



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

# **COMPARACIÓN DEL MICROBIOMA NASOSINUSAL EN PACIENTES CON RINOSINUSITIS AGUDA Y CRÓNICA**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:  
JUAN CARLOS HERNAIZ LEONARDO

TUTOR PRINCIPAL  
DR. RAFAEL FRANCO CENDEJAS  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
“LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

Este proyecto se pudo realizar gracias al trabajo conjunto de muchas personas. En primer lugar, quiero agradecer a mis compañeros de residencia en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Su apoyo fue fundamental durante la investigación. En todo momento buscaron la manera de ayudarme, incluso dejándome tomar hisopados de sus narices para que pudiera mejorar mi técnica de muestreo. En particular, quiero agradecer a mis compañeros de generación; Juan Carlos Ceballos, Michelle Lupa y Víctor Rojas. Durante dos años, su apoyo incondicional me permitió cumplir con las obligaciones de la maestría, a pesar de que esto implicara más trabajo para ellos. Siempre fueron comprensivos y jamás me recriminaron algo. De la misma manera, agradezco a mis maestros en la residencia, particularmente el Dr. Dávalos, el Dr. Schobert, el Dr. Cisneros y la Dra. Cortes, que me permitieron completar el trabajo de manera satisfactoria, siendo guías y consejeros durante todo el proceso.

Siempre he contado con el apoyo de mi familia y este periodo no fue la excepción. Agradezco a mis papas y a mis hermanas por motivarme a seguir adelante, mostrando su cariño hacia mi en todo momento.

Parte del trabajo lo realicé en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en donde el Dr. Jiménez Chobillón y la Dra. María de la Luz García me abrieron las puertas del servicio. Su apoyo fue fundamental, por lo que les estoy muy agradecido. De igual manera, el resto del personal del INER, incluyendo médicos adscritos, residentes y enfermeras, fueron siempre amables y profesionales conmigo. A pesar de venir de otro hospital, me trataron como uno más del equipo, lo cual les agradezco mucho.

Desde pregrado, la Dra. Diana Vilar me ha brindado su constante guía y consejo. Es una mujer admirable que motiva a sus alumnos a ser siempre mejores médicos y personas. Gracias a ella, mi interés por la investigación creció. Me siento muy afortunado de contar con su apoyo y le estaré siempre agradecido.

Agradezco a todo el personal de SENASICA por su gran ayuda, desde la capacitación bioinformática hasta el desarrollo del trabajo de laboratorio. Sin su colaboración, nada de esto habría sido posible. Igualmente, quiero agradecer a la Dra. Gabriela Martínez. Además de ser una excelente maestra en Bioestadística I, me ayudó a completar el trabajo de laboratorio cuando parecía que el proyecto estaba perdido.

Agradezco a todo el personal del Laboratorio de Infectología del INRLGII. Desde el primer momento, fueron pacientes y comprensivos conmigo. Su ética de trabajo y profesionalismo es admirable, y les estaré siempre agradecido por su ayuda. En particular, Claudia Colín y Luis Esaú López me ayudaron más de lo que puedo expresar. Sin duda, son personas admirables tanto por su inteligencia como por su actitud laboral.

Todas estas personas formaron parte de mi maestría, sin embargo, nada habría sido posible sin el Dr. Rafael Franco. Desde el segundo año de residencia, estuvo ahí para asesorarme. Admiro mucho la paciencia que me tuvo durante todo el proceso, sobre todo contestando los mensajes de pánico que le escribía cada semana. Además de brindarme constantes consejos, fue directamente responsable del éxito de este proyecto. Gracias a él, pude utilizar los recursos del laboratorio de Infectología y, a través de colaboraciones, logramos completar el trabajo con un presupuesto muy limitado. Sin duda, creo que no pude haber pedido un mejor tutor.

Finalmente, quiero agradecer a mi futura esposa Carolina Tella. No fue fácil completar la maestría durante la residencia y menos trabajar durante el confinamiento por la pandemia de COVID-19. Siempre estuvo a mi lado, motivándome y escuchando mis preocupaciones. Ella es el pilar en el cual me apoyo en los momentos más difíciles. Estoy feliz de terminar esta etapa de mi formación, sobre todo, porque lo pude compartir con ella.

¡Gracias a todos!

# ÍNDICE

RESUMEN

PREFACIO

## 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Introducción

1.2. Rinosinusitis aguda

1.3. Interacciones virales y bacterianas en vía respiratoria alta

1.4. Rinosinusitis crónica

1.5. Índices de diversidad biológica

1.6. Microbioma nasosinusal y su importancia clínica

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

## 3. JUSTIFICACIÓN

## 4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal

4.2. Objetivos secundarios

## 5. HIPÓTESIS

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño de estudio, población y muestra

6.2. Métodos de recolección de las muestras

6.3. Procesamiento de las muestras

6.3.1. Extracción de DNA

6.3.2. Preparación de librerías y secuenciación de V3-V4 16s rRNA

6.4. Análisis bioinformático

6.5. Análisis estadístico

## 7. RESULTADOS

7.1. Características demográficas de la muestra

7.2. Beta diversidad en pacientes con RSAV y RSC

7.3. Composición taxonómica del microbioma en RSAV y RSC

7.4. Asociación entre variables clínicas e índices de diversidad

## **8. DISCUSIÓN**

## **9. CONCLUSIÓN**

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

## **11. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

11.1. Tablas y gráficas suplementarias

11.2. Pipeline de QIIME 2

## RESUMEN

La rinosinusitis aguda (RSA) y crónica (RSC) son enfermedades con fisiopatologías diferentes, sin embargo, la mayor parte de los pacientes con RSC refieren haber comenzado con un cuadro agudo no resuelto. Es probable que durante una RSA se generen modificaciones en el microbioma nasosinusal que asemejan a lo encontrado en los casos crónicos.

## OBJETIVO

Comparar la composición del microbioma nasosinusal en RSA y RSC. Como objetivo secundario, se buscaron asociaciones entre los índices de diversidad alfa y beta con variables clínicas.

## METODOLOGÍA

Estudio de corte transversal que incluyó pacientes con RSA viral (RSAV) y RSC valorados en dos centros de referencia. Se obtuvieron muestras de meato medio para análisis de la región V3-V4 del gen 16SrRNA. Se construyeron variantes en la secuencia del amplicon (ASVs) y se asignó taxonomía utilizando la base de datos SILVA v132. Se analizó la diversidad alfa y beta, así como los taxa más frecuentes según el tipo de rinosinusitis. Se asoció la edad, puntuación en SNOT-22 y hallazgos endoscópicos con los índices de diversidad.

## RESULTADOS

Se analizaron 25 muestras (12 en RSAV y 13 en RSC) de pacientes entre 18-79 años. Se observó un agrupamiento de las muestras según el tipo de rinosinusitis en el PCoA, el cual resultó significativo (PERMANOVA  $p = 0.019$ ). En ambos tipos de rinosinusitis, el género más frecuente fue *Staphylococcus* (41% en RSAV vs 47% en RSC). No observamos diferencias significativas en el índice de diversidad filogenética (Kruskal-Wallis  $H = 0.0411$ ,  $p = 0.83$ ) o el índice de igualdad (Kruskal-Wallis  $H = 1.1488$ ,  $p = 0.28$ ), sin embargo, el resultado del ANCOM mostró que el género *Pseudomonas* y la familia *Burkholderiaceae* se encontraron en una proporción mayor en RSA en comparación con RSC. Ninguna de las variables clínicas se asoció de manera significativa con los índices de diversidad.

## CONCLUSIONES

La composición del microbioma nasosinusal difiere según el tipo de rinosinusitis. Los resultados de este estudio permitirán generar nuevas hipótesis de investigación.

## PREFACIO

La rinosinusitis es una de las enfermedades más comunes encontradas en la práctica otorrinolaringológica. Su prevalencia es del 6-15% en casos agudos y del 2% en casos crónicos. Actualmente, representa la indicación más común en los Estados Unidos para el uso de antibióticos, siendo prescritos en 82% de las visitas médicas sin que estén necesariamente indicados. Los costos directos anualizados por paciente son de aproximadamente \$1,100 en casos recurrentes y de \$770 - \$2.450 en casos crónicos (1,2). Lo anterior convierte a la rinosinusitis en un problema importante de salud pública a nivel mundial.

Dependiendo de su tiempo de evolución, la rinosinusitis se clasifica en aguda (RSA) y crónica (RSC). La mayor parte de los casos agudos son secundarios a infecciones virales (RSAV). Estas dos entidades tienen fisiopatologías muy diferentes; la primera es una enfermedad infecciosa mientras que la segunda es una enfermedad inflamatoria, sin embargo, la mayor parte de los pacientes con RSC refieren que su padecimiento inició posterior a un cuadro agudo.

Gracias a las técnicas de secuenciación masiva se han podido analizar interacciones microbiológicas previamente indetectables por cultivo convencional. Durante una infección de vía aérea superior se generan cambios en el microbioma nasosinusal, probablemente como consecuencia de las interacciones virales y bacterianas (3,4). Pocos estudios han analizado estos cambios y desconocemos que tan similares son a los observados en RSC. En el caso de esta última enfermedad, existe una disminución importante en la diversidad bacteriana con pérdida de bacterias protectoras (5-9).

Por lo tanto, es posible que la RSAV genere cambios en la biota nasosinusal que, en pacientes predispuestos, evoluciona a un estado de disbiosis y consecuente RSC. Este trabajo tiene como propósito evaluar los cambios que existen en el microbioma nasosinusal en pacientes con RSAV y compararlos con los observados en RSC. Los resultados de este trabajo ayudarán a entender la fisiopatología de la rinosinusitis y la posible transición de un cuadro agudo a uno crónico. El estudio del microbioma nasosinusal puede resultar en tratamientos emergentes para pacientes con rinosinusitis y representa un área activa de investigación en rinología.

En las siguientes secciones, se dará al lector un panorama general de la enfermedad con especial atención a las alteraciones microbiológicas.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Introducción**

De manera general podemos clasificar a la rinosinusitis según su tiempo de evolución en aguda si tiene menos de 12 semanas, y crónica si lleva más de doce semanas. La RSC, a su vez, se clasifica como rinosinusitis con poliposis nasosinusal (RSCcPN) o sin poliposis nasosinusal (RSCsPN). Cuando un paciente presenta tres o más episodios al año de RSA con recuperación completa entre cada episodio se clasifica como RSA recurrente. Esta definición es la más aceptada a nivel mundial en la actualidad a pesar de ser un poco arbitraria, ya que la mayoría de los casos de RSA no sobrepasan los 10 días (1,2,10). Existen variantes fúngicas de la RSC, como la rinosinusitis fúngica alérgica, las bolas fúngicas y las rinosinusitis fúngicas invasivas, sin embargo, estas variantes no comparten la fisiopatología clásicamente descrita para la RSC, por lo que no se discutirán en este trabajo. Igualmente, las rinosinusitis secundarias a tumores, iatrogénicas, odontógenas o postraumáticas no se describen dentro del espectro clásico de la enfermedad y, por lo tanto, no se mencionará en lo que resta del trabajo.

Los síntomas encontrados tanto en la RSA como en la RSC son muy similares. El síntoma más común es la obstrucción nasal, seguido de descarga retronasal, rinorrea, hiposmia, dolor facial y tos (1,11). En los casos agudos es más frecuente encontrar fiebre, rinorrea purulenta y dolor facial, mientras que los casos crónicos presentan predominantemente obstrucción nasal y síntomas alérgicos. El síntoma cardinal en todo caso de rinosinusitis es la obstrucción nasal, motivo por el cual representa uno de los criterios diagnósticos mayores para todas las formas de esta enfermedad (1,2,12,13).

La revisión endoscópica forma parte de la exploración clínica básica en los casos de rinosinusitis. En los casos agudos se puede observar descarga purulenta en la cavidad nasal. La RSC, en cambio, puede manifestarse como una poliposis nasosinusal o se puede evidenciar como una obstrucción a nivel del complejo ostiomeatal sin la presencia de pólipos (1,2,12,13).

El diagnóstico es clínico y se apoya en los hallazgos endoscópicos y tomográficos. La Academia Americana de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (AAO-HNS) establece como definición operacional de rinosinusitis cualquier inflamación de la nariz y senos paranasales (SPN) que se acompañe de dos o más de los siguientes síntomas, uno de los cuales debe de ser obstrucción nasal o descarga purulenta:

Dolor facial y/o presión

Hiposmia / anosmia

y/o evidencia endoscópica de

Pólipos nasales

Descarga mucopurulenta

Edema/obstrucción mucosa en meato medio

y/o evidencia tomográfica de

Cambios en el complejo ostiomeatal y/o SPN.

La fisiopatología de la rinosinusitis es compleja y multifactorial. A grandes rasgos, RSA es causada por una infección de la nariz y los SPN. En su mayoría se trata de infecciones virales y solo el 2% de los casos tienen una etiología bacteriana (2). En cambio, la RSC se debe a una inflamación persistente de la nariz y los SPN. En la RSCsPN el perfil es de predominio Th1, mientras que en la variante con poliposis nasosinusal la respuesta es principalmente Th2 (14,15).

## 1.2 Rinosinusitis aguda

Como se mencionó anteriormente, la RSA es un padecimiento de etiología viral en la mayor parte de los casos. El virus más frecuentemente asociado es el rinovirus, seguido de los coronavirus y otros virus respiratorios. Solo el 2% de los casos se llegan a complicar con una infección bacteriana, sin embargo, el uso de antibióticos no justificado continua siendo un problema grave (2). El cuadro clínico se caracteriza por rinorrea, tos, dolor o presión facial, obstrucción nasal, hiposmia, fiebre y malestar general. De los síntomas mencionados, la rinorrea purulenta, la obstrucción nasal y el dolor u opresión facial son los más predictivos de RSA. Es por eso que la Academia Americana de Otorrinolaringología y cirugía de Cabeza y Cuello (AAO-HNS) los utiliza como síntomas cardinales

para el diagnóstico de RSA (2). La exploración física suele demostrar descarga purulenta proveniente del meato medio, la cual puede ser referida como rinorrea o descarga posterior por los pacientes. La mucosa nasal suele encontrarse edematosa y reseca. A la palpación, se puede encontrar dolor en sitios de proyección de SPN, aunque este signo es poco sensible y específico. Hay que buscar de manera dirigida eritema y dolor intenso en la región periorbitaria y malar, ya que nos puede sugerir complicaciones extranasales. La agudeza visual y los movimientos extraoculares no se alteran a menos de que exista involucro intraorbitario. La cefalea de tipo migrañoso no suele ser un síntoma común en esta enfermedad y hay que diferenciarla del dolor u opresión facial.

La RSAV no requiere antibióticos y suele tratarse de manera sintomática (2). En ocasiones, los pacientes pueden presentar fiebre de bajo grado, dolor facial y malestar general, lo cual se puede manejar con el uso de AINEs. Los lavados nasales con solución salina tienen un perfil de efectos adversos muy favorable y se recomiendan para mejorar las secreciones. Los descongestionantes nasales como la oximetazolina pueden ofrecer un alivio rápido para la obstrucción nasal, pero su uso continuo genera rinitis medicamentosa, por lo que se deben de utilizar por menos de tres días. Los antihistamínicos orales pueden ayudar con la secreción nasal, aunque no hay evidencia para recomendar su uso de manera rutinaria. Finalmente, los esteroides nasales son frecuentemente utilizados para mejorar la obstrucción nasal, sin embargo, no hay evidencia suficiente para recomendar su uso. Un meta análisis de Cochrane no logró demostrar diferencias con el uso de esteroides nasales en pacientes con RSAV (16). Los autores resaltan que solo dos ensayos clínicos tuvieron bajo riesgo de sesgo y no se tuvo un adecuado poder estadístico. Por lo tanto, no podemos concluir que no exista beneficio con el uso de esteroides nasales. Es necesario contar con ensayos clínicos aleatorizados y ciegos con suficiente poder estadístico para poder contestar esta pregunta.

Distinguir entre una RSAV y una infección bacteriana es difícil. Ninguno de los síntomas mencionados predice de manera definitiva una infección bacteriana. La secreción purulenta frecuentemente se utiliza como argumento para iniciar tratamiento antibiótico, pero puede ser causada por cuadros virales. Debido a que la mayor parte de los casos se autolimitan, tanto la IDSA

(Infectious Disease Society of America) como la AAO-HNS recomiendan iniciar tratamiento antibiótico si después de 10 días no mejoran los síntomas o el paciente empeora (2,17). Este criterio es especialmente importante, ya que las infecciones virales pueden durar más de 10 días, pero los síntomas siempre tienden a mejorar. Cuando los pacientes reportan una exacerbación de sus síntomas después de un periodo de estabilidad (“double worsening” o doble empeoramiento), es probable que se trate de una sobreinfección bacteriana y se debe de tratar con antibióticos.

Las bacterias más frecuentemente implicadas en la RSA son *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*. En casos complicados, la infección puede ser polimicrobiana y requiere de antibióticos de amplio espectro (18). A partir de la introducción de la vacuna contra neumococo, la proporción de casos debidos a *S. pneumoniae* disminuyó, mientras que la proporción de casos de *M. catarrhalis* y *H. influenzae* incrementó (2,19). A pesar de esto, *S. pneumoniae* continúa siendo un agente etiológico importante de RSA.

Dada la microbiología mencionada, la amoxicilina continúa siendo el antibiótico de elección para los casos de RSA bacteriana. Dependiendo de los patrones de resistencia locales, se puede optar por amoxicilina sola o en combinación con ácido clavulánico. Para pacientes alérgicos a la penicilina, la doxiciclina es una buena opción, ya que tiene efecto antiinflamatorio agregado (2,17,20). Las quinolonas respiratorias son una buena alternativa en caso de alergias, pero se debe de restringir su uso en la medida de lo posible por su perfil de efectos adversos. Si no se observa mejoría a los 7 días de tratamiento, se debe de modificar el antibiótico y obtener cultivos de meato medio (21). En teoría, la manera ideal de obtener cultivos es con una punción del seno maxilar, sin embargo, es raro que se realice este procedimiento fuera del ámbito académico, ya que los cultivos guiados por endoscopia de meato medio son mucho menos invasivos y tienen un excelente rendimiento diagnóstico. Los cultivos de la cavidad nasal y la nasofaringe no reflejan las bacterias encontradas en SPN, por lo que no se recomiendan para guiar el tratamiento antibiótico (2,21). Los esteroides tópicos y los lavados nasales se recomiendan como tratamiento sintomático independientemente de la etiología. Por el momento, no se recomienda el uso de antihistamínicos y descongestionantes.

### 1.3 Interacciones virales y bacterianas en vía respiratoria alta

Las infecciones virales en vía aérea superior son un factor de riesgo importante para una infección bacteriana subsecuente. Las relaciones entre bacterias, así como entre virus y bacterias permiten cuadros de coinfección graves. En esta sección, se analizarán estas interacciones y su implicación para el desarrollo de rinosinusitis.

Normalmente, encontramos múltiples bacterias en la nariz y los SPN. La mayoría son comensales y no generan problemas. De hecho, ciertas bacterias pueden tener un papel “protector” al ayudar a moderar la respuesta inmune. Bacterias como *S. pneumoniae* o *Staphylococcus aureus* también forman parte de la biota normal, aunque se asocian a enfermedades infecciosas en nariz y SPN (22). Para que una persona desarrolle una infección de vía aérea superior (IVAS) bacteriana, la cantidad de bacterias patógenas debe de incrementar con respecto al total de bacterias y al número de comensales “protectores”. Para lograrlo, primero debe de colonizar el sitio anatómico a infectar.

La probabilidad que una bacteria tiene de colonizar un nicho ecológico depende en parte de la biota que reside en dicho sitio. Un ejemplo concreto es la relación entre *H. influenzae* y *S. pneumoniae*. En un trabajo realizado por Margolis y cols. (23), los autores inocularon *H. influenzae* en la nasofaringe de ratas previamente colonizadas por *S. pneumoniae* y observaron que la densidad de *H. influenzae* incrementó con respecto a ratas no colonizadas. Este efecto sinergista podrá deberse a que *S. pneumoniae* libera recursos que no son accesibles de otra forma a *H. influenzae*. En cambio, la densidad de *S. pneumoniae* no incrementó cuando las ratas fueron pretratadas con *H. influenzae*. En el humano, estas bacterias conviven en la nasofaringe, por lo que interactúan constantemente. Una de sus relaciones involucra a la fosforilcolina, una molécula que se utiliza durante la adhesión celular. Ambas bacterias son capaces de expresarla, pero *H. influenzae* no la requiere para sobrevivir. Esto permite que *H. influenzae* induzca la producción de anticuerpos anti-fosforilcolina y, posteriormente, inhiba su expresión. De esta manera, dirige la respuesta inmune contra *S. pneumoniae* (24). *S. aureus* también compite con *S. pneumoniae* por el mismo nicho ecológico. Por lo tanto, la disminución de una se asocia a la expansión de la otra (25).

La vía aérea superior está colonizada por múltiples bacterias que interactúan entre sí, por lo que estas relaciones se complican de manera exponencial. En una persona sana, existe un equilibrio entre todos los miembros de la comunidad (incluido el huésped). Estas interacciones forman una red que se mantiene gracias a la presencia de microorganismos “gatekeepers”, cuyo papel es balancear el ambiente y mantener la estabilidad (26,27). Una infección viral puede romper este equilibrio y propiciar la colonización e invasión de bacterias patógenas (28).

La coinfección por virus y bacterias es frecuente y puede tener consecuencias graves. Los casos de neumonía adquirida en la comunidad tienen una mortalidad significativamente mayor cuando existe coinfección viral y bacteriana (29). Las IVAS inician como cuadros virales, pero pueden sobre infectarse y terminar en RSA bacterianas. Existen diversos mecanismos que facilitan la coexistencia entre virus y bacterias. En primer lugar, algunas infecciones virales aumentan la capacidad de bacterias como *S. pneumoniae* o *S. aureus* de adherirse al epitelio. Rinovirus, por ejemplo, aumenta la expresión de ICAM-1 en el epitelio respiratorio, facilitando la adhesión de *H. influenzae*. De la misma manera, RSV y parainfluenza aumentan la expresión del receptor del factor activador de plaquetas (PAFr) utilizado por *S. pneumoniae* y *H. influenzae* para su adhesión (24). Las infecciones virales también generan una disrupción en la barrera epitelial. Esto facilita la invasión celular y adhesión bacteriana. En el caso particular de *S. pneumoniae*, la disrupción epitelial expone fibronectina en la membrana basal y facilita su adhesión (24). La respuesta inmune montada contra los virus respiratorios puede entorpecer la eliminación de bacterias. Ejemplos incluyen el aumento de INF-gama, disminución de TNF-alfa, menor número de neutrófilos reclutados, disminución de la capacidad fagocítica de monocitos y disminución de la respuesta mediada por células NK (24). En conjunto, los cambios que ocurren en una infección viral facilitan la adhesión, invasión y evasión de la respuesta inmune de bacterias patológicas en el humano.

Los mecanismos anteriores benefician desproporcionadamente a bacterias como *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *H. influenzae*, resultando en cambios en la composición de la biota (24,30). Kloepfer y colaboradores (28) realizaron un subanálisis del estudio “RhinoGen” y observaron que la

composición del microbioma nasosinusal difería entre pacientes sanos, con rinovirus asintomáticos y con exacerbaciones de asma por rinovirus. Ellos observaron que los géneros más frecuentes en pacientes sin rinovirus fueron *Dolosigranulum* (12.2%), *Streptococcus* (11.3%), *Staphylococcus* (10.1%) y *Corynebacterium* (9.7%). Cuando se analizaron los pacientes con rinovirus de manera global, se observó un incremento en *Dolosigranulum* y *Moraxella*. Estudiando los resultados a detalle, encontraron que ambos grupos de rinovirus (sintomático y exacerbación de asma) presentaban un aumento en *Moraxella*, sin embargo, *Corynebacterium* y *Dolosigranulum* incrementaban en el grupo asintomático y disminuían en el grupo con exacerbaciones. Al analizar el cambio en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) por la cantidad de rinovirus, los autores encontraron un aumento de *Streptococcus* y *Haemophilus* directamente proporcional al aumento en la cantidad de rinovirus. De manera inversa, al aumentar la cantidad de rinovirus, disminuía el número de OTUs correspondientes a *Dolosigranulum* y *Corynebacterium*. Los resultados anteriores nos indican que rinovirus es capaz de modificar la composición del microbioma y que el cambio es proporcional a la cantidad de partículas virales presentes (28). El estudio anterior sugiere que *Corynebacterium* y *Dolosigranulum* tienen un papel protector en las IVAS. Ambos géneros se han asociado a una disminución en la abundancia de *Streptococcus* y disminuyen el riesgo de otitis media aguda en niños (31).

A manera de resumen, una infección viral puede propiciar la expansión de bacterias causantes de RSA bacteriana al incrementar su adherencia al epitelio respiratorio, perturbar la barrera epitelial y alterar la respuesta inmunológica. Al mismo tiempo, estas bacterias patológicas compiten entre ellas y modifican el ecosistema nasosinusal. El conjunto de estas interacciones resulta en una disminución de bacterias protectoras como *Corynebacterium* y *Dolosigranulum* e incrementa la densidad de bacterias patológicas.

Es importante resaltar que la gran mayoría de las RSAV resuelven sin dejar secuelas a largo plazo. Un porcentaje pequeño de pacientes persiste con los síntomas y desarrolla una RSC. Hay múltiples factores genéticos y ambientales involucrados en el desarrollo de esta enfermedad, lo cual explica porqué la mayor parte de los pacientes con IVAS no progresan a la cronicidad. En la siguiente

sección, se desarrollarán las diferentes teorías sobre la fisiopatología de la RSC y se hablará brevemente sobre su tratamiento.

#### **1.4 Rinosinusitis crónica**

La RSC es una enfermedad inflamatoria. Tiene un componente infeccioso importante, sobre todo en las exacerbaciones, pero su fondo siempre es inflamación crónica en nariz y SPN. El 15% de la población en Estados Unidos refiere síntomas nasosinusales por más de 3 meses y 2% de la población tienen un diagnóstico corroborado de RSC (1). El mecanismo básico involucra inflamación de la nariz y los SPN que dificulta el drenaje. Como consecuencia, se generan los síntomas característicos de la enfermedad, sin embargo, existen muchas interrogantes sobre porqué se inflaman los SPN en primer lugar.

La etiología de la RSC es multifactorial, por lo que no tiene un patrón de herencia clásico. La mayor parte de los estudios genéticos se han enfocado en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Dentro de los genes estudiados resaltan CFTR, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, CD-14, IRAK-4, LFT, NOS1, IL1RL1, IL-4, IL-13, IL-33, TNF, LTC4S, PTGDR, entre otros (32–34). Los genes asociados al HLA presentan una asociación importante con el desarrollo de RSC. En población mexicana se demostró una asociación entre HLA-DRB1\*03 y la presencia de poliposis nasosinusal (OR = 2.9; IC 95% 1.2 – 4.2) (35). Estos resultados difieren de lo encontrado en población caucásica, en donde HLA-DR7 tiene mayor asociación. Lo anterior refuerza un probable componente inmunológico importante en la fisiopatología de la RSC.

Uno de los factores de riesgo más importante para el desarrollo de RSC es la atopia (12). La patología nasosinusal frecuentemente coexiste con cuadros de rinitis alérgica y asma, lo cual confunde el diagnóstico. La rinitis alérgica particularmente coexiste con la RSC en más del 25% de los casos (1). En el caso del asma, se ha observado que 31% y 42% de los pacientes con RSCcPN presentan sibilancias y disnea respectivamente (36). Un subgrupo de pacientes con RSCcPN y asma presentan intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Esta triada se conoce como Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA), antiguamente llamada Triada de Samter.

Los trastornos de la motilidad ciliar adquiridos y congénitos, estados de inmunocompromiso, reflujo laringo faríngeo, tabaquismo y cirugía nasal previa representan factores de riesgo para RSC de cualquier tipo (1,2). Las alteraciones anatómicas como las desviaciones septales, celdillas de Haller y los cornetes neumatizados, no han demostrado aumentar la probabilidad de RSC por si solas (37).

Existen diferentes teorías sobre la génesis de la RSC (7,14). En un inicio, se pensaba que las infecciones fúngicas eran responsables de los síntomas e incluso se llegaban a recetar antifúngicos sistémicos como tratamiento inicial de RSC. La teoría fúngica, propuesta por primera vez en la Clínica Mayo, postulaba que el estímulo inicial para el desarrollo de la RSC era la exposición a antígenos provenientes de hongos del género *Alternaria* (7). Esta teoría ha sido abandonada debido a que no se ha podido reproducir esta respuesta *in vitro* y a que los antifúngicos no han mostrado mejoría clínica en estos pacientes.

La teoría de los superantígenos postula que las exotoxinas producidas por el *S. aureus* desencadenan una respuesta Th2 al actuar como superantígenos. Las toxinas generan una respuesta mediada por IgE y aumentan la concentración de eosinófilos y citocinas Th2, principalmente IL-5 e IL-13. Existen múltiples artículos que apoyan este mecanismo tanto en la RSCcPN como en el asma y en la EREA (38–41), sin embargo, no todas las bacterias aisladas son productoras de exotoxinas, por lo que dicha teoría no explica por completo la enfermedad. De manera alternativa, se ha propuesto que el peptidoglicano de la pared celular bacteriana puede generar una respuesta Th2 por un mecanismo mediado por TLR2 (42,43).

La teoría de las biopelículas y la teoría del microbioma complementan los mecanismos descritos en el párrafo anterior. Las biopelículas (o biofilms en inglés) son estructuras complejas formadas por colonias bacterianas embebidas en una matriz extracelular compuesta de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas, que permiten a las bacterias disminuir su actividad metabólica y evadir la respuesta inmunológica del huésped. El biofilm dificulta la penetración de antibióticos y, por lo tanto, es un factor protector para las bacterias que residen en el mismo (44). Se ha observado

biofilm tanto en el seno maxilar como en otros SPN, encontrándose en 42 – 75% de los pacientes que entran a cirugía nasosinusal (7,45,46). Una de las bacterias productoras de biofilm que se encuentra con mayor frecuencia en la RSC es el *S. aureus*.

La teoría del microbioma, por otro lado, postula que el balance que existe entre las diferentes bacterias en la nariz y los SPN se altera en la RSC. Dependiendo del tipo de RSC, este desbalance puede propiciar una respuesta Th1-Th17 (RSCsPN) o Th2 (RSCcPN y EREA).

El microbioma bacteriano se refiere al material genético derivado de las bacterias que coexisten en el organismo humano, mientras que la biota o microbiota bacteriana se refiere a los microorganismos en particular. En los últimos 10 años, se ha buscado identificar dichas bacterias y su relación con la fisiología humana. En condiciones normales, se pueden encontrar más de 900 especies diferentes de bacterias la nariz y los SPN. Bacterias pertenecientes a las phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroides* se encuentran en prácticamente todos los pacientes sanos. Ciertos géneros se han asociado a un ambiente sano. En particular, *Burkholderia* y *Cutibacterium* pudieran tener un papel protector al ayudar a mantener la estabilidad de la biota (47–49). Existen mecanismos activos y pasivos por los cuales éstas y otras bacterias pueden ayudar a balancear la biota. De manera activa, pueden secretar compuestos antibacterianos, como la bacteriocina secretada por *Cutibacterium*. De manera pasiva, compiten por espacio físico con bacterias patógenas (47). Un meta-análisis realizado por Wagner y cols. (49) demostró que al remover a *Burkholderia* y a *Cutibacterium* de pacientes sanos, se observaba una fragmentación importante de la red de interacción bacteriana. En este mismo estudio, *Corynebacterium* se asoció a RSC, mientras que la familia *Corynebacteriaceae* se asoció a sujetos sanos.

El caso de *Corynebacterium* es especialmente interesante. Trabajos como el de Abreu y cols. (5) demuestran que *Corynebacterium tuberculostearicum* puede generar inflamación en la mucosa nasosinusal, mientras que el género *Corynebacterium* de manera global se asocia a sujetos sanos en diversos estudios (6,27,50–52). Estos resultados aparentemente contradictorios se explican por la falta de resolución de las técnicas actuales para definir especie. Dado la profundidad de secuenciación cuando se analizan regiones variables del gen 16s rRNA, no es posible determinar

con seguridad la especie en la gran mayoría de los casos (53). Esta misma lógica explicaría porque muchos sujetos sanos tienen AR tan altas de *Staphylococcus* cuando *S. aureus* se ha asociado consistentemente con RSC; no conocemos el grado de *Staphylococcus* coagulasa negativos que componen este porcentaje.

Dado que muchos estudios difieren en metodología y análisis bioinformático, no se contaba con información fidedigna sobre la composición normal del microbioma nasosinusal. Por lo tanto, un grupo liderado por el Dr. Psaltis en Australia publicó el “International Sinonasal Microbiome Study” o ISMS (51). Este proyecto incluyó 13 centros en 9 países diferentes y tuvo como objetivo principal caracterizar el microbioma nasosinusal en sujetos sanos y con RSC. Para disminuir posibles sesgos de medición, el tipo de muestreo fue estandarizado para todos los pacientes y las muestras se analizaron en conjunto en el centro principal. Igualmente, el análisis bioinformático se realizó en un solo centro y todos los datos se analizaron en conjunto. Dentro de sus resultados, encontraron que *Corynebacterium* (AR promedio = 48.7%; prevalencia = 88.49%) y *Staphylococcus* (AR promedio = 29.25%; prevalencia = 79.86%) eran los dos géneros más abundantes en sujetos sanos. *Streptococcus*, *Moraxella* y *Haemophilus* también se encontraron en la mayoría de los pacientes. Los autores proponen que existe un “microbioma base” (“*core microbiome*”) compuesto por estos cinco géneros y que su composición no depende de la enfermedad o región geográfica. El único centro que presentó una diversidad beta significativa fue Ámsterdam, sin embargo, sus resultados no se desviaban del microbioma base. En este estudio no se detectó *Cutibacterium* de manera significativa. Los autores comentan los resultados publicados en series anteriores podrían deberse a errores en la secuenciación o el análisis bioinformático.

En la RSC, la composición del microbioma nasal altera de diferentes formas. La primera y, probablemente la más importante, es la pérdida de la diversidad alfa (54–56). Todos los tipos de RSC tienen índices de diversidad alfa disminuidos en comparación con sujetos sanos. El grado de inflamación y la cantidad de eosinófilos se asocian a menores índices de diversidad alfa (57). A nivel de géneros individuales, *Staphylococcus* se ha encontrado incrementado en múltiples estudios (6,9,50,52,54) En el pasado, se pensaba que *S. aureus* no era parte de la biota normal y solo aparecía en casos patológicos, sin embargo, ahora se sabe que forma parte del ecosistema

de la nariz y los SPN. Como se mencionó anteriormente, *Staphylococcus* es el segundo género más frecuente en sujetos normales y forma parte del microbioma base en esta región. En los casos de enfermedad, es posible que su AR aumente y resulte en un estado proinflamatorio. Este fenómeno se demostró en un modelo *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Cuando se exponía a las PBMC a concentraciones bajas de *S. aureus* la producción de IL-10 aumentaba de manera significativa, sin embargo, concentraciones altas de *S. aureus* disminuyen la secreción de IL-10 y aumentan la secreción de TNF-alfa (58).

En el caso específico de la EREA, ocurren modificaciones importantes en la vía del ácido araquidónico (AA). A manera de resumen, el AA se utiliza por la familia de las ciclooxigenasas (COX) para generar prostaglandinas y tromboxanos o por las lipooxigenasas para generar leucotrienos (7,59,60). En pacientes con RSCcPN, el constante estímulo inflamatorio genera una sobreexpresión de 5-LO y, por lo tanto, aumento en los niveles de cisteinil leucotrienos, particularmente LTE4 (59–61). Eventualmente, los niveles de COX-1 y 2 disminuyen con la resultante disminución en la producción de PGE2. Si se administra un inhibidor de COX durante esa etapa de la enfermedad, se bloquea por completo la producción de PGE2 y, como consecuencia, la estimulación generada por LTE4 aumenta de manera desmedida, generando los síntomas clásicos de las exacerbaciones por aspirina; broncoconstricción, lagrimeo, prurito, obstrucción nasal y rinorrea (59–61).

El esteroide sistémico representa la piedra fundamental del tratamiento de la RSC. Como parte de su mecanismo de acción antiinflamatorio, los esteroides generan una linfopenia transitoria, siendo la población T CD4<sup>+</sup> inmaduras la más afectada; igualmente, generan una disminución en la secreción de citocinas Th1 y Th2, alterando más a las primeras. En el caso de los eosinófilos, los glucocorticoides promueven su apoptosis, lo cual los convierte en potentes fármacos para disminuir la respuesta efectora por esta población celular. Finalmente, disminuyen la presentación de antígenos por las células dendríticas (62–65). Por lo anterior, los glucocorticoides disminuyen la respuesta inmune en los pacientes con RSC, con lo que mejora el edema y consecuente obstrucción nasal.

Cuando el tratamiento médico no funciona, la cirugía es la mejor alternativa. Los objetivos de la cirugía son permeabilizar los SPN, reducir la cantidad de tejido inflamado y disminuir la carga bacteriana (1,13,66). La cirugía endoscópica de SPN (CESPN) ha evolucionado de manera importante en los últimos años gracias a equipos de navegación, mejor instrumental y visualización en alta resolución. En la actualidad, representa el estándar de oro en el tratamiento de RSC que no responde a tratamiento médico. Los cuidados postquirúrgicos siempre deben de incluir esteroides tópicos y lavados nasales, ya que uno de los objetivos de la cirugía es mejorar la permeabilidad del tratamiento tópico al abrir los SPN.

En casos seleccionados, la terapia biológica puede ayudar a control de la enfermedad. El omalizumab ha mostrado efectividad cuando se tienen niveles elevados de IgE. Igualmente, mepolizumab y dupilumab están aprobados para uso en pacientes con RSCcPN (1,2,67). El alto costo de esta terapia limita su uso, sobre todo en países de bajos recursos.

En el 15% de los casos, los pacientes persisten con molestias posterior a la cirugía. Se han estudiado diversos tratamientos tópicos con el propósito de mejorar el ambiente local y reducir el grado de inflamación en este subgrupo de pacientes. Entre los tratamientos estudiados encontramos lavados con yodopovidona, lavados con peróxido de hidrógeno, miel de manuka tópica y terapia fotodinámica. Este último tratamiento es interesante, ya que busca erradicar la microorganismos resistentes y biopelículas en SPN para que se lleve a cabo una recolonización por bacterias comensales convencionales. El proceso implica utilizar colorantes fotosensibles como azul de metileno que, al exponerse a una fuente de luz y oxígeno ambiental, producen radicales libres de oxígeno (68,69). Es probable que en el futuro se desarrollen tratamientos tópicos dirigidos a reestablecer el balance en la biota nasosinusal.

## **1.5 Índices de diversidad biológica**

Una parte fundamental en el estudio del microbioma es el análisis de la diversidad biológica. Esta sección tiene como objetivo introducir al lector a los diferentes índices de diversidad utilizados en este trabajo.

De manera global podemos hablar de tres tipos de diversidad biológica; alfa, beta y gama (70,71). La diversidad alfa representa la variabilidad en un área o ecosistema determinado. Por otro lado, la diversidad beta compara los cambios en diversidad en diferentes ecosistemas. Finalmente, la diversidad gama representa la diversidad de todos los ecosistemas en conjunto. En los estudios del microbioma nasosinusal, normalmente nos centramos en la diversidad alfa en cada grupo y la diversidad beta entre los grupos de estudio.

Existen muchas formas de medir la diversidad alfa y beta. Comenzando por la diversidad alfa, la métrica más sencilla es el número de especies diferentes que se observan en un ecosistema. Este valor es fácil de calcular, pero ignora por completo la distancia filogenética entre los microorganismos. A manera de ejemplo, podríamos concluir que un ecosistema es diverso porque tiene muchas especies diferentes, pero al analizarlo a detalle observaríamos que todas las especies pertenecen a la familia *Streptococcaceae*. Para evitar este inconveniente, Daniel Faith desarrolló un índice de diversidad que toma en cuenta la distancia filogenética entre las especies observadas, el cual se conoce como diversidad filogenética o índice de Faith (72). Este índice nos habla de la riqueza de un ecosistema, pero ignora la proporción que cada especie representa. Para poder valorar este aspecto, es necesario valorar la igualdad del ecosistema. Existen múltiples índices que valoran la igualdad, entre ellos Pielou o Shannon-Weaver, Simpson y Camargo. La forma de calcularlos difiere entre ellos, sin embargo, todos nos hablan del mismo fenómeno.

Por otro lado, la diversidad beta valora que tan diferentes son dos ecosistemas. De la misma manera que la diversidad alfa, la manera más sencilla de comparar dos grupos sería buscar el número de especies únicas para cada grupo. El índice de disimilaridad Bray-Curtis toma en cuenta las abundancias relativas de cada especie y compara la composición entre ambos grupos. Un valor de 0 significa que las muestras son iguales (no hay disimilaridad), mientras que un valor de 1 significa que las muestras no comparten ninguna característica (son completamente disimilares). El índice Jaccard, por su lado, se refiere al grado de similaridad entre dos conjuntos. De manera matemática se puede definir como:

$$J(A, B) = \frac{A \cap B}{A \cup B}$$

Para obtener la distancia de Jaccard, la cual normalmente se refiere al grado de disimilaridad entre ambos conjuntos, únicamente restamos 1 al índice. Es importante notar que esta métrica toma en cuenta si un factor está presente o ausente, sin importar su abundancia relativa. Finalmente, la distancia de UniFrac toma en cuenta la distancia filogenética entre las especies y, cuando se usa la versión ponderada, se toman en cuenta las abundancias relativas. Existen muchos otros índices de diversidad alfa y beta los cuales no se discutieron en esta sección. La selección del índice a utilizar depende de la hipótesis que se esté probando y la preferencia del investigador.

## 1.6 Microbioma nasosinusal y su importancia clínica

La biota nasosinusal influye en el correcto funcionamiento de la nariz y los SPN. Cuando existe alguna alteración en su composición, se altera el balance entre los microorganismos comensales y el huésped y puede resultar en enfermedad para el paciente. En las secciones anteriores, se han detallado algunas de las alteraciones que ocurren en el microbioma tanto en pacientes con patología aguda como crónica. Uno de los objetivos que se tiene con este tipo de investigaciones es encontrar nuevas estrategias terapéuticas para el control de enfermedades como la RSC. A pesar de ser un campo relativamente nuevo en Otorrinolaringología, existe evidencia sobre cómo la modificación de la biota nasosinusal puede ayudar a pacientes con patología nasosinusal, principalmente RSC.

En primer lugar, el conocimiento del microbioma nasosinusal puede ayudar a predecir resultados postoperatorios. Ramakrishnan y cols. (50) investigaron el microbioma de pacientes con RSC y controles sanos. Reclutaron 56 pacientes con RSC y 26 controles para el análisis inicial. Dentro del grupo de RSC, 27 sujetos cumplieron criterios para análisis postoperatorio. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre pacientes con RSC y controles, observaron que la presencia de secreción purulenta y asma se asociaba a diferentes perfiles microbiológicos; los pacientes con asma y RSC tenían mayor AR de *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Ralstonia*, mientras que los pacientes con secreción purulenta tenían mayor AR de bacterias anaerobias. Dentro del grupo de pacientes postoperados, encontraron que los pacientes con resultados subóptimos tenían una menor AR de *Actinobacteria* en comparación con pacientes con resultados óptimos (22.5% AR vs 7.8% AR,  $p = 0.016$ ). En particular, en género *Corynebacterium* se encontraba

enriquecido en los pacientes con resultados óptimos, mientras que *Staphylococcus* estaba enriquecido en el grupo de resultados subóptimos.

Muchos trabajos han buscado relacionar el microbioma con escalas de calidad de vida, sin embargo, los resultados son poco concluyentes. En una revisión sistemática por Wang y cols. (48) se analizaron 9 estudios que evaluaban el microbioma nasosinusal con desenlaces clínicos, incluidas escalas de calidad de vida. Uno de los estudios encontró que *Acinetobacter* se correlacionaba con menores puntuaciones en SNOT-22, mientras que *Pseudomonas* se asociaba a una mayor puntuación en SNOT-22. Dos estudios encontraron una correlación entre *Corynebacterium* y menores puntuaciones en SNOT-22, mientras que un estudio encontró mayores puntuaciones en SNOT-22 en pacientes enriquecidos con *Corynebacterium*. El último estudio mencionado incluyó un modelo murino en donde se demostró que *Corynebacterium tuberculostearicum* puede inducir rinosinusitis (5). De manera interesante, *Staphylococcus* no se relacionó con peores resultados en calidad de vida o empeoramiento clínico. A pesar de esos resultados, no se pueden obtener conclusiones claras debido al limitado número de estudios y bajo número de pacientes. Es importante resaltar que los estudios incluidos utilizaban diferentes tecnologías para la secuenciación y no se especifican las regiones variables analizadas, lo cual hace imposible el realizar un metaanálisis.

Dadas las alteraciones mencionadas, el uso de probióticos podría ayudar a balancear la biota nasosinusal y mejorar el perfil inflamatorio. Estudios animales han demostrado que el tratamiento con *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus epidermidis* disminuyen la inflamación causada por *Corynebacterium tuberculostearicum* y *Staphylococcus aureus* respectivamente (73,74). Desgraciadamente, no se han podido replicar estos resultados en humanos. Mukerji y cols. (75) realizaron un ensayo clínico doble ciego en donde se administró *Lactobacillus rhamnosus* R0011 en tabletas masticables dos veces al día por cuatro semanas vs placebo. A las ocho semanas de seguimiento, no observaron diferencias significativas en las puntuaciones de SNOT-20 o en frecuencia de los síntomas.

En población pediátrica, probióticos orales con *E. faecalis* han demostrado disminuir la recurrencia de RSA. En un ensayo no aleatorizado realizado por Kitz y cols. (76) niños con rinosinusitis recurrentes recibieron probióticos de *E. faecalis* durante 8 semanas junto con el tratamiento estándar (amoxicilina durante 7 días y tratamiento sintomático) y se compararon contra pacientes que recibieron tratamiento estándar únicamente. A los 6 meses, el grupo experimental presentó un menor número de eventos y una menor duración en los mismos. Los resultados de este estudio deben de tomarse con reserva ya que tiene un alto riesgo de sesgo, sin embargo, apoya el uso de probióticos orales para prevención de cuadros de RSA. Un segundo ensayo clínico aleatorizado y doble ciego por Habermann cols. (77) comparó un probiótico de *E. faecalis* durante seis meses contra placebo en niños con rinosinusitis recurrente. El desenlace primario fue el número de episodios de RSA a los 8 meses de seguimiento. Los pacientes en el brazo experimental tuvieron una reducción del 50% en el número de episodios al año en comparación al grupo placebo. La duración y gravedad de los episodios no mostraron diferencias entre los grupos. Estos resultados apoyan el uso de probióticos orales para prevenir episodios de RSA en niños.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los virus respiratorios son capaces de alterar la composición de la biota nasosinusal, favoreciendo la expansión de bacterias patológicas. Estas alteraciones probablemente persisten en pacientes predisuestos y resultan en un proceso inflamatorio crónico en SPN. No se conocen a detalle las alteraciones en la composición del microbioma que ocurren en RSAV y si éstas tienen alguna relación con las alteraciones encontradas en RSC.

El presente trabajo buscará contestar la pregunta ¿Cuáles son las diferencias en la composición del microbioma de pacientes con RSAV y RSC?

## 3. JUSTIFICACIÓN

Dado el tiempo de evolución de la RSC, la baja probabilidad que tiene una RSAV de progresar a una RSC y los costos de secuenciación actuales, realizar un estudio de cohorte es extraordinariamente costoso y poco eficiente. Por otro lado, los estudios descriptivos pueden ayudar a explicar la transición entre RSAV y RSC. A pesar de contar con sesgos metodológicos intrínsecos al tipo de diseño, sus resultados pueden sugerir nuevas preguntas de investigación que podrán ser contestadas con diseños más robustos.

En el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INRLGII) contamos con el equipo necesario y personal médico capacitado para desarrollar este proyecto. Se colaboró con el Departamento de Otorrinolaringología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en el diseño y realización del estudio. Esta colaboración facilitó el reclutamiento de pacientes, ya que ambas instituciones son centros de referencia de Otorrinolaringología a nivel nacional. También colaboró con el Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes (CNRPyC) del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Su ayuda permitió realizar el trabajo de laboratorio y análisis bioinformática siguiendo los más altos estándares de calidad.

Cabe resaltar que no existen trabajos sobre microbioma nasosinusal en México. Debido a que la composición del microbioma puede variar por localización geográfica, es fundamental contar con

datos nacionales para poder aplicar el conocimiento generado a nivel mundial en nuestros pacientes.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo principal**

Comparar la composición del microbioma en pacientes con RSAV y RSC. De manera específica se buscará:

- Comparar los índices de diversidad filogenética (índice de Faith) e igualdad en pacientes con RSAV y RSC.
- Comparar la diversidad beta (índices de Bray-Curtis y Jaccard) en pacientes con RSAV y RSC.
- Determinar si existen bacterias con AR significativamente diferentes en pacientes con RSAV y RSC.

### **4.2 Objetivos secundarios**

Determinar si existe una asociación entre la diversidad alfa y la sintomatología nasosinusal. En particular, se buscará determinar si los índices de diversidad filogenética e igualdad se asocian cambios en la puntuación de SNOT-22.

## **5. HIPÓTESIS**

La composición del microbioma será diferente en pacientes con RSAV y RSC. De manera específica, se encontrarán diferencias en los índices de diversidad alfa y beta según el tipo de rinosinusitis y se encontrará una asociación entre los índices de diversidad y la puntuación de SNOT-22.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño de estudio, población y muestra

Se diseñó un estudio de corte transversal que incluyó pacientes adultos (18 años o mayores) con diagnóstico de RSAV y RSC valorados en el INRLGII y el INER de diciembre 2019 a febrero 2020. El tipo de muestreo fue a conveniencia. Todos los pacientes fueron valorados por un Otorrinolaringólogo y el diagnóstico se realizó de acuerdo a los criterios de la AAO-HNS (2). Se excluyeron pacientes con cirugía de SPN en los últimos dos años, inmunodeficiencias primarias de cualquier tipo, pacientes con diagnóstico de VIH o bajo tratamiento antirretroviral, pacientes con trastornos de la motilidad ciliar (Discinesia ciliar primaria o Síndrome de Kartagener), pacientes con poliposis nasosinusal debida a otros padecimientos (fibrosis quística, granulomatosis eosinofílica, síndrome de Woakes), pacientes con patología nasosinusal no relacionada a rinosinusitis (tumores nasosinuales, sinusitis maxilar odontógena, mucocelos, etc) y pacientes con uso de antibióticos en los últimos dos meses.

El estudio fue aprobado por el comité de investigación interinstitucional, con número de aprobación C15-19. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes previo a su inclusión en la investigación.

### 6.2 Métodos de recolección de las muestras

Todos los candidatos fueron valorados por un otorrinolaringólogo de manera inicial. En caso de ser incluidos, contestaban una versión impresa del SNOT-22 validada al español (78) y eran revisados de manera endoscópica. El grado de poliposis se valoró en cada lado utilizando la escala de Lildholdt (79): 0 ausencia de pólipos, 1 (leve) pólipos no sobrepasan el borde superior del cornete inferior, 2 (moderado) pólipos entre el borde superior e inferior del cornete inferior, 3 (grave) pólipos sobrepasan el borde inferior del cornete inferior. Los pacientes fueron catalogados como poliposis leve, moderada o grave según el puntaje máximo obtenido en ambos lados (por ejemplo, si un paciente tenía calificación de 2 en un lado y 3 en el otro, era clasificado como grave). Durante la exploración endoscópica se obtenía un hisopado de meato medio con la siguiente técnica: se introducía un hisopo de dacron estándar en el meato medio y se giraba durante 5 segundos, evitando tocar el vestíbulo y la mucosa septal en el proceso. Una vez obtenida la

muestra, los hisopos se colocaban en tubos estériles con solución salina y 10 microL de QIAGEN Proteinas K con actividad 600 mAU/ml, para ser transportados bajo refrigeración al Laboratorio de Infectología del INR. Si el paciente refería molestias previo a completar la toma de muestra, se suspendía el procedimiento y se descartaba el hisopado. En el laboratorio, las muestras se congelaban a -80°C hasta su procesamiento.

## 6.3 Procesamiento de las muestras

### 6.3.1 Extracción de DNA

Una vez que se obtuvieron todas las muestras, se extrajo el DNA utilizando un Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. El procedimiento se realizó bajo condiciones estériles, utilizando equipo nuevo entre muestras para evitar contaminación.

### 6.3.2 Preparación de librerías y secuenciación de V3-V4 16s rRNA

La concentración de DNA se verificó mediante Nanodrop y por Qubit en el laboratorio de Secuenciación del CNRPYC (Tabla Sup. 1). Posteriormente, se realizó una PCR para la amplificación dirigida de la región V3-V4 del gen 16SrRNA bajo las siguientes condiciones:

Reactivo	X 1 rxn	Marca del reactivo	Paso	Temperatura	Tiempo	
H <sub>2</sub> O GBM	17.4 µL	Invitrogen	25 ciclos (paso 2 al 4):	94 °C	2 min	
Buffer 10x	2.5 µL	Invitrogen				
MgSO 50mM	1 µL	Invitrogen		2	94°C	30 seg
dNTPs10mM	0.5	Invitrogen				
Oligo Fwrd <sup>2</sup> 10 µM	0.5	IDT				
Oligo Rvrs <sup>2</sup> 10 µM	0.5	IDT	3	55°C	30 seg	
Platinum TaqPol High Fidelity	0.1 µL	Invitrogen	4	68°C	40 seg	
DNA bacteriano 5 ng µL	2.5 µL	---	5	72°C	5 min	
Vol. Total	25 µL					

**Tabla 1.** Condiciones y programa de amplificación de PCR

La secuencia utilizada para los primers en esta reacción fue la siguiente: 16S amplicon PCR forward primer: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG; 16S amplicon PCR reverse primer: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. Una vez obtenidos los productos por PCR, se purificaron por medio de perlas Ampure XP. Se corrió una electroforesis en

chip (Bioanalizador) de 13 muestras al azar, con la finalidad de verificar la calidad del producto de PCR y su tamaño. Dos de las 12 muestras elegidas aleatoriamente no presentaron señal del pico que indica su longitud en pb (Figura Sup. 1).

Una vez obtenido el producto de PCR purificado se procedió a realizar las librerías de las muestras, siguiendo el protocolo establecido por Illumina para la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16SrRNA. Se realizó la cuantificación por Qubit con la finalidad de conocer la concentración en la que se encontraban (Tabla Sup. 2). Una vez cuantificadas se seleccionaron aleatoriamente 4 muestras y se realizó una electroforesis en chip (Figura Sup. 2) con la finalidad de poder verificar una adecuada ligación de los adaptadores al producto de PRC y si se había obtenido las pares de bases (pb) necesarias para continuar con el proceso.

Las librerías fueron normalizadas y con ellas se preparó el pool, del cual se tomaron 3 volúmenes de 50 microlitros, con la finalidad de purificar y verificar la concentración y pb a las que se encuentra, dando como resultado una adecuada concentración nM (Figura Sup. 3). Una vez corroborada la viabilidad del pool, se procedió a realizar la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16SrRNA utilizando la plataforma Illumina MiSeq según las indicaciones del proveedor. Se obtuvieron archivos demultiplexados fastq de cada muestra para su análisis bioinformático.

## **6.4 Análisis bioinformático**

Los archivos demultiplexados fastq fueron procesados utilizando QIIME 2 (q2cli versión 2020.2.0). Se realizó un primer control de calidad para verificar la integridad de las secuencias forward y reverse. Se realizó un segundo control de calidad (denoising) y formación de secuencias de variantes de amplicon (ASV) utilizando Dada2 (80) con los siguientes parámetros (trim-left=20; trunc-len=40). Las ASV han demostrado mayor rendimiento en el número de especies detectadas con menor probabilidad de error en comparación con la formación de OTUs. A diferencia de las OTUs, el utilizar ASV permite la comparación entre estudios, independientemente de la base de datos o muestras de cada investigación (81,82). Para eliminar posibles errores de secuenciación y datos extremos, la tabla se filtró para eliminar muestras con menos de 1500 secuencias y ASV que solo aparecían en una muestra, con menos de 10 secuencias de manera global. La asignación

taxonómica se realizó utilizando un clasificador entrenado con un algoritmo “näive Bayes” utilizando la base de datos SILVA v.132 (abril 2018).

Se escogió una profundidad de rarefacción de 6000 previo a continuar con el análisis para comprobar una adecuada profundidad de muestreo. Las curvas de rarefacción para el índice de Shannon, número de ASVs e índice de diversidad filogenética confirmaron una adecuada profundidad para todas las muestras (Figuras Sup. 6). Para valorar la diversidad beta se calculó el índice de disimilaridad de Bray-Curtis y la distancia de Jaccard. El análisis completo se puede revisar en la sección 11.2 Pipeline de QIIME 2 del material suplementario

## **6.5 Análisis estadístico**

Las diferencias en la diversidad alfa entre los grupos de enfermedad se valoraron con una prueba de Kruskal-Wallis. Se realizó una correlación de Spearman entre los índices de diversidad y las variables continuas para buscar posibles asociaciones. Específicamente, para el grado de poliposis se sumó la puntuación por lado y se utilizó el total en la correlación. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis y la distancia de Jaccard. La diversidad beta se comparó con un análisis múltiple de la varianza por permutación (PERMANOVA). El análisis se realizó utilizando QIIME 2 y R v 4.0.0.

## 7. RESULTADOS

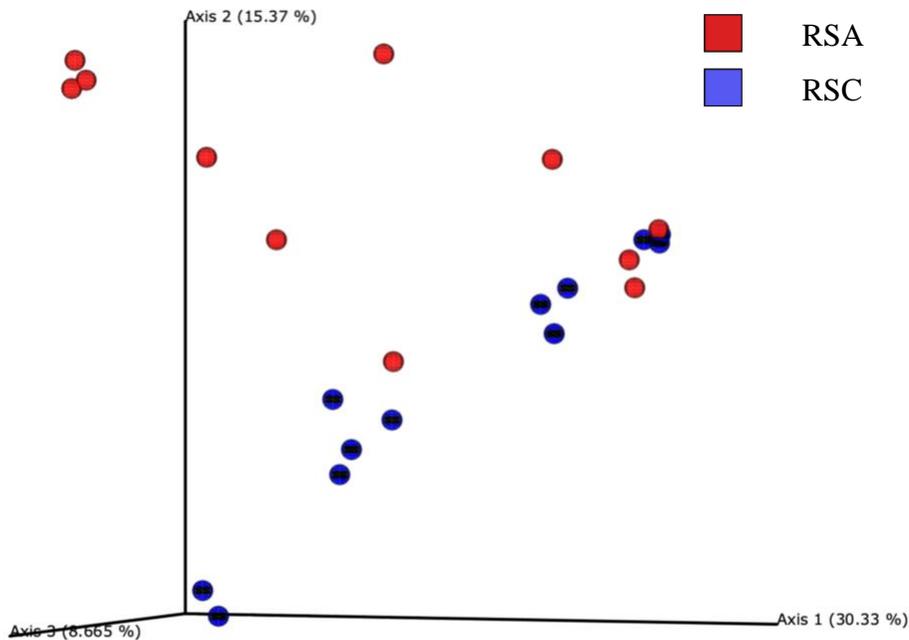
### 7.1 Características demográficas de la muestra

Se obtuvieron 27 muestras para el estudio; 13 de pacientes con RSAV y 14 de pacientes con RSC. Dos muestras no amplificaron posterior a la primera PCR y fueron descartadas (una muestra de RSC y otra de RSA; Figura Sup. 1), para un total de 25 muestras analizadas. Debido a la mala calidad de las secuencias reversas, se decidió realizar el análisis con las secuencias forward únicamente (Figura Sup. 4 y 5). El 52% (n = 13) de los pacientes fueron mujeres; 50% (n = 6) en el grupo de RSAV y el 54% (n = 7) en el grupo de RSC. El rango de edad para el grupo de pacientes con RSAV fue de 18-70 años (media  $33 \pm 15$  años) y de 29-79 años (media  $55 \pm 14$  años) para los pacientes con RSC. Ninguno de los pacientes era fumador actual o tenía patología nasosinusal además de rinosinusitis. La mediana de la puntuación de SNOT-22 para ambos grupos fue de 47 (rango 5-87). No se encontraron diferencias en las puntuaciones de SNOT-22 globales (RSAV mediana 47 (13-57); RSC mediana 49 (5-87); p = 0.72) o el subdominio nasal del SNOT-22 (RSAV mediana 21 (10-32); RSC mediana 24 (5-44); p = 0.95) entre los grupos.

Dentro del grupo de RSC, el 92% tenían diagnóstico de EREA (n = 12) y 69% (n = 9) tenían antecedentes de cirugía endoscópica de SPN hace más de dos años. El 38% (n = 5) de los pacientes con RSC tenían poliposis grave, 38% (n = 5) poliposis moderada, 15% (n = 2) poliposis leve y 8% (n = 1) no tuvieron pólipos al momento de la revisión.

### 7.2 Beta diversidad en pacientes con RSAV y RSC

Se realizó una PCoA utilizando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis para valorar el grado de disimilaridad por el tipo de rinosinusitis (Figura 1). En general, las muestras de pacientes con RSC tienen contribuciones bajas del PC2 y altas del PC1, mientras que las provenientes de pacientes con RSAV tienen una contribución alta del PC2 y baja del PC1. Los resultados del PERMANOVA mostraron diferencias significativas según el tipo de rinosinusitis (pseudo F = 2.36618; p = 0.019).



**Figura 1.** PCoA utilizando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis. Las muestras se agrupan según el tipo de rinosinusitis. Los resultados del PERMANOVA mostraron diferencias significativas según el tipo de patología (pseudof  $F = 2.36618$ ;  $p = 0.019$ ).

Esta agrupación se confirmó cuando se utilizaba la distancia de Jaccard (pseudof  $F = 2.76353$ ;  $p = 0.001$  (Figuras Sup. 7). Ninguna de las variables cualitativas explicaba la variabilidad observada en el PCoA.

### 7.3 Composición taxonómica del microbioma en RSAV y RSC

La asignación taxonómica se realizó utilizando la base de datos de Silva v 132. La composición del microbioma varía entre pacientes según el tipo de rinosinusitis. Los phyla más frecuentes en RSAV son *Proteobacteria* (55%), *Firmicutes* (42%) y *Actinobacteria* (2%). En RSC, *Firmicutes* (58%) es el phylum más frecuente, seguido de *Proteobacteria* (34%) y *Actinobacteria* (6%) (Figura 2).

La figura 3 muestra los resultados según el género. Ambos tipos de rinosinusitis tienen predominio de *Staphylococcus* (RSAV 41%; RSC 47%). En RSAV, *Pseudomonas* (36%) es el segundo género más frecuente, seguido de las familias *Burkholderiaceae* (8.4%) y *Enterobacteriaceae* (6%).

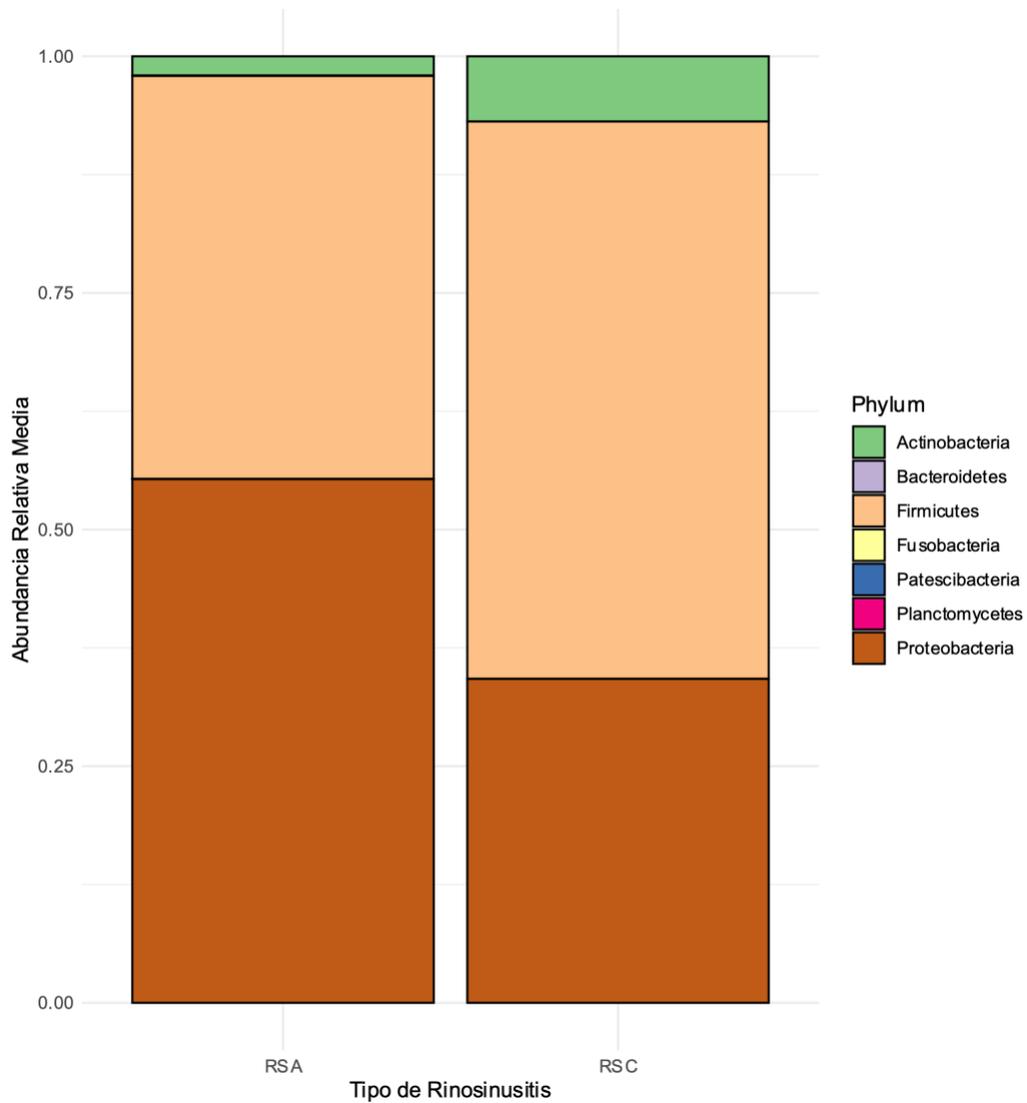


Figura 2. Gráfica de barras con las phyla más frecuentes según el tipo de rinosinusitis.

*Corynebacterium* representa el 2% de las secuencias. La distribución es más variada en el caso de RSC; la familia de *Enterobacteriaceae* (19%) es la segunda en frecuencia, seguida de los géneros *Bacillus* (8%), *Corynebacterium* (7%) y la familia *Pasteurellaceae* (5%). Los géneros más frecuentes junto con su AR se pueden consultar en la Tabla Sup. 2 y la Figura Sup. 8.

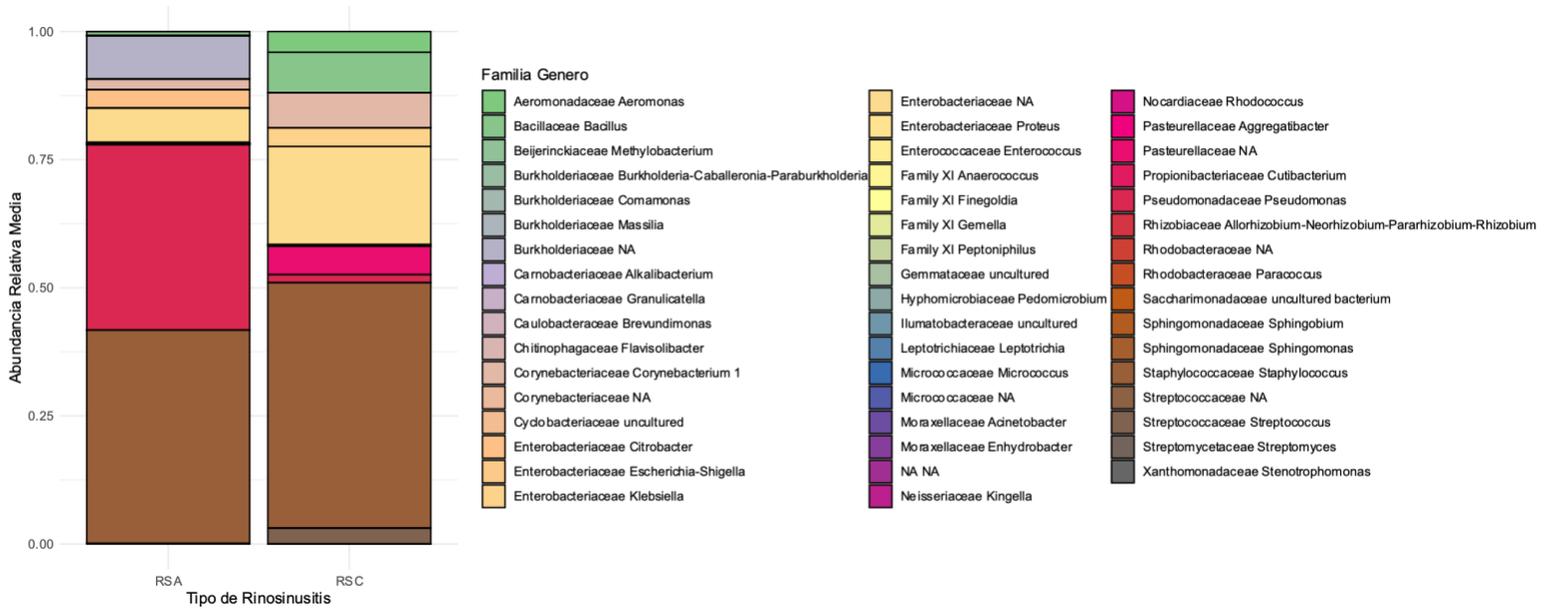
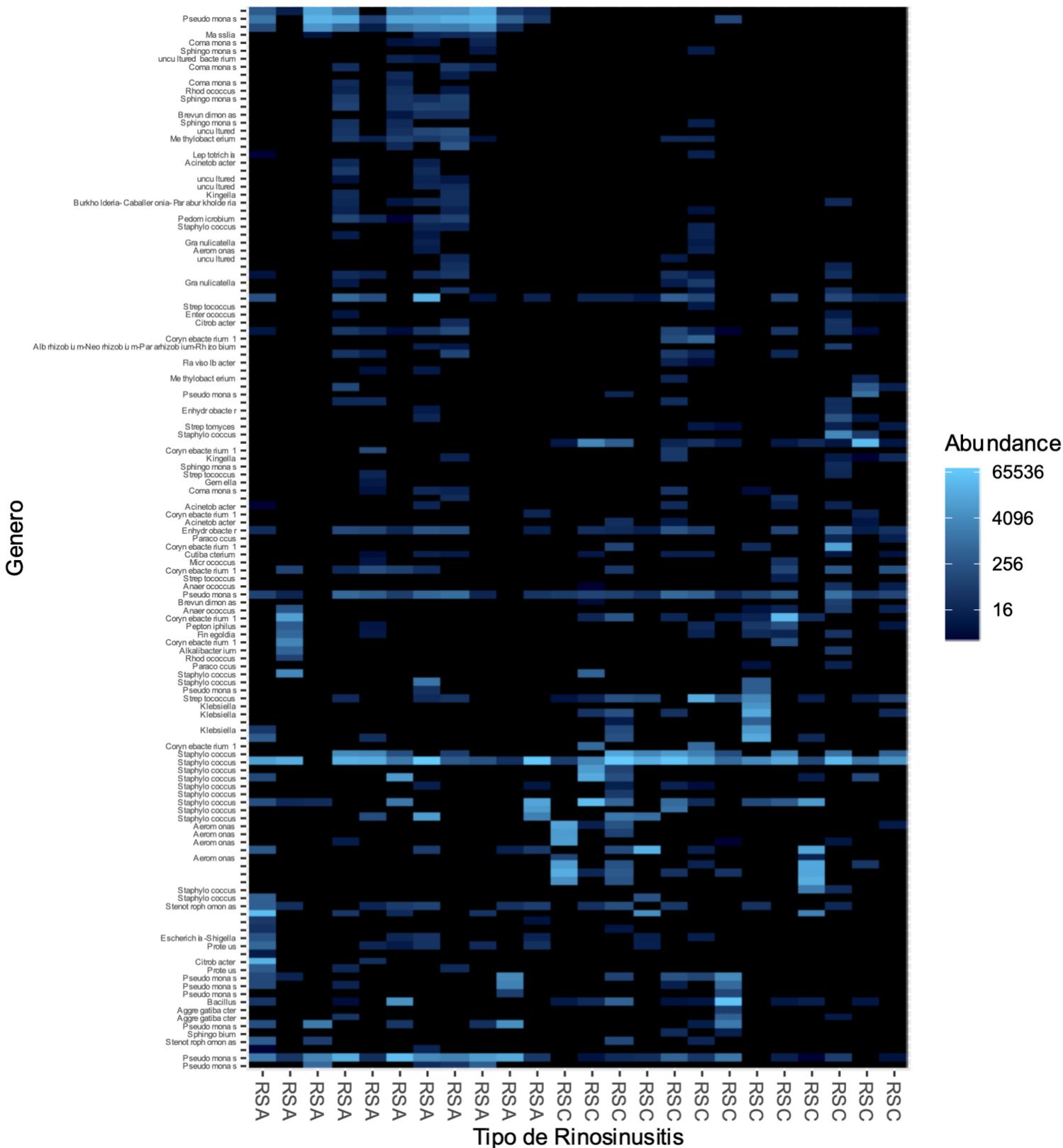


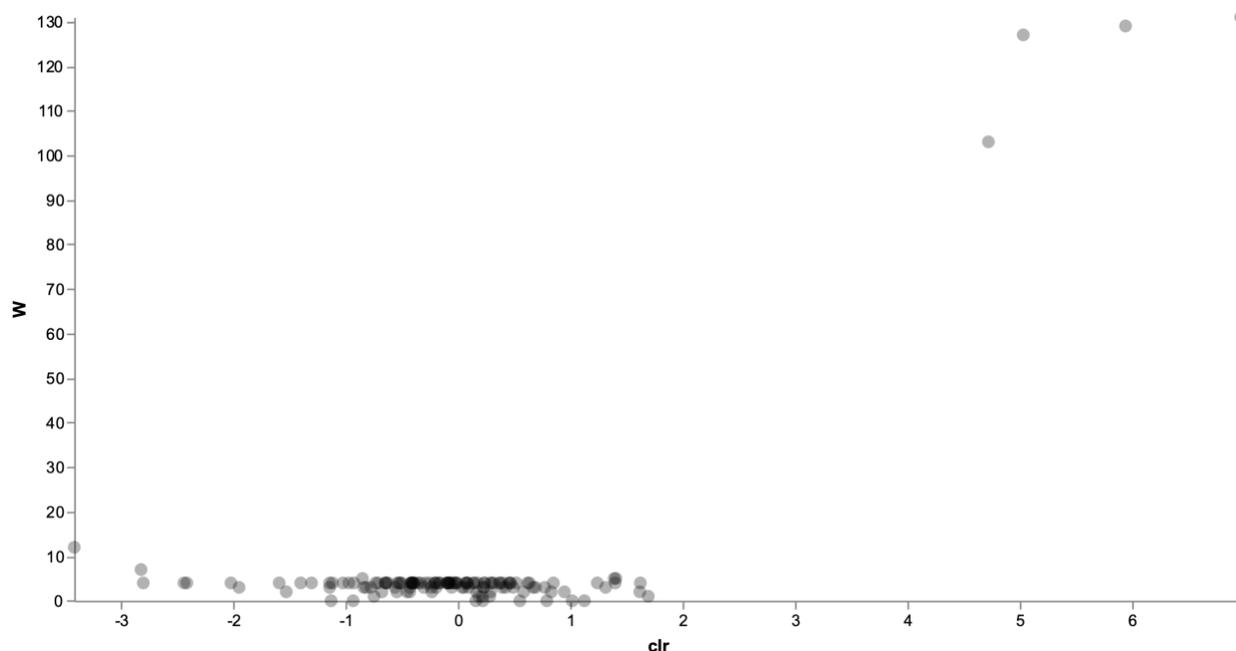
Figura 3. Gráfica de barras con los géneros más frecuentes según el tipo de rinosinusitis.

Para explorar las diferencias en AR según el tipo de rinosinusitis, se elaboró un mapa de calor (Figura 4). Las muestras individuales según el tipo de sinusitis se encuentran en el eje x, mientras que las bacterias ordenadas por su distancia de Jaccard componen el eje Y. El contenido de cada celda representa su abundancia. La mitad superior del mapa de calor muestra cómo el género *Pseudomonas* tiene mayor abundancia en RSAV en comparación con RSC. Géneros relacionados como *Sphingomonas* y *Comamonas* se encuentran con mayor frecuencia en RSAV. De manera interesante, *Burkholderia* se encuentra mayormente en RSAV. La parte inferior del mapa de calor incluye a bacterias del género *Staphylococcus*, *Klebsiella*, y otras enterobacterias. En esta sección, no observamos patrones evidentes en la distribución según el tipo de rinosinusitis.

Dadas las características observadas, se buscaron diferencias en los índices de diversidad alfa según el tipo de rinosinusitis. No se encontraron diferencias significativas en el índice de diversidad filogenética (Kruskal-Wallis  $H = 0.0411$ ,  $p = 0.83$ ) o el índice de igualdad (Kruskal-Wallis  $H = 1.1488$ ,  $p = 0.28$ ) según el tipo de rinosinusitis.



**Figura 4.** Mapa de calor para los diferentes géneros según el tipo de rinosinusitis. En la parte superior izquierda se observa cómo los pacientes con RSAV tienen mayor abundancia de *Pseudomonas* en comparación con la RSC. Igualmente, la mitad superior muestra múltiples especies con abundancias pequeñas presentes en RSAV, pero no en RSC. Lo anterior justifica los resultados significativos en beta diversidad.



**Figura 5.** Gráfica de volcán para resultados de ANCOM. En el eje de las x encontramos la puntuación F, la cual nos habla de la diferencia de un ASV particular con el resto. El eje de las y representa el estadístico W, el cual habla de la fuerza de la asociación. En la esquina superior derecha se observan tres puntos, los cuales representan de derecha a izquierda el género *Pseudomonas* y dos bacterias de la familia *Burkholderiaceae*, con género no identificado. Se observa un cuarto punto por debajo de los tres mencionados, el cual no resultó significativo.

Para identificar las bacterias con distribuciones diferenciales entre los tipos de rinosinusitis, se realizó un análisis de la composición del microbioma (ANCOM) (Figura 5). La gráfica muestra tres ASV en la esquina superior derecha, con un cuarto punto por debajo de ellas. Los tres puntos superiores representan al género *Pseudomonas* ( $W = 131$ ) y dos bacterias de la familia *Burkholderiaceae* con género no identificado ( $W = 129$  y  $W = 127$  respectivamente). El cuarto punto corresponde a otro tipo de *Pseudomonas* pero no tiene una asociación significativa ( $W = 103$ ). Los resultados anteriores indican que *Pseudomonas* y la familia *Burkholderiaceae* tienen AR diferentes en pacientes con RSAV y RSC de manera significativa.

## 7.4 Asociación entre variables clínicas e índices de diversidad

Se correlacionó la edad, la puntuación de SNOT-22, el subdominio nasal de SNOT-22 y la puntuación endoscópica con los índices de diversidad alfa sin encontrar asociaciones significativas (Tabla 2).

Variable clínica	Diversidad filogenética		Índice de igualdad	
	rho	p	rho	p
Edad	-0.17	0.41	0.03	0.86
SNOT-22	-0.04	0.82	0.27	0.19
SNOT-22 sub. Nasal	-0.13	0.53	0.16	0.44
Endoscopia	0.24	0.4	-0.15	0.62

**Tabla 2.** Correlaciones entre variables clínicas e índices de diversidad alfa. No se encontraron asociaciones significativas entre las variables.

No se encontraron diferencias en el índice de diversidad filogenética de Faith según el antecedente de cirugía (Kruskal-Wallis  $H = 1.49$ ,  $p = 0.22$ ) o el diagnóstico de EREA (Kruskal-Wallis  $H = 0.053$ ,  $p = 0.81$ ) o en el índice de igualdad para las mismas variables (Kruskal-Wallis  $H = 0.25$ ,  $p = 0.61$ ;  $H = 0.26$ ,  $p = 0.10$ , respectivamente). Finalmente, no se observaron agrupaciones en ninguno de los PCoAs de acuerdo con el antecedente de cirugía, grupo de edad o diagnóstico de EREA.

## 8. DISCUSIÓN

Las alteraciones en el microbioma de pacientes con rinosinusitis es un tema complejo, que constantemente está evolucionando. Múltiples factores, como la toma de muestra, el tipo de región variable secuenciada y las diferentes herramientas bioinformáticas, pueden modificar los resultados y complicar la comparación entre estudios. Es por esto que, en los últimos años, se ha tratado de unificar la metodología y realizar meta análisis de la evidencia publicada (49,51). Una alternativa que podría facilitar la comparación entre estudios es el análisis de “microbiotipos nasosinuales”, similar a los enterotipos observados en microbioma intestinal (83). Bassiouni y cols. (84) realizaron un subanálisis del set de datos del ISMS para tratar de encontrar microbiotipos específicos. Utilizando un algoritmo de inteligencia artificial para clasificar los datos, lograron describir tres microbiotipos nasosinuales; el microbiotipo 1 compuesto en su mayoría por *Corynebacterium*, el microbiotipo 2, en donde predomina *Staphylococcus* y el microbiotipo 3,

compuesto por múltiples géneros. Dentro del microbiotipo 3 se describen varios subtipos dependiendo del género predominante; 3S para *Streptococcus*, 3H para *Haemophilus*, 3M para *Moraxella*, 3P para *Pseudomonas* y 3O en donde otras bacterias componen el microbioma. Los autores no encontraron asociaciones entre el tipo de sinusitis, región geográfica o variables clínicas y los diferentes biotipos.

Este estudio demostró diferencias significativas en la composición del microbioma de pacientes con RSAV en comparación con RSC. El género *Pseudomonas* y la familia *Burkholderiaceae* fueron significativamente más frecuentes en RSAV, similar a lo que encontraríamos en un microbiotipo 3, sin embargo, *Staphylococcus* representó 41% de las secuencias observadas, lo cual sugeriría un microbiotipo 1. Por lo tanto, es posible que estos resultados representen un estado de transición entre un microbiotipo 1 y 3. Sorprendentemente, los géneros más asociados a RSA bacteriana (*Streptococcus*, *Moraxella* y *Haemophilus*) se encontraron en menos del 1% de las secuencias. Estos resultados llaman mucho la atención y probablemente se expliquen por el tipo de pacientes incluidos. Los sujetos con RSAV en nuestro estudio fueron hisopados en los primeros tres días de presentar sus síntomas y nunca evolucionaron a una RSA bacteriana. Estudios posteriores deberán de analizar los cambios en el microbioma nasosinusal de manera longitudinal para corroborar si existen cambios en el microbiotipo durante la RSA.

Fuera de pacientes con fibrosis quística (85), el género *Pseudomonas* no se encuentra con frecuencia en RSA, sin embargo, frecuentemente se asocia con exacerbaciones de RSC. Zi Yang Jiang y cols. (21) analizaron de manera retrospectiva los cultivos de pacientes con exacerbaciones de RSC y encontraron que las dos bacterias más frecuentes eran *Staphylococcus aureus* (29.5%) y *Pseudomonas aeruginosa* (23.8%). En un estudio más reciente, Vandelaar y cols. (86) analizaron de manera retrospectiva los datos de secuenciación del gen 16SrRNA de pacientes con exacerbaciones de RSC. Los autores encontraron una prevalencia del (20%) del género *Pseudomonas*, con una AR media del 15%.

Diferentes virus respiratorios interactúan con *Pseudomonas* en el epitelio respiratorio. La infección por RSV puede inducir la producción de biopelículas por *Pseudomonas aeruginosa* en un modelo

*in vitro* (87). Dado que los virus respiratorios pueden ser causantes de exacerbaciones de RSC (88), es probable que estas interacciones virales y bacterianas jueguen un papel importante en las exacerbaciones de cuadros respiratorios. En nuestro estudio, solo incluimos pacientes con infecciones virales. Posiblemente, la presencia de virus respiratorios facilitó la expansión de *Pseudomonas*, pero debido a la naturaleza del estudio, no podemos concluir al respecto. Desafortunadamente, no contamos con información etiológica sobre los virus involucrados en nuestros pacientes. La fase de reclutamiento se llevó a cabo durante el invierno, lo cual probablemente influyó el tipo de virus involucrados. Esta información nos habría permitido establecer conclusiones más robustas y hubiera ayudado a evidenciar posibles interacciones virales y bacterianas, por lo que deberá de ser explorado en estudios posteriores.

Estudios previos han mostrado que *Burkholderia* disminuye en RSC y se asocia a un microbioma “sano”. Como se mencionó en el marco teórico, su presencia ayuda a mantener la estabilidad de la comunidad bacteriana (49). En nuestro estudio, menos del 1% de las secuencias de pacientes con RSC correspondieron a la familia *Burkholderiaceae*, mientras que representaron el 8% de las secuencias en RSAV. Probablemente, estos resultados se deban a una pérdida de *Burkholderiaceae* en casos crónicos y no una expansión en los casos agudos, ya que no se suelen asociar a enfermedad. De esta forma, los pacientes crónicos carecerían de una familia “protectora” en comparación con sujetos con patología aguda viral. Dado que no contamos con grupo control de sujetos sanos, es difícil poder concluir al respecto.

Las muestras provenientes de RSC tenían un predominio de *Staphylococcus* y una baja AR de *Corynebacterium*, similar a un microbiotipo 2. Esta composición es congruente con lo publicado en series anteriores (6,50,52,89). *Staphylococcus aureus* contribuye al desarrollo de RSC al producir biopelículas, secretando exotoxinas que funcionan como superantígenos, compitiendo por recursos con comensales benéficos y estimulando una respuesta Th2 en la mucosa nasosinusal (7,41,90). A pesar de esto, estudios como el ISMS no encontraron diferencias en la cantidad de *Staphylococcus* entre sujetos sanos y pacientes con RSC. Una posible explicación a estos resultados aparentemente contradictorios es que las técnicas actuales de secuenciación no permiten definir la especie en la mayor parte de los casos. Estudios *in vitro* han demostrado que

*Staphylococcus epidermidis* puede inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* al secretar la proteasa de serina *Esp* (91). Igualmente, ratones pretratados con *Staphylococcus epidermidis* desarrollan una menor hiperplasia de células caliciformes cuando se les induce rinosinusitis con *Staphylococcus aureus* (92). Es probable que en estados de salud tengamos una gran proporción de *Staphylococcus* coagulasa negativo y que, durante la RSC, esta comunidad sea reemplazada por *Staphylococcus aureus*. Otras técnicas metagenómicas, como la secuenciación shotgun, podría ayudar a resolver este punto. La inclusión de datos funcionales también ayudará a diferenciar entre los perfiles de sujetos con RSC y personas sanas.

La AR de *Corynebacterium* está disminuida en ambos tipos de rinosinusitis. No podemos saber si el resultado se debe a una prevalencia elevada de microbiotipo nasosinusal tipo 2 o es consecuencia directa de la enfermedad, ya que no contamos con grupo control. A la fecha, no existen datos sobre la composición del microbioma nasosinusal en población mexicana, sin embargo, estudios previos han demostrado que la disminución de *Corynebacteriaceae* se asocia a estados de enfermedad (49). *Staphylococcus aureus* compite por el mismo nicho ecológico que *Corynebacterium*, por lo que su incremento se asocia a una disminución en la AR de *Corynebacterium*. De la misma manera, cuando incrementa *Corynebacterium* disminuye la colonización por *Staphylococcus*. Este fenómeno se ha corroborado en humanos; un estudio con voluntarios sanos demostró que la inoculación nasal de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* disminuye la colonización por *Staphylococcus aureus*, incluyendo cepas resistentes (93).

*Cutibacterium* representó un porcentaje mínimo de las secuencias, similar a lo descrito en el ISMS (51). Este género comúnmente se encuentra en la piel y otras regiones con glándulas sebáceas (94). En nuestro estudio, las muestras se tomaron de meato medio, teniendo especial cuidado en no contaminar con la piel del vestíbulo nasal. Es poco probable que este género participe de manera importante en la fisiología nasosinusal dada su baja AR, sin embargo, la secuenciación de la región V4 tiene poca resolución en cuanto a géneros encontrados en la piel (95). Por lo tanto, no podemos descartar por completo el papel de *Cutibacterium* en la fisiología nasosinusal. Estudios posteriores deberán de utilizar herramientas que no tengan las limitaciones derivadas de la secuenciación de la región V3-V4 para poder obtener conclusiones robustas.

Los índices de diversidad alfa fueron similares en ambos tipos de rinosinusitis y no encontramos asociaciones entre las variables clínicas y los índices de diversidad alfa y beta. Estos resultados concuerdan con lo publicado en el ISMS y otras series más pequeñas (49,51), sin embargo, la ausencia de grupo control impide comparar nuestros resultados con sujetos sanos. Igualmente, las limitaciones intrínsecas del análisis del gen 16s impiden hacer comparaciones a nivel de especie, por lo que no podemos descartar asociaciones en este nivel.

Este estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, la falta de seguimiento imposibilita saber si los resultados se deben a cambios permanentes o representan estados transicionales. Por otro lado, la muestra es pequeña y la población estudiada es limitada, lo cual reduce la validez externa del estudio. En particular, el 92% de los pacientes con RSC tuvieron diagnóstico de EREA; mucho más de lo encontrado en población general. Los casos de RSAV fueron diagnosticados de manera clínica y no se tiene información sobre el tipo de virus implicado. Finalmente, la secuenciación del gen 16SrRNA permite describir la composición taxonómica pero no ofrece información sobre el estado funcional de la comunidad. A pesar de lo anterior, este estudio sugiere varias hipótesis interesantes que deberán ser exploradas en investigaciones posteriores.

## 9. CONCLUSIONES

La composición del microbioma nasosinusal fue significativamente diferentes según el tipo de rinosinusitis; *Staphylococcus* fue el género más frecuente de manera global. *Pseudomonas* y *Burkholderiaceae* se encontraron con mayor frecuencia en RSA. Los índices de diversidad no fueron significativamente diferentes según el tipo de sinusitis y no se asociaron al cambio en las variables clínicas.

Los resultados de este estudio deben servir para generar nuevas hipótesis sobre la interacciones virales y bacterianas en casos de rinosinusitis. Estudios posteriores deberán de analizar el microbioma de manera longitudinal e incluir datos funcionales para delimitar las diferencias en los diferentes tipos de rinosinusitis.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinology*. 2012;50(SUPPL. 23):4–305.
2. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, et al. Clinical Practice Guideline (Update): Adult Sinusitis. *Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2015;152(2\_suppl):S1–39. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0194599815572097>
3. Kloepfer KM, Sarsani VK, Poroyko V, Lee WM, Pappas TE, Kang T, et al. Community-acquired rhinovirus infection is associated with changes in the airway microbiome. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):312-315.e8.
4. Rowan NR, Lee S, Sahu N, Kanaan A, Cox S, Phillips CD, et al. The role of viruses in the clinical presentation of chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2015;29(6):e197–200.
5. Abreu NA, Nagalingam NA, Song Y, Roediger FC, Pletcher SD, Goldberg AN, et al. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculo-stearicum* enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci Transl Med*. 2012;4(151).
6. Aurora R, Chatterjee D, Hentzleman J, Prasad G, Sindwani R, Sanford T. Contrasting the microbiomes from healthy volunteers and patients with chronic rhinosinusitis. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2013;139(12):1328–38.
7. Lam K, Schleimer R, Kern RC. The Etiology and Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis: a Review of Current Hypotheses. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(7).
8. Suzaki H, Watanabe S, Pawankar R. Rhinosinusitis and asthma-microbiome and new perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;13(1):45–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128418>
9. Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2012;122(2):467–72.
10. Peters AT, Spector S, Hsu J, Hamilos DL, Baroody FM, Chandra RK, et al. Diagnosis and management of rhinosinusitis: A practice parameter update. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. 2014;113(4):347–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2014.07.025>
11. Lin SW, Wang YH, Lee MY, Ku MS, Sun HL, Lu KH, et al. Clinical spectrum of acute rhinosinusitis among atopic and nonatopic children in Taiwan. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* [Internet]. 2012;76(1):70–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2011.10.002>
12. Akdis CA, Bachert C, Cingi C, Dykewicz MS, Hellings PW, Naclerio RM, et al. Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: A PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;131(6):1479–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.036>
13. Scadding GK, Durham SR, Mirakian R, Jones NS, Drake-Lee AB, Ryan D, et al. BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(2):260–75.
14. Stevens WW, Lee RJ, Schleimer RP, Cohen NA. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015;136(6):1442–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.009>

15. Riechelmann H, Deutsche T, Rozsasi A, Keck T, Polzehl D, Bürner H. Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(9):1186–91.
16. Hayward G, Thompson MJ, Perera R, Del Mar CB, Glasziou PP, Heneghan CJ. Corticosteroids for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2016(3).
17. Chow AW, Benninger MS, Brook I, Brozek JL, Goldstein EJC, Hicks LA, et al. IDSA Clinical Practice Guideline for Acute Bacterial Rhinosinusitis in Children and Adults. *Clin Infect Dis*. 2012;54(8):1041–5.
18. Miah MS, Nix P, Koukkoullis A, Sandoe J. Microbial causes of complicated acute bacterial rhinosinusitis and implications for empirical antimicrobial therapy. *J Laryngol Otol*. 2016;130(2):169–75.
19. Han JK, Hendley JO, Winther B. Bacterial pathogens of acute sinusitis in the osteomeatal complex during common colds and wellness. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2011;1(5):356–60.
20. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, Beule A, Wormald PJ, Mayr S, et al. Oral steroids and doxycycline: Two different approaches to treat nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(5):1069-1076.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.02.020>
21. Jiang ZY, Kou Y-F, Batra PS. Endoscopic culture-directed antibiotic therapy: Impact on patient symptoms in chronic rhinosinusitis. *Am J Otolaryngol* [Internet]. 2015;36(5):642–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjoto.2015.04.009>
22. Dimitri-Pinheiro S, Soares R, Barata P. The Microbiome of the Nose—Friend or Foe? *Allergy Rhinol*. 2020;11:215265672091160.
23. Margolis E, Yates A, Levin BR. The ecology of nasal colonization of streptococcus pneumoniae, haemophilus influenzae and staphylococcus aureus: The role of competition and interactions with host’s immune response. *BMC Microbiol*. 2010;10.
24. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *PLoS Pathog*. 2013;9(1).
25. Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009;7(12):887–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2245>
26. Byrd AL, Segre JA. Adapting Koch’s postulates: Criteria for disease causation must take microbial interactions into account. *Science* (80- ). 2016;351(6270):224–6.
27. Man WH, De Steenhuijsen Piters WAA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017;15(5):259–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>
28. Kloepfer KM, Sarsani VK, Poroyko V, Lee WM, Pappas TE, Kang T, et al. Community-acquired rhinovirus infection is associated with changes in the airway microbiome. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2017;140(1):312-315.e8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.038>
29. Rozencwajg S, Bréchet N, Schmidt M, Hékimian G, Lebreton G, Besset S, et al. Co-infection with influenza-associated acute respiratory distress syndrome requiring extracorporeal membrane oxygenation. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2018;51(3):427–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.005>
30. Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope*. 2009;119(7):1406–11.
31. Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities

- of the upper respiratory tract and otitis media in children. *MBio*. 2011;2(1):1–7.
32. Hsu J, Avila PC, Kern RC, Hayes MG, Schleimer RP, Pinto JM. Genetics of chronic rhinosinusitis: State of the field and directions forward. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;131(4):977-993.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.028>
  33. Levchenko AS, Piskunov VS, Konoplya NA, Bushueva OY, Raspopov AA, Mezentseva OY, et al. Genetic Aspects of Chronic Rhinosinusitis. *Russ J Genet*. 2018;54(8):910–8.
  34. Min JY, Tan BK. Risk factors for chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015;15(1):1–13.
  35. Ramírez-Anguiano J, Yamamoto-Furusho JK, Barquera R, Beltrán O, Granados J. Association of HLA-DR3 and HLA-DR4 with sinonasal polyposis in Mexican Mestizos. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2006;135(1):90–3.
  36. Bousquet J, Burney PG, Zuberbier T, Cauwenberge P V., Akdis CA, Bindslev-Jensen C, et al. GA 2LEN (Global Allergy and Asthma European Network) addresses the allergy and asthma “epidemic.” Vol. 64, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009. p. 969–77.
  37. Bolger WE, Butzin CA, Parsons DS. Paranasal Sinus Bony Anatomic Variations and Mucosal Abnormalities [Internet]. Vol. 101, *The Laryngoscope*. 1991. p. 56??64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1288/00005537-199101000-00010>
  38. Weidinger S, Mempel M, Ollert M, Elser I, Rakoski J, Köhn FM, et al. Anaphylaxis to mizolastine [5]. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(4):979–81.
  39. Bernstein JM, Allen C, Rich G, Dryja D, Bina P, Reiser R, et al. Further observations on the role of *Staphylococcus aureus* exotoxins and IgE in the pathogenesis of nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2011;121(3):647–55.
  40. Kowalski ML, Cieślak M, Pérez-Novo CA, Makowska JS, Bachert C. Clinical and immunological determinants of severe/refractory asthma (SRA): Association with Staphylococcal superantigen-specific IgE antibodies. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2011;66(1):32–8.
  41. Bernstein JM, Kansal R. Superantigen hypothesis for the early development of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2005;13(1068-9508 (Print)):39–44. Available from: [c:%5CKarsten%5CPDFs%5CStaphylokokken-PDFs%5CStaph-2005%5CBernstein - Kansal-Superantigen hypothesis for the early development of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533229)
  42. Matsui K, Ikeda R. Peptidoglycan in combination with muramyldipeptide synergistically induces an interleukin-10-dependent T helper 2-dominant immune response. *Microbiol Immunol*. 2014;58(4):260–5.
  43. Matsui K, Nishikawa a. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces T(H)2 immune response in mice. *J Investig Allergol Clin Immunol* [Internet]. 2012;22(2):80–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533229>
  44. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2004;2(2):95–108. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro821>
  45. Hekiert AM, Kofonow JM, Doghramji L, Kennedy DW, Chiu AG, Palmer JN, et al. Biofilms correlate with TH1 inflammation in the sinonasal tissue of patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol - Head Neck Surg* [Internet]. 2009;141(4):448–53. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2009.06.090>
46. Brook I. Microbiology of chronic rhinosinusitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;35(7):1059–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2640-x>
  47. Psaltis AJ, Wormald PJ. Therapy of Sinonasal Microbiome in CRS: A Critical Approach. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(9).
  48. Wang JC, Moore CA, Epperson M V., Sedaghat AR. Association of the sinonasal bacterial microbiome with clinical outcomes in chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;00(0):1–11.
  49. Wagner Mackenzie B, Waite DW, Hoggard M, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. Bacterial community collapse: a meta-analysis of the sinonasal microbiota in chronic rhinosinusitis. *Environ Microbiol*. 2017;19(1):381–92.
  50. Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015;136(2):334-342.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.02.008>
  51. Paramasivan S, Bassiouni A, Shiffer A, Dillon MR, Cope EK, Cooksley C, et al. The international sinonasal microbiome study: A multicentre, multinational characterization of sinonasal bacterial ecology. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2020;
  52. Gan W, Yang F, Tang Y, Zhou D, Qing D, Hu J, et al. The difference in nasal bacterial microbiome diversity between chronic rhinosinusitis patients with polyps and a control population. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(6):582–92.
  53. Earl JP, Adappa ND, Krol J, Bhat AS, Balashov S, Ehrlich RL, et al. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome*. 2018;6(190):1–26.
  54. Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2014;69(4):517–26.
  55. Chalermwatanachai T, Velásquez LC, Bachert C. The microbiome of the upper airways: focus on chronic rhinosinusitis. *World Allergy Organ J*. 2015;8(3):1–14.
  56. Manarey CR a, Anand VK, Huang C. Incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* [Internet]. 2004;114(5):939–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126760>
  57. Rom D, Bassiouni A, Eykman E, Liu Z, Paramasivan S, Alvarado R, et al. The Association Between Disease Severity and Microbiome in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2019;129(6):1265–73.
  58. Schwartz JS, Peres AG, Endam LM, Cousineau B, Madrenas J, Desrosiers M. Topical probiotics as a therapeutic alternative for chronic rhinosinusitis: A preclinical proof of concept. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(6):e202–5.
  59. Walgama ES, Hwang PH. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Otolaryngol Clin North Am* [Internet]. 2017;50(1):83–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otc.2016.08.007>
  60. Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, Xing W, Shen S, Milne GL, et al. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood*. 2012;119(16):3790–8.
  61. Daffern PJ, Muilenburg D, Hugli TE, Stevenson DD. Association of urinary leukotriene E4

- excretion during aspirin challenges with severity of respiratory responses. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 1999;104(3 Pt 1):559–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10482828>
62. Pundir V, Pundir J, Lancaster G, Baer S, Kirkland P, Cornet M, et al. Role of corticosteroids in Functional Endoscopic Sinus Surgery - a systematic review and meta-analysis. *Rhinology* [Internet]. 2016;1(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26970247>
  63. Kalish LH, Arendts G, Sacks R, Craig JC. Topical steroids in chronic rhinosinusitis without polyps: A systematic review and meta-analysis. Vol. 141, *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2009. p. 674–83.
  64. Head K, Chong LY, Hopkins C, Philpott C, Burton MJ, Schilder AGM. Short-course oral steroids alone for chronic rhinosinusitis. Vol. 2016, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016.
  65. Chong LY, Head K, Hopkins C, Philpott C, Schilder AGM, Burton MJ. Intranasal steroids versus placebo or no intervention for chronic rhinosinusitis. Vol. 2016, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016.
  66. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Kumar KA, Kramper M, et al. Clinical Practice Guideline ( Update ): Adult Sinusitis. 2015;
  67. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, Hellings PW, Amin N, Lee SE, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet* [Internet]. 2019;394(10209):1638–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31881-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31881-1)
  68. Adebola SO. Safety and efficacy of anti-microbial photodynamic therapy (aPDT) in patients with severe recalcitrant chronic rhinosinusitis: a pilot study. Diss. University of British Columbia. 2019.
  69. Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Balcom J. Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2011;1(5):329–34.
  70. Jervis Bardy J, Psaltis AJ. Next Generation Sequencing and the Microbiome of Chronic Rhinosinusitis: A Primer for Clinicians and Review of Current Research, Its Limitations, and Future Directions. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2016;125(8):613–21.
  71. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(12).
  72. Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv*. 1992;61:1–10.
  73. Yamanishi S, Pawankar R. Current advances on the microbiome and role of probiotics in upper airways disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(1):30–5.
  74. Cope EK, Lynch S V. Novel Microbiome-Based Therapeutics for Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(3).
  75. Mukerji SS, Pynnonen MA, Kim HM, Singer A, Tabor M, Terrell JE. Probiotics as adjunctive treatment for chronic rhinosinusitis: A randomized controlled trial. *Otolaryngol - Head Neck Surg* [Internet]. 2009;140(2):202–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2008.11.020>
  76. Kitz R, Martens U, Zieseniß E, Enck P, Rose MA. Probiotic *E.faecalis* - Adjuvant therapy in children with recurrent rhinosinusitis. *Cent Eur J Med*. 2012;7(3):362–5.

77. Habermann W, Zimmermann K, Skarabis H, Kunze R, Rusch V. Verminderung der rezidivhäufigkeit bei patienten mit chronisch rezidivierender hypertrophischer sinusitis unter behandlung mit einem bakteriellen immunstimulans (Enterococcus faecalis-bakterien humaner herkunft). *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 2002;52(8):622–7.
78. de los Santos G, Reyes P, del Castillo R, Fragola C, Royuela A. Cross-cultural adaptation and validation of the sino-nasal outcome test (SNOT-22) for Spanish-speaking patients. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2015;272(11):3335–40.
79. Lildholdt T, Rundcrantz H, Bende M, Larsen K. Glucocorticoid treatment for nasal polyps. The use of topical budesonide powder, intramuscular betamethasone, and surgical treatment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123:595–600.
80. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016;13(7):581–3.
81. Nearing JT, Douglas GM, Comeau AM, Langille MGI. Denoising the Denoisers: An independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ.* 2018;2018(8):1–22.
82. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J [Internet].* 2017;11(12):2639–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
83. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174–80.
84. Bassiouni A, Paramasivan S, Shiffer A, Dillon MR, Cope EK, Cooksley C, et al. Microbiotyping the sinonasal microbiome. *bioRxiv [Internet].* 2019;(April):549311. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/549311v3.article-info>
85. West SEH, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, et al. Respiratory Infections With *Pseudomonas aeruginosa* in Children With Cystic Fibrosis Early Detection by Serology and Assessment of Risk Factors. *JAMA.* 2002;287(22):2958–67.
86. Vandelaar LJ, Hanson B, Marino M, Yao WC, Luong AU, Arias CA, et al. Analysis of Sinonasal Microbiota in Exacerbations of Chronic Rhinosinusitis Subgroups. *OTO Open.* 2019;3(3):2473974X1987510.
87. Hendricks MR, Lashua LP, Fischer DK, Flitter BA, Eichinger KM, Durbin JE, et al. Respiratory syncytial virus infection enhances *pseudomonas aeruginosa* biofilm growth through dysregulation of nutritional immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(6):1642–7.
88. Basharat U, Aiche MM, Kim MM, Sohal M, Chang EH. Are rhinoviruses implicated in the pathogenesis of sinusitis and chronic rhinosinusitis exacerbations? A comprehensive review. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019;9(10):1159–88.
89. Cope EK, Goldberg AN, Pletcher SD, Lynch S V. Compositionally and functionally distinct sinus microbiota in chronic rhinosinusitis patients have immunological and clinically divergent consequences. *Microbiome.* 2017;5(1):1–16.
90. Chalermwatanachai T, Zhang N, Holtappels G, Bachert C, De Melo CB. Association of mucosal organisms with patterns of inflammation in chronic rhinosinusitis. *PLoS One.* 2015;10(8).
91. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature [Internet].* 2010;465(7296):346–9. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/nature09074>  
074

92. Cleland EJ, Drilling A, Bassiouni A, James C, Vreugde S, Wormald PJ. Probiotic manipulation of the chronic rhinosinusitis microbiome. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014;4(4):309–14.
93. Kiryukhina N V., Melnikov VG, Suvorov A V., Morozova YA, Ilyin VK. Use of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2013;5(4):233–8.
94. De Boeck I, Wittouck S, Martens K, Claes J, Jorissen M, Steelant B, et al. Anterior Nares Diversity and Pathobionts Represent Sinus Microbiome in Chronic Rhinosinusitis. *mSphere.* 2019;4(6):1–15.
95. Meisel JS, Hannigan GD, Tyldsley AS, SanMiguel AJ, Hodkinson BP, Zheng Q, et al. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2016;136(5):947–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.016>

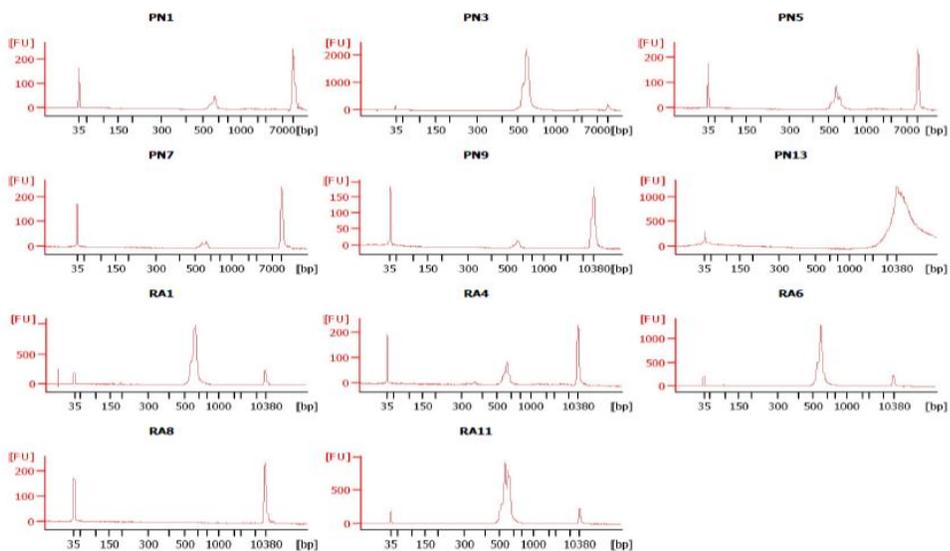
## 11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### 11.1 Tablas y gráficas suplementarias

Identificador	Concentración Nanodrop (ng/μL) INR	Concentración Nanodrop (ng/μL) CNRPyC	260/280 INR	260/280 CNRPyC	260/230 INR	260/230 CNRPyC	Concentración Qubit (ng/μL) CNRPyC
PN1	365.3	381.2	1.81	1.8	1.57	1.64	227
PN2	385.6	467.2	1.77	1.78	1.19	1.23	212
PN3	322	315.2	1.8	1.79	1.35	1.41	179
PN4	105.9	120.7	1.75	1.77	1.57	1.68	62.8
PN5	118.3	132.9	1.73	1.73	1.34	1.39	267
PN6	342.6	380.1	1.76	1.76	1.41	1.45	150
PN7	169.7	174.9	1.71	1.7	1.56	1.59	32.7
PN8	96.3	101.5	1.7	1.7	1.46	1.49	48
PN9	348.1	354.9	1.74	1.73	1.3	1.36	98.4
PN10	201.9	203.7	1.76	1.74	1.26	1.27	37.1
PN11	231.1	243.8	1.73	1.73	1.33	1.37	33.7
PN12	400.9	403.4	1.73	1.72	1.69	1.75	61.8
PN13	207.4	204.6	1.76	1.75	1.59	1.62	85.9
PN14	287.3	297.6	1.78	1.78	1.72	1.77	61.8
RA1	28.5	26.2	1.84	1.85	1.68	1.69	11.9
RA2	193.6	209.9	1.79	1.79	2.01	2.04	84.7
RA3	203	214.9	1.77	1.76	1.88	1.94	69.4
RA4	138.8	159.3	1.79	1.81	1.88	1.92	79.7
RA5	103.7	107.7	1.7	1.76	1.44	1.53	42.6
RA6	567.3	615.2	1.73	1.74	2.26	2.34	145
RA7	989.9	837.9	1.85	1.86	2.02	2.07	415
RA8	525.8	589.6	1.62	1.62	2.07	2.16	66.4
RA9	370.9	417.6	1.6	1.61	1.67	1.68	40.6
RA10	545.2	727.9	1.67	1.68	1.61	1.59	108
RA11	517.8	592.5	1.81	1.83	2.1	2.16	252
RA12	93	48.8	1.74	1.72	1.14	1.08	28.1
RA13	15.5	19.2	1.97	1.46	1.39	1.3	6.35

**Tabla suplementaria 1.** Parámetros reportados por el Laboratorio de Infectología del INR y medidos por el CNRPyC. Todas las muestras cumplieron con la concentración mínima necesaria de >1.5 ng/μL para continuar con los procesos posteriores.

Identificador	Bioanalizador pb (Producto PCR)
PN1	576
PN3	554
PN5	547
PN7	573
PN9	571
PN13	SA
RA1	574
RA2	571
RA4	558
RA6	558
RA8	SA
RA11	539

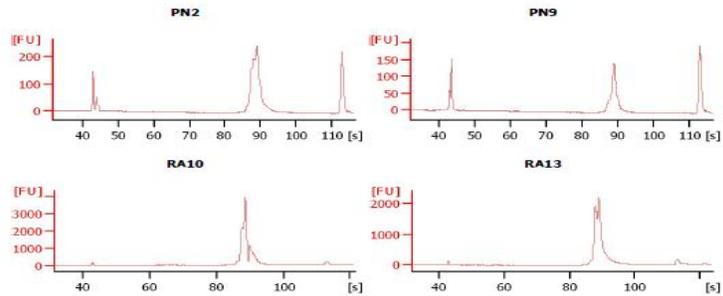


**Figura suplementaria 1.** Resultado de electroforesis en chip del producto de primera PCR. Las muestras PN13 y RA8 no amplificaron. Tamaño de librerías reportado en pb. SA = Sin amplificación.

Identificador	Genoteca [ng/μl]	Genoteca [nM]	Identificador	Genoteca [ng/μl]	Genoteca [nM]
PN1	0.6	1.4	RA1	0.4	0.9
PN2	0.5	1.1	RA2	0.3	0.7
PN3	26.3	63.3	RA3	5.7	13.7
PN4	4.4	10.7	RA4	0.5	1.2
PN5	1.1	2.6	RA5	0.3	0.7
PN6	15.2	36.6	RA6	8.6	20.6
PN7	0.4	1.0	RA7	26.5	63.6
PN8	2.9	7.1	RA9	9.2	22.2
PN9	0.3	0.8	RA10	11.9	28.6
PN10	14.7	35.4	RA11	12.8	30.7
PN11	1.8	4.3	RA12	29.9	71.8
PN12	10.3	24.8	RA13	5.2	12.6
PN14	7.0	16.9	-	-	-

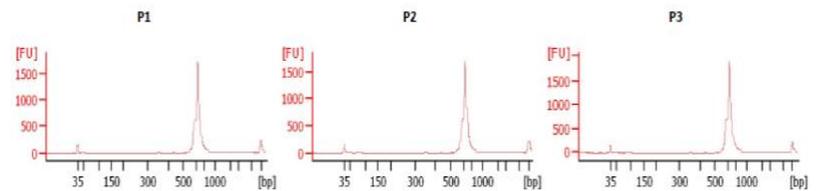
**Tabla suplementaria 2.** Concentración de librerías por Qubit.

Identificador	Bioanalizador pb (Producto PCR)
PN2	614
PN9	612
RA10	608
RA13	615

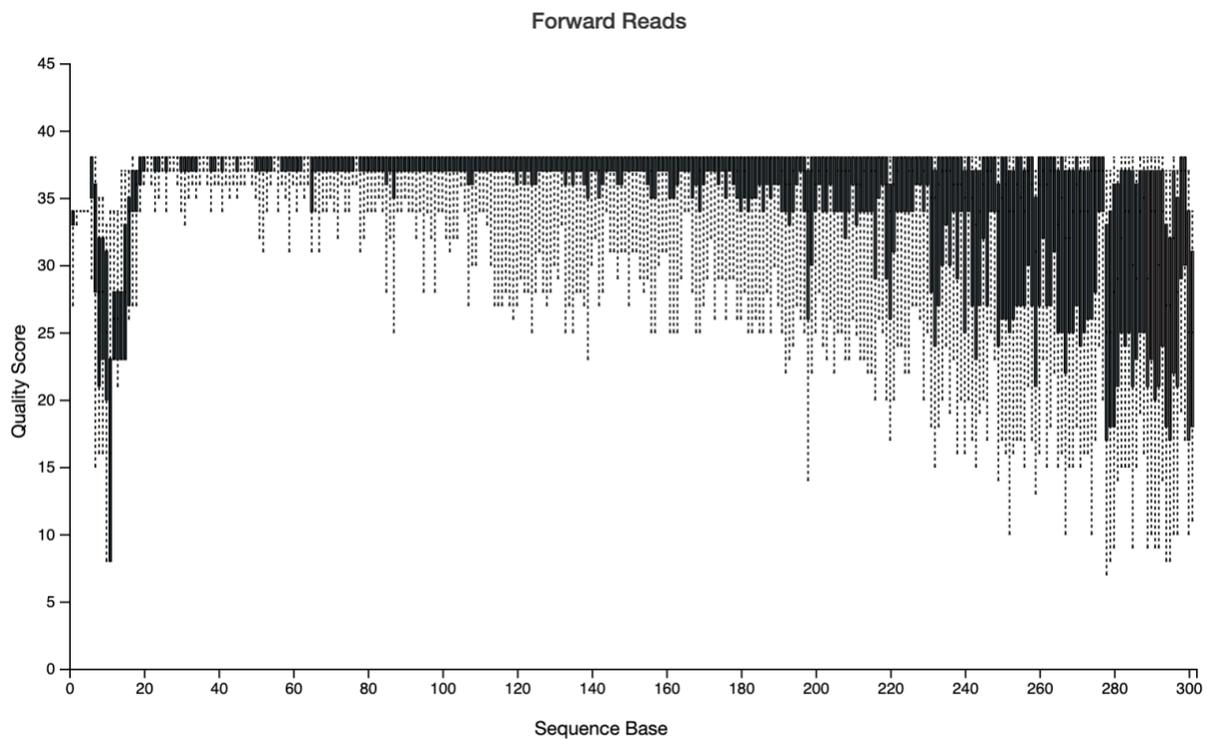


**Figura suplementaria 2.** Resultado de electroforesis en chip del producto de PCR posterior a la purificación. Tamaño de librerías reportado en pb.

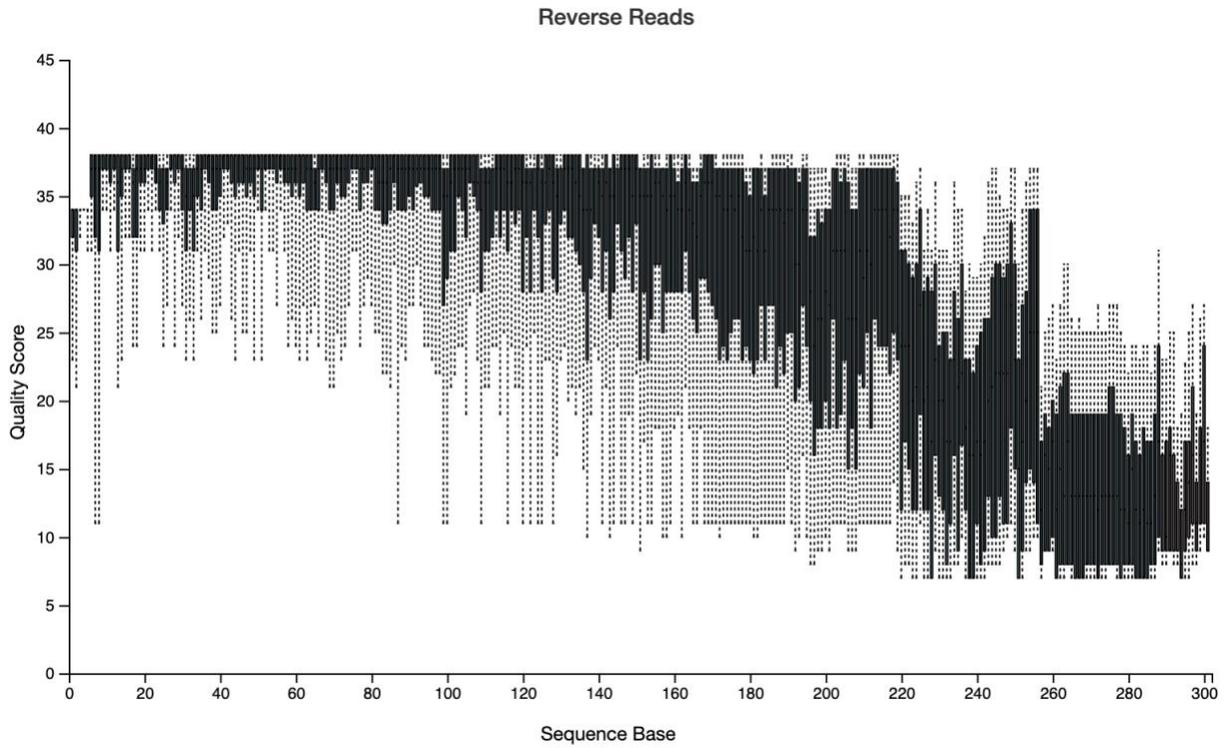
ID pool	Pool Bioanalizador pb	Pool [ng/ $\mu$ l]	Pool [nM]
Pool 1	618	2.3	5.6
Pool 2	617	2.4	5.7
Pool 3	615	2	4.9



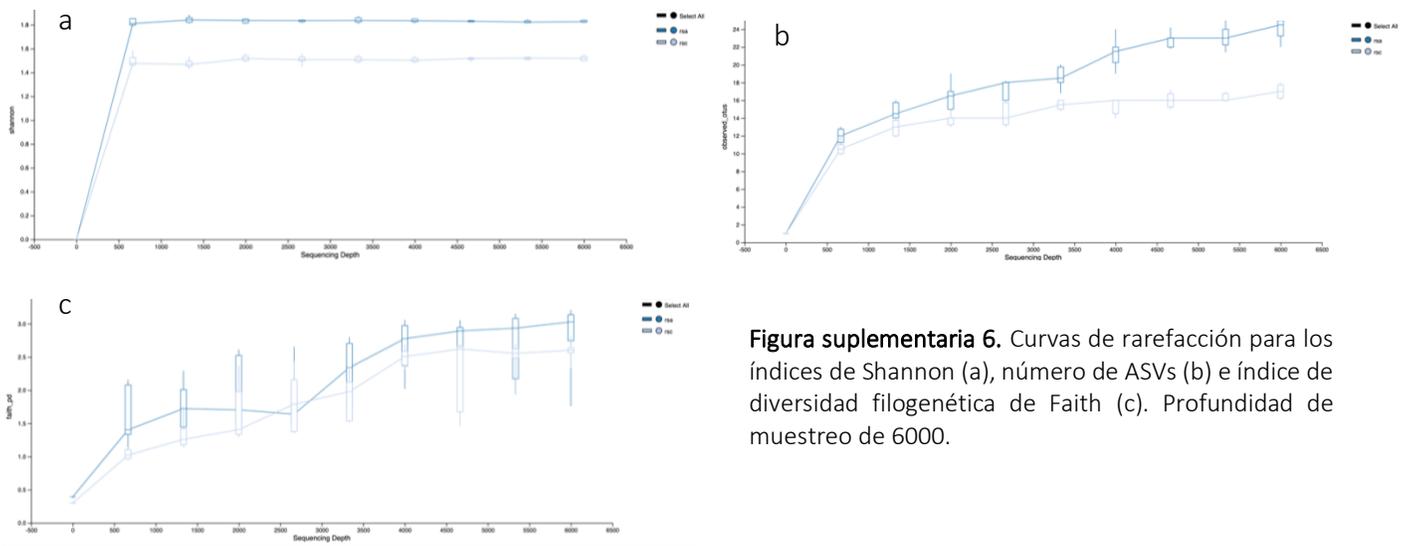
**Figura suplementaria 3.** Resultado de electroforesis en chip del pool. Tamaño de librerías reportado en pb.



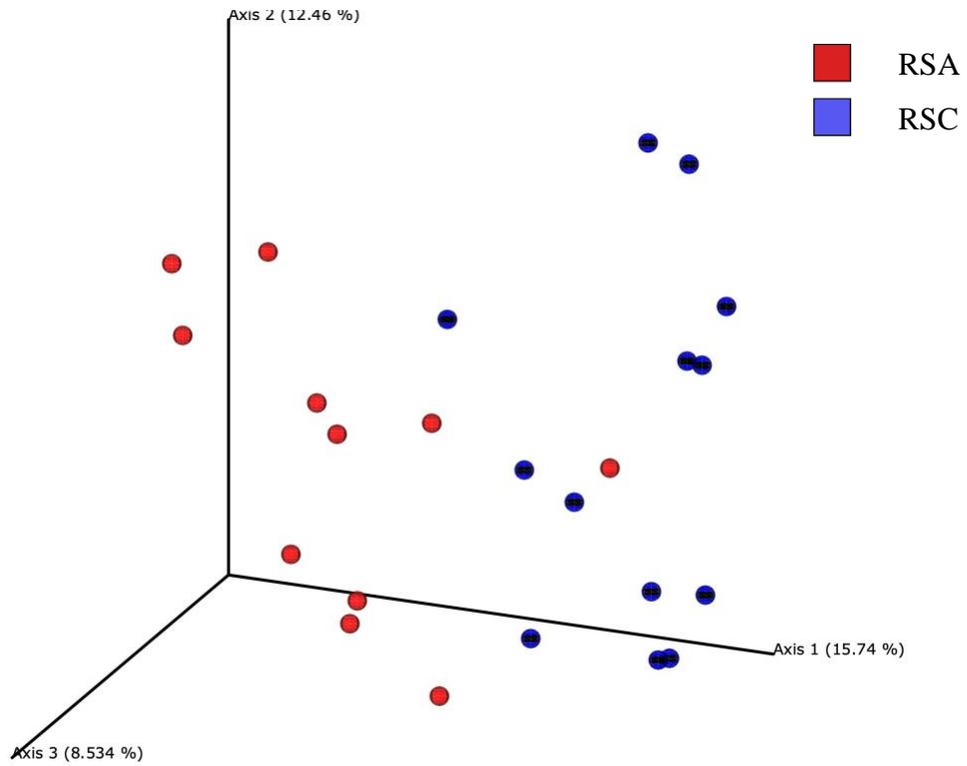
**Figura suplementaria 4.** Calificación de calidad por nucleótido para las secuencias forward. A partir de la posición 240, la calidad del percentil 25 cae por debajo de 30.



**Figura suplementaria 5.** Calificación de calidad por nucleótido para las secuencias forward. A partir de la posición 140, la calidad del percentil 25 cae por debajo de 30. Después de la posición 220, la calidad del percentil 25 no supera 10.



**Figura suplementaria 6.** Curvas de rarefacción para los índices de Shannon (a), número de ASVs (b) e índice de diversidad filogenética de Faith (c). Profundidad de muestreo de 6000.

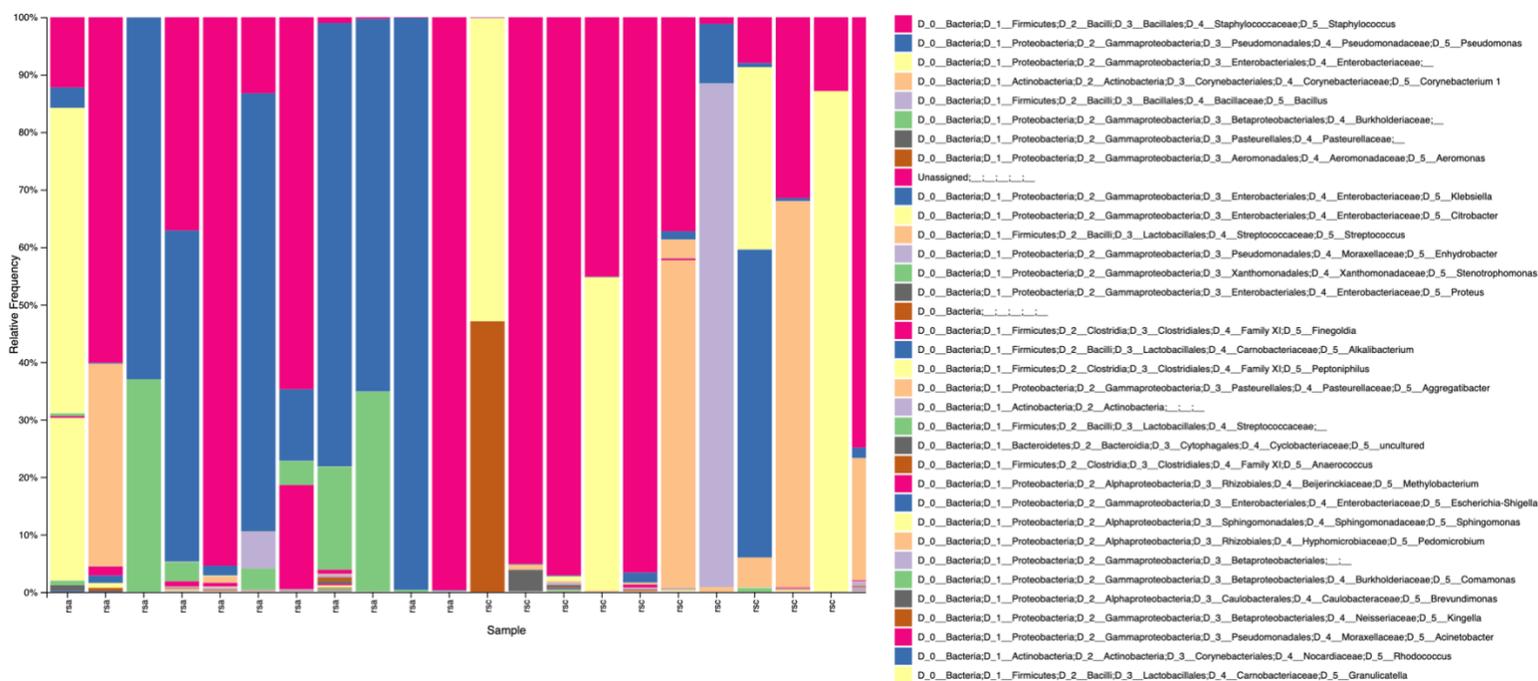


**Figura suplementaria 7.** PCoA utilizando la distancia de Jaccard. Las muestras se agrupan según el tipo de rinosinusitis. Los resultados del PERMANOVA mostraron diferencias significativas según el tipo de patología (pseudof = 2.76353;  $p = 0.001$ ).

Rinosinusitis	Familia Género	Frecuencia	AR	Rinosinusitis	Familia Género	Frecuencia	AR
RSAV	Staphylococcaceae Staphylococcus	317391	41.5770%	RSC	Staphylococcaceae Staphylococcus	406767	47.8706%
RSAV	Pseudomonadaceae Pseudomonas	275947	36.1480%	RSC	Enterobacteriaceae NA	162823	19.1619%
RSAV	Burkholderiaceae NA	64221	8.4127%	RSC	Bacillaceae Bacillus	66867	7.8693%
RSAV	Enterobacteriaceae NA	50948	6.6740%	RSC	Corynebacteriaceae Corynebacterium 1	57960	6.8211%
RSAV	Enterobacteriaceae Citrobacter	27029	3.5407%	RSC	Pasteurellaceae NA	47074	5.5399%
RSAV	Corynebacteriaceae Corynebacterium 1	15123	1.9811%	RSC	Aeromonadaceae Aeromonas	34356	4.0432%
RSAV	Bacillaceae Bacillus	5719	0.7492%	RSC	Enterobacteriaceae Klebsiella	30952	3.6426%
RSAV	Enterobacteriaceae Proteus	1068	0.1399%	RSC	Streptococcaceae Streptococcus	25795	3.0357%
RSAV	Xanthomonadaceae Stenotrophomonas	1045	0.1369%	RSC	Pseudomonadaceae Pseudomonas	13178	1.5509%
RSAV	Family XI Finegoldia	660	0.0865%	RSC	Moraxellaceae Enhydrobacter	878	0.1033%
RSAV	Moraxellaceae Enhydrobacter	632	0.0828%	RSC	NA NA	520	0.0612%
RSAV	Carnobacteriaceae Alkalibacterium	551	0.0722%	RSC	Pasteurellaceae Aggregatibacter	489	0.0575%
RSAV	Cyclobacteriaceae uncultured	361	0.0473%	RSC	Streptococcaceae NA	399	0.0470%
RSAV	Family XI Peptoniphilus	349	0.0457%	RSC	Xanthomonadaceae Stenotrophomonas	389	0.0458%
RSAV	Beijerinckiaceae Methylobacterium	269	0.0352%	RSC	Family XI Peptoniphilus	234	0.0275%
RSAV	Enterobacteriaceae Escherichia-Shigella	265	0.0347%	RSC	Family XI Anaerococcus	115	0.0135%
RSAV	Family XI Anaerococcus	236	0.0309%	RSC	Moraxellaceae Acinetobacter	80	0.0094%
RSAV	Hyphomicrobiaceae Pedomicrobium	226	0.0296%	RSC	Family XI Finegoldia	75	0.0088%
RSAV	Sphingomonadaceae Sphingomonas	226	0.0296%	RSC	Caulobacteraceae Brevundimonas	73	0.0086%
RSAV	Burkholderiaceae Comamonas	167	0.0219%	RSC	Neisseriaceae Kingella	69	0.0081%
RSAV	NA NA	153	0.0200%	RSC	Carnobacteriaceae Granulicatella	66	0.0078%
RSAV	Nocardiaceae Rhodococcus	121	0.0159%	RSC	Beijerinckiaceae Methylobacterium	62	0.0073%
RSAV	Streptococcaceae Streptococcus	80	0.0105%	RSC	Rhizobiaceae Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium- Rhizobium	56	0.0066%
RSAV	Caulobacteraceae Brevundimonas	64	0.0084%	RSC	Carnobacteriaceae Alkalibacterium	51	0.0060%
RSAV	Burkholderiaceae Massilia	62	0.0081%	RSC	Burkholderiaceae Comamonas	40	0.0047%
RSAV	Burkholderiaceae Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia	60	0.0079%	RSC	Rhodobacteraceae Paracoccus	40	0.0047%
RSAV	Neisseriaceae Kingella	56	0.0073%	RSC	Propionibacteriaceae Cutibacterium	36	0.0042%
RSAV	Enterobacteriaceae Klebsiella	42	0.0055%	RSC	Sphingomonadaceae Sphingomonas	36	0.0042%
RSAV	Moraxellaceae Acinetobacter	41	0.0054%	RSC	Enterobacteriaceae Citrobacter	30	0.0035%
RSAV	Pasteurellaceae Aggregatibacter	38	0.0050%	RSC	Micrococcaceae Micrococcus	29	0.0034%
RSAV	Micrococcaceae NA	34	0.0045%	RSC	Micrococcaceae NA	29	0.0034%
RSAV	Rhodobacteraceae NA	27	0.0035%	RSC	Sphingomonadaceae Sphingobium	29	0.0034%
RSAV	Corynebacteriaceae NA	26	0.0034%	RSC	Streptomycetaceae Streptomyces	27	0.0032%
RSAV	Gemmataceae uncultured	22	0.0029%	RSC	Burkholderiaceae Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia	18	0.0021%
RSAV	Propionibacteriaceae Cutibacterium	21	0.0028%	RSC	Enterobacteriaceae Escherichia-Shigella	18	0.0021%
RSAV	Saccharimonadaceae uncultured bacterium	19	0.0025%	RSC	Chitinophagaceae Flavisolibacter	15	0.0018%

RSAV	Carnobacteriaceae Granulicatella	18	0.0024%	RSC	Corynebacteriaceae NA	13	0.0015%
RSAV	Aeromonadaceae Aeromonas	16	0.0021%	RSC	Enterobacteriaceae Proteus	10	0.0012%
RSAV	Rhizobiaceae Allorhizobium-Neorhizobium- Pararhizobium-Rhizobium	16	0.0021%	RSC	Leptotrichiaceae Leptotrichia	10	0.0012%
RSAV	Ilumatobacteraceae uncultured	14	0.0018%	RSC	Enterococcaceae Enterococcus	7	0.0008%
RSAV	Family XI Gemella	7	0.0009%	RSC	Ilumatobacteraceae uncultured	7	0.0008%
RSAV	Enterococcaceae Enterococcus	5	0.0007%	RSC	-	-	-
RSAV	Micrococcaceae Micrococcus	5	0.0007%	RSC	-	-	-
RSAV	Leptotrichiaceae Leptotrichia	2	0.0003%	RSC	-	-	-

**Tabla suplementaria 2.** Familias y géneros más frecuentes según el tipo de rinosinusitis. En los casos en los que no se lograba determinar el género, únicamente se describe la familia.



**Figura suplementaria 8.** Géneros más frecuentes según el tipo de rinosinusitis.

## 11.2 Pipeline de QIIME 2

```
##### Importar secuencias y control de calidad #####
qiime tools import \
  --type 'SampleData[SequencesWithQuality]' \
  --input-path fastq-f \
  --input-format CasavaOneEightSingleLanePerSampleDirFmt \
  --output-path demux-single-end.qza

# Visualizacion demux
qiime demux summarize \
  --i-data demux-single-end.qza \
  --o-visualization demux.qzv

# Control de calidad y denoising
qiime dada2 denoise-single \
  --i-demultiplexed-seqs demux-single-end.qza \
  --p-trim-left 20 \
  --p-trunc-len 240 \
  --o-representative-sequences rep-seqs.qza \
  --o-table table.qza \
  --o-denoising-stats stats-dada2.qza

# Visualizacion stats dada2
qiime metadata tabulate \
  --m-input-file stats-dada2.qza \
  --o-visualization stats-dada2.qzv

# Visualizacion tabla y rep-seq
qiime feature-table summarize \
  --i-table table.qza \
  --o-visualization table.qzv \
  --m-sample-metadata-file metadata.tsv

qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data rep-seqs.qza \
  --o-visualization rep-seqs.qzv

# Analisis filogenetico y arboles
qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree \
  --i-sequences rep-seqs.qza \
  --o-alignment aligned-rep-seqs.qza \
  --o-masked-alignment masked-aligned-rep-seqs.qza \
  --o-tree unrooted-tree.qza \
  --o-rooted-tree rooted-tree.qza

##### Filtrado de la tabla #####
mkdir filter-data

# Filtrar features que solo aparecen en 1 muestra
qiime feature-table filter-features \
  --i-table table.qza \
  --p-min-samples 2 \
```

```

--p-min-frequency 10 \
--o-filtered-table filter-data/filtered-table.qza

# Filtro por tiempo
qiime feature-table filter-samples \
--i-table filter-data/filtered-table.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--p-where "[tiempo]='2o-analisis'" \
--p-min-frequency 1500 \
--o-filtered-table filter-data/filtered-cm-table.qza

##### Entrenar clasificador #####
# Descargar version silva 132 de repositorio de qiime2 al directorio actual
# Importar secuencias para clasificador
qiime tools import \
--input-path Silva_132_release/SILVA_132_QIIME_release/rep_set/rep_set_16S_only/99/silva_132_99_16S.fna \
--output-path sequences.qza \
--type 'FeatureData[Sequence]'

# Importar taxonomia
qiime tools import \
--type 'FeatureData[Taxonomy]' \
--input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat \
--input-path
    Silva_132_release/SILVA_132_QIIME_release/taxonomy/16S_only/99/majority_taxonomy_7_levels.txt \
--output-path ref-taxonomy.qza

# Extraemos secuencias representativas
qiime feature-classifier extract-reads \
--i-sequences sequences.qza \
--p-f-primer CCTACGGGNGGCWGCAG \
--p-r-primer GACTACHVGGGTATCTAATCC \
--p-min-length 100 \
--p-max-length 400 \
--o-reads ref-seqs.qza

# Entrenamos al clasificador
qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes \
--i-reference-reads ref-seqs.qza \
--i-reference-taxonomy ref-taxonomy.qza \
--o-classifier classifier.qza

# Construccion de taxa con nuevo clasificador
qiime feature-classifier classify-sklearn \
--i-classifier classifier.qza \
--i-reads rep-seqs.qza \
--o-classification taxonomy-newclass.qza

qiime metadata tabulate \
--m-input-file taxonomy-newclass.qza \
--o-visualization taxonomy-newclass.qzv

##### Analisis diversidad con tabla filtrada #####

```

```

# Generamos metricas de diversidad
qiime diversity core-metrics-phylogenetic \
--i-phylogeny rooted-tree.qza \
--i-table filter-data/filtered-cm-table.qza \
--p-sampling-depth 1300 \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--output-dir filter-data/core-metrics-results

# Rarefaccion diversidad alfa
qiime diversity alpha-rarefaction \
--i-table filter-data/filtered-cm-table.qza \
--i-phylogeny rooted-tree.qza \
--p-max-depth 6000 \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--o-visualization filter-data/alpha-rarefaction-filter.qzv

# Barplot taxa
qiime taxa barplot \
--i-table filter-data/filtered-cm-table.qza \
--i-taxonomy taxonomy-newclass.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--o-visualization filter-data/taxa-bar-plots-filter.qzv

##### Analisis estadistico #####
# Estadistica alfa diversidad
qiime diversity alpha-group-significance \
--i-alpha-diversity filter-data/core-metrics-results/faith_pd_vector.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--o-visualization filter-data/core-metrics-results/faith-pd-group-significance-filter.qzv

qiime diversity alpha-group-significance \
--i-alpha-diversity filter-data/core-metrics-results/evenness_vector.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--o-visualization filter-data/core-metrics-results/evenness-group-significance-filter.qzv

# Correlación alfa diversidad con variables cuantitativas
qiime diversity alpha-correlation \
--i-alpha-diversity filter-data/core-metrics-results/evenness_vector.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--p-method spearman \
--output-dir evenness_correlation/

qiime diversity alpha-correlation \
--i-alpha-diversity filter-data/core-metrics-results/faith_pd_vector.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--p-method spearman \
--output-dir faith_correlation/

# Estadistica beta diversidad
# tipo de paciente
qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix filter-data/core-metrics-results/bray_curtis_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--m-metadata-column tipo-paciente \

```

```
--o-visualization filter-data/core-metrics-results/bray_curtis-tipo-paciente-significance-filter.qzv \  
--p-pairwise
```

```
# ANCOM para diferenciar taxa entre tipo-paciente
```

```
# primero añadimos 1 a frecuencias zero para que no de error con pseudocount
```

```
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table filter-data/filtered-cm-table.qza \  
--o-composition-table filter-data/comp-table.qza
```

```
qiime composition ancom \  
--i-table filter-data/comp-table.qza \  
--m-metadata-file metadata.tsv \  
--m-metadata-column tipo-paciente \  
--o-visualization filter-data/ancom-tipo-paciente.qzv
```