JO, Early SV. Location of bacterial biofilm in the mucus overlying the adenoid by light microscopy. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2009 dic;135(12):1239–45.

12. Pintucci JP, Corno S, Garotta M. Biofilms and infections of the upper respiratory tract. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2010 ago;14(8):683–90.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.

Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia

Mail: ogutierrez71@yahoo.com

13. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J. Clin. Invest. 2003 nov;112(10):1466–77.

14. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 2010 sep;8(9):623–33.

15. Foreman A, Wormald P-J. Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. Laryngoscope. 2010 ago;120(8):1701–6.

16. Post JC, Hiller NL, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2007 oct;15(5):347–51.

17. Tamashiro E, Antunes MB, Palmer JN, Cohen NA, Anselmo-Lima WT. Implications of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. Braz J Infect Dis. 2009 jun;13(3):232–5.

18. Zernotti ME, Angel Villegas N, Roques Revol M, Baena-Cagnani CE, Arce Miranda JE, Paredes ME, et al. Evidence of bacterial biofilms in nasal polyposis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2010;20(5):380–5.

19. Kania RE, Lamers GEM, Vonk MJ, Dorpmans E, Struik J, Tran Ba Huy P, et al. Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. Laryngoscope. 2008 ene;118(1):128–34.

20. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell. Microbiol. 2009 jul;11(7):1034–43.

21. Reese S, Guggenheim B. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. Microsc. Res. Tech. 2007 sep;70(9):816–22.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.

Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia

Mail: ogutierrez71@yahoo.com

22. Anexos

Instrumento de Recolección de la Información.

"COLORACIONES HISTOLÓGICAS Ó MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO PARA DETECCIÓN DE BIOPELICULAS EN PACIENTES CON RINOSINUSITIS CRÓNICA"

RESULTADO PRESENCIA DE BIOPELÍCULA.

OBSERVADOR: _____ FECHA: _____

ESPECIMEN No: _____ OBSERVACION No: _____

METODO VALORADO	RESULTADO
HEMATOXILINA-EOSINA	
GIEMSA/ACIDO PERYODICO DE SCHIFF	
H-E/GIEMSA/PAS	
MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION	
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMICION	

1. **Presencia**, presencia de Biopelícula

0. **Ausencia**, ausencia de Biopelícula

Instrumento de Recolección de la Información.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

"COLORACIONES HISTOLÓGICAS Ó MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO PARA DETECCIÓN DE BIOPELICULAS EN PACIENTES CON RINOSINUSITIS CRÓNICA"

RESULTADO NIVEL DE PRESENCIADE BIOPELÍCULA.

OBSERVADOR: _____ FECHA: _____

ESPECIMEN No: _____ OBSERVACION No: _____

METODO VALORADO	RESULTADO
HEMATOXILINA-EOSINA	
GIEMSA/ACIDO PERYODICO DE SCHIFF	
H-E/GIEMSA/PAS	
MICROSCOPIA OPTICA DE ALTA RESOLUCION	
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMICION	

2. **Presencia Extensiva**, compromiso > 50% de la mucosa.

1. **Presencia**, compromiso <50% de la mucosa.

0. **Ausencia** de compromiso de la mucosa.

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA SAMARITANA

DEPARTAMENTO DE OTORRINOLARINGOLOGIA

Grupo de Investigación

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

PROYECTO: Coloraciones Histológicas o Microscopia Electrónica de Barrido para detección de Biopeliculas en pacientes con Rinosinusitis Crónica.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Camilo Andrés Reyes Gelves.

TUTOS: Dr.Omar Gutiérrez.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Día/mes/año: _____/_____/_____ Código del Sujeto:_____

Este documento explica en qué consiste este estudio de investigación. Es importante que usted lea cuidadosamente esta información y que luego decida si desea participar o no como voluntario.

PROPÓSITO:

El propósito de esta investigación es determinar la efectividad de las coloraciones Hematoxilina Eosina, Gram, Giemsa y Acido Peryodico de Schiff para la detección de Biopeliculas en pacientes con diagnostico de Rinosinusitis Crónica en el Hospital Universitario de la Samaritana de Bogotá.

DURACIÓN:

El tiempo que cada sujeto de estudio otorgará para esta investigación será tan sólo 20 a 30 minutos. El tiempo disponible para la recolección de los datos es de 1 año. Los resultados del estudio se reportarán en Mayo del 2012.

PROCEDIMIENTOS:

Los procedimientos que le conciernen a usted como sujeto en este estudio incluyen:

- esponder unas preguntas con el fin de realizar una historia clínica.
- Proporcionar resultados imegenologicos, en este caso, Escanografía de los Senos Paransales.
- Extracción de UNA muestra (Biopsia) de mucosa de los senos paranasales durante el momento de su cirugía y de la zona afectada por su enfermedad.

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

POSIBLES RIESGOS O INCOMODIDADES:

No se prevé ningún riesgo serio para los sujetos en este proyecto de investigación. Los posibles riesgos o incomodidades asociadas con su participación en este estudio incluyen:

- Complicaciones inherentes al procedimiento por el cual usted es llevado a cirugía (equimosis o hematoma local, sangrado leve, infección, etc.)

BENEFICIOS:

Los beneficios para usted por su participación en el estudio son:

- Determinar si usted presenta crecimiento de Biopeliculas (películas de bacterias) en la mucosa de los senos paransales.
- Mediante estas pruebas diagnosticas, se podría descubrir en su caso otras causas que están produciendo su enfermedad, y que no le generaran costos económicos adicionales derivados de estos estudios.

CONFIDENCIALIDAD:

Se realizará todo esfuerzo para asegurar que los hallazgos de este estudio sean confidenciales. Copias de los documentos de este estudio serán conservados en el archivo del Comité de Investigaciones del Hospital Universitario de La Samaritana por un período mínimo de tres años. Las muestras tomadas serán desechadas al finalizar el estudio y no podrán ser utilizadas para ningún análisis diferente al propuesto. Los hallazgos de este estudio podrán ser publicados o presentados en reuniones sin revelar su nombre o identidad. Se protegerán sus derechos y privacidad; no obstante los investigadores asociados con esta investigación tendrán acceso a los documentos e información relacionados con este estudio. Su expediente será completamente confidencial según lo indica la Ley. Este no será compartido con otras personas a menos que sea exigido por la Ley o de acuerdo con las especificaciones mencionadas anteriormente.

PARTICIPACION VOLUNTARIA:

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

Su participación en este estudio de investigación es **absolutamente voluntaria,** por lo tanto, no habrá ningún tipo de remuneración económica o compensación por su participación, excepto poder descubrir otras causas que generen su enfermedad, o que participen en el desarrollo de su enfermedad. Usted puede rehusarse a participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee después de haber ingresado (llamando al Doctor Camilo Andrés Reyes Gelves al teléfono 4077075 extensión 10040).Se le informará inmediatamente si cualquier hallazgo de este estudio podría tener impacto en su salud.

Su firma confirma que ha leído y comprendido este documento. En caso de participar, recibirá una copia firmada de este consentimiento informado. A usted se le ha dado y se le continuará dando la oportunidad de hacer preguntas y discutir con los investigadores su participación.

- Usted ha elegido **SI participar** en este proyecto de investigación libre y voluntariamente y en constancia firma el presente documento:

_____ Día/mes/año:_____/_____/_____

FIRMA DEL SUJETO VOLUNTARIO

_____ Día/mes/año:_____/_____/_____

FIRMA DE TESTIGO

_____ Día/mes/año:_____/_____/_____

FIRMA DE TESTIGO

_____ Día/mes/año:_____/_____/_____

FIRMA DEL INVESTIGADOR

Usted ha decidido **NO participar** en este proyecto de investigación y en constancia firma:

_____ Día/mes/año:_____/_____/_____

FIRMA DEL SUJETO VOLUNTARIO

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com

COLORACIONES HISTOLÓGICAS VS MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISION PARA DETECCIÓN DE BIOPELICULAS EN PACIENTES CON RINOSINUSITIS CRÓNICA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA SAMARITANA EN EL AÑO 2011.

Reyes CA, Gutiérrez OA, Andrade RE, Contreras DD

Camilo Andrés Reyes Gelves, Residente Otorrinolaringología, Hospital Universitario de la Samaritana, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
Mail: camilo_reyes81@hotmail.com.
Omar Alberto Gutiérrez Guauque, Otorrinolaringólogo, Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, Colombia
Mail: ogutierrez71@yahoo.com