UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CARLOS EDUARDO MONTEIRO ZAPPELINI

Padrão imuno-histoquímico da mucosa nasal de portadores de rinossinusite crônica com e sem exposição a fibras do algodão e controle

RIBEIRÃO PRETO 2019

CARLOS EDUARDO MONTEIRO ZAPPELINI

Padrão imuno-histoquímico da mucosa nasal de portadores de rinossinusite crônica com e sem exposição a fibras do algodão e controle

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma T. Anselmo-Lima

RIBEIRÃO PRETO 2019 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zappelini, Carlos Eduardo Monteiro

Padrão imuno-histoquímico da mucosa nasal de portadores de rinossinusite crônica com e sem exposição a fibras do algodão e controle. / Carlos Eduardo Monteiro Zappelini; Orientadora, Wilma T. Anselmo-Lima. Ribeirão Preto. - 2019.

78p.: 12il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

1. Algodão. 2. IL-4. 3. IL-5. 4. IL-10., 5. IL-17. 6. IL-33. 7. Rinossinusite.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Zappelini, Carlos Eduardo Monteiro

Título: Padrão imuno-histoquímico da mucosa nasal de portadores de rinossinusite

crônica com e sem exposição a fibras do algodão e controle.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aprovado em://	
Prof. Dr	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr.	
Instituição:	
Accipature	

Dedicatória

Dedico inteiramente este trabalho aos meus país, Cláudio José
Zappelini e Myrthes de Lima Monteiro Zappelini. Não poderia
deixar de homenageá-los aqui, esses que desde sempre se
esforçaram ao extremo para que eu tivesse uma boa educação e o
melhor estudo possível acompanhado de muito amor e dedicação
a mim.

São e sempre serão mínhas referências!

Agradecimentos

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade de São Paulo que agiram de maneira generosa sempre que solicitados.

Agradeço à María Cecília Onofre, do Programa de Pós-Graduação em Oftalmología, Otorrinolaringología e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que sempre esteve à disposição para tirar minhas dividas, burocráticas ou não, e me ajudar das mais diversas maneiras para conclusão deste estudo.

Agradeço à Adriana Murashima, da Casa 19, que de maneira brilhante, e com muita paciência, me ajudou na análise das biópsias das minhas amostras.

Agradeço ao colega Dr. Ivan de Pícoli Dantas pelo incentivo a essa pesquisa desde o início dos meus anos como residente de Otorrinolaringología. Posso dizer que foi um dos grandes apoiadores e pessoa de extrema importância para alcançar os resultados finais desse estudo.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Wilma T. Anselmo-Lima, que me concedeu a confiança em minha capacidade como pesquisador, além da paciência e tranquilidade para me transmitir os ensinamentos necessários para realizar esta pesquisa. Pessoa esta, que com o passar dos anos pude cada vez mais admirar pela sua capacidade técnica e de ótimo relacionamento com todos que a rodeiam.

Agradeço a mínha coorientadora deste trabalho Profa. Dra. Fabíana Cardoso Pereira Valera, pelo estímulo ao desenvolvimento desta tese e fundamentais ensinamentos, que contribuiram, de forma imensurável, ao longo dos anos de pesquisa.

Agradeço a todos os colegas de Doutorado, que vivenciaram momentos de muito estudo no decorrer desta jornada.

Agradeço, por fím, especialmente aos meus país, seu Cláudio e dona Myrthes, que sempre me motivaram, entenderam as mínhas faltas e os momentos de afastamento e reclusão e me mostraram o quanto era importante estudar. Mesmo assim, amor e carinho sempre estiveram presentes!

Apoio Financeiro

O presente estudo foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Agradeço a esta instituição pelo apoio financeiro e, principalmente, pelo interesse neste estudo.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela Bolsa concedida.



Zappelini CEM. Padrão imuno-histoquímico da mucosa nasal de portadores de rinossinusite crônica com e sem exposição a fibras do algodão e controle. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2019.

A rinossinusite crônica (RSC) é uma doença inflamatória da mucosa nasal, e pouco tem sido relacionada à exposição no ambiente de trabalho, em especial ao algodão. Atualmente, uma série de citocinas e quimiocinas tem sido estudada para elucidação das características imunológicas que levam ao desenvolvimento da doença. Objetivos: Caracterizar a exposição ao algodão como indutora de RSC e determinar o padrão de resposta inflamatória imuno-histoquímica da mucosa nasal de indivíduos expostos ou não ao algodão e que desenvolveram RSC. Casuística e Metodos: Por meio de questionário baseado no EPOS e SNOT-22 foi realizado diagnóstico clínico de RSC em indivíduos expostos ao algodão no ambiente de trabalho. Após a confirmação diagnóstica com tomografia computadorizada e nasofibroscopia flexível foi realizada biópsia na mucosa de concha média de pacientes com diagnóstico clínico de RSC para análise da expressão de IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IL-33. A análise foi realizada também em grupo com RSC sem exposição ao algodão e controle sem RSC. Resultados: Todos os indivíduos expostos ao algodão com sintomatologia sugestiva de RSC apresentaram padrão histológico com aumento da expressão de IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IL-33. Conclusões: O presente estudo comprovou a estreita relação entre a exposição ao algodão no ambiente de trabalho e o surgimento de uma resposta inflamatória com aumento da expressão das interleucinas estudadas. A possível instituição de terapias/medicamentos que inibissem a expressão dessas citocinas poderia auxiliar na diminuição do processo inflamatório presente na RSC e/ou no desencadeamento da doenca.

Palavras chaves: Algodão. IL-4. IL-5. IL-10. IL-17. IL-33. Rinossinusite.



Zappelini CEM. Immunohistochemical pattern of the nasal mucosa of patients with chronic rhinosinusitis with and without exposure to cotton fibers and control. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2019.

The chronic rhinusinusitis (CRS) is an inflammatory disease of the nasal mucosa, and has been little related to exposure in the work environment, especially to cotton. Currently, a number of cytokines and chemokines have been studied to elucidate the immunological characteristics that lead to the development of the disease. **Objectives:** To characterize exposure to cotton as an inducer of CRS and to determine the pattern of inflammatory immune-histochemical response of the nasal mucosa of individuals exposed or not to cotton and who developed CRS. Casuistic and Methods: Using a questionnaire based on EPOS and SNOT-22, a clinical diagnosis of CRS was performed in individuals exposed to cotton in the work environment. After diagnostic confirmation with computed tomography and flexible nasofibroscopy, biopsy was performed on the middle concha mucosa of patients with clinical diagnosis of CRS to analyze the expression of IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 and IL-33. The analysis was also performed in a group with CRS without exposure to cotton and control without CRS. Results: All individuals exposed to cotton with symptoms suggestive of CRS had a histological pattern with increased expression of IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 and IL-33. **Conclusions:** This study confirms the close relationship between exposure to cotton in the workplace and the appearance of an inflammatory response with increased expression of interleukins studied. The possible institution of therapies / drugs that inhibit the expression of these cytokines could help in the reduction of the inflammatory process present in CRS and in the onset of the disease.

Key words: Cotton. IL-4. IL-5. IL-10. IL-17. IL-33. Rhinosinusitis.



Figura 1 -	Processamento de imagens para quantificação da expressão de DAB. (A) Imagem original. (B) Matriz referente à DAB extraída pela deconvolução de cor. (C) <i>Threshold</i> utilizado para binarizar a imagem, realçando somente a expressão da IL. (D) Imagem original + imagem binarizada (mostrada em vermelho) ilustrando as regiões segmentadas
Figura 2 -	Caracterização da análise dos funcionários da indústria têxtil avaliados
Figura 3 -	Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo com rinossinusite crônica com exposição às fibras de algodão. (A e B) coloração do anticorpo anti-IL-4; (C e D) coloração do anticorpo anti-IL-5; (E e F) coloração do anticorpo anti-IL-10. Identificado em marrom (ampliação de 40x)
Figura 4 -	Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo com rinossinusite crônica com exposição a fibras de algodão. (A e B) coloração do anticorpo anti-IL-17; (C e D) coloração do anticorpo anti-IL-33. Identificado em marrom (ampliação de 40x)
Figura 5 -	Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo controle. (A e B) coloração do anticorpo anti-IL-4; (C e D) coloração do anticorpo anti-IL-5; (E e F) coloração do anticorpo anti-IL-10. Não identificado (marrom) (ampliação de 40x)
Figura 6 -	Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo controle. (A e B) coloração do anticorpo anti-IL-17; (C e D) coloração do anticorpo anti-IL-33. Não identificado (marrom) (ampliação de 40x) 50
Figura 7 -	Comparação entre os grupos RSCcA (rinossinusite crônica com exposição ao algodão) vs CTRL (controle). O gráfico mostra a mediana da avaliação quantitativa (Teste de Mann-Whitney)51
Figura 8 -	Interleucina 4: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)51
Figura 9 -	Interleucina 5: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)
Figura 10 -	Interleucina 10: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)
Figura 11 -	Interleucina 17: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)53
Figura 12 -	Interleucina 33: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA) 53



Tabela 1 -	Caracterização por gênero dos funcionários que responderam aos questionários	12
Tabela 2 -	Caracterização do diagnóstico clínico de RSC nos funcionários que responderam aos questionários quanto aos achados de RSC à nasofibroscopia flexível, de acordo com o escore de Lund-Kennedy e quanto aos achados de RSC à TCSP, de acordo com o escore de Lund-Mackay	44
Tabela 3 -	Caracterização número de pacientes quanto ao gênero nos grupos do estudo	44
Tabela 4 -	Avaliação subjetiva de forma qualitativa da marcação na imuno- histoquímica no grupo de RSC com exposição ao algodão	49
Tabela 5 -	Avaliação subjetiva de forma qualitativa da marcação na imuno- histoquímica no grupo controle	19
Tabela 6 -	Média e erro padrão (EP) da marcação (%) quando comparados os três grupos	51



APM- Agente de alto peso molecular

BPM- Agentes de baixo peso molecular

BSA- Solução de albumina de soro bovino

CVF- Capacidade vital forçada

DAB- Diaminobenzidina

EPOS- European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyposis

FESS- Cirurgia Endoscópica Funcional dos Seios Paranasais

FEV1- Volume expiratório forçado no primeiro segundo

HCFM-RP-USP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto da Universidade de São Paulo

IFN-γ- Interferon

IgE- Imunoglobulina E

IHQ- Imuno-histoquímico

IL- Interleucina

NF- Nasofibroscopia Flexível

PBS- Tampão fosfato-salino

PFE- Pico de fluxo expiratório

PN- Pólipo nasal

RAL Rinite Alérgica Local

RGB- Red, Breen, Blue

RSC- Rinossinusite crônica

RSCcA- Rinossinusite crônica com exposição ao algodão

RSCsA- Rinossinusite crônica sem exposição ao algodão

RSCcPN- Rinossinusite crônica com polipose nasal

RSO- Rinossinusite ocupacional

SNOT-22- Sino-nasal Outcome Test - 22

TCSP- Tomografia Computadorizada dos Seios Paranasais

TGF-β- Transforming growth factor beta

Th- *T-helper*

TLR4- Receptor toll-like para endotoxina

TNF-α- Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA	24
	2.1. Rinossinusite ocupacional	
	2.2. Algodão como indutor de doença respiratória	
	2.3. Fatores ocupacionais relacionados à inflamação da via aérea superior	
	2.4. Efeitos dos alérgenos ocupacionais inalados no sistema imunológico	
	2.5. O papel das interleucinas na rinossinusite crônica	29
	2.5.1. Interleucina-4	29
	2.5.2. Interleucina-5	
	2.5.3. Interleucina-10	30
	2.5.4. Interleucina-17	
	2.5.5. Interleucina-33	30
3	OBJETIVOS	32
٥.	050211400	
1	CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
4.	4.1. Aspectos éticos	
	4.2. Casuística	
	4.3. Avaliação histológica	
	4.3.1. Coloração com hematoxilina e eosina	
	4.3.2. Ensaios imuno-histoquímicos	37
	4.3.2. Ensaios inuno-nistoquimicos	
	4.4. Allalise estatistica	39
5	RESULTADOS	11
J.	5.1. Análise imuno-histoquímica	
	5.1.1. Análise subjetiva: RSCcA x controle	
	5.1.2. Análise objetiva: RSCcA x RSCsA x Controle	44
	3. 1.2. Analise objetiva. NGCCA x NGCSA x Controle	30
6	DISCUSSÃO	54
υ.	6.1. Proteção aos trabalhadores	
	6.1. Proteção aos trabalhadores	61
7	CONCLUSÕES	62
1.	CONCLUSUES	03
Ω	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
J.	ILI LILITOIAO DIDLIOONAI IOAO	
a	ANEXOS	71

1- Introdução

A rinossinusite crônica (RSC), uma das doenças crônicas mais comuns, é definida como uma condição de inflamação na mucosa dos seios paranasais que persiste por mais de 12 semanas. A prevalência da RSC foi relatada entre 6 e 27,1% (Hastan et al., 2011). Se apresenta com obstrução, secreção nasal, hiposmia, tosse, cacosmia, cefaleia, entre os principiais sintomas. Ao exame físico são encontradas hipertrofia de conchas nasais, deformidade septal, pólipos nasais (PN), degeneração polipóide e secreção nasal, como principais achados. Pode ser dividida em duas formas: RSC com PN (RSCcPN) e sem PN (RSCsPN). Seu diagnóstico clínico é baseado em sintomas, o que pode provocar uma super prevalência de casos. Essa prevalência aparenta aumentar com a idade e é mais encontrada em mulheres (Fokkens et al., 2012).

O trato respiratório é uma das principais portas de entrada de partículas e substâncias estranhas ao organismo. As fossas nasais constituem o primeiro contato com os agentes inalados e executa os primeiros mecanismos de defesa: filtração, condicionamento do ar e sensação de odores e irritantes. São funções importantes, mas geralmente subestimadas.

O local de trabalho pode representar uma ameaça aos mecanismos de defesa nasal devido à exposição repetida e prolongada a substâncias que podem ter impacto negativo na respiração e olfato (Siracusa; Desrosiers; Marabini, 2000). Existem evidências de que trabalhadores expostos a vários alérgenos e produtos químicos têm potencial para adquiriem doenças crônicas, incluindo a rinossinusite (Siracusa; Desrosiers; Marabini, 2000). Em contraste com a maioria das rinites alérgicas e hiperresponsividade nasal, a rinossinusite ocupacional (RSO) oferece um controle de medida exclusivo e eficaz relacionado à exposição para reduzir seu impacto nos pacientes (Jarvis et al., 2012).

Dados prospectivos de adolescentes apresentados ao ambiente de trabalho mostram que trabalhar em ambientes de alto risco resulta em maior incidência de rinite em comparação com aqueles não empregados em tais ambientes. Os dados também mostram que a maior incidência de RSO é encontrada durante os primeiros meses de exposição a substâncias irritantes e sensibilizantes, enfatizando a importância da prevenção precoce (Hellgren, 2008).

Dois estudos da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição da Coréia do Sul identificaram vários fatores de risco para RSC, incluindo falta de vacinação contra influenza, desvio de septo e rinite alérgica. Além disso, houve aumento significativo da prevalência de RSC em operadores e montadores de máquinas e instaladores, trabalhadores artesanais e de comércio correlato (Kim et al., 2011; Koh; Kim, Han, 2009).

A prevalência de RSO foi estimada em 5-15% entre todas as formas de rinossinusite (Puchner; Fink, 2000). Mais de 60 milhões de pessoas em todo o mundo trabalham na indústria têxtil e, embora a exposição ao pó de algodão tenha sempre sido associada à bissinose, está claro hoje que ela também está relacionada à doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e câncer de pulmão (Lai; Christiani, 2013).

A ocorrência estimada de RSC ocupacional, em relação a outras causas, na Europa é de: Portugal (27,10%), Bélgica (18,80%), Polônia (17,10%), Holanda (14,30%), França (13,30%), Itália (10,90%), Reino Unido (10,60%), Alemanha (10,50%), Dinamarca (7,90%), Suécia (8,65%) e Finlândia (6,90%) (Hellings et al., 2013; Hox et al., 2012). Nesses países, os agentes ocupacionais mais citados pelos pacientes e controles são: alvejante, pó inorgânico, tintas, cimento, amônia, gás combustível e acetona, principalmente os faxineiros, trabalhadores de construção civil, pintores, carpinteiros e mecânicos.

No Guia de Doenças Otorrinolaringológicas Ocupacionais (Della Giustina et al., 2003), o algodão não é citado como possível causa de rinossinusite, estando relacionado apenas à rinite ocupacional. Devido à escassez de resultados de estudos longitudinais, algumas questões importantes permanecem sem resposta, como a importância da manifestação de RSO crônica em pessoas expostas ao pó de algodão e as possíveis alterações imuno-histoquímicas (IHQ) que podem resultar dessa exposição.

O algodão como aeroalergeno, bem como a endotoxina, presente em todas as etapas do processamento do algodão, são conhecidos por induzirem respostas inflamatórias em doenças que afetam as vias aéreas. O nível de endotoxinas em plantas de processamento de algodão está significativamente acima dos níveis seguros estabelecidos na literatura (Lai; Christiani, 2013).

No entanto, dada a alta frequência de sintomas das vias aéreas superiores na população geral, testes objetivos confirmando a etiologia ocupacional não são realizados e são necessários para um manejo adequado. O primeiro passo para estabelecer a origem relacionada ao trabalho é a exclusão de outras causas comuns, como fatores locais (desvios septais, disfunção da válvula nasal) ou alergias a alergenos comuns, por exemplo, ácaros, pólenes, fungos ou animais de estimação. Outro método é a "remoção do trabalho" temporariamente. O paciente é avaliado após um período de semanas longe da exposição laboral e é reavaliado novamente algumas semanas após a retomada do trabalho (Hox et al., 2014).

Por se tratar de doença inflamatória, é fundamental o entendimento dos mediadores inflamatórios e das vias de ação envolvidos na RSC. Várias hipóteses têm sido aventadas para elucidar os mecanismos de ação da doença. Alguns fatores podem influenciar na gravidade da sintomatologia clínica, sendo um dos principais relacionado a componentes genéticos predisponentes, que podem afetar a expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias repercutindo na gravidade do processo inflamatório (Haukim et al., 2002). Essa condição genética somar-se-ia à interação ambiental, a exemplo da alergia, infecção bacteriana (em especial, diante da formação de biofilmes e/ou de superantígenos), ou ainda infecções fúngicas, para compor o fenogenótipo da RSC. Fatores pró-inflamatórios, a exemplo das interleucinas (IL) 4, 5, 10, 17, 33 e algumas quimiocinas, têm sido estudados e comprovadamente envolvidos no desenvolvimento da RSC (Bachert et al., 2001).

Devido à escassez de estudos sobre a RSC induzida por exposição ao algodão, decidiu-se investigar as correlações entre o grau de expressão das IL 4, 5, 10, 17 e 33 nos pacientes portadores de RSC expostos ao algodão, naqueles com RSC sem exposição ao algodão e controles sem RSC.



2.1 Rinossinusite ocupacional

Denomina-se RSO quando ocorrem inflamações da mucosa sinusal no exercício da atividade laboral, desencadeadas pela exposição a agentes irritantes como gases, vapores, névoas e poeiras (Shusterman, 1997). Assim, considera-se que sua etiologia geralmente é multicausal (Walusiak, 2006). É relativamente bem conhecido que a exposição a inalantes de baixo peso molecular (poeiras, fumos e gases), bem como de alto peso molecular (exposição em biotério, plantas, látex, indústria têxtil, etc.), podem desencadear rinite relacionada ao trabalho. A ocorrência de rinossinusite está associada à rinite e, portanto, pode se considerar que a exposição ocupacional também aumenta o risco de RSC. Porém, os estudos disponíveis que relacionam exposição profissional ao desenvolvimento ou exacerbação de doenças respiratórias estão mais focados na asma e nos sintomas do trato respiratório inferior (Brautbar, 1998). Infelizmente, o estabelecimento do nexo causal e a completa elucidação da fisiopatologia do desenvolvimento da RSO e os mais diversos tipos de exposições ocupacionais existentes em nosso meio não fazem parte da rotina dos profissionais da saúde afeitos a essa questão por falta de conhecimentos epidemiológicos, fisiopatológicos específicos e de políticas públicas (Della Giustina et al., 2003).

A RSC está associada a doenças alérgicas e não alérgicas (Dass; Peters, 2016). A relação causal para a maioria dos pacientes com RSC, no entanto, permanece desconhecida. Trabalhadores de limpeza, em geral, com exposição ocupacional a alérgenos transportados pelo ar e sensibilizadores, tais como poeiras orgânicas, tinta spray, vapores de soldagem, possuem confirmado aumento no desenvolvimento de rinite (Hellgren et al., 2002; Hellgren; Karlsson; Torén, 2003). Gao et al. (2016), em estudo recente, baseado em entrevistas com 10.633 sujeitos com exposição ocupacional a poeiras e fungos ou ambientes úmidos, observaram associação significativa desses agentes no desenvolvimento da RSC. Em estudo de caso-controle, verificou-se que pacientes com RSC com indicação de cirurgia (cirurgia endoscópica funcional dos seios da face - FESS), em particular aqueles com necessidade de cirurgias repetidas, são mais propensos a terem sido expostos a agentes nocivos inalados no trabalho do que controles. A relação entre exposição

ocupacional e desenvolvimento da RSC ainda permanece incerto e não foram encontrados estudos populacionais maiores em relação à exposição ocupacional (Clarhed et al., 2018).

Poucos estudos avaliaram previamente o efeito da exposição ocupacional na prevalência da RSC. Koh, Kim e Han (2009) utilizaram dados da Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição da Coréia de 1998, 2001 e 2005 para comparar a prevalência da RSC entre os principais grupos da classificação ocupacional padrão com trabalhadores administrativos como grupo de referência. Em geral, a prevalência de RSC foi elevada em trabalhadores manuais com efeito significativo entre operadores de plantas ou máquinas e montadores. O efeito da exposição ocupacional a poeira, fumos e gases na prevalência de rinossinusite tem sido abordado por outros pesquisadores, comparando a prevalência de rinossinusite em ocupações tradicionais de "alta exposição", como os trabalhadores de fábricas de especiarias (Zuskin et al., 2004).

Diagnosticar doença ocupacional das vias aéreas superiores é um desafio para o clínico. O mais importante é pensar sobre a possibilidade de uma etiologia ocupacional em qualquer paciente que sofra de doença crônica das vias aéreas superiores. Consequentemente, é importante obter informações sobre a ocorrência, tipo e duração dos sintomas, se há relação com o trabalho e questionar sobre exposições acidentais. Os sintomas de rinorréia, obstrução nasal, espirros, prurido e episódios de epistaxe, ligados a exposições específicas no trabalho, são sugestivos de rinite ocupacional (Moscato et al., 2008). Reclamações adicionais de pressão facial, gotejamento pós-nasal e redução do olfato são sugestivos de progressão para rinossinusite. Além disso, é importante estar alerta para a melhora de sintomas sinonasais durante os finais de semana, feriados e períodos de férias.

2.2 Algodão como indutor de doença respiratória

A exposição ao algodão pode induzir limitação aguda do fluxo aéreo de modo reversível, manifestada pelo declínio no volume expiratório forçado no primeiro segundo (FEV1) (Wang et al., 2005). No entanto, a magnitude da doença crônica das vias respiratórias após a exposição em longo prazo ao algodão não está clara,

apesar de vários estudos terem indicado que em longo prazo a exposição pode levar à doença respiratória crônica e perda excessiva da função pulmonar. Devido à escassez de dados longitudinalmente coletados, algumas importantes questões permanecem sem solução. Por exemplo, qual a repercussão na manifestação de sintomas de RSO crônica em populações expostas à poeira de algodão, bem como quais alterações IHQ são decorrentes desta exposição.

Os resultados de um estudo de coorte que avaliou um grupo de trabalhadores têxteis chineses expostos cronicamente à poeira de algodão foram relatados. Uma das características da coorte foi que 50% dos trabalhadores eram mulheres não fumantes, o que permitiu a avaliação dos efeitos da exposição ao algodão, sem relação com o tabagismo. Esses trabalhadores apresentaram maior incidência cumulativa de sintomas respiratórios e perda da função pulmonar. Para fornecer confirmação e evidência para os efeitos respiratórios crônicos da exposição ao algodão, os autores observaram esses trabalhadores por 20 anos. Durante o último período de cinco anos verificou-se que quase todos (96%) os trabalhadores haviam se aposentado da indústria têxtil (Wang et al., 2005).

De acordo com o Guia de Doenças Ocupacionais Otorrinolaringológicas, o algodão não é citado como agente causal de rinossinusite, sendo somente relacionado à rinite ocupacional. Todavia, estudos demonstraram que a poeira gerada durante a manipulação e o processamento do algodão causa problemas de saúde nos trabalhadores (Wang et al., 2005).

Bardana (1995) objetivou determinar a prevalência de sintomas respiratórios entre os trabalhadores de processamento do algodão e envolveu 188 trabalhadores de fábricas de descaroçamento de algodão. A capacidade vital forçada (CVF), pico de fluxo expiratório (PFE) e FEV1 diminuíram significativamente com o aumento da duração da exposição dos trabalhadores (p<0,001). Os resultados de um questionário de avaliação médica respiratória padrão indicaram que, dependendo do tempo de exposição, 51% a 71 % dos trabalhadores sofriam de aperto no peito, 55% a 62 % dor no peito experiente, enquanto que 33% a 42% relataram tosse frequente. Os exames de sangue desses trabalhadores apresentaram maiores valores de taxa de sedimentação de eritrócitos, eosinófilos e leucócitos, principalmente quando a exposição era mais prolongada, gerando recomendação de check-ups médicos periódicos, uso obrigatório de equipamento de proteção individual e ventilação adequada no local de trabalho.

2.3 Fatores ocupacionais relacionados à inflamação da via aérea superior

Agentes ocupacionais capazes de causar inflamação sintomática da via aérea são tradicionalmente classificados como de alto peso molecular (APM) (>5 kDa), ou agentes de baixo peso molecular (BPM) (<5 kDa) (Bernstein et al., 2003). Agentes de APM são substâncias biológicas derivadas de plantas ou animais, como farinha, látex, ácaros, animais de laboratório e outras fontes, que podem causar inflamação das vias aéreas por meio da bem conhecida resposta imune mediada por IgE, levando à inflamação dirigida por T-helper (Th), como é o caso de aeroalérgenos não ocupacionais, como pólens e ácaros. Os mecanismos pelos quais as substâncias de BPM podem induzir a via aérea à inflamação são muito menos conhecidos. Agentes BPM podem ser subdivididos em grupos, de acordo com a sua capacidade de sensibilização.

2.4 Efeitos dos alérgenos ocupacionais inalados no sistema imunológico

A inflamação das vias aéreas causada por APM segue o paradigma bem conhecido de sensibilização alérgica a aeroalérgenos comuns, com mecanismos mediados por Th2 (Greiner et al., 2011). Os alérgenos inalados são absorvidos por células dendríticas nas vias aéreas e apresentados a linfócitos CD4+ nos gânglios linfáticos. As citocinas em conjunto com a ativação das células CD4+ provocam mudança para o subtipo com a produção de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas ativam os linfócitos B para secretar antígeno específico IgE (Imunoglobulina E), que são liberados na circulação e se ligam a mastócitos que residem na mucosa das vias aéreas. Renovado contato com o alérgeno resulta em ligações cruzadas do antígeno com a sua IgE ligada a mastócito específico, induzindo a degranulação dos mastócitos com liberação local de histamina, triptase e leucotrienos. Esses mediadores agem nos tecidos vizinhos, causando os sintomas alérgicos agudos como espirros, rinorreia, chiado, tosse e broncoconstrição. Os

BPMs não são imunogênicos em seu estado de origem. No entanto, alguns agentes são capazes de sensibilizar o sistema imunológico adaptativo, agindo como haptenos, formando conjugados com proteínas, como queratina ou albumina (Sigdgaard; Heederik, 2010). Esses complexos hapteno-proteicos são reconhecidos pela célula dendrítica e, como os APMs, apresentados às células CD4+, que podem iniciar uma resposta imune. No entanto, o tipo de resposta imune gerada pode variar.

2.5 O papel das interleucinas na rinossinusite crônica

Sabe-se que o reconhecimento imunológico inato aos patógenos pelas células epiteliais da mucosa nasossinusal desempenha importante papel na RSC. A concentração e o papel na fisiopatogênese das IL são bem conhecidos, porém não há um padrão bem estabelecido entre os trabalhadores da indústria têxtil expostos ao algodão.

2.5.1 Interleucina-4

A IL-4 é uma glicoproteína anti-inflamatória de 129 aminoácidos de massa molecular de 15-19 kDa. Tem muitas funções biológicas, incluindo a estimulação de células B e T, proliferação e diferenciação de células B em células plasmáticas. É um regulador chave na imunidade humoral e adaptativa. Induzindo a produção de IgE, a superprodução de IL-4 está associada com alergias (Webber et al., 2009).

2.5.2 Interleucina-5

A IL-5 foi originalmente definida como uma citocina derivada de células T que ativa células B para a diferenciação terminal em células produtoras de imunoglobulina (Takatsu; Takaki; Hitoshi, 1994). Concomitantemente, a IL-5 tem sido reconhecida como o principal fator de maturação e diferenciação de eosinófilos (Koike; Takatsu, 1994; Rothenberg; Hogan, 2006).

A IL-5 humana é uma glicoproteína ativa na forma de um homodímero ligado a um radical sulfídico com 115 aminoácidos em cada cadeia de peso molecular de 25 a 40 Kd. É uma citocina produzida pelos linfócitos Th2 e mastócitos, expressa pelos eosinófilos e que desempenha papel importante em várias doenças em que há aumento de eosinófilos como a asma, rinite alérgica e esofagite eosinofílica. É responsável pela estimulação da produção de células B, pelo aumento da secreção de imunoglobulinas e exerce papel fundamental na ativação de eosinófilos (Bachert; Van Cauwenberge, 1997; Bagley; Lopez; Vadas, 1997; Milburn et al. 1993).

2.5.3 Interleucina-10

A IL-10 é uma citocina com potentes propriedades anti-inflamatórias, que desempenha papel central na limitação da resposta imune do hospedeiro a patógenos; prevenindo, assim, danos ao hospedeiro e mantendo a homeostase normal do tecido (Subramanian; Cheng, 2012).

2.5.4 Interleucina 17

O membro original da família IL-17, IL-17A, foi identificado em 1995, e subsequentemente, cinco citocinas, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também conhecida como IL-25) e IL -17F, foram identificadas como citocinas da família IL-17. A capacidade da IL-17A e IL-17F em evocar a migração de neutrófilos, mas não de eosinófilos, torna provável que essas citocinas estejam envolvidas na asma grave, em que o acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas é marca registrada da doença (Moseley et al., 2003).

2.5.5 Interleucina-33

A IL-33, um membro da família das citocinas IL-1, é expressa por células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, células de músculo liso, macrófagos e células dendríticas (Liew; Pitman; McInnes, 2010; Schmitz et al., 2005; Sims; Smith, 2010). O receptor de IL-33, um complexo heterodimérico composto por receptores ST2 e IL-

1 proteína acessória (IL1RAP), é expresso em numerosas células imunes, incluindo células Th2, mastócitos, basófilos, eosinófilos e macrófagos (Chackerian et al., 2007; Liew; Pitman; McInnes, 2010; Sims; Smith, 2010). A IL-33 é um quimioatrativo para células Th2 e promove a polarização de Th2 de células T CD4, melhorando a produção de IL-5 e IL-13, independente da IL-4 (Komai-Koma et al., 2007; Kurowska-Stolarska et al., 2008). IL-33 pode também induzir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por mastócitos e aumentar a degranulação, estimular os basófilos e eosinófilos e aumentar a polarização de IL-13 de macrófagos ativados (Allakhverdi et al., 2007; Kurowska-Stolarska et al., 2009; Pecaric-Petkovic et al., 2009). Mais recentemente, o importante papel da IL-33 na regulação do desenvolvimento e da função de células linfóides inatas do tipo 2 foi descrita (Barret; Austen, 2009; Spits; Di Santo, 2011).

Investigar possíveis correlações entre o grau de expressão das IL 4, 5, 10, 17 e 33, nos funcionários expostos ao algodão em ambiente laboral e que apresentam RSC com pacientes com RSC sem essa exposição e outro grupo, o controle, sem RSC.



4.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo nº1139\2013 (Anexo A).

Os pacientes foram convidados a participar do estudo e devidamente esclarecidos sobre os objetivos e os procedimentos a serem realizados, sendo incluídos os que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCL) (Anexo B).

4.2 Casuística

A amostra do estudo incluiu todos os funcionários de uma indústria têxtil na cidade de Nova Odessa, Estado de São Paulo, Brasil. Todos os funcionários dessa fábrica estavam expostos ao pó de algodão e, de acordo com o Relatório Técnico de 2010 sobre a Avaliação de Agentes Ambientais, em níveis acima da tolerância, devido às características físicas da planta.

O estudo foi desenvolvido em três etapas:

Etapa 1. Entre outubro e novembro de 2009, os funcionários foram selecionados para o diagnóstico clínico da RSC com dois questionários. O questionário 1 (Anexo C), que serviu como ferramenta de triagem para o diagnóstico da doença, consistiu em questões relacionadas a presença de sintomas de rinossinusite, de acordo com o European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyposis (EPOS), e o questionário 2 (Anexo D) foi o Sino-nasal Outcome Test - 22 (SNOT-22) (Fokkens et al., 2012). Todos os funcionários da fábrica preencheram os dois questionários no momento da avaliação e forneceram seu consentimento assinado para participar do estudo. Os seguintes critérios de exclusão foram utilizados nessa fase do estudo: cirurgia nasal prévia, tratamento farmacológico atual para doenças do nariz e não exposição ao algodão durante todo o dia de trabalho.

Todos os participantes receberam uma pontuação no SNOT-22 com base em suas respostas e foram classificados como critérios clínicos positivos / com RSC e negativos / sem RSC.

Etapa 2. Nessa fase, os participantes que preencheram os critérios positivos para RSC foram convidados a realizar testes complementares para estabelecer o diagnóstico clínico. Os voluntários que concordaram em participar dessa fase foram submetidos à naso-fibroscopia flexível (NF), avaliação por tomografia computadorizada dos seios paranasais (TCSP) e biópsia da mucosa nasal da concha média de ambas as narinas.

Foi utilizado o sistema Lund-Mackay para analisar imagens de TCSP e o sistema de escore endoscópico de Lund-Kennedy para avaliar os resultados das NF (Hellings et al., 2013; Hox et al., 2012). Os achados da TCSP foram considerados positivos quando os escores de Lund-Mackay foram maiores que 2 e a NF foi considerada positiva quando os escores de Lund-Kennedy foram maiores que 2. Um segundo grupo de pacientes com RSC, sem exposição laboral às fibras do algodão, foi selecionado direto no Ambulatório de Rinologia do HCFMRP-USP e também submetido às avaliações complementares. Por fim, para o grupo controle, foram selecionados pacientes sem alterações nasais ou sinusais, submetidos à rinoplastia, cirurgia estética ou cirurgia otológica no HCFMRP-USP e também à biópsia da concha média de ambas as narinas.

Etapa 3. Todas as amostras da mucosa da concha média foram preparadas em laboratório para análises histológicas e IHQ para os mediadores inflamatórios IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IL-33, com base em kits de imunoensaio selecionados e específicos, analisadas e fotografadas no microscópio com aumento de 5x, 10x, 20x e 40x, conforme descrito na literatura internacional.

A seleção dos três grupos com diferentes anticorpos primários foi um meio de avaliar melhor eventuais variações citoplasmáticas, epiteliais e de núcleos. No grupo com RSC com exposição às fibras de algodão, na avaliação da IL-4 se esperava que corasse a camada basal do epitélio e das glândulas (internamente); na IL-5, a

camada apical do epitélio e no estroma, na IL-10 que corasse principalmente as glândulas (externamente), na IL-17 nas glândulas (internamente) e no estroma e, finalmente, na IL-33 esperava-se que corasse o núcleo da camada basal do epitélio.

Para incrementar a avaliação, optou-se por fazer uma avaliação das lâminas de forma subjetiva (examinadores) e outra objetiva (por um software). A avaliação subjetiva da reação IHQ foi realizada por três observadores, de forma independente, de maneira qualitativa (presente ou ausente) e quantitativa, de acordo com a intensidade da coloração observada (fraca = 1, moderada = 2 e acentuada = 3). Quando não houve concordância entre as avaliações, a lâmina foi discutida para se chegar a um consenso.

4.3 Avaliação histológica

As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina a 60º para inclusão em blocos. Os blocos de parafina foram cortados por micrótomo Leica Jung RM2065 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) em cortes de 6 µm de espessura, e avaliados por microscopia ótica.

4.3.1 Coloração com hematoxilina e eosina

Inicialmente, os cortes foram desparafinizados em xilol, rehidratados em série decrescente de etanol e lavados em água destilada. A seguir, foram corados em solução de Hematoxilina de Harris (H) por dois minutos, lavados em água corrente, imersos em Eosina por dois minutos, e novamente lavados em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em *Tissue Mount* (Tissue Tek® Glas™ Mounting Media, Sakura, Finetek USA).

4.3.2 Ensaios imuno-histoquímicos

As lâminas com os cortes histológicos foram desparafanizadas em duas séries de xilol por 15 minutos cada e reidratadas em uma bateria de álcoois decrescentes (ABS, 95, 90, 80, 70 e 50 e água destilada), e lavadas em solução tampão PBS 0.1M por três vezes de cinco minutos cada.

Os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio 1% diluído em solução de tampão fosfato-salino (PBS) 0.1M por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro; em seguida foram lavados três vezes com água destilada e também três vezes em PBS 0.1M. Para o bloqueio das reações inespecíficas, as lâminas foram incubadas em solução de albumina de soro bovino (BSA) 2%, diluído em PBS 0,1 M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) durante 30 minutos, à temperatura ambiente e depois lavadas três vezes com PBS 0.1M. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários (anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-10, anti-IL-17 e anti-IL-33) em câmera úmida à temperatura ambiente por duas horas. Tais anticorpos foram adquiridos da Abcam (Abcam, Cambridge, UK), Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EUA) e diluídos em 1% solução de BSA de acordo com as especificações do fabricante. As lâminas foram lavadas seis vezes em PBS 0.1 M, por cinco minutos cada. Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (diluição de 1:1000 em solução de BSA 1%) anti-rabbit (anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-10, anti-IL-17 e anti-IL-33). Novamente, as lâminas foram lavadas seis vezes em PBS 0.1M. Em seguida, o material foi incubado na solução reveladora de peroxidase de DAB 3,3'(Diaminobenzidina) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, com a utilização de DAB como cromógeno e lavado em PBS três vezes, por cinco minutos cada, em temperatura ambiente. O cromógeno DAB reagiu com a peroxidase conjugada com o anticorpo secundário, resultando em uma coloração marrom. Foi realizada a contra coloração com H por um minuto; em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente uma vez. Posteriormente, foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em *Tissue Mount* (Tissue Tek® Glas™ Mounting Media, Sakura, Finetek, USA).

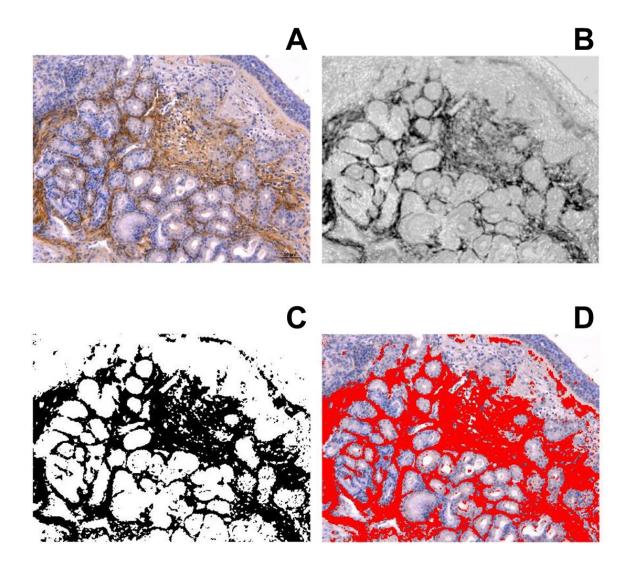
A avaliação histológica foi realizada com a utilização de microscópio Leica BM 4000 B LED (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e as imagens foram capturadas com câmera DFC 310C (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), acoplada ao microscópio, fornecendo imagem colorida RGB (Red, Breen, Blue) de 8-bit.

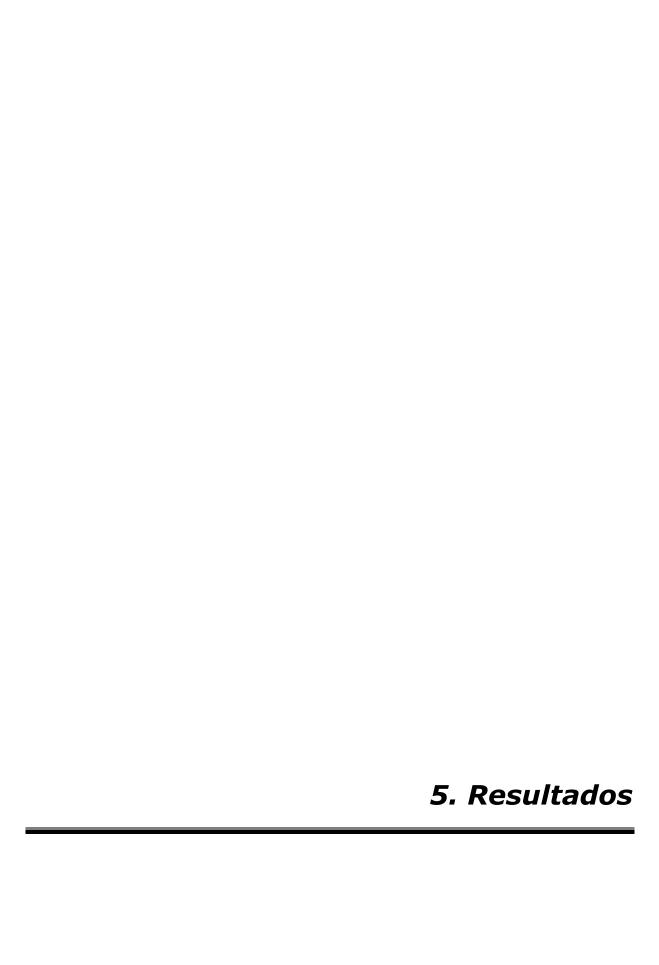
4.4 Análise estatística

As análises estatísticas da avaliação subjetiva foram realizadas com o software JMP SAS 10.0 (SAS Institute, Cary, NC). Os dados foram relatados como frequência e porcentagens. Os grupos foram comparados usando o teste qui-quare e o teste de Mann-Whitney. O gráfico foi gerado com o software Origin Pro 9.0 (OriginLab, Northampton, MA).

A avaliação objetiva da expressão dos marcadores IHQ foi realizada por meio de processamento de imagens para separar da imagem digital original, em formato RGB (Red, Breen, Blue), três matrizes em escala de cinza referentes à H, DAB e resíduo. O procedimento consiste em utilizar a deconvolução de cor com base nos vetores H e DAB. A Figura 1 ilustra os passos realizados durante a análise. A partir da imagem original (A) foi obtida a matriz referente à DAB (B). A intensidade de DAB foi ajustada utilizando um threshold para obtenção de uma imagem binária (C). A expressão de DAB foi expressa como porcentagem de sua área em função da área total. Em (D) observou-se a sobreposição da região DAB sobre a imagem original. Todos os procedimentos foram realizados em rotinas elaboradas no software Matlab 2015a (The MathWorks Inc., Natick, MA).

Figura 1 - Processamento de imagens para quantificação da expressão de DAB. (A) Imagem original. (B) Matriz referente à DAB extraída pela deconvolução de cor. (C) Threshold utilizado para binarizar a imagem, realçando somente a expressão da IL. (D) Imagem original + imagem binarizada (mostrada em vermelho) ilustrando as regiões segmentadas





Foram avaliados 133 funcionários que preencheram o questionário para o diagnóstico de RSC (questionário 1) e o SNOT-22. Desses, 66,4% eram do sexo feminino e 33,6% do sexo masculino. A média de idade foi de 39 (± 8) anos e o tempo médio de trabalho na fábrica foi de 11 (± 3) anos. De acordo com a seleção baseada em questionários, 35,3% (n=47) dos participantes preencheram critérios clínicos para o diagnóstico de RSC (Tabela 1). A média encontrada para o score do SNOT-22 foi de 28 pontos.

Tabela 1 - Caracterização por gênero dos funcionários que responderam aos questionários

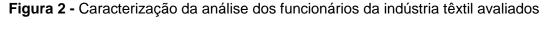
Gênero	n (amostragem)	Porcentagem (%)
Masculino	45	33,8
Feminino	88	66,2
Total	133	100

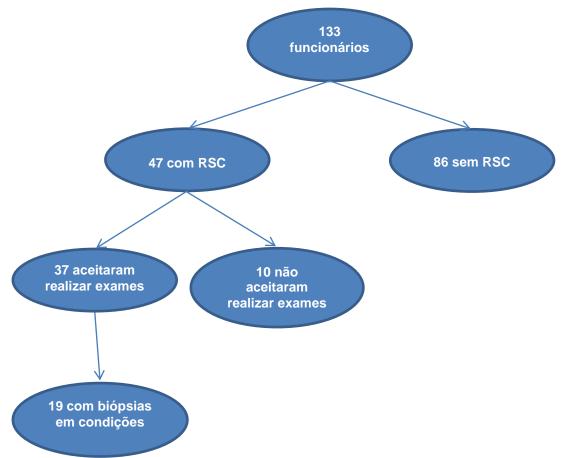
Voluntários que preencheram os critérios clínicos para RSC (n=47) foram convidados a fazer testes complementares (NF, TCSF e biópsia nasal) (Tabela 2). Desses, 37 concordaram em fazer os testes. Foram encontradas alterações na NF compatíveis com RSC em 26 (70,2%) indivíduos. Com base nos achados da TCSP, o diagnóstico de RSC foi confirmado em 27 (72,9%) casos (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização do diagnóstico clínico de RSC nos funcionários que responderam aos questionários quanto aos achados de RSC à nasofibroscopia flexível, de acordo com o escore de Lund-Kennedy e quanto aos achados de RSC à TCSP, de acordo com o escore de Lund-Mackay

	Diagnóstico RSC	Lund-Kennedy	Lund-Mackay
Positivo	47 (35,3%)	26 (70,2%)	27 (72,9%)
Negativo	86 (64,7%)	11 (28,8%)	10 (27,1%)
Total	133 (100%)	37 (100%)	37 (100%)

Foram consideradas em condições ideais para a nova análise as biópsias de apenas 19 pacientes. Desses, 79% (15) eram do sexo feminino e 21% (4) do sexo masculino. A idade média foi de 42 (± 10) anos.





O grupo de pacientes com RSC sem exposição ao algodão (RSCsA), por sua vez, foi formado por 19 participantes, sendo 63,1% (12) mulheres e 36,9% (7) homens, com idade média de 39 (± 7) anos. O grupo controle foi formado por 12 participantes, sendo 50% homens e 50% mulheres (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao gênero (p=0,093). A idade média foi de 34 (± 5) anos.

Tabela 3 - Caracterização número de pacientes quanto ao gênero nos grupos do estudo

Gênero	RSCcA	RSCsA	Controle
Masculino	4	7	6
Feminino	15	12	6
Total	19	19	12

^{*}RSCcA: grupo de funcionários com rinossinusite crônica com exposição às fibras do algodão; RSCsA: grupo de pacientes com rinossinusite crônica sem exposição às fibras do algodão

5.1 Análise imuno-histoquímica

5.1.1 Análise subjetiva: RSCcA x controle

Primeiramente, os grupos de funcionários com RSC e o grupo controle tiveram suas biópsias analisadas de forma subjetiva de acordo com a marcação com cada tipo de IL (IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IL-33) qualitativa e quantitativamente (Figuras 2 a 5).

Figura 3 - Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo com rinossinusite crônica com exposição às fibras de algodão. (A e B) coloração do anticorpo anti-IL-4; (C e D) coloração do anticorpo anti-IL-5; (E e F) coloração do anticorpo anti-IL-10. Identificado em marrom (ampliação de 40x)

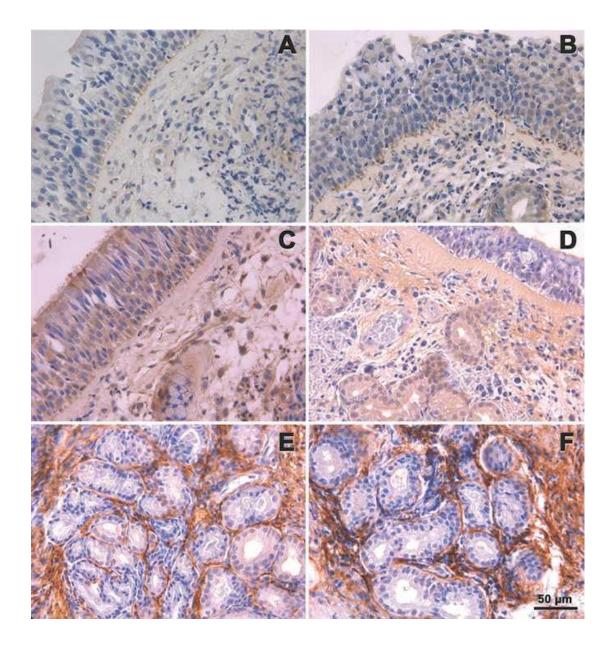


Figura 4 - Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo com rinossinusite crônica com exposição a fibras de algodão. (A e B) coloração do anticorpo anti-IL-17; (C e D) coloração do anticorpo anti-IL-33. Identificado em marrom (ampliação de 40x)

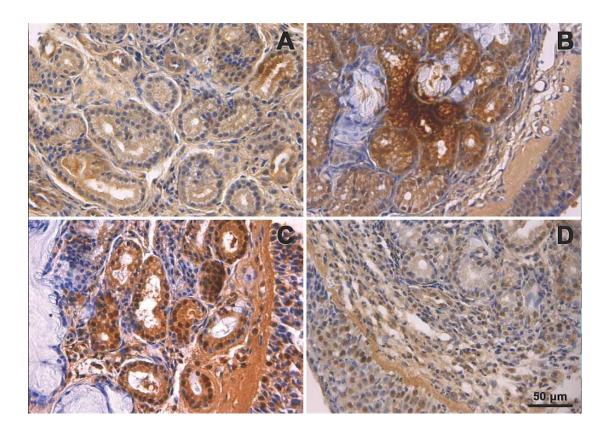


Figura 5 - Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo controle. **(A e B)** coloração do anticorpo anti-IL-4; **(C e D)** coloração do anticorpo anti-IL-5; **(E e F)** coloração do anticorpo anti-IL-10. Não identificado (marrom) (ampliação de 40x)

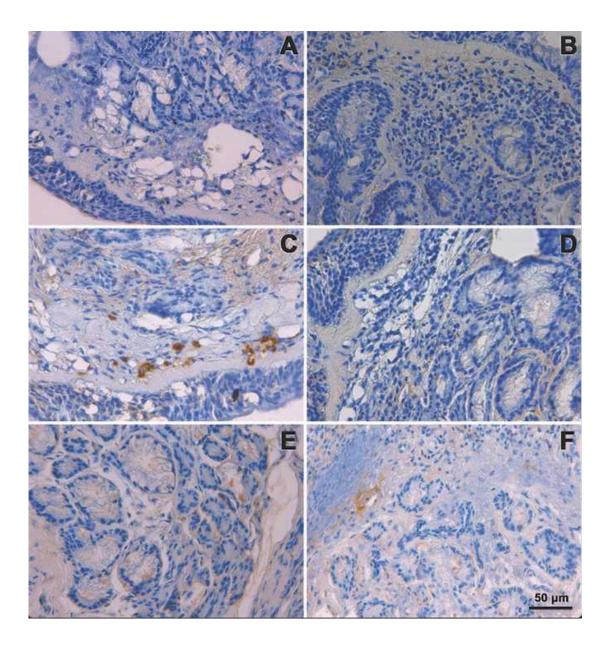
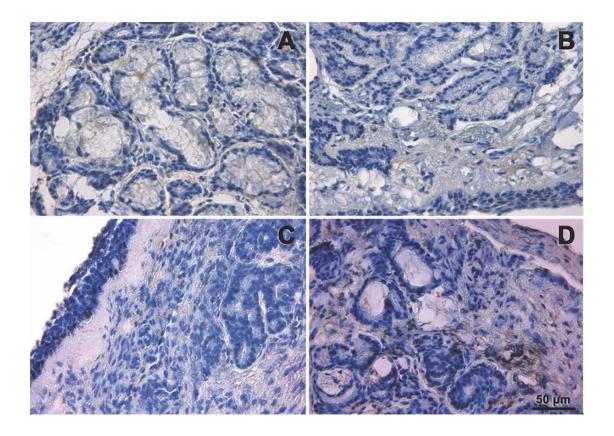


Figura 5 - Cortes histológicos da mucosa nasal do grupo controle. (A e B) coloração do anticorpo anti-IL-17; (C e D) coloração do anticorpo anti-IL-33. Não identificado (marrom) (ampliação de 40x)



No grupo de funcionários com RSC expostos às fibras de algodão, as lâminas não coraram em apenas 10,5% (2) da IL-4, 10,5% (2) da IL-5, em 5,3% (1) na IL-10, em 21% (4) na IL-17 e em 5,3% (1) na IL-33. Por sua vez, eles coraram significativamente (acentuada) em 26,3% (5) da IL-4, 47,4% (9) da IL-5, 63,1% (12) da IL-10, 52, 6% (10) na IL-17 e 57,9% (11) na IL-33. No grupo controle, as lâminas não coraram em 91,7% (11) da IL-4, 66,7% (8) da IL-5, 100% (12) da IL-10, 91,7% (11) na IL-17 e em apenas 8,3% (1) na IL-33. Por sua vez, coraram significativamente (acentuada) apenas em 8,3% (1) na IL-33 (Tabelas 4 e 5). Quando avaliadas de forma independente e comparando os dois grupos, todas as IL apresentaram significância estatística.

Tabela 4 - Avaliação subjetiva de forma qualitativa da marcação na imuno-histoquímica no grupo de RSC com exposição ao algodão

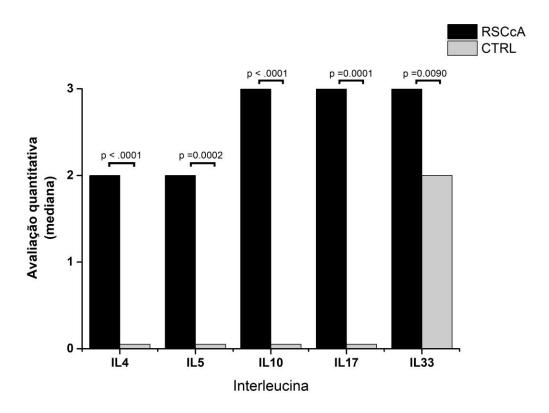
Interleucina	Presente	Ausente	TOTAL
IL-4	17	2	19
IL-5	17	2	19
IL-10	18	1	19
IL-17	15	4	19
IL-33	18	1	19

Tabela 5 - Avaliação subjetiva de forma qualitativa da marcação na imuno-histoquímica no grupo controle

Interleucina	Presente	Ausente	TOTAL
IL-4	1	11	12
IL-5	4	8	12
IL-10	0	12	12
IL-17	1	11	12
IL-33	11	1	12

E quando comparadas, de forma quantitativa, todas as ILs mostraram alteração significativamente estatística entre os grupos (Figura 6).

Figura 6 - Comparação entre os grupos RSCcA (rinossinusite crônica com exposição ao algodão) vs CTRL (controle). O gráfico mostra a mediana da avaliação quantitativa (Teste de Mann-Whitney)



5.1.2 Análise objetiva: RSCcA x RSCsA x controle

Na análise objetiva, foram analisados os três grupos quantitativamente e todas as ILs mostraram significância estatística, quando comparados entre eles (Tabela 6 e Figuras 7 a 11).

Tabela 6 - Média e erro	padrão (EP) da marcação	(%)	quando com	parados os	três grupos
	(,	(/			

IL.			GRI	JPO			ANOVA * (F; p)
"-	СТІ	RL	RSC	RSCsA		cA	_ ANOVA (1, p)
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	
IL4	13,8 ^a	1,4	18,3 ^a	2,6	35,3 ^b	2,6	16,7; <,0001
IL5	12,4 ^a	2,1	12,8 ^a	2,3	36,5 ^b	2,5	24,3; <,0001
IL10	13,7 ^a	1,3	10,3 ^a	2,0	34,1 ^b	1,4	62,4; <,0001
IL17	13,1 ^a	0,9	13,6 ^a	2,4	38,7 ^b	1,6	59,9; <,0001
IL33	10,2 ^a	1,7	18,2 ^a	3,4	45,5 ^b	1,3	54,4; <,0001

^{*}Análise de variância unifatorial. As letras sobrescritas indicam diferença no pós-teste de Tukey. Nível de significância adotado foi p < 0,05.

Figura 8 - Interleucina 4: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)

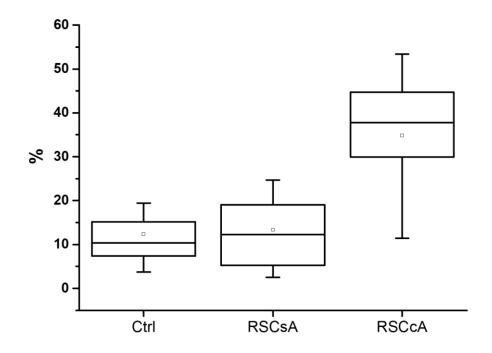


Figura 9 - Interleucina 5: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)

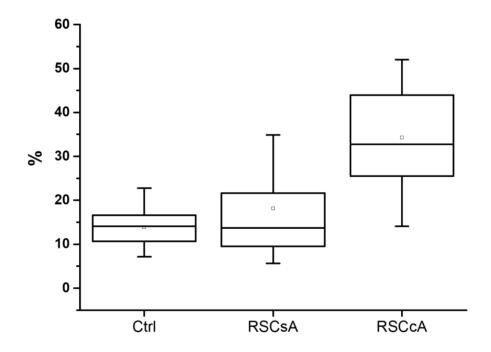


Figura 10 - Interleucina 10: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)

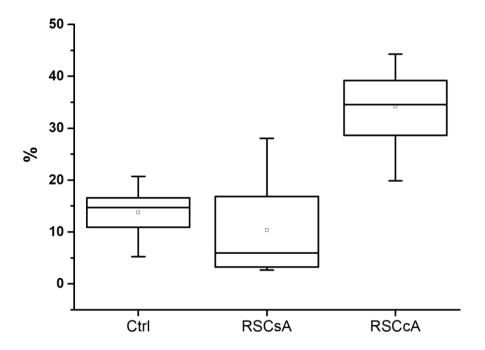


Figura 11 - Interleucina 17: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)

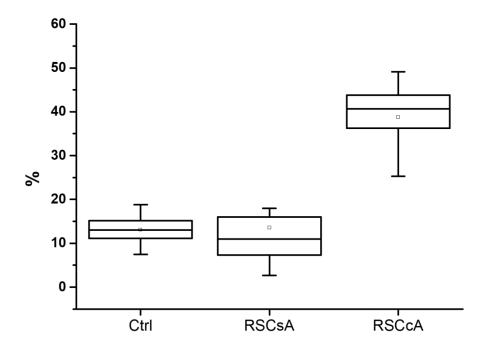
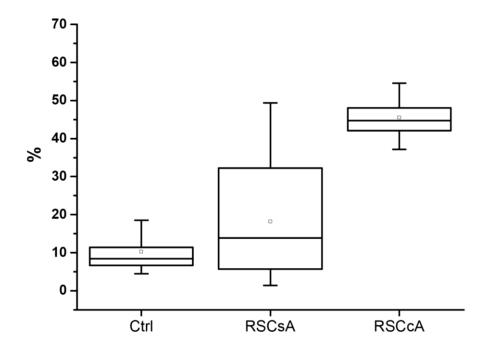


Figura 12 - Interleucina 33: Comparação quantitativa entre os grupos controle (Ctrl), rinossinusite crônica sem exposição ao algodão (RSCsA) e rinossinusite crônica com exposição ao algodão (RSCcA)



6. Discussão

O termo "RSO" foi proposto apenas recentemente, e existem dados muito limitados sobre o impacto de agentes ocupacionais na doença sinusal (Hox et al., 2012). No entanto, faz sentido supor que as cavidades sinusais também podem ser afetadas pela exposição a agentes ocupacionais porque a mucosa do nariz e dos seios paranasais estão tão intimamente ligadas anatômica e histologicamente, além de compartilharem perfis inflamatórios semelhantes.

Della Giustina et al. (2003), em uma recente revisão, observaram extensa relação de doenças das vias aéreas superiores relacionadas com o trabalho e seus agentes causais associados com a ocupação, ambiente e operações executadas, indo, por sua vez, ao encontro dos itens identificados na presente casuística.

Apenas poucos estudos se concentraram na ocorrência de sintomas sinusais em relação ao trabalho. Zuskin et al. (1998, 2004) realizaram várias pesquisas em setores de trabalho específicos, como recicladores de papel, trabalhadores têxteis e farmacêuticos, e encontraram relação clara entre sintomas de rinosssinusite e exposições relacionadas ao trabalho. No entanto, o questionário não cobria totalmente a definição atual de rinossinusite (Fokkens et al., 2012).

Estudos de acompanhamento dos trabalhadores presentes no local do desastre do World Trade Center revelaram que sintomas de rinossinusite foram relatados em 50% dos trabalhadores expostos ao ferro (Skloot et al., 2004) e 48% dos bombeiros (Webber et al., 2009). Hox et al. (2014), em estudo retrospectivo de 467 pacientes com rinossinusite submetidos à FESS revelaram que exposições ocupacionais relevantes foram duas vezes mais frequentes entre esses pacientes do que seus controles (25% vs 12%, respectivamente), mas também que as proporções de sujeitos com exposições ocupacionais relevantes aumentaram significativamente (p<0,001) com o número de FESS. Embora esse estudo retrospectivo não comprove que os agentes ocupacionais causaram rinossinusite, ele fornece fortes evidências de que exposições ocupacionais estão envolvidas nas formas mais graves de rinossinusite.

Segundo Arrais (1999), dada a exposição ao pó de algodão e outras matérias primas, amplamente utilizadas na indústria têxtil, os sintomas descritos podem ser atribuídos aos trabalhadores por causa da ação desses aeroalérgenos.

Do ponto de vista da imunopatogênese, os mecanismos alérgicos típicos que causam inflamação nas vias aéreas, incluindo mastócitos, IgE, histamina, eosinófilos e linfócitos, podem ser importantes mediadores das respostas inflamatórias por meio da produção e liberação de fatores quimiotáticos, como ILs e quimiotaxinas. A agressão local ao epitélio, causada pelo pó de algodão, pode, portanto, desencadear respostas alérgicas do tipo Th2 locais.

Um estudo epidemiológico com 203 trabalhadores, dos quais 119 foram expostos à poeira de algodão e 84 controles, revelou a ocorrência de bissinose entre 20,1% do grupo exposto. O exame radiológico dos seios da face foi realizado e o diagnóstico foi feito sem o conhecimento prévio do estado de exposição dos trabalhadores ou do diagnóstico pulmonar. O grupo exposto mostrou diferença significativa na ocorrência de sinusite bacteriana crônica, que também aumenta a prevalência pelo aumento da duração da exposição ao pó de algodão. Doença respiratória não específica foi significativamente maior na prevalência entre trabalhadores expostos (14,3%). Não se observou nenhuma diferença significativa de rinossinusite alérgica nos dois grupos, embora toda a população examinada mostrasse taxas notavelmente altas de doenças sinusais. A maior parte do pó de algodão transportado pelo ar é composta de fibras grandes com maior probabilidade de retenção nas vias respiratórias nasais e superiores. A irritação crônica dessa poeira pode explicar a maior proporção de sinusite bacteriana crônica e doença respiratória não específica. Não houve associação entre a bissinose e qualquer forma de rinossinusite (El Batawi; Effat; Hussein, 1964).

De acordo com o Guia de Doenças Ocupacionais Otorrinolaringológicas, o algodão não é citado como agente causal de rinossinusite, sendo somente relacionado à rinite ocupacional. Todavia, o presente estudo mostrou que existe associação entre este aeroalérgeno e o diagnóstico de RSC. Segundo Hox et al. (2014), a rinite ocupacional já é uma entidade médica em que estão definidos os guidelines para diagnóstico e tratamento. Na RSO, não há na literatura evidências da correlação entre a exposição nos mais diversos ambientes de trabalho e a patologia, o diagnóstico é sempre um desafio na prática clínica e muito menos se tem literatura a respeito dos mecanismos da patofisiologia desta entidade. Em relação ao algodão, Christiani e Malo (2009) descreveram os efeitos em longo prazo

da exposição, mas somente em relação às doenças pulmonares, sendo que não foram encontradas na literatura evidências de que a exposição ao algodão seja causa ocupacional de RSC, o que torna este estudo inédito.

O presente estudo, diferentemente do que Lange et al. (2013) demostraram na Dinamarca, evidenciou que a complementação diagnóstica, tanto com NF quanto com TCSP, comprovou o alto índice de RSC na população inicialmente triada com questionário, seguindo as diretrizes para definição diagnóstica, segundo o EPOS. Sendo assim, é possível afirmar que o método utilizado para triagem inicial dos funcionários mostrou ser eficaz na prática clínica. Boari e de Castro Júnior (2005), utilizando esses mesmos métodos para confirmação diagnóstica de RSC em pacientes com fibrose cística, sabidamente doentes, observaram que o diagnóstico de RSC foi positivo em 20,58% dos casos, quando se tentava o diagnóstico pelo questionário; 73,52% pela nasofibroscopia 93,54% е pela tomografia computadorizada.

Aplicando o SNOT-22, foram obtidos resultados interessantes. A média encontrada, neste estudo, para o score do SNOT-22 foi de 28 pontos entre todos os 133 funcionários. Gillet et al. (2009), em um dos seus estudos relacionados a esse questionário, concluíram que a nota de corte para considerar uma necessidade de tratamento foi de apenas sete pontos; mostrando, mais uma vez, a grande alteração encontrada nessa população exposta ao algodão, em média, há 11 anos.

A realização da avaliação histológica mostrou que o grupo de funcionários com RSC expostos ao algodão apresentou alterações estatisticamente significativas em todas as ILs analisadas, quando comparado aos outros dois grupos.

Tem-se, portanto definido, que existe um padrão de resposta característico em relação a essas citocinas e quimiocinas à poeira do algodão, porém quando se fala dessa exposição, refere-se basicamente a dois estímulos diferentes, já muito bem conhecidos: exposição às partículas em suspensão inaláveis e presença de endotoxina, já descritas. Kennedy et al. (1987) investigaram a etiologia da doença pulmonar em trabalhadores de indústria têxtil expostos ao algodão e sua relação com o nível de exposição tanto às partículas de poeira inalável quanto à endotoxina, presentes nesse ambiente de trabalho.

A endotoxina é um componente da parede celular de bactérias presentes no algodão em toda sua cadeia produtiva, e um agente pró-inflamatório que induz respostas locais e sistêmicas (Liao et al., 2010). Já a Enterotoxina B do Staphylococcus aureus já foi demonstrada, sendo importante na patogênese da PN pelo aumento dos níveis de IL-5 e IgE específica na mucosa nasal (Kim et al., 2011).

Dessa maneira, é possível apresentar duas teorias para o desenvolvimento da RSC nesses indivíduos expostos ao algodão no ambiente de trabalho:

- Teoria da Rinite Alérgica Local: em que o algodão induziria inflamação tipo Th2 na mucosa nasal, com recrutamento eosinofílico e expressão de IL significativamente maior que nos não expostos a ele.
- Teoria da Imunidade Inata: o sistema imune é composto por vários tipos de células que expressam receptores de reconhecimento de patógenos e antígenos. Miyata e van Eeden (2011) demonstraram que no pulmão, baixas concentrações de endotoxinas nas partículas ambientais podem desencadear uma resposta imune inata via TLR4 (receptor toll-like para endotoxina), com ativação de fatores de transcrição e citocinas pró-inflamatórias, levando a uma cascata inflamatória Th2. Essa teoria explicaria o recrutamento eosinofílico e sua consequente liberação de citocinas e quimiocinas na mucosa do grupo de expostos deste estudo, e a ativação dessa imunidade inata levaria ao edema de mucosa e toda gama de sintomatologia de rinite e RSC.

Atualmente, todos os esforços de pesquisa no campo têm sido direcionados para o entendimento do mecanismo de instalação e manutenção da cascata inflamatória na RSC. A identificação e caracterização das citocinas e quimiocinas implicadas na gênese dos diferentes subgrupos dessa doença podem levar a tratamentos com capacidade de inibir esses mediadores inflamatórios, contribuindo para melhorar a qualidade de vida do indivíduo.

Uma atividade biológica essencial da IL-4 no desenvolvimento da inflamação alérgica é conduzir a diferenciação de células Th0 em células Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, mas não interferon (IFN-y) (Miyata; van Eeden, 2011; Nakajima; Takatsu, 2007). Estudos utilizando camundongos deficientes em IL-4 mostraram claramente que a IL-4 era necessária para o desenvolvimento de inflamação alérgica, uma vez que a inflamação alérgica induzida por antígeno diminuía significativamente em camundongos deficientes em IL-4 em comparação com camundongos do tipo selvagem.

Aurora et al. (2013) analisaram 30 pacientes com RSC e 12 controles, em que a resposta imunológica foi medida pela quantificação de 30 citocinas diferentes que demonstrou níveis aumentados das seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-8 e IL-13, juntamente com o aumento dos níveis de eosinófilos e basófilos.

Quando avaliou-se a IL-4, houve diferença estatisticamente significativa, quando comparado o grupo de funcionários com RSC (expostos a fibras de algodão) com o controle, qualitativamente (<0,0001) e quantitativamente (<0,0001).

Sejima et al. (2012) realizaram um estudo envolvendo pacientes com RSC sem pólipo nasal (RSCsPN) e RSC com pólipo nasal (RSCcPN) com o objetivo de analisar quais mediadores inflamatórios estão presentes em cada subgrupo de doença claramente definida, podendo este conhecimento levar à melhor diferenciação de doenças crônicas dos seios paranasais. Evidenciou-se que os pacientes RSCcPN apresentavam níveis significativamente mais elevados de IL-5 e de IgE em comparação com os RSCsPN e controles. O grupo RSCsPN foi caracterizado por níveis elevados de TGF-β (Transforming growth factor beta), enquanto o grupo RSCcPN mostrou uma polarização Th2 e os níveis mais baixos de TGF-β. Nas amostras de RSCcPN, 68,4% eram eosinofílicas e 52.6% SAE (Staphylococcus aureus enterotoxin) - IgE positiva. Além disso, 31,6 % dos RSCcPN foram pacientes asmáticos, enquanto nenhum dos RSCsPN sofria de asma brônquica.

Figueiredo, Silva e Weckx (2008) observaram 21 pacientes com RSC com PN e 13 indivíduos controles e propuseram uma análise da expressão gênica de alguns mediadores inflamatórios pela técnica de RT-PCR, observando que a expressão dos genes de IL-5 é significativamente maior nos pacientes com RSC. Níveis elevados de IL-5 foram detectados em ensaios de RNAm e proteína nos com PN em pacientes com doenças concomitantes que promovem eosinofilia como asma e intolerância à aspirina.

Quando avaliada a IL-5, verificou-se diferença estatisticamente significativa, quando comparados o grupo de funcionários com RSC (expostos a fibras de algodão) com os outros grupos.

Oyer, Nagel e Mulligan (2013) comparararam os níveis de citocinas no tecido dos seios nasais de controles e de pacientes com RSC e examinaram amostras de 43 pacientes. Os níveis de IFN-γ e IL-8 estavam fora da gama detectável do ensaio. Os níveis de IL-2, 4, 6, 10, 17A se correlacionaram com os de tecido (p<0,05 para todos, r>0,49), enquanto que o TNF-α (Fator de necrose tumoral alfa) não (p=0,71). Pacientes com RSC apresentaram níveis elevados de muco de IL-2, 4, 6, 10 e 17A em comparação com os controles. Os RSCcPN demonstraram elevação de IL-4, 6, 10, 17A e TNF-α em comparação com os controles.

Quando avaliada a IL-10, houve diferença estatisticamente significativa, quando comparados o grupo de funcionários com RSC (expostos a fibras de algodão) com os outros grupos.

A IL17A, produzida principalmente pelas células Th17, foi previamente descrita como uma citocina inflamatória que induz um perfil de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases pró-inflamatórias. Estudos recentes revelaram que a IL-17 está correlacionada com distúrbios pulmonares inflamatórios, desencadeando o acúmulo de neutrófilos. Mais recentemente, observou-se que a expressão de IL-17 pode estar envolvida no desenvolvimento de PN. E por fim, descreveu-se a caracterização da expressão de IL-17 em pacientes com RSCcPN do nordeste da China (Xiao-Dan Jiang et al. 2011).

Quando analisada a IL-17, notou-se diferença estatisticamente significativa, quando comparado o grupo de funcionários com RSC (expostos a fibras do algodão) com os outros grupos.

O mecanismo pelo qual a expressão de IL-33 no epitélio das vias aéreas é regulada por antígenos microbianos não é clara. Estudos indicam que as células epiteliais das vias aéreas humanas produzem IL-33 em resposta à estimulação com um extrato do fungo *Alternaria* ou extrato de barata oriental (Kouzaki et al., 2011). A expressão elevada de IL-33 foi também observada em células epiteliais das vias aéreas humanas em resposta ao DNA microbiano e às citocinas pró-inflamatórias (Chustz et al., 2010; Reh et al., 2010). Outro estudo demonstrou aumento significativo na expressão de IL-33 em células epiteliais nasossinusais de pacientes com RSCcPN em resposta a vários antígenos fúngicos comumente associados à RSC, incluindo A. fumigatus, A. alternata e C. herbarum. No entanto, apenas o extrato de A. fumigatus promoveu aumento na indução de IL-33 em células epiteliais de pacientes com RSCcPN em comparação àqueles com RSCsPN, sugerindo diferenças na resposta de células epiteliais entre esses pacientes para A. fumigatus. Coletivamente, concluíram que esses dados sugerem que a IL-33 produzida pelas células epiteliais nasossinusais em resposta a fungos ambientais comuns pode impulsionar sua produção em pacientes com RSNcPN; que poderia, por sua vez, promover produção de muco e eosinofilia tecidual tipicamente observada nesses pacientes. Isto suporta um papel chave para a IL-33 na fisiopatologia da RSCcPN (Chackerian et al., 2007; Schmitz et al., 2005).

Quando avaliada a IL-33, verificou-se diferença estatisticamente significativa, quando comparado o grupo de funcionários com RSC (expostos a fibras do algodão) com os outros grupos.

Este estudo confirmou a estreita relação entre a exposição ao pó de algodão no local de trabalho e a ocorrência de expressão aumentada de IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IL-33, sugerindo ser o algodão um indutor de RSC. A implementação de terapias/medicamentos com capacidade de inibir a expressão dessas citocinas e de ser utilizada durante o período de exposição ocupacional poderia ajudar a reduzir o processo inflamatório nesses indivíduos e inibir o desenvolvimento de rinite e RSC.

6.1 Proteção aos trabalhadores

Diante do exposto, deparou-se com dois problemas principais:

1. O primeiro é trabalhar no estabelecimento do nexo causal e a completa elucidação da fisiopatologia do desenvolvimento da RSO e os mais diversos tipos de exposições ocupacionais existentes em nosso meio, uma vez que não faz parte da rotina dos profissionais da saúde afeitos a falta de conhecimentos epidemiológicos, essa questão por fisiopatológicos específicos e políticas públicas.

2. O segundo é trabalhar na necessidade de medidas preventivas para evitar o desenvolvimento e a evolução das mais diversas doenças das vias respiratórias relacionadas à exposição laboral. O uso de equipamentos de proteção individual mais eficazes e, se necessário, ajustes no tempo de jornada de trabalho, visando diminuir o contato desses inalantes com a mucosa e sua progressão para a RSC e outras enfermidades.

7. Conclusões

Este estudo confirmou a estreita relação entre a exposição ao pó de algodão no local de trabalho com a ocorrência de expressão aumentada de IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e IL-33, de forma significativa, quando comparada entre os pacientes portadores de RSC expostos ao algodão, os com RSC sem exposição ao algodão e os controles.

8. Referências Bibliográficas ¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

Allakhverdi Z et al. Cutting edge: the ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. J Immunol 2007;179(4):2051-4.

Arrais A. Doenças do nariz e seios paranasais. In: Prado FC, Ramos OL, Rothschild HA (eds). Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento. 19ª Ed. São Paulo: Artes médicas; 1999; p. 1258-64.

Aurora R et al. Contrasting the microbiomes from healthy volunteers and patients with chronic rhinosinusitis. Otolaryngol Head Neck Surg. 2013;139(12):1328-38.

Bachert C, Van Cauwenberge PB. Inflammatory mechanisms in chronic sinusitis. Acta Otorhinolaryngol Belg. 1997;51(4):209-17.

Bachert C et al. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(4):607-14.

Bagley CJ, Lopez AF, Vadas MA. New frontiers for IL-5. J Allergy Clin Immunol. 1997;99(6 Pt 1):725-8.

Bardana EJ Jr. Occupational asthma and related respiratory disorders. Dis month. 1995;41(3):143-99.

Barret NA, Austen KF. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. Immunity 2009;31(3):425-37.

Bernstein L et al. Asthma in the Workplace. 3rd Ed. New York: Taylor and Francis Group, 2003.

Boari L, de Castro Júnior NP. Diagnosis of chronic rhinosinusitis in patients with cystic fibrosis: correlation between anamnesis, nasal endoscopy and computed tomography. Braz J Otorhinolaryngol. 2005;71(6):705-10.

Brautbar N. Ammonia expsure: A common cause for sinusitis - A case report and review of the literature. Toxicol Ind Health. 1998;14(6):891-5.

Chackerian AA et al. IL-1 Receptor Acessory Protein and ST2 Comprise the IL-33 Receptor Complex. J Immunol 2007;179(4):2521-55.

Clarhed UKE et al. Chronic rhinosinusitis and occupational exposure - The telemark population study. J Occup Environ Med. 2018;60(7):656-60.

Christiani DC, Malo JL. Upper airways involvement. In: Bernstein IL, Chan-Yeun M, Malo JL, Bernstei DI (eds). Asthma in the workplace. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1999. p. 331-9.

Chustz RT et al. Regulation and function of IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2010;45(1):145-53.

Dass K, Peters AT. Diagnosis and management of rhinosinusitis: highlights from the 2015 practice parameter. Curr Allergy Asthma Rep. 2016;16(4):29.

Della Giustina TBA et al. Guia das doenças ocupacionais otorrinolaringológicas. Rev Bras Otorrinolaringol Supl Cad Debates. 2003;69(1),1-24.

El Batawi MA, Effat H, Hussein M. Cotton dust inhalation and upper respiratory tract disease. Int Arch Gewerbepathol Gewerbehyg. 1964;20:443-8.

Figueiredo CR, Silva ID, Weckx LL. Inflammatory genes in nasal polyposis Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;16(1):18-21.

Fokkens WJ et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. Rhinology. 2012;50(1):1-12.

Gao WX et al. Occupational and environmental risk factors for chronic rhinosinusitis in China: a multicentre cross-sectional study. Respir Res. 2016;17(1):54.

Gillet S et al. A Pilot study of the SNOT 22 score in adults with no sinonasal disease. Clin Otolaryngol. 2009;34(5);467-9.

Greiner AN et al. Allergic rhinitis. Lancet. 2011;378(9809):2112-22.

Hastan D et al. Chronic rhinosinusitis in European underestimated disease. A GA(2)LEN study. Allergy. 2011;66(9):1216-23.

Haukim N et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: online data bases, supplement 2. Genes Immun. 2002;3(6):313-30.

Hellgren J et al. Population-based study of non-infectious rhinitis in relation to occupational exposure, age, sex, and smoking. Am J Ind Med. 2002;42(1):23-8.

Hellgren J, Karlsson G, Torén K. The dilemma of occupational rhinitis: management options. Am J Respir Med. 2003;2(4):333-41.

Hellgren J. Occupational rhinosinusitis. Curr Allergy Rep. 2008;8(3):234-9.

Hellings PW et al. Uncontrrolled allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: where do we stand today? Allergy 2013;68(1):1-7.

Hox V et al. Negative impact of occupational exposure on surgical outcome in patients with rhinosinusitis. Allergy 2012;67(4):560-5.

Hox V et al. Occupational upper airway disease: how work affects the nose. Allergy. 2014;69(3):282-91.

Jarvis D et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. Allergy 2012;67(1):91-8.

Kennedy SM et al. Cotton dust and endotoxin exposure-response relationships in cotton textile workers. Am Rev Respir Dis. 1987;135(1):194-200.

Kim DW et al. Staphylococcus aureus enterotoxin B contributes to induction of nasal polypoid lesions in an allergic rhinosinusitis murine model. Am J Rhinol Allergy. 2011;25(6):e255-61.

Kim YS et al. Prevalence and risk factors of chronic rhinosinusitis in Korea. Am J Rhinol Allergy. 2011;25(3):117-21.

Koh DH, Kim HR, Han SS. The relationship between chronic rhinosinusitis and occupation: the 1998, 2001, and 2005 Korea National health and nutrition examination survey (KNHANES). Am J Ind Med. 2009;52(3):179-84.

Koike M, Takatsu K. IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? Int Arch Allergy Immunol. 1994;104(1):1-9.

Komai-Koma M et al. IL33 is a chemoattractant for human Th2 cells. Eur J Immunol. 2007;37(10):2779-86.

Kouzaki H et al. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. J Immunol. 2011;186(7):4375-87.

Kurowska-Stolarska M et al. IL-33 induces antigen-specific IL-51 T cells and promotes allergicinduced airway inflammation independent of IL-4. J Immunol 2008;181(7):4780-90.

Kurowska-Stolarska M et al. IL33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J Immunol. 2009;183(10):6469-77.

Lai PS, Christiani DC. Long-term respiratory health effects in textile workers. Curr Opin Pulm Med. 2013;19(2):152-7.

Lange B et al. Diagnosing chronic rhinosinusitis: comparing questionnaire-based and clinical-based diagnosis. Rhinology. 2013;51(2):128-36.

Liao VH et al. A probabilistic approach to quantitatively assess the inhalation risk for airborne endotoxin in cotton textile workers. J Hazard Mater. 2010;177(1-3):103-8.

Liew F, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. Nat Rev Immunol. 2010;10(2):103-10.

Milburn MV et al. A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4. A resolution of human interleukin-5. Nature. 1993;363(6425):172-6.

Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. Toxicol Appl Pharmacol. 2011;257(2):209-26.

Moscato G et al. Occupational rhinitis. Allergy. 2008;63(8):969-80.

Moseley TA et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2003;14(2):155-74.

Nakajima H, Takatsu K. Role of Cytokines in Allergic Airway Inflamation. Int Arch Allergy Immunol. 2007;142(4):265-73.

Over SL, Nagel W, Mulligan JK. Differential expression of adhesion molecules by sinonasal fibroblasts among control and chronic rhinosinusitis patients. Am J Rhinol Allergy. 2013;27(5):381-6.

Pecaric-Petkovic T et al. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. Blood 2009;113(7):1526-34.

Puchner TC, Fink JN. Occupational rhinitis. Immunology Allergy Clin North America. 2000;20(2):303-22.

Reh DD et al. Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with nasal polyps is associated with altered epithelial cell expression of interleukin-33. Am J Rhinol Allergy. 2010;24(2):105-9.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. Annu Rev Immunol 2006;24:147-74.

Schmitz J et al. IL-33, an interleukin-1- like cytokine that signals via the IL-1 receptorrelated protein ST2 and induces T Helper type 2-associated cytokines. Immunity. 2005;23(5):479-90.

Sejima T et al. Cytokine profiles in Japanese patients with chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 2012;61(1):115-22.

Shusterman D. Upper respiratory tract disorders. In: LaDou J (ed.). Occupational and environmental medicine. 2nd ed. Stanford CT: Appleton and Lange; 1997, p. 291-304.

Sigsgaard T, Heederik D. Occupational Asthma, 1st ed. Basel: Birkh€auser, 2010.

Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. Nat Rev Immunol. 2010;10(2):89-102.

Siracusa A, Desrosiers M, Marabini A. Epidemiology of occupational rhinitis: prevalence, aetiology and determinants. Clin Exp Allergy. 2000;30(11):1519-34.

Skloot G et al. Respiratory symptoms and physiologic assessment of ironworkers at the World Trade Center disaster site. Chest 2004;125(4):1248-55.

Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. Nat Immunol. 2011;12(1):21-7.

Subramanian I, Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. Crit Rev Immunol. 2012;32(1):23-63.

Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inf lammation. Adv Immunol, 1994:57:145-90.

Walusiak J. Occupational upper airway disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2006,6(1):1-6.

Wang XR et al. A 20-year follow-up study on chronic respiratory effects of exposure to cotton dust. Eur Respir J. 2005;26(5):881-6.

Webber MP et al. Trends in respiratory symptoms of firefighters exposed to the world trade center disaster: 2001-2005. Environ Health Perspect. 2009;117(6):975-80.

Xiao-Dan Jiang et al. The characterization of OL-17A expression in pacients with chronic rhinosinisitis with nasal polyps. Am J Rhinol Allergy. 2011;25(5):e171-5.

Zuskin E et al. Respiratory function and immunological status in paper-recycling workers. J Occup Environ Med. 1998;409(11):986-93.

Zuskin E, et al. Respiratory findings in pharmaceutical workers. Am J Ind Med. 2004;46(5):472-9.

9. Anexos

ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 02 de outubro de 2014

Oficio nº 3624/2014 CEP/FC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ENTEROTOXINAS B EM BACTÉRIAS DA MUCOSA NASAL DE PACIENTES PORTADORES DE RINOSSINUSITE CRÔNICA COM EXPOSIÇÃO À FIBRA DO ALGODÃO"- Versão 3, de 11/09/2014, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 395ª Reunião Ordinária realizada em 29/09/2014 e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Versão de 28/08/2014, de acordo com o Processo HCRP nº 7210/2014.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. FABIO CARMONA Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

molla

Ilustrissimos Senhores

CARLOS EDUARDO MONTEIRO ZAPPELINI PROFa.DRa. WILMA TEREZINHA ANSELMO LIMA(Orientadora)

Depto, de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _				,	anos,
brasileira(o)	,RG	, trabalho	na Cooperativa	Nova Es	perança e
resido à			·		, estou
sendo convida	do a participa	r de um estudo	denominado	"Padrâ	io imuno-
histoquímico	da mucosa n	asal de portador	es de rinossinu	ısite crôni	ca com e
sem exposiçã	o à fibras do	algodão e cont	trole". cujos obje	etivos e ju	stificativas
são: pesquisar	os prováveis	fatores (Imunohis	toquímicos) envo	lvidos na	ocorrência
da Rinossinus	ite entre os	trabalhadores	que, presumivel	mente po	r estarem
expostos à fibr	a de algodão	no ambiente de t	trabalho, desenve	olvem esta	a patologia
tão prevalente	na população e	em geral, mas em	especial neste di	rupo do es	tudo.

A minha participação no referido estudo será no sentido de permitir a realização dos exames e estudos que se seguirão para confirmar o diagnóstico clínico de rinossinusite crônica e as conclusões a que o estudo se refere. Durante esta etapa estou ciente que serei submetido à Videoendoscopia Nasal (filmagem com câmera de vídeo especial pela cavidade nasal), Tomografia Computadorizada dos Seios Paranasais (exame de imagem, similar aos RXs) e Realização de retirada de porção pequena da mucosa nasal do corneto médio (sob anestesia local tópica, ou seja, não será necessário injeção de qualquer substância), e este material do meu nariz será armazenado e utilizado para este estudo e outros que se seguirem, se necessário e sempre sob sigilo e tutela da Comissão de Ética Médica da USP-RP.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar como benefício o aprofundamento do conhecimento de meu quadro clínico, ou seja, a real situação da minha doença – Rinossinusite Crônica, se realmente comprovada.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, estou ciente que durante a realização das exames é possível ocorrer algum desconforto e até mesmo pequenos sangramentos nasais, sempre em pequena quantidade e de fácil resolução.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo.

O pesquisador envolvido com o referido projeto é o Dr. Ivan de Picoli Dantas, Pós Graduando da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Universidade de São Paulo), o telefone de contato é 19-34069003 e o da Instituição é 16-36022862, o e-mail para contato é czappelini2@hotmail.com, e com ele poderei manter contato à qualquer instante para assuntos e dúvidas relacionadas ao estudo.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma seguinte: apresentarei os recibos e ou tickets de passagens de transporte e o Dr. Carlos Eduardo fará o ressarcimento em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

	Ribeirão Preto,	de	de 20
Nome e assinatura do sujeito da pesquisa			
Dr. Carlos Eduardo Monteiro Zappelini – Pe	squisador Respon	sável	

ANEXO C - QUESTIONÁRIO 1

Assinatura:

Nome:	Idade:	Sexo:
Função na empresa:	Tempo na função:	
Fuma: SIM () NÃO ()		
Você tem Sinais ou Sintomas Sugestivos	de Rinossinusite Crôn	ica?
Assinale SIM apenas se os sintomas aba	aixo persistem por ma	iis de três meses por
 Obstrução/bloqueio/congestão r SIM () NÃO () 	nasal (nariz entupido):	
 Gotejamento anterior ou poste garganta ou pelo nariz constant SIM () NÃO () 		arro escorrendo pela
 Pressão ou dor facial (dor na ca SIM () NÃO () 	ıbeça, na face e ou na	testa):
 Redução/perda do olfato (não s SIM () NÃO () 	ente ou sente pouco c	heiro):

ANEXO D - QUESTIONÁRIO 2

Nome			
INOITIC			

SNOT-22 - Sino Nasal Outcome Test

Considerando a gravidade e a frequência do sintoma relate cada item, assinalando o número correspondente a como você o sente	Não há problema (0)	Problema muito suave (1)	Problem a leve (2)	Problema moderado (3)	Problema severo (4)	Pior problema que pode existir (5)	Item(s) mais importante(s)
Necessidade de assuar o nariz							
2. Espirros							
3. Nariz escorrendo							
4. Tosse							
5. Secreção escorrendo pela garganta							
6. Secreção grossa saindo pelo nariz							
7. Sensação de ouvido cheio ou tapado							
8. Tontura							
9. Dor de ouvido							
10. Dor ou pressão no rosto							
11. Dificuldade para conseguir dormir							
12. Acorda no meio da noite							
13. Falta de uma boa noite de sono							
14. Acorda cansado							
15. Fadiga ou cansaço durante o dia							
16. Diminuição do seu rendimento para realizar atividades do seu dia a dia							
17. Diminuição do seu rendimento para realizar atividades do trabalho.							
18. Frustrado, agitado ou irritado							
19. Tristeza							
20. Sensação de vergonha							
21. Dificuldade para sentir cheiros ou gostos							
22. Nariz entupido							

ANEXO E - FOTOS DO LOCAL

Figura 1.



Figura 2.



Figura 3



Figura 4.

