UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OFTALMOLOGIA,
OTORRINOLARINGOLOGIA E CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

MIRELA CRISTINA MOREIRA PRATES

**Estudo *in situ* da infecção e replicação de vírus respiratórios de RNA em pacientes com
rinossinusite crônica**

Ribeirão Preto

2018

MIRELA CRISTINA MOREIRA PRATES

**Estudo *in situ* da infecção e replicação de vírus respiratórios de RNA em pacientes com
rinossinusite crônica**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Terezinha Anselmo Lima

Ribeirão Preto

2018

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.

Prates, Mirela Cristina Moreira

Estudo in situ da infecção e replicação de vírus respiratórios de RNA em pacientes com rinossinusite crônica. Ribeirão Preto, 2018.

62 f. : il. + 1 DVD

Tese (doutorado), apresentada ao Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dra. Wilma Terezinha Anselmo Lima

Palavras chave: 1.Doença rinossinusite crônica. 2. Vírus. 3. Infecção. 4.Replicação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PRATES, Mirela Cristina Moreira

Título: Estudo *in situ* da infecção e replicação de vírus respiratórios de RNA em pacientes com rinossinusite crônica.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao longo de todo esse trabalho que resultaram nesta tese, pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando. Agora que alcanço meus objetivos não poderia deixar de reconhecê-los.

Gostaria de agradecer especialmente a Prof. Dra. Wilma Terezinha Anselmo Lima, admirável e competente profissional por me orientar durante meu doutorado e compartilhar seus ensinamentos em todos esses anos de convivência. Ao Prof. Dr. Eurico Arruda, por permitir usufruir de seu laboratório de pesquisa e por toda a ajuda e instrução concedida.

Aos membros da banca, muito obrigada por estarem disponíveis na participação da minha defesa.

A querida amiga e profissional Maria Lúcia Silva, que me ensinou e ajudou em todo o processamento histológico dos tecidos, corte e preparo das lâminas para realização das imunohistoquímicas.

Obrigada a toda equipe de otorrinolaringologia que fizeram as coletas dos tecidos de pólipos, concha média e seio maxilar, Dra. Fabiana Valera, Dr. Edwin Tamashiro, Dr. Guilherme Buzzato e Dr. Lucas Carenzi.

Aos meus amigos Juliano, que com alegria e paciência me ajudou nos ensinamentos das técnicas e Anibal que muito contribuiu para realização desse trabalho.

Gostaria de agradecer a toda a equipe do Laboratório de Patogênese Viral, amigos e companheiros de trabalho que muito me ajudaram (Marcus Vinicius, Bruna, Ronaldo, Ítalo, Ana Carolina, Luiz Carlos, Marjorie, Ricardo, Glaucia, Leonardo, Rosa).

Gostaria de agradecer e dedicar esse trabalho a minha mãe Marli e minha irmã Mônica que nunca mediram esforços e palavras de apoio para me ajudar em toda esta etapa, estando sempre ao meu lado tornando os momentos difíceis mais leves: amo muito vocês! Ao meu cunhado Marcelo e minhas sobrinhas Júlia e Helena, que foram essenciais para realização deste trabalho.

Dedico também este trabalho ao meu namorado Neto por cada palavra de incentivo, estando sempre por perto durante todos os períodos custosos com muita paciência e amor.

À FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro, extrema importância para realização deste trabalho.

"Se eu vi mais longe, foi por estar
sobre ombros de gigantes".

Isaac Newton

RESUMO

PRATES, M. C. M. **Estudo *in situ* da infecção e replicação de vírus respiratórios de RNA em pacientes com rinossinusite crônica.** 2018. 62f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Rinossinusite crônica (RSC), com ou sem pólipos nasais é uma inflamação crônica da mucosa nasal e seios paranasais, cujo tratamento muitas vezes pode ser a cirurgia. Vários vírus respiratórios são detectados em biópsias de pólipo nasal, concha média e mucosa do seio maxilar de pacientes com a doença, mas seu papel no desencadeamento dessa inflamação não é claro. O Objetivo do presente estudo teve como objetivo localizar e caracterizar *in situ* sítios de infecção por rinovírus (HRV), metapneumovírus (HMPV) e vírus sincicial respiratório (HRSV), detectar se há replicação dos mesmos, caracterizar as células, em tecidos de pólipo nasal, concha média e mucosa do seio maxilar removidas cirurgicamente de pacientes com rinossinusite crônica. Tecidos de 17 pacientes positivos por qPCR foram utilizados para identificar a localização e caracterização dos sítios de infecção, além de avaliar a atividade replicativa, onde proteínas de capsídeo viral foram detectadas por imunohistoquímica (IHQ). Para identificação das células infectadas pelos vírus estudados, foi realizada a técnica de SIMPLE. Os resultados revelaram positividade em 7 de 11 amostras positivas para HRV analisadas por PCR em tempo real, sendo encontrada a proteína viral em 5 amostras de pólipo nasal, uma amostra da mucosa do seio maxilar e uma em concha média. Cinco amostras tiveram seu genoma detectado no PCR em tempo real para HMPV, sendo que 3 delas tiveram marcação da proteína por IHQ, uma amostra positiva em cada tecido estudado. Em um total de 4 amostras, houve detecção da proteína F de HRSV em 3 delas, sendo 2 em pólipo nasal e uma concha média. Em todas as reações de IHQ foram incluídos controles positivos e negativos adequados. Depois da detecção das proteínas desses vírus respiratórios, as amostras tiveram seus fenótipos testados, células produtoras de muco e epiteliais ciliadas, mastócitos, células dendríticas, eosinófilos e linfócitos através da técnica SIMPLE. Foi demonstrado que há evidência de replicação de rinovírus, metapneumovírus e vírus sincicial respiratório no epitélio e no estroma tecidual de pólipo nasal, concha média e mucosa do seio maxilar. Foram detectadas células CD4⁺ e CD123⁺ infectadas por HRSV, evidenciadas pela marcação da proteína estrutural viral F. Adicionalmente, observamos células CD4⁺, CD14⁺ e CD20⁺, além de células residentes em glândulas produtoras de muco, infectadas com HRV utilizando anticorpo anti-VP1 viral. Para HMPV a infecção se limitou ao epitélio superficial dos tecidos e glândulas produtoras de muco. Esses dados revelam uma possível persistência de HRV, HRSV e HMPV em tecidos de pacientes com rinossinusite crônica, que podem assim serem reservatórios de vírus na ausência de sintomas de infecção aguda.

Palavras chave: Doença rinossinusite crônica. Vírus. Infecção. Replicação

ABSTRACT

PRATES, M. C. M. **In situ study of infection and replication of respiratory RNA in patients with chronic rhinosinusitis.** 2018. 62f. Thesis (Doutoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Chronic rhinosinusitis (CRS) with or without nasal polyp is a chronic inflammation of the nasal mucosa and paranasal sinuses, whose treatment can often be surgery. Several respiratory viruses are detected in biopsies of nasal polyp, middle shell and maxillary sinus mucosa of patients with the disease, but their role in triggering this inflammation is unclear. The objective of the present study was to locate and characterize in situ sites of infection by rhinovirus (HRV), metapneumovirus (HMPV) and respiratory syncytial virus (HRSV), to detect if there is replication of the same, to characterize the cells in nasal polyp tissues, middle shell and maxillary sinus mucosa surgically removed from patients with chronic rhinosinusitis. Tissues from 17 patients positive for qPCR were used to identify the location and characterization of infection sites, and to evaluate the replicative activity, where viral capsid proteins were detected by immunohistochemistry (IHC). To identify the cells infected by the viruses studied, the SIMPLE technique was performed. The results revealed positivity in 7 of 11 HRV positive samples analyzed by real-time PCR. Viral protein was found in 5 nasal polyp samples, one in the maxillary sinus mucosa and one in the middle shell. Five samples had their genome detected in the real-time PCR for HMPV, 3 of them had protein marking by IHC, a positive sample in each tissue studied. In a total of 4 samples, HRSV F protein was detected in 3 of them, 2 in nasal polyp and 1 medium concha. All positive and negative controls were included in all IHC reactions. After the detection of the proteins of these respiratory viruses, the samples had their tested phenotypes, mucus-producing cells and ciliated epithelial cells, mast cells, dendritic cells, eosinophils and lymphocytes through the SIMPLE technique. It has been demonstrated that there is evidence of rhinovirus, metapneumovirus and respiratory syncytial virus replication in the epithelium and in the tissue stroma of the nasal polyp, middle concha and maxillary sinus mucosa. CD4 +, CD14 + and CD20 + cells were detected, as well as cells residing in mucus-producing glands, infected with HRV using anti-viral VP1 antibody. For HMPV the infection was limited to the superficial epithelium of the tissues and mucus producing glands. These data reveal a possible persistence of HRV, HRSV and HMPV in tissues of patients with chronic rhinosinusitis, who may thus be virus reservoirs in the absence of symptoms of acute infection.

Keywords: Chronic rhinosinusitis disease. Virus. Infection. Replication

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático da metodologia utilizada nesse trabalho.....	26
Figura 2.	Imunohistoquímica para detecção da proteína F de HRSV em células de pólio nasal e concha média.....	34
Figura 3.	Imunohistoquímica para a proteína F de HRSV em amostras de tecidos de pacientes com rinossinusite crônica.....	35
Figura 4.	Detecção de proteína de HMPV em pólio nasal de pacientes com rinossinusite crônica.....	36
Figura 5.	Imunohistoquímica para proteína estrutural de HMPV em amostras de tecidos de pacientes com rinossinusite crônica.....	37
Figura 6.	Imunohistoquímica para detecção da proteína VP-1 de HRV em células de pólio nasal, concha média e mucosa do seio maxilar.....	38
Figura 7.	Imunohistoquímica para a proteína estrutural de HRV em amostras de tecidos de pacientes com rinossinusite crônica.....	39
Figura 8.	Marcações sequenciais para a proteína F de HRSV utilizando a técnica de SIMPLE em pólio nasal e concha média.....	41
Figura 9.	Marcações sequenciais para proteína VP-1 de HRV utilizando a técnica de SIMPLE em pólio nasal.....	42
Figura 10.	Marcações sequenciais para proteína VP-1 de HRV utilizando a técnica de SIMPLE mucosa do seio maxilar.....	43
Figura 11.	Marcações sequenciais para proteína VP-1 de HRV utilizando a técnica de SIMPLE em concha média.....	43
Figura 12.	Marcações para proteína VP-1 de HRV em glândulas produtoras de muco utilizando a técnica de SIMPLE em concha média.....	44
Figura 13.	Marcações sequenciais para a proteína de HMPV utilizando a técnica de SIMPLE em glândulas produtoras de muco.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Primers</i> e Sondas utilizados para a detecção dos vírus respiratórios por PCR em tempo real.....	28
Tabela 2.	Amostras positivas para HRV, HRSV e HMPV por PCR em tempo real e Imunohistoquímica.....	40

LISTA DE SIGLAS

RSC	Rinossinusite crônica
HRV	Rinovírus humano
HMPV	Metapneumovírus humano
HRSV	Vírus sincicial respiratório humano
FLU	Influenza
HPIV	Parainfluenza
HCoV	Coronavírus humano
HEV	Enterovírus
IHQ	Imunohistoquímica
SIMPLE	Imunohistoquímica sequencial
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IFN- γ	Interferon- γ
TH1	Células T helper
TLR 3	Receptor Toll-like 3
TLR7	Receptor Toll-like 7
TLR 9	Receptor Toll-like 9
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear – $\kappa\beta$,
IFN- β	Interferon- β
IL-1	Interleucinas-1 β
IL-6	Interleucinas-6
IL-8	Interleucinas-8
TNF- α	Interferon-alfa
IFN- γ	Interferon- γ
MEM	Meio essencial mínimo
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Qpcr	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Phosphate buffered saline
BSA	Soro de albumina bovina (bovine serum albumin)
RT	Transcriptase reversa
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Revisão de Literatura.....	16
1.1.1 O papel dos Vírus nas RSC.....	16
1.2 Fisiopatogenia.....	18
1.3 Quadro clínico.....	21
1.4 Tratamento.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Pacientes e amostras.....	26
3.1.1 Coleta e preparo das amostras.....	27
3.2 Quantificação da carga viral.....	27
3.3 Imunohistoquímica para detecção das proteínas virais de HRSV.....	28
3.4 Imunohistoquímica para detecção das proteínas virais de HRV.....	29
3.5 Imunohistoquímica para detecção das proteínas virais de HMPV.....	30
3.6 Imunohistoquímica sequencial (SIMPLE) para proteínas virais e para marcadores imunofenotípicos.....	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Detecções de Genomas de Virus por PCR.....	33
4.2 Detecção de antígenos virais in situ.....	33
4.3 Determinação de fenótipos de células positivas para HRSV, HRV e HMPV.....	40
4.3.1 Imunofenotipagem de células positivas para HRSV em pólipos nasais e conchas média.....	40
4.3.2. Imunofenotipagem de células positivas para HRV em pólipos nasais, conchas média e mucosas do seio maxilar.....	42
4.3.3. Imunofenotipagem das células infectadas por HMPV em pólipos nasais.....	44
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS.....	53

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A rinossinusite crônica (RSC), é uma doença nasossinusal inflamatória caracterizada pela persistência de sintomas com duração de doze ou mais semanas consecutivas, apresentando grande impacto em saúde pública (BENNINGER et al., 2003). O último *guideline* europeu em rinossinusite, EPOS 2012, definiu a modalidade crônica dessa doença, como uma inflamação do nariz e seios paranasais, com duração maior ou igual a doze semanas, devendo apresentar dois ou mais dos seguintes sintomas, um dos quais deve ser bloqueio/congestão/obstrução nasal e/ou descarga nasal anterior ou posterior, associado a dor/pressão facial ou redução/perda de olfato. Em relação aos exames complementares, associam-se os achados da endoscopia nasal, com presença de pólipos e/ou descarga mucopurulenta, proveniente do meato médio e/ou obstrução mucosa ou edema do meato médio. A tomografia computadorizada pode completar o diagnóstico quando evidenciar alterações mucosas no complexo ostiomeatal ou nos seios paranasais (FOKKENS et al., 2012).

A RSC pode ser fenotipicamente classificada em dois grupos: rinossinusite crônica sem pólio nasal (RSCsPNS) e rinossinusite crônica que apresenta pólio nasal (RSCcPNS). Sendo assim, existem diversos estudos que sugerem evidências que essa doença apresenta diferentes mecanismos fisiopatológicos (ANSELMO-LIMA et al., 2013).

Os pólio nasais (PNs) são estruturas formadas por tecido conjuntivo frouxo que surgem nas cavidades nasais, geralmente provenientes do complexo ostiomeatal ou recesso eseno-etmoidal, histologicamente apresentam tecido edematoso, células inflamatórias, glândulas e capilares em seu estroma (BACHERT et al., 2009). São revestidos por epitélio pseudoestratificado respiratório com células ciliadas e caliciformes, cujas suas células inflamatórias predominantes são os eosinófilos, porém são encontrados também neutrófilos, mastócitos, plasmócitos, linfócitos, monócitos e fibroblastos. Um dos importantes pontos para a subdivisão da RSC em duas categorias é o padrão de resposta inflamatória apresentado por pacientes com e sem pólipos (BACHERT et al., 2009).

Tanto na RSCsPNS como na RSCcPNS, ocorre remodelamento tecidual da mucosa nasossinusal, isso se dá devido à presença de ativadores plasminogênicos tipo uroquinase, ativador plasminogênio 1 e seus receptores, que levam ao aumento de proteínas extracelulares, inibindo a síntese de metaloproteinases (MMPs), degradando a matriz extracelular e resultando na fibrose tecidual (BACHERT et al., 2008; SEJIMA; HOLTAPPELS; BACHERT, 2011; BRACIALE; SUN; KIM, 2012).

Além disso, são notadas alterações da produção das glândulas mucosas, secundária ao aumento na expressão de MUC1, MUC2, MUC5A e MUC8, fazendo com que há um aumento na hipersecreção e hiperviscosidade da secreção nasossinusal e consequente diminuição do *clearance* mucociliar, agravando ainda mais o quadro (MARTINEZ-ANTON et al., 2006).

A RSC é considerada um dos problemas de saúde mais comum do mundo (PEREZ et al., 2014). Segundo um levantamento realizado na Europa pelo Global Allergy and Asthma European Network Project (GA2LEN), a prevalência da rinossinusite crônica (RSC) foi de 10% (HASTAN et al., 2011). Já Pilan et al. (2012) encontraram um índice de 5,51% na cidade de São Paulo. Na população americana, o valor estimado é de 13% (PLEIS; WARD; LUCAS, 2009). Estes números estão de acordo com a prevalência mundial da doença, que varia de 5 a 15% da população geral (FOKKENS et al., 2012; PILAN et al., 2012).

Esta doença tem um impacto socioeconômico muito grande, com custos elevados, que incluem consultas a especialistas, exames complementares, tratamento medicamentoso recorrente, além de ser de morbidade elevada, levando ao absenteísmo no trabalho e baixo rendimento escolar.

A etiologia da RSCcPN está pouco esclarecida; sabe-se que é uma doença multifatorial, em que fatores genéticos, imunológicos, ambientais e da mucosa do próprio hospedeiro estão envolvidos, todavia ainda não está certa a forma como isto ocorre (ZHANG et al., 2011). Vários possíveis fatores já foram identificados, como respostas alérgicas, *clearance* mucociliar prejudicado, disfunção imune, defesa epitelial alterada, agentes microbianos e exposição ambiental, porém, requer maior esclarecimento de que forma estes fatores interagem entre si, e qual o papel dos agentes microbianos, vírus, bactérias e fungos modificando ou não a doença, ou mesmo agindo como fatores etiológicos (ZHANG et al., 2011). Por isso resolvemos aprofundar nossos conhecimentos estudando a replicação de alguns vírus na mucosa doente dos pacientes com RSC.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 O papel dos Vírus nas RSC

Existe hoje uma escassez na literatura sobre o papel dos vírus respiratórios associados a etiopatologia da RSC, que ainda não está clara, sendo assim, vários agentes infecciosos estão sendo testados para identificar uma possível causa (JANG et al., 2006; BACHERT et al., 2009; FALCONE et al., 2011; FOKKENS et al., 2012).

Um dos primeiros trabalhos a pesquisar detecção viral em 20 pacientes com RSC, teve como resultado a presença de adenovírus (HAdV) e vírus sincicial respiratório (HRSV) na mucosa de seios paranasais por PCR em tempo real, obtendo como resultado quatro (20%) amostras positivas para HRSV e nenhuma positiva para HAdV (RAMADAN et al. 1997).

Em 2006, Jang e colaboradores analisaram a detecção de rinovírus (HRV) em pacientes com RSC pela técnica de PCR em tempo real. Foram analisadas amostras de lavados nasais e biópsias de conchas nasais inferiores de 39 pacientes e 27 controles. Nas biópsias, oito (21%) pacientes com RSC e nenhum dos controles foi positivo para o HRV, sugerindo que esse vírus poderia exercer papel importante na patogenia da RSC. Nenhuma amostra de lavado nasal, foi positiva para vírus (JANG et al., 2006).

Estudo recente, mostrou que o vírus mais frequentemente encontrado em amostras (lavados nasais e biópsias de conchas inferiores) de 111 pacientes com RSC e 50 controles foi o HRV. As amostras foram positivas em 50,5% dos lavados e em 64% das biópsias de pacientes, com diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos controles (CHO et al., 2013).

Zhang et al. (2009) fizeram um estudo no qual pólipos foram infectados por HRV e confirmados por PCR e hibridização *in situ*, em que pesquisaram a influência da infecção pelo HRV na expressão de MMPs, de inibidores teciduais de MMPs (TIMP-1) e de fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) em culturas de fibroblastos de pólipos nasais (ZHANG et al., 2009). Esses tecidos foram infectados por HRV e confirmados por PCR e hibridização *in situ*. Os níveis de MMP-2 e 9, TIMP-1 e VEGF foram medidos pelo método Elisa, e mudanças na expressão de seus genes detectadas por PCR para seu mRNA. A infecção por HRV aumentou a expressão de MMP-2, MMP-9 e VEGF e de seu mRNA, porém não a de TIMP-1, reforçando a hipótese de que o HRV poderia contribuir na patogênese de PNs em pacientes com RSC (ZHANG et al., 2009).

Um estudo prospectivo transversal feito por Lima et al. (2015), analisou a sazonalidade da RSC utilizando a técnica de PCR em tempo real para detectar genomas de vírus respiratórios em secreções e amostras de tecido de pacientes com CRS com e sem pólipos nasais. Pôde ser observado uma frequência de detecção viral de 41% (31/75). O vírus respiratório mais frequentemente detectado foi o rinovírus humano, encontrado em 18 pacientes (24%), seguido de metapneumovírus humano, enterovírus humano, vírus sincicial respiratório humano, adenovírus humano, bocavírus humano, humano coronavírus e vírus da gripe humana, detectados em 12 (16%), cinco (6,6%), quatro (5,3%), quatro (5,3%), dois (2,6%), dois (2,6%) e um (1,3%) pacientes, respectivamente. Foi visto um pico na detecção do vírus mais

prevalente nas estações de outono e inverno, concluindo que o padrão de sazonalidade do vírus respiratório encontrado nas amostras de mucosa nasal, pólipos e sinais paranasais em pacientes com RSC reforça a ideia de possibilidade de infecções virais respiratórias assintomáticas (LIMA et al., 2015).

Rowan et al. (2015) analisaram a detecção de vírus respiratórios em pacientes com e sem a RSC. A partir de amostras de seios paranasais eles observaram uma maior prevalência de vírus respiratórios em pacientes com RSC em relação aos controles, porém sem associação a um determinado vírus (ROWAN et al., 2015). Já Cho et al. (2013), realizaram um estudo prospectivo para determinar o predomínio de vírus respiratórios em pacientes com e sem a doença RSC, sendo utilizada a técnica de PCR em tempo real em amostras de lavado nasal e da concha média. Rinovírus foi o mais prevalente e o único vírus que apresentou taxa de infecção significativamente diferente entre pacientes e controles. Esses dados sugerem que pode haver uma forte relação entre inflamação da RSC e vírus respiratórios (CHO et al., 2013).

Foi analisada a prevalência de vírus respiratórios em amostras de pólipos nasal, concha média e mucosa de pacientes com rinossinusite com pólipos nasal através de métodos moleculares: foi observado que não houve associação entre a presença de pólipos nasais e vírus respiratórios (COSTA et al., 2014).

Com o objetivo de explorar a prevalência de vírus respiratórios em pacientes com RSC, Liao et al. (2014) fizeram um estudo prospectivo de caso-controle entre RSCcPN e RSCsPN e grupo controle. Utilizando a técnica de PCR em tempo real, células epiteliais do meato nasal médio foram testadas para 9 vírus respiratórios. Foi observado que embora não houvesse diferença significativa entre os grupos estudados, a detecção viral foi de 75,47%, 68,66% e 73,77% nos controles, RSCcPN e RSCsPN, respectivamente (LIAO et al., 2014).

1.2 Fisiopatogenia

A rinossinusite crônica com e sem polipose nasal apresenta grandes diferenças nos quesitos celulares e moleculares, mesmo tendo diversas semelhanças em seus sintomas. Estudos demonstraram que existe evidências de diferenciação fenotípicas considerada fraca na RSC, por isso tornou-se necessária a diferenciação entre diferentes tipos de RSC, baseado nos marcadores celulares e moleculares, assim, a vantagem dessa diferenciação seria na prevenção do prognóstico do paciente de uma forma mais específica, e desenvolvimento de novas terapias (AKDIS et al., 2013).

Histologicamente, a RSCsPN é caracterizada por infiltrado neutrofílico, aumento de fibrose e de depósito de colágeno no estroma; a membrana basal apresenta-se pouco espessada, e não há depósito de pseudocistos (VAN BRUAENE; BACHERT, 2011). Entretanto, a RSCcPN é caracterizada por extenso infiltrado leucocitário (em 80% dos casos eosinofílico) associado à fraca presença de pseudocistos com acúmulo de albumina e de edema, associado à diminuição de colágeno no estroma; a membrana basal encontra-se espessada, e há alteração histológica significativa no epitélio (VAN BRUAENE; BACHERT, 2011).

Podemos dizer que imunidade adaptativa é mais recente filogeneticamente, comandada pelos linfócitos. Esse sistema depende da entrada do antígeno específico no epitélio e da prévia exposição do indivíduo a esse antígeno. Para que esse sistema seja acionado, existe a necessidade de lesão da barreira epitelial. Já imunidade inata é mais antiga filogeneticamente, e reconhece imediatamente o que não pertence ao organismo, como por exemplo vírus de DNA de fita simples: por essa não ser característica do ser humano, a imunidade inata é ativada imediatamente. Na atualidade, sabe-se que esse sistema é extremamente complexo, e que interage de forma dinâmica com a imunidade adaptativa (VAN DRUNEN et al., 2012).

Assim, podemos dizer que a RSC existe devido a uma lesão do epitélio irreparável por microrganismo, ativando assim, a imunidade inata. Esta, é responsável por acionar pôr fim a imunidade adaptativa do indivíduo (VAN DRUNEN et al., 2012). Portanto, a célula epitelial inicia esse processo. Além de agir como barreira mecânica contra os diferentes patógenos, o epitélio nasal atua também nos processos imunológicos inatos e adaptativos. Portanto, em condição de lesão epitelial, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ligam-se aos receptores receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes na membrana celular e o citoplasma das células epiteliais. Os PRRs mais conhecidos são os NOD-receptors e TLR (toll-like receptors), sendo específicos para cada patógeno (LI et al., 2013; TIEU; KERN; SCHLEIMER, 2009).

Os TLR se ligam aos PAMPS e levam a secreção de proteínas no muco nasal (a exemplo de lisozimas e lactoferrina (AKDIS et al., 2011), citocinas e quimiocinas (KERN et al., 2008).

O TLR liga-se à partícula específica e ativa a cascata inflamatória que irá ocorrer pela via canônica ou alternativa. Essas vias ativam fatores de transcrição que induzem ou reprimem a transcrição gênica de algumas moléculas como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. A diferença entre as duas vias é que a via alternativa induz a produção de IFNs (interferons), o que aciona a resposta inflamatória adaptativa do tipo Th1 (IWAMURA; NAKAYAMA, 2008; CASANOVA et al., 2011). Já a via canônica aciona os fatores de transcrição NF- κ B (nuclear

fator κ B) (KIM et al., 2007; CASANOVA et al., 2011), MAPK e STAT-3, que amplificam a resposta imune adaptativa, em alguns casos com padrão predominantemente Th1 e em outros Th2 (AKDIS et al., 2011).

O fator de transcrição NF- κ B tem sua expressão aumentada em pacientes com RSCcPN (TAKENO et al., 2002; VALERA et al., 2008). Esse fator é de elevada importância pelo seu extenso poder pró-inflamatório, induzindo a produção de várias citocinas, como IL-1 β (interleucina-1 β), TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IFN γ , eotaxina, ICAM-1 e VCAM-1 (NECELA; CIDLOWSKI, 2004; VALERA et al., 2008). Além disso, NF- κ B pode inibir diretamente a ação do corticosteroide na célula, por impedir a ligação do seu receptor (GR – glucocorticoid receptor) ao DNA da célula (NECELA; CIDLOWSKI, 2004; VALERA et al., 2008).

As células epiteliais direcionam a resposta inflamatória como citocinas IL-33, IL-25 e TSLP, que induzem a polarização das células dendríticas e dos linfócitos T para o padrão Th2 e conseqüentemente a eosinofilia no tecido (KERN et al., 2008; CALUS et al., 2012; LI et al., 2013; CHIN; HARVEY, 2013). Quando o paciente é diagnosticado com RSC, a expressão de IL-33 está aumentada, o que traz relação direta com o grau de eosinofilia no tecido (CHIN, D. and R.J. HARVEY, 2013). Independente da resposta adaptativa, IL-25 e TSLP induzem a expansão de linfócitos Th2 (WANG et al., 2007; KOYASU; MORO, 2011). A TSLP é especialmente importante na interface entre células epiteliais e células dendríticas, ativando-as e finalmente polarizando as células T para o padrão Th2 (CHIN; HARVEY, 2013).

Para atrair as células inflamatórias e moléculas de adesão, que facilitam a permeabilidade vascular para o influxo de células, são produzidas quimiocinas, elas aumentam o número de células inflamatórias para a mucosa nasal. Algumas quimiocinas recrutam especialmente eosinófilos tornando-os aumentados na RSCcPN (VALERA et al., 2008; FIGUEIREDO; SILVA; WECKX, 2008; TIEU; KERN; SCHLEIMER, 2009; DE CASTRO et al., 2013), enquanto os neutrófilos são recrutados pela IL-8, aumentado na RSC com ou sem pólipos (OTTO; WENZEL, 2008). Alguns resultados controversos são encontrados na literatura a respeito das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, sendo que alguns estudos não demonstram aumento de expressão de ICAM-1 (VALERA et al., 2008; CAVALLARI et al., 2012).

Nos pacientes com RSCsPN, o padrão inflamatório é quase que exclusivamente neutrofílico, mediado por Th1 (LI et al., 2013), com aumento de IFN- γ , IL-12 e TNF- α (CALUS et al., 2012).

A IL-5 que tem como função induzir eosinofilia tecidual, por aumento de influxo dessas células e por diminuir a apoptose das mesmas, tem especial importância na RSCcPN, já que ela é altamente produzida por eosinófilos (VOEGELS; DE MELO PADUA, 2005; FIGUEIREDO; SILVA; WECKX, 2008; OTTO; WENZEL, 2008; CALUS et al., 2012).

Em contrapartida, os pólipos nasais de pacientes com fibrose cística e os de origem asiática são predominantemente neutrofílicos, com intenso infiltrado de IL-8, IFN- γ , MPO (mieloperoxidase) e IL-1 β (AKDIS et al., 2011).

A expressão de IL-1 β está aumentada nos pólipos tanto eosinofílicos como neutrofílicos. Essa citocina é uma importante molécula pró-inflamatória, e sua expressão está relacionada à pior resposta ao tratamento com corticosteroide tópico (VALERA et al., 2008).

A hipótese considerada mais aceita para a fisiopatogenia da RSC é uma doença inflamatória crônica causada por multifatores, com provável pré-disposição genética.

1.3 Quadro clínico

Infecções virais no trato respiratório superior, hipertrofia tonsilar, rinite alérgica são doenças que podem dificultar o diagnóstico clínico da RSC, doença que apresenta como sinais e sintomas mais frequente o bloqueio, obstrução e congestão nasal, que acomete cerca de 83,7% dos pacientes (HASTAN et al., 2011). Esse sintoma é decorrente de congestões dos vasos sinusoidais, resultando em edema local seguido de fibrose tecidual. A rinorréia é outro sintoma presente em 63,6% dos pacientes diagnosticados com RSC. Pode variar de secreção hialina até mucopurulenta. Pode estar associado a cacoscomia, tosse e ao pigarro (HASTAN et al., 2011).

Outro sintoma marcante da RSC é a alteração do olfato. Hiposmia ou até anosmia são frequentes e estão presentes em até 46% dos casos, principalmente aqueles que apresentam rinossinusite crônica com pólipos nasais (BHATTACHARYYA, 2006; HASTAN et al., 2011). Além disso, tosse, dor facial, entre outros sinais endoscópicos de pólipos nasais ou descarga purulenta principalmente do meato médio e ou edema são sinais e sintomas presentes na RSC (FOKKENS et al., 2012; TAN et al., 2017).

1.4 Tratamento

Achados recentes revelaram que RSC não é uma doença causada por uma infecção bacteriana persistente, ou seja, a percepção da doença como um processo inflamatório multifatorial já é clara (ANSELMO-LIMA et al., 2015).

Já foi visto que não é justificável por período curto de tempo o uso de antibióticos como tratamento de pacientes com RSC (SAKANO et al., 2018). O EPOS 2012 e o Último consenso sobre Rinossinusites publicado no Brasil, indica para essa doença, com ou sem pólipos, o uso de corticosteróide nasal ou sistêmico, além da lavagem com solução salina (OZTURK et al., 2011; ACHILLES; MOSGES, 2013).

Quando o paciente não responde ao tratamento clínico adequado, a cirurgia é uma alternativa. Estudos mostram que há uma melhora na qualidade de vida do paciente, sem consequências negativas quanto às sequelas osteoesqueléticas faciais (BRIETZKE; BRIGGER, 2008).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo contribuir para o entendimento da patogênese da doença rinossinusite crônica, avaliando a replicação viral e identificação dos fenótipos infectados em tecidos desses pacientes.

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Localizar e caracterizar *in situ* sítios de infecção por HRSV, HRV, HMPV em tecidos de concha média, pólipos nasais e seio maxilar de pacientes com rinossinusite crônica.
- Detectar evidências de replicação viral nesses tecidos.
- Caracterização celular em tecidos de pacientes com rinossinusite crônica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (número 10466/2008). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento autorizando a coleta do material.

3.1 Pacientes e amostras

Foram coletadas amostras de 100 indivíduos, 58 do sexo masculino e 42 do sexo feminino no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Os pacientes apresentavam idades entre 11 a 83 anos (média: 42,82 anos e mediana 41 anos). Como critérios de inclusão foram selecionados todos os pacientes portadores de rinossinusite crônica com pólio nasal (RSCcPN), ou rinossinusite crônica sem pólio nasal (RSCsPN) seguindo os critérios clínicos do guideline EPOS 2012: nasofibroscopia evidenciando presença de pólipos ou não e classificação de Lund-Mackay maior ou igual a dois. Foram excluídos pacientes com sinais ou sintomas de doença aguda no momento da cirurgia, com menos de 17 anos de idade, e aqueles com pólipos unilaterais ou papiloma invertido.(Fig.1)

Figura 1. Desenho esquemático da metodologia utilizada nesse trabalho.

3.1.1 Coleta e preparo das amostras

Amostras de mucosa de concha média, pólipos nasal e seio maxilar foram coletadas no momento da cirurgia, imediatamente foram inseridos em meio mínimo essencial (MEM, Gibco, Grand Island, USA) suplementado com 10% de antibiótico e antimicótico (Gibco), e foram transportadas refrigeradas até o laboratório de patogênese viral, onde foi realizado o processamento. Fragmentos dos tecidos foram lavados duas vezes com MEM (Gibco) para remoção de debris celulares e sangue. Posteriormente foram cortados usando instrumentos tratados com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma, Switzerland) para minimização da ação de qualquer tipo de contaminação com rinonucleases. Os fragmentos de tecido foram fixados em um fixador de Carnoy, composto de 60% de etanol, 30% de ácido acético e 10% de clorofórmio (Merk, Darmstadt, Alemanha) durante 3 horas. Após esses procedimentos, os fragmentos foram desidratados em série de etanol (JTBaker, México) por 1 hora cada (70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, II e III), e a seguir diafanizados em mistura 1:1 de xilol:etanol por 20 minutos, e submetidos a três trocas de xilol (Synth, Diadema, SP) por 30 minutos cada. A seguir, os tecidos foram parafinizados (Merk) em dois banhos de parafina de 2 horas cada, seguidos de inserção em bloco de parafina. Corte de 3µm foram preparados em micrótomo Leica e disposto em lâminas.

3.2 Quantificação da carga viral

Foram utilizados amostras de tecido de aproximadamente 30mg para extração de RNA / DNA utilizando o método de Trizol, seguindo as orientações do fabricante.

Aproximadamente 1µg de RNA foi utilizado na transcrição reversa (RT) juntamente com random *primers* e enzima Multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystems), seguindo recomendações do fabricante.

Os vírus de RNA detectados neste estudo foram rinovírus (HRV), influenza (FLU), parainfluenza (HPIV), vírus sincicial respiratório humano (HRSV), metapneumovírus humano (HMPV), coronavírus humano (HCoV), enterovírus (HEV). O RNA extraído de amostras foi utilizado em uma reação de transcrição reversa com "ImProm-II Reverse Transcriptase" (Promega) e random primers. Depois disso, o cDNA ou o DNA foram tratados com 20 ng de RNase (Invitrogen) seguido da procura de vírus por PCR em tempo real - método Taqman, usando o "7300 thermocycler Real Time PCR system" (Applied Biosystems). Sondas e iniciadores específicos utilizados na PCR para detectar vírus RNA / DNA e também β -actina

(gene para normalizar a reação) foram usados. A reação utilizada para detectar todos os vírus foi com 1 µL de amostra de DNA, iniciadores 0,5 µM, sondas 0,2 µM e 5 µL de Master Mix Taqman (Applied Biosystems). E as condições de amplificação foram: 45 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 15 segundos e extensão final de 1min a 60 ° C.

Tabela 1. *Primers e Sondas utilizados para a detecção dos vírus respiratórios por PCR em tempo real.*

Vírus	Nome	Sequência (5' → 3')	Alvo	Referência
HRSV	B17-F	GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA	N	[59]
	B120-R	TGTCAATATTATCTCCTGTACTACGTTGAA	N	[59]
	Joe-			
	BPB45	TGATACATTAAATAAGGATCAGCTGCTGTC ATCCA-Tamra	N	[59]
HMPV	HMPV-F	GTGATGCACTCAAGAGATACCC	N	[60]
	HMPV-R	CATTGTTTGACCGGCCCCATAA	N	[60]
	HMPV-probe	Fam-CTTTGCCATACTTCAATGAACAAC- Tamra	N	[60]
HRV	HRV-F	GCACTTCTGTTTCCCC	5'UTR	[61]
	HRV-R	AGCCTGCGTGGCTGCC	5'UTR	[61]
	HRV-probe 1	Fam-AGCCTCATCTGCCAGGTCTA-Tamra	5'UTR	[61]
	HRV-probe 2	Vic-AGCCTGCGTGGCTGCC- Tamra	5'UTR	[61]

3.3 Imunohistoquímica para detecção das proteínas virais de HRSV

Cortes de concha média, pólipos nasal e seio maxilar foram desparafinizados em 3 banhos de xilol (Synth, Diadema, SP) por 10 minutos cada, e hidratados por incubações sequenciais de 5 minutos em concentrações decrescentes de etanol (JTBacker, México) (100%, 90%, 80%, 70% e 50%).

Os cortes dos blocos foram submetidos ao desmascaramento antigênico com tampão 0,1 M de citrato sódio e 0,1 M de ácido cítrico seguido de aquecimento por 4 minutos em forno micro-ondas (Brastemp, Brasil) na potência máxima, e 15 minutos em potência mínima. Em seguida, os cortes foram incubados com 10% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos em ambiente sem iluminação, lavados com PBS (Gibco, Grand Island, NY, USA), bloqueados por 30 minutos em PBS com 0,01% de BSA (Gibco) e 3% de soro de cavalo (Gibco), e incubados com anticorpo primário anti a proteína F de HRSV feito em mouse (Chemicon MAB 858-1) diluído 1:100, usando o diluente PBS/BSA e 0,1% de triton-X100 1:1000 (Sigma), por 1 hora à temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação com anticorpo de cavalo anti-camundongo biotinilado (Mouse IgG BA-2000-vectastain ABC Kit-anti Mouse IgG biotinylated antibody)

diluído 1:1000 usando o mesmo diluente do primário em 30 minutos à temperatura ambiente. A detecção do anticorpo biotinilado foi feita com estreptavidina conjugada com peroxidase, diluída 1:300 (Streptavidin-peroxidase polymer, ultrasensitive-sigma-s2438-250UG) por 30 minutos em temperatura ambiente, usando como substrato da peroxidase o kit NovaRED (Vector Nova Red Substrate Kit-for peroxidase SK-4800), seguindo as orientações do fabricante. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harry (Vector), e os cortes foram desidratados por incubações de 2 minutos cada em concentrações crescentes de etanol seguido de xilol (etanol a 50%, 70%, 80%, 90%, 100%-3 banhos e 2 banhos de xilol I, II por 5 minutos cada), e montados com Etellan (Merk, Darmstadt, GE).

Para padronizar a reação de imunohistoquímica (IHQ), foi utilizada como controle positivo uma suspensão de células Hep-2 infectadas com vírus sincicial respiratório (HRSV) em coágulo de plasma humano. Para esta preparação, 24h após a infecção com HRSV, monocamadas de células Hep-2 foram removidas, lavadas duas vezes com PBS (Gibco) e centrifugadas a 200G por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* de células foi ressuspenso em 100µl de plasma humano, ao qual foram adicionados 20µl de trombina (Diagnostic Stago, Gennevilliers, France), seguindo-se de incubação de 5 minutos à temperatura ambiente para formação do coágulo, e fixação em 4% de paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) em PBS por 12 horas. Após a fixação, os coágulos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (JTBaker) (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), imersos em 3 banhos de xilol (JTBaker) e em seguida inseridos em parafina (Merk). Preparação idêntica foi feita com células Hep não infectadas como controle negativo.

3.4 Imunohistoquímica para detecção das proteínas virais de HRV

Cortes de tecidos de concha média, pólipos nasal e seio maxilar foram desparafinizados em 3 banhos de xilol (Synth Lab) de 10 minutos cada, e reidratados por incubações sequenciais de 5 minutos em concentrações decrescentes de etanol (JTBaker) (100%, 90%, 80%, 70% e 50%). Os cortes foram submetidos ao desmascaramento antigênico conforme descrito acima, seguido de incubação com 10% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos, lavadas com PBS (Gibco) e bloqueadas por 30 minutos com 0,01% de BSA (Gibco) em PBS. Seguiu-se incubação por 1 hora com anticorpos monoclonais da proteína VP1 diluído 1:300 em PBS/BSA com 0,1% de trinton-X100 (Sigma) à temperatura ambiente.

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo de cavalo anti-camundongo biotinilado (Mouse IgG BA-2000-vectastain ABC Kit-anti Mouse IgG biotinylated antibody) diluído 1:1000 usando o mesmo diluente do primário por 30 minutos à temperatura ambiente. Revelação, contracoloração, desidratação e montagem foram feitos conforme descrito acima. Coágulos de controle positivos e negativo foram feitos da mesma forma descrita acima, porém utilizando células Hela.

3.5 Imunohistoquímica para detecção das proteínas virais de HMPV

Cortes de tecidos de concha média, pólipos nasal e seio maxilar foram desparafinizados em 3 banhos de xilol (Synth Lab) de 10 minutos cada, e reidratados por incubações sequenciais de 5 minutos em concentrações decrescentes de etanol (JTBaker) (100%, 90%, 80%, 70% e 50%). Os cortes foram submetidos ao desmascaramento antigênico conforme descrito acima, seguido de incubação com 10% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos, lavadas com PBS (Gibco) e bloqueadas por 30 minutos com 0,01% de BSA (Gibco) em PBS. Seguiu-se incubação por 1 hora com anticorpos monoclonais da nucleoproteína (Abcam MAB 94802) diluído 1:100 em PBS/BSA com 0,1% de trinton-X100 (Sigma) à temperatura ambiente.

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo de cavalo anti-camundongo biotinilado (Mouse IgG BA-2000-vectastain ABC Kit-anti Mouse IgG biotinylated antibody) diluído 1:500 usando o mesmo diluente do primário por 30 minutos à temperatura ambiente. Revelação, contracoloração, desidratação e montagem foram feitos conforme descrito acima. Para padronizar a reação de imunohistoquímica (IHQ), foi utilizada como controle positivo uma lâmina com corte de adenoide positiva para metapneumovírus e como controle negativo foi utilizado uma amostra de mesmo tecido negativa para esse vírus.

3.6 Imunohistoquímica sequencial (SIMPLE) para proteínas virais e para marcadores imunofenotípicos

Cortes de tecido positivos por qPCR para HRSV, HRV e HMPV foram investigados por imunohistoquímica seriada pelo método SIMPLE (Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing Method). Utilizamos o SIMPLE para identificar tipos celulares positivos para proteínas estruturais virais dos vírus estudados. Um mesmo corte de tecido será testado sequencialmente com marcadores apropriados para, epitélio ciliado colunar pseudoestratificado, células produtoras de muco e mastócitos. Após a marcação inicial para

proteínas estruturais dos vírus, será intercalada etapas de remoção do sinal entre cada um dos testes para sucessivos marcadores. Após realização da IHQ, a marcação foi revelada com cromógeno AEC (Vector Laboratories) por no máximo 30 min ou até a formação de coloração vermelha, e as imagens foram adquiridas no microscópio Scan Scope Olympus VS120. A seguir, os tecidos marcados foram desidratados em série alcóolica até o desaparecimento do sinal positivo. Para eluição dos anticorpos, as lâminas foram incubadas em 0.15 mM KMnO_4 /0.01 M H_2SO_4 por 2 min a temperatura ambiente, e lavadas imediatamente em água destilada. Os tecidos foram remarcados com outro anticorpo de interesse, e a contra coloração feita com hematoxilina de Harry (Vector) foi realizada somente após a última marcação.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Detecções de Genomas de Virus por PCR

Foram coletadas amostras de 100 pacientes com rinossinusite crônica (média de idade: 42 anos, mediana 41 anos) no ambulatório de Rinossinusologia do Hospital da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, Brasil.

Inicialmente, no Laboratório de Patogênese Viral, foi analisado um grupo de pacientes diagnosticados com Rinossinusite Crônica, em que se obteve taxa de detecção viral de 54% (54/100). Metapneumovírus foi o mais frequente vírus encontrado, em 25 pacientes (25%), seguido de HRV, HRSV, HEV, HcoV, HadV, HboV e FLU, detectados em 19 (19%), 11 (11%), 7 (7%), 4 (4%), 4 (24%), 3 (3%) e 2 (2%) pacientes, respectivamente. Esses dados foram previamente publicados (Lima T. J et al, 2015). Dos pacientes positivos para vírus respiratórios por PCR, foi selecionado um subgrupo de 17 pacientes (12,4%) que foram positivos para os três vírus respiratórios mais frequentes: rinovírus em 11 (68,8%), vírus sincicial respiratório em 4 (17,6%) e metapneumovírus em 5 (29,4%).

Pôde ser observado que, dos 11 pacientes positivos para rinovírus, 7 (63,6%) apresentavam o vírus localizado no pólipó nasal, 3 (27,3%) no seio maxilar e apenas 1 (9,1%) na concha média. Dos 4 pacientes que tiveram positividade para HRSV, 2 (50%) apresentavam o vírus no pólipó nasal, 1 no seio maxilar (25%) e somente 1 (25%) na concha média. Dos 5 pacientes com metapneumovírus detectado por PCR em tempo real, 2 (15,4%) tiveram o vírus localizado no pólipó nasal, 2 (40%) na mucosa do seio maxilar e 1 (20%) na concha média. Esse estudo mostrou ainda que 3 pacientes (17,6%) apresentaram codetecções virais, sendo que 2 deles apresentaram rinovírus e metapneumovírus concomitantemente. HRSV e HRV foram detectados ao mesmo tempo em um paciente, e não houve codetecções de HMPV e HRSV.

Esse estudo mostrou ainda que 3 pacientes (17,6%) apresentaram codetecções virais, sendo que 2 deles apresentaram rinovírus e metapneumovírus concomitantemente. HRSV e HRV foram detectados ao mesmo tempo em um paciente, e não houve codetecções de HMPV e HRSV.

4.2 Detecção de antígenos virais in situ

A partir das amostras positivas por PCR em tempo real, utilizamos os tecidos parafinados para realização da técnica de imunohistoquímica buscando a detecção de proteínas estruturais virais.

Estavam disponíveis para realização de ensaios de IHQ blocos parafinados de 17 pacientes cujos tecidos foram positivos por qPCR. Foram selecionados tecidos positivos para HRV, HMPV e HRSV, que foram os vírus mais frequentes. A IHQ foi positiva para a proteína de HRV em 7 de 11 tecidos; para HMPV em 3 de 5 tecidos, e para HRSV em 3 de 4 tecidos analisados. Proteína estrutural de HRV foi detectada em uma amostra da mucosa do seio maxilar, 5 pólipos nasais e 1 concha média. Em relação ao HMPV, houve marcação intensa para proteína estrutural em 3 amostras, sendo uma de cada tecido estudado. Foi demonstrada positividade para proteína estrutural de HRSV em 2 amostras de pólio nasal, 1 concha média. Houve intensa marcação para a proteína estrutural F de HRSV em células epiteliais de pólio nasal e concha média provenientes de pacientes com rinossinusite crônica (Figura 3).

Figura 2. Imunohistoquímica para detecção da proteína F de HRSV em células de pólio nasal e concha média.

Detecção da proteína F de HRSV no epitélio de pólio nasal (a), concha média (b) e mucosa do seio maxilar (c) pela técnica de imunohistoquímica com contracoloração de hematoxilina de Harris. Imagens adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus.

Para localizar a produção de proteína de HRSV em pólio nasal e concha média de pacientes positivos por PCR em tempo real, foram feitos testes de imunohistoquímica (IHQ) para a proteína F de HRSV (Figura 4).

Figura 3. Imunohistoquímica para a proteína F de HRSV em amostras de tecidos de pacientes com rinossinusite crônica.

Coágulos de células Hep-2 não infectadas (A) e infectadas com HRSV (B), respectivamente controles negativo e positivo (aumento de 400x); (C) e (D), pólipos nasais positivos para HRSV, evidenciando marcação para a proteína F (aumentos de 400x e 1000x, respectivamente). Proteína estrutural viral foi detectada na concha média (E) e (F) (aumentos de 400x e 1000x, respectivamente). Contracoloração com hematoxilina de Harris.

Detecção da proteína de HMPV no epitélio de pólipos nasais pela técnica de imunohistoquímica com contracoloração de hematoxilina de Harris. Imagens adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus (Figura 5).

Figura 4. Detecção de proteína de HMPV em pólipos nasais de pacientes com rinossinusite crônica.

A produção de proteína estrutural de HMPV foi estudada em pólipos nasais, concha média e mucosa do seio maxilar de pacientes positivos para este agente por PCR em tempo real (Figura 6).

Figura 5. Imunohistoquímica para proteína estrutural de HMPV em amostras de tecidos de pacientes com rinossinusite crônica.

Cortes de tecido de adenoides sabidamente negativa (A) e positiva (B) para HMPV usados como controles (aumento de 400x); (C) e (D) pólipos nasais positivos para proteína estrutural de HMPV no epitélio, (aumentos respectivamente de 400x e 1000x); (E) e (F) mucosas do seio maxilar mostrando positividade para HMPV (aumentos de 400x e 1000x, respectivamente); (G) e (H) conchas médias positivas para proteína estrutural de HMPV (aumentos de 400x e 1000x, respectivamente). Contracoloração com hematoxilina de Harris.

Houve intensa marcação para a proteína estrutural VP-1 de HRV em células epiteliais de pólipos nasal, concha média e mucosa do seio maxilar provenientes de pacientes com rinossinusite crônica (Figura 7).

Figura 6. Imunohistoquímica para detecção da proteína VP-1 de HRV em células de pólipos nasal, concha média e mucosa do seio maxilar.

Detecção da proteína VP-1 de HRV no epitélio de pólipos nasal positivo para a proteína estrutural de HRV (a), concha média (b) e mucosa do seio maxilar (c) pela técnica de imunohistoquímica com contracoloração de hematoxilina de Harris. Imagens adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus.

A produção de proteína estrutural de HRV foi a seguir avaliada em pólipos nasal, concha média e mucosa do seio maxilar de pacientes positivos para este agente por PCR em tempo real (figura 8).

Figura 7. Imunohistoquímica para a proteína estrutural de HRV em amostras de tecidos de pacientes com rinossinusite crônica.

Coágulos de células de HeLa-I não infectadas (A), e infectadas com HRV (B) foram usados como controles negativo e positivo (aumentos de 200x e 400x, respectivamente); (C) pólipos nasais positivos para HRV, evidenciando marcação para a proteína VP-1 (aumento de 400x) (D) mucosas de seio maxilar maxilar mostrando positividade para HRV (aumento de 400x) (E) concha média positivas para proteína estrutural de HRV (aumento de 400x). Contracoloração com hematoxilina de Harris.

Tabela 2. Amostras positivas para HRV, HRSV e HMPV por PCR em tempo real e Imunohistoquímica.

	PN		CM		MSM		Total de amostras positivas para cada vírus	
	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ
HRV	7	5	1	1	3	1	11	7 (63,6%)
HRSV	2	2	1	1	1	0	4	3 (75%)
HMPV	2	1	1	1	2	1	5	3 (60%)

4.3 Determinação de fenótipos de células positivas para HRSV, HRV e HMPV.

A utilização da estratégia de “*Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing*” (SIMPLE) permitiu determinar os tipos celulares positivos para proteínas estruturais dos vírus estudados.

4.3.1 Imunofenotipagem de células positivas para HRSV em pólipos nasais e conchas média.

Foi encontrada marcação para proteína F de HRSV em linfócitos T CD4+ e em células dendríticas CD123+ (Figura 9). Grande quantidade de eosinófilos foi vista na marcação com orceína, mas sem associação com antígeno viral. Não foi detectada proteína viral em células produtoras de muco vistas na coloração com PAS.

Figura 8. Marcações sequenciais para a proteína F de HRSV utilizando a técnica de SIMPLE em pólipso nasal e concha média.

Marcações sequenciais em pólipso nasal e concha média. Em (A) células de pólipso nasal marcadas com anticorpo para a proteína F de HRSV com pseudo-coloração em verde; (B) o mesmo corte de tecido com células marcadas com anticorpo para linfócito T (CD3), pseudo-coloridas em rosa; (C) o mesmo corte de tecido com células marcadas para CD4, pseudo-coloridas em vermelho; (D) cor amarela indica sobreposição entre as marcações para HRSV (pseudo-colorida em verde) e CD4 (pseudo-colorida em vermelho); (E) células de concha média marcadas com anticorpo para proteína F de HRSV pseudo-coloridas em verde; (F) mesmo corte do tecido com células marcadas com anticorpo anti-CD123 para células dendríticas, pseudo-coloridas em vermelho; (G) cor amarela indica sobreposição entre marcações para HRSV (pseudo-colorida em verde) e para CD123 (pseudo-colorida em vermelho). A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris e as imagens foram adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus.

4.3.2. Imunofenotipagem de células positivas para HRV em pólipos nasal, concha média e mucosa do seio maxilar.

Foram detectados linfócitos T CD4, macrófagos (CD14+) e linfócitos B (CD20+) com proteína VP-1 de HRV (Figura 10). Além disso, houve marcações para a proteína de HRV em células produtoras de muco utilizando a coloração de PAS. Eosinófilos foram encontrados na coloração com orceína, não infectados com HRV.

Figura 9. Marcações sequenciais para proteína VP-1 de HRV utilizando a técnica de SIMPLE em pólipo nasal.

Marcações sequenciais em pólipo nasal. Em (A), células de pólipo nasal marcadas com anticorpo anti-VP1 de HRV pseudo-coloridas em verde; (B) células no mesmo corte de tecido marcadas com anti-CD3, pseudo-coloridas em rosa; (C) células no mesmo corte do tecido marcadas com anti-CD4 pseudo-coloridas em vermelho; (D) coloração amarela indica sobreposição entre as marcações para HRV e CD4; Contracoloração feita com hematoxilina de Harris. Imagens adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus.

Figura 10. Marcações sequenciais para proteína VP-1 de HRV utilizando a técnica de SIMPLE mucosa do seio maxilar.

Marcações sequenciais mucosa do seio maxilar. Em (A), células da mucosa do seio maxilar marcadas com anti-HRV pseudo-coloridas em verde; (B) mesmo corte de tecido com células marcadas para CD14 pseudo-coloridas em vermelho; (C) a cor amarela indica sobreposição entre as marcações para HRV e CD14. Contracoloração feita com hematoxilina de Harris. Imagens adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus.

Figura 11. Marcações sequenciais para proteína VP-1 de HRV utilizando a técnica de SIMPLE em concha média.

Marcações sequenciais concha média. Em (A) células de concha média marcadas com anticorpo anti-HRV pseudo-coloridas em verde; (B) mesmo corte de tecido com células marcadas com anti-CD20 pseudo-coloridas em vermelho; (C) a coloração amarela indica sobreposição entre marcações para HRV e CD20. Contracoloração feita com hematoxilina de Harris. Imagens adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus.

Figura 12. Marcações para proteína VP-1 de HRV em glândulas produtoras de muco utilizando a técnica de SIMPLE em concha média.

Marcações em glândulas produtoras de muco. Em (A), células de concha média marcadas com anticorpo anti-HRV; (B) mesmo corte marcado com PAS. Contracoloração feita com hematoxilina de Harris. Imagens adquiridas em Scan Scope VS120 Olympus.

4.3.3. Imunofenotipagem das células infectadas por HMPV em pólipos nasais.

Foram observadas infecções de HMPV em glândulas produtoras de muco utilizando a coloração de PAS (figura 11).

Foram encontradas células eosinofílicas (coloração orceína) nesses tecidos, porém essas células não estão infectadas pelo vírus.

Figura 13. Marcações sequenciais para a proteína de HMPV utilizando a técnica de SIMPLE em glândulas produtoras de muco.

Marcações sequenciais utilizando a técnica de SIMPLE em tecidos do trato respiratório superior. Em (a), células de pólio nasal marcadas com anticorpo anti-proteína de HMPV e contracoloração feita com hematoxilina de Harris; (b) células da mesma região e corte do tecido coradas com corante PAS. Imagens adquiridas

Discussão

5. DISCUSSÃO

Infecções virais do trato respiratório superior são muito frequentes e têm grande repercussão em saúde pública (Miller, E.K., et al., 2007). Porém, apesar da sua grande frequência e impacto em saúde humana, pouco se sabe sobre o papel de infecções virais respiratórias em doenças crônicas do trato respiratório superior.

Um estudo recente realizado pelo nosso grupo detectou a presença de vírus respiratórios de RNA em secreções respiratórias e tecidos de pacientes sem sintomas de IRA com RSC, com ou sem pólipos nasais (Lima, J.T., et al., 2015). Esse achado suscitou importantes questões quanto ao significado, especialmente no que se refere à possibilidade desses vírus respiratórios serem persistentes em tecidos naso-sinusais de pacientes com RSC. Outro aspecto importante que merece investigação é se esses agentes poderiam contribuir cronicamente para a patogênese dessas doenças.

O presente estudo buscou compreender melhor a razão da detecção de RNA de três vírus respiratórios comuns (rinovírus, metapneumovírus e vírus sincicial respiratório) no trato respiratório superior de pacientes com rinosinusite crônica, mesmo na ausência de evidências clínicas de infecção aguda por esses agentes. Estudos previamente publicados pelo nosso grupo e por outros autores relataram detecção de vírus respiratórios por RT-PCR em secreções de pacientes com RSC, mas não encontramos na literatura indexada um estudo semelhante ao presente, que tenha investigado essas infecções *in situ* nos tecidos afetados pela RSC. Essa abordagem é importante, já que a presença de RNA viral em secreções nasofaríngeas pode ser devida à replicação viral em qualquer ponto do trato respiratório superior, ou até mesmo ser RNA remanescente de infecção prévia. Todavia, foi possível demonstrar por métodos *in situ* que havia atividade produtiva dos vírus em tecidos removidos de pacientes com RSC submetidos a tratamento cirúrgico, havendo produção de proteínas estruturais virais. Foi também possível determinar os tipos celulares infectados, o que ajuda a aprofundar o conhecimento sobre possíveis relações de vírus respiratórios com mucosas cronicamente inflamadas de RSC.

Um estudo feito por Abshirini et al (2015) detectou altas frequências de HRV (29%) e HRSV (12%) em indivíduos com RSC, em secreções de pacientes com RSC. Wood et al, (2011) evidenciaram associação entre RSC e asma, e viram que infecções causadas por vírus respiratórios aumentam as chances de desenvolvimento de doença asmática durante a infância em pessoas com RSC (Wood AJ et al., 2011). O presente estudo vai além, pois demonstra não

só a presença de genomas de HRV, HRSV e HMPV em secreções, mas confirma a presença de proteínas virais por imunohistoquímica nos tecidos envolvidos na RSC.

Embora a detecção de genoma de HRV *in situ* tenha sido feita por Pitkaranta et al (2001) em mucosa de seio maxilar de pacientes adultos com sinusite aguda (Pitkäranta A. et al, 2001), o presente estudo pela primeira vez comprova a detecção *in situ* de proteína viral estrutural de HRV, um corolário de atividade produtiva viral, em tecidos de pacientes com RSC. Já é sabido que HRV infecta células epiteliais diferenciadas de explantes de adenoides e de mucosa de pólipos nasais infectados *ex vivo* (Arruda, E., 1991), e que a infecção em modelo experimental humano mostrou replicação viral apenas em esparsas células de biópsias nasais obtidas por raspagem superficial com microcureta (Arruda, E., et al., 1995). Naquele estudo experimental feito em voluntários humanos HRV-14 e HRV-39 se replicaram em pequena proporção de células epiteliais, focalmente distribuídas no epitélio nasal, bem como em células ciliadas e não-ciliadas da nasofaringe (Arruda E., 1995). Além disso, é sabido que a infecção de células do epitélio nasal por HRV causa perda de integridade da barreira epitelial, possivelmente facilitando a translocação de outros patógenos, bem como possivelmente da própria progênie viral, pela via paracelular (Kennedy, J.L., et al., 2012). Posteriormente, ficou evidente que há uma associação de HRV e infecções secundárias bacterianas na RSC, nas quais o vírus pode exercer papel de agente facilitador da colonização de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Haemophilus* e *Fusobacterium* spp (Cheng, K.J., et al., 2017) (Lal, D., et al., 2017).

As células nas quais HRV foi observado foram células epiteliais, linfócitos T CD4+, macrófagos CD14+, linfócitos B CD20+, além de células epiteliais de glândulas produtoras de muco. A infecção de células linfo-hematopoiéticas deve ter consequências na produção de citocinas e quimiocinas que podem resultar em fenótipos diferentes de doença por HRV, especialmente assestada sobre quadro de RSC. Nesse sentido, é útil lembrar que a produção de mediadores inflamatórios e a destruição de células epiteliais nasais por HRV resulta em exacerbação das respostas imuno-inflamatórias (Clement S. et al., 2005, Gwaltney JM Jr., 1967, Shin SH., 2004, Tan KS., 2018, Hansel TT., 2017, Lee SB., 2016).

O presente estudo mostrou extensa marcação para a proteína VP-1 de HRV no epitélio dos tecidos de pólipo nasal, concha média e mucosa do seio maxilar, indicando que HRV deve ser produzido no epitélio rino-sinusal, e a replicação viral pode ter impacto na remodelação do tecido hiperplásico na RSC (Lauren O. Bakaletz., 1995).

É conhecido o papel protetor de células TCD4+ contra uma grande variedade de vírus respiratórios, incluindo HRV (Parry D. E., 2000, Hogan RJ., 2001). Achados anteriores

mostraram evidências da capacidade do HRV de ativar células T CD4⁺ e CD8⁺, mesmo na ausência de células apresentadoras de antígenos (APCs) e, consequentemente, a produção de citocinas inflamatórias e a ativação de células efectoras, inclusive eosinófilos (Ilarraza R., 2013). A presença de linfócitos CD4⁺ infectados por HRV em nossos experimentos *in situ* levanta algumas hipóteses relevantes na RSC. Primeiro, tais células podem ser linfócitos de memória de longa vida e por isso albergar HRV de forma crônica em pacientes com RSC. Em segundo lugar, considerando que células T CD4⁺ são as principais orquestradoras da resposta imune, é possível que essa infecção comprometa a modulação da resposta imune dependente de T CD4⁺.

O presente estudo demonstrou *in situ* células CD20⁺ infectadas por HRV. Nesse aspecto, é importante considerar que HRV infecta e forma centros de replicação viral em linfócitos B, ativando intensamente sua proliferação, o que pode ter importante impacto no papel de linfócitos B na resposta imune a HRV (Nothelfer K. et al., 2015; Aab et al, 2017).

Achados anteriores mostraram a presença de infiltrado inflamatório em biópsias de mucosa nasal durante infecção experimental por rinovírus. Foram identificados mastócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos, porém, não houve alteração significativa no número de células inflamatórias entre grupos normal e atópico (Fraenkel DJ., 1994). No presente estudo, foi mostrado que HRV também infectam macrófagos CD14⁺. Infelizmente, não foram determinados os subtipos de macrófagos que são alvos da infecção, mas pode ser que essas células desempenhem papel modulador da resposta inflamatória em pacientes com RSC.

Schneider et. al (2012) analisaram células produtoras de muco em camundongos infectados com HRV e viram produção aumentada de muco nas grandes e pequenas vias aéreas (Schneider D., 2012). Dados do presente estudo demonstraram que células produtoras de muco evidenciadas pela coloração PAS são infectadas por HRV. Esses achados são importante evidência de que a infecção dessas células pode ser a causa de produção aumentada de muco, e que talvez o muco infectado seja uma maneira de transmissão do agente a outros hospedeiros.

Assim como para o HRV, os resultados do presente estudo sobre HRSV evidenciaram a infecção viral no epitélio superficial. Trabalhos anteriores confirmaram o tropismo desse vírus por células ciliadas (Villenave R., 2013, Zhang L., 2002). No presente estudo, observamos a presença da proteína F de RSV no epitélio de pólipos nasal, concha média e mucosa do seio maxilar. É provável que a infecção do epitélio permita acesso de HRSV a células não-ciliadas (Villenave R., 2012).

No presente estudo, observamos infecção de células dendríticas CD123⁺ em pacientes com RSC. A infecção dessas células pode ter impacto na modulação da resposta imune, contribuindo para a gravidade da infecção e exacerbação de sintomas. Achados anteriores

demonstraram que a infecção por HRSV no epitélio das vias aéreas pode induzir a liberação de vários fatores secretados que provavelmente regulam a resposta imune do hospedeiro, tais como vários tipos de citocinas TNF-a e TNF-b (González PA., 2012, Lotz MT and Peebles RS Jr., 2012). Isso está de acordo com observações de que células dendríticas são acionadas na mucosa nasal no início da infecção por HRSV (Gill MA, 2008) e que células dendríticas nas vias aéreas inferiores de casos graves de bronquiolite por HRSV produzem resposta pró-inflamatória ativando fenótipos celulares (Kerrin et al, 2017).

Eosinófilos são ativados durante a fase aguda da infecção por HRSV e podem contribuir na recuperação. Estudo feito por Lindemans et, al (2006), mostrou que o marcador de ativação mieloide CD11b está aumentado em infecções por HRSV. Em concordância com isso, os pacientes com RSC e pólipos nasais analisados no presente estudo mostravam padrão histológico eosinofílico. Contudo, não observamos eosinófilos infectados com HRSV nos tecidos analisados.

Achados anteriores sugerem que as células das vias aéreas infectadas por HMPV, especialmente epiteliais, facilitam a adesão de *S. pneumoniae* (Lai SH., 2016). No presente estudo vimos a presença de HMPV infectando epitélios nasais e de seios paranasais. Células epiteliais de pólipos nasais mostraram-se fortemente positivas para proteína de HMPV. Não foram vistas células dendríticas infectadas por HMPV, o que contradiz dados de Gurrero-Plata et al, (2006) e Le Nouën (2011), que mostraram que, além de células linfóides, HMPV foi capaz de infectar células dendríticas humanas.

O presente estudo mostrou a infecção de HMPV em epitélio de glândulas produtoras de muco no pólipo nasal e na mucosa do seio maxilar, sugerindo que a infecção dessas células pode causar excreção de HMPV em secreções para outras regiões do trato respiratório superior. Tal hipótese corrobora com o fato de que HMPV é frequentemente detectado em secreções respiratórias. Confirmando esse fato, Xue yan Zheng et al, (2018) observou HMPV em secreções de crianças utilizando a técnica de PCR em tempo real.

Os linfócitos T contribuem para o clearance de infecção por HMPV (Kolli D., 2008, Erickson JJ., 2012, Alvarez R., 2004). Kolli et al, (2008) mostraram que, mesmo considerando a importância de células T na proteção contra doenças, sua infecção pode levar a depleção de células T CD4+, podendo contribuir para diminuição da inflamação pulmonar e redução da obstrução das vias aéreas. Esses achados sugerem que células T, especialmente as células T CD4+, exercem papel no aumento da doença clínica, e na patologia pulmonar por HMPV (Kolli D., 2008). Não vimos células T CD4+ infectados por HMPV no presente estudo, sugerindo que o HMPV não contribui significativamente para inflamação em pacientes com RSC.

A presença de HRV, HRSV e HMPV em epitélios nasais e paranasais de pacientes com RSC, além de poder ter implicações patogénicas, pode significar persistência desses agentes em um tecido propício à sua cronicidade, visto que as mucosas naso-sinusais cronicamente inflamadas podem ser fonte constante de vírus para outros hospedeiros, favorecendo a transmissão desses agentes.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de proteínas virais e fenótipos em amostras dos tecidos pólipos nasal, concha média e mucosa do seio maxilar de pacientes com rinossinusite crônica, assim contribuindo para um melhor entendimento da importância dos vírus respiratórios em pacientes com RSC. O presente estudo sugeriu que a infecção produtiva de HRV, HRSV e HMPV pode ocorrer em tecidos cronicamente inflamados em virtude da presença de proteínas estruturais virais, além do genoma detectado em estudo anterior. As principais células sede das infecções virais foram células epiteliais, linfócitos T (CD3+/CD4+), macrófagos (CD14+), células dendríticas (CD123), linfócitos B (CD20+) além de células residentes de glândulas produtoras de muco. Trata-se de um importante achado para elucidar aspectos obscuros da RSC com e sem pólipos nasal, além de corroborar com a hipótese de persistência de vírus respiratório em tecidos de pacientes com rinossinusite crônica, que podem assim ser reservatórios de vírus na ausência de sintomas de infecção aguda.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- Aab A, Wirz O, van de Veen W, Söllner S, Stanic B, Rückert B, Aniscenko J, Edwards MR, Johnston SL, Papadopoulos NG, Rebane A, Akdis CA, Akdis M Human rhinoviruses enter and induce proliferation of B lymphocytes. *Allergy*. 2017 Feb;72(2):232-243.
- Abshirini H, Makvandi M, Seyyed Ashrafi M, Hamidifard M, Saki N. Prevalence of rhinovirus and respiratory syncytial virus among patients with chronic rhinosinusitis. *Jundishapur J Microbiol*, 2015. 8(3): p. e20068.
- Achilles N, Mosges R. Nasal saline irrigations for the symptoms of acute and chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2013. 13(2): p. 229-35.
- Akdis, C.A., 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*, 2013. 131(6): p. 1479-90.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T./ Fujita, H., Gomez, E., Kluner, S., Meyer, N., O Mahony, I., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van de Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., and AKDIS, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma:receptor, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 701-721 e e701-e770
- Alvarez R, Harrod KS, Shieh WJ, Zaki S, Tripp RA. Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *J Virol*. 2004 Dec;78(24):14003-11.
- Anselmo-Lima WT, Sakano E, Tamashiro E, Nunes AA, Fernandes AM, Pereira EA, Ortiz É, Pinna Fde R, Romano FR, Padua FG, Mello Junior JF, Teles Junior J, Dolci JE, Balsalobre Filho LL, Kosugi EM, Sampaio MH, Nakanishi M, Santos MC, Andrade NA, Mion Ode G, Piltcher OB, Fujita RR, Roithmann R, Voegels RL, Guimarães RE, Meirelles RC, Paula Santos R, Nakajima V, Valera FC, Pignatari SS. Rhinosinusitis: evidence and experience: October 18 and 19, 2013 - São Paulo. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2015. 81(1 Suppl 1): p. S1-S49.
- Arruda E, Boyle TR, Winther B, Pevear DC, Gwaltney JM Jr, Hayden FG. Localization of human rhinovirus replication in the upper respiratory tract by in situ hybridization. *J Infect Dis*, 1995. 171(5): p. 1329-33.
- Bachert, C., et al., Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008. 8(1): p. 34-8.
- Bachert, C., et al., Important research questions in allergy and related diseases: 3-chronic rhinosinusitis and nasal polyposis - a GALEN study. *Allergy*, 2009. 64(4): p. 520-33.
- Bakaletz LO. Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends in Microbiology* Volume 3, Issue 3, p110–114, March 1995.

Benninger, M.S., et al., Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003. 129(3 Suppl): p. S1-32.

Bhattacharyya, N., Clinical and symptom criteria for the accurate diagnosis of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 2006. 116(7 Pt 2 Suppl 110): p. 1-22.

Bhattacharyya, N., Contemporary assessment of the disease burden of sinusitis. *Am J Rhinol Allergy*, 2009. 23(4): p. 392-5.

Bhattacharyya, N., Incremental health care utilization and expenditures for chronic rhinosinusitis in the United States. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2011. 120(7): p. 423-7.

Bo Liao, Chun-Yan Hu, Tao Liu, Zheng Liu. Respiratory Viral Infection in the Chronic Persistent Phase of Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 124:832–837, 2014.

Bouscambert-Duchamp, M., Lina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Andréoletti L. Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(3): p. 1411-4.

Braciale, T.J., J. Sun, T.S. Kim. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(4): p. 295-305.

Brietzke SE, Brigger MT. Adenoidectomy outcomes in pediatric rhinosinusitis: a meta-analysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2008. 72(10): p. 1541-5.

Calus, L., Van Zele T, Derycke L, Krysko O, Dutre T, Tomassen P, Dullaers M, Bachert C, Gevaert P. Local inflammation in chronic upper airway disease. *Curr Pharm Des*, 2012. 18(16): p. 2336-46.

Carroll KN, Wu P, Gebretsadik T, Griffin MR, Dupont WD, Mitchel EF, Hartert TV. The severity-dependent relationship of infant bronchiolitis on the risk and morbidity of early childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1055-61, 1061.e1.

Casanova, J.L., L. Abel, and L. Quintana-Murci, Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol*, 2011. 29: p. 447-91.

Cavallari, F.E, Valera FCP, Gallego AJ, Malinsky RR, Kupper DS, Milanezi C, da Silva JS, Tamashiro E, Anselmo-Lima WT. Expression of RANTES, eotaxin-2, ICAM-1, LFA-1 and CCR-3 in chronic rhinosinusitis patients with nasal polypsis. *Acta Cir Bras*, 2012. v.27, n.9, p. 645-649.

Cesario TC. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul;55(1):107-13.

Chen, Y., R. Dales, and M. Lin, The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *Laryngoscope*, 2003. 113(7): p. 1199-205.

Cheng KJ, Xu YY, Zhou ML, Zhou SH, Wang SQ. Role of local allergic inflammation and *Staphylococcus aureus* enterotoxins in Chinese patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Laryngol Otol*, 2017. 131(8): p. 707-713.

Chin, D. and R.J. Harvey, Nasal polyposis: an inflammatory condition requiring effective anti-inflammatory treatment. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013. 21(1): p. 23-30.

Cho GS, Moon BJ, Lee BJ, et al., High Rates of Detection of Respiratory Viruses in the Nasal Washes and Mucosae of Patients with Chronic Rhinosinusitis. *J Clin Microbiol*. 2013 Mar; 51(3): 979–984.

Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S, Chaponnier C, Lew D, Lacroix JS. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis*. 2005 Sep 15;192(6):1023-8.

Costa Costa C, Garzaro M, Boggio V, Sidoti F, Simeone S, Raimondo L, Cavallo GP, Pecorari G, Cavallo R. Detection of Herpesviruses 1–6 and Community-Acquired Respiratory Viruses in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis. *Intervirology*. 2014;57(2):101-5.

de Arruda E 3rd, Mifflin TE, Gwaltney JM Jr, Winther B, Hayden FG, Localization of rhinovirus replication in vitro with in situ hybridization. *J Med Virol*, 1991. 34(1): p. 38-44.

Deepthi Kolli T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection. *J. Virol*. September 2008 vol. 82no. 17 8560-8569.

Deffernez, C., et al., Amplicon sequencing and improved detection of human rhinovirus in respiratory samples. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(7): p. 3212-8.

De Castro, M.C., Rocha-Silva F, Gomes LI, Zauli DA, de Moraes Mourão M, de Castro MM, Guimarães RE, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Impact of mitomycin C on the mRNA expression signatures of immunological biomarkers in eosinophilic nasal polyposis. *Am J Rhinol Allergy*, 2013. 27(1): p. e32-41.

De Weerd W, Twilhaar WN, Kimpen JL. T cell subset analysis in peripheral blood of children with RSV bronchiolitis. *Scand J Infect Dis*. 1998;30(1):77-80.

Durr, D.G., M.Y. Desrosiers, and C. Dassa, Impact of rhinosinusitis in health care delivery: the Quebec experience. *J Otolaryngol*, 2001. 30(2): p. 93-7.

Eloy, P., et al., Actual concepts in rhinosinusitis: a review of clinical presentations, inflammatory pathways, cytokine profiles, remodeling, and management. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2011. 11(2): p. 146-62.

Erickson JJ, Gilchuk P, Hastings AK, Tollefson SJ, Johnson M, Downing MB, Boyd KL, Johnson JE, Kim AS, Joyce S, Williams JV. Viral acute lower respiratory infections impair CD8⁺ T cells through PD-1. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2967-82.

Falcone, V., et al., Human bocavirus DNA in paranasal sinus mucosa. *Emerg Infect Dis*, 2011. 17(8): p. 1564-5.

Figueiredo CR, Silva IDCG, Weckx LLM. Inflammatory genes in nasal polyposis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008. 16(1): p. 18-21.

Fokkens W, Lund V, Mullol J et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol* 45, Suppl. 20, 2007, p. 1-136.

Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N, Cervin A, Douglas R, Gevaert P, Georgalas C, Goossens H, Harvey R, Hellings P, Hopkins C, Jones N, Joos G, Kalogjera L, Kern B, Kowalski M, Price D, Riechelmann H, Schlosser R, Senior B, Thomas M, Toskala E, Voegels R, Wang de Y, Wormald PJ.. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinology*, Suppl. 2012. 23:3 p preceding table of contents, 1-298.

Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. Immunohistochemical analysis of nasal biopsies during rhinovirus experimental colds. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Oct;150(4):1130-6.

Garcia-Garcia ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellán A, Gozalo F, Tenorio T, Pérez-Breña P. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol*, 2007. 42(5): p. 458-64.

Garcia-Garcia ML, Rey CC, Rabes T. del R. Pediatric Asthma and Viral Infection. *Arch Bronconeumol*, 2016. 52(5): p. 269-273.

Gill MA, Long K, Kwon T, Muniz L, Mejias A, Connolly J, Roy L, Banchereau J, Ramilo O. Differential recruitment of dendritic cells and monocytes to respiratory mucosal sites in children with influenza virus or respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis*. 2008 Dec 1;198(11):1667-76.

Gliklich, R.E. and R. Metson, The health impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995. 113(1): p. 104-9.

González PA, Bueno SM, Carreño LJ, Riedel CA, Kalergis AM. Respiratory syncytial virus infection and immunity. *Rev Med Virol*. 2012 Jul;22(4):230-44.

Guerrero-Plata A, Casola A, Suarez G, Yu X, Spetch L, Peeples ME, Garofalo RP. Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Mar;34(3):320-9.

Gwaltney JM, Hendley JO, Simon G, Jordan WS. Rhinovirus infections in an industrial population. *JAMA*. 1967 Nov 6;202(6):494-500.

Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009; 360:588-598.

Hansel TT, Tunstall T, Trujillo-Torralbo MB, Shamji B, Del-Rosario A, Dhariwal J, Kirk PDW, Stumpf MPH, Koopmann J, Telcian A, Aniscenko J, Gogsadze L, Bakhsoliani E, Stanciu L, Bartlett N, Edwards M, Walton R, Mallia P, Hunt TM, Hunt TL, Hunt DG, Westwick J, Edwards M, Kon OM, Jackson DJ, Johnston SL. A Comprehensive

Evaluation of Nasal and Bronchial Cytokines and Chemokines Following Experimental Rhinovirus Infection in Allergic Asthma: Increased Interferons (IFN- γ and IFN- λ) and Type 2 Inflammation (IL-5 and IL-13) . *EBioMedicine*. 2017;19:128-138.

Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, Bousquet PJ, Brozek G, Bruno A, Dahlén SE, Forsberg B, Gunnbjörnsdóttir M, Kasper L, Krämer U, Kowalski ML, Lange B, Lundbäck B, Salagean E, Todo-Bom A, Tomassen P, Toskala E, van Drunen CM, Bousquet J, Zuberbier T, Jarvis D, Burney P. Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA(2)LEN study. *Allergy*, 2011. 66(9): p. 1216-23.

Hogan RJ, Zhong W, Usherwood EJ, Cookenham T, Roberts AD, Woodland DL. Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen- specific CD4+ T cells that persist in the lungs. *J Exp Med*. 2001b;193:981–986.

Hu, A., et al., Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(1): p. 149-54.

Huizing, E.H., European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology*, 2005. 43(3): p. 238; author reply 238.

Illaraza R, Wu Y, Skappak CD, Ajamian F, Proud D, Adamko DJ. Rhinovirus has the unique ability to directly activate human T cells in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):395-404.

Isaacs, S., et al., A meta-analysis of topical amphotericin B for the treatment of chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2011. 1(4): p. 250-4.

Iwamura, C. and Nakayama T. Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2008. 8(1): p. 7-13.

Jang, Y.J., et al., Detection of rhinovirus in turbinate epithelial cells of chronic sinusitis. *Am J Rhinol*, 2006. 20(6): p. 634-6.

Kato A, Favoreto S Jr, Avila PC, Schleimer RP. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol*, 2007. 179(2): p. 1080-7.

Kecia N.Carroll, Tina V.Hartert, The impact of respiratory viral infection on wheezing illnesses and asthma exacerbations. *Immunology and Allergy Clinics of North America* Volume 28, Issue 3, August 2008, Pages 539-561.

Kennedy JL, Turner RB, Braciale T, Heymann PW, Borish L. Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr Opin Virol*, 2012. 2(3): p. 287-93.

Kerrin A, Fitch P, Errington C, Kerr D, Waxman L, Riding K, McCormack J, Mehendele F, McSorley H, MacKenzie K, Wronski S, Braun A, Levin R, Theilen U, Schwarze J. Differential lower airway dendritic cell patterns may reveal distinct endotypes of RSV bronchiolitis. *Thorax*. 2017 Jul;72(7):620-627.

Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, Grammer LC, Schleimer RP. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol*, 2008. 22(6): p. 549-59.

Kim, Y.K., Oh SY, Jeon SG, Park HW, Lee SY, Chun EY, Bang B, Lee HS, Oh MH, Kim YS, Kim JH, Gho YS, Cho SH, Min KU, Kim YY, Zhu Z. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol*, 2007. 178(8): p. 5375-82.

Kim YS, Kim NH, Seong SY, Kim KR, Lee GB, Kim KS. Prevalence and risk factors of chronic rhinosinusitis in Korea. *Am J Rhinol Allergy*, 2011. 25(3): p. 117-21.

Kolli D, Bataki EL, Spetch L, Guerrero-Plata A, Jewell AM, Piedra PA, Milligan GN, Garofalo RP, Casola A. T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection. *J Virol*. 2008 Sep;82(17):8560-9.

Koyasu, S. and K. Moro, Innate Th2-type immune responses and the natural helper cell, a newly identified lymphocyte population. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011. 11(2): p. 109-14.

Lai SH, Liao SL, Wong KS, Lin TY. Preceding human metapneumovirus infection increases adherence of *Streptococcus pneumoniae* and severity of murine pneumococcal pneumonia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016 Apr;49(2):216-24.

Lal D, Keim P, Delisle J, Barker B, Rank MA, Chia N, Schupp JM, Gillece JD, Cope EK. Mapping and comparing bacterial microbiota in the sinonasal cavity of healthy, allergic rhinitis, and chronic rhinosinusitis subjects. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2017. 7(6): p. 561-569.

Lauren O. Bakaletz Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends in Microbiology* Volume 3, Issue 3, p110–114, March 1995.

Lee SB, Yi JS, Lee BG, Gong CH, Kim NH, Joo CH, Jang YJ. Human rhinovirus serotypes in the nasal washes and mucosa of patients with chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015 Mar;5(3):197-203.

Lee SB, Song JA, Choi GE, Kim HS, Jang YJ. Rhinovirus infection in murine chronic allergic rhinosinusitis model. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(11):1131-1138.

Le Nouën C, Hillyer P, Winter CC, McCarty T, Rabin RL, Collins PL, Buchholz UJ. Low CCR7-mediated migration of human monocyte derived dendritic cells in response. *PLoS Pathog* 7(6): e1002105, 2011.

Liao B, Hu CY, Liu T, Liu Z. Respiratory Viral Infection in the Chronic Persistent Phase of Chronic Rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 2014. 124. 832–837

Li, C, Shi L, Yan Y, Gordon BR, Gordon WM, Wang DY. Gene expression signatures: a new approach to understanding the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2013. 13(2): p. 209-17.

Lima JT, Paula FE, Proença-Modena JL, Demarco RC, Buzatto GP, Saturno TH, Delcaro LS, Tamashiro E, Valera FCP, Arruda E, Anselmo-Lima WT. The seasonality of respiratory viruses in patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*, 2015. 29(1): p. 19-22.

Lindemans CA, Kimpen JLL, Luijk B, Heidema J, Kanters D, van der Ent CK, Koenderman L. Systemic eosinophil response induced by respiratory syncytial virus. *Clin Exp Immunol*. 2006 Jun; 144(3): 409–417.

Lotz MT, Peebles RS. Mechanisms of respiratory syncytial virus modulation of airway immune responses. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012 Oct;12(5):380-7.

Maitre NL, Williams JV Human metapneumovirus in the preterm neonate: current perspectives. *Res Rep Neonatol*. 2016;6:41-49. Epub 2016 Jul 28.

Martinez-Anton A, Debolós C, Garrido M, Roca-Ferrer J, Barranco C, Alobid I, Xaubet A, Picado C, Mullol J. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy*, 2006. 36(4): p. 448-57.

Miller EK, Lu X, Erdman DD, Poehling KA, Zhu Y, Griffin MR, et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *J Infect Dis* 2007;195:773-81.

Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaniingsih ER, Ngama M, Muniyoki PK, Kartasmita C, Simões EA, Rudan I, Weber MW, Campbell H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010, 375(9725), p. 1545-55.

Necela, B.M. and J.A. Cidlowski, Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc*, 2004. 1(3): p. 239-46.

Neumann, R., E. Genersch, and H.J. Eggers, Detection of adenovirus nucleic acid sequences in human tonsils in the absence of infectious virus. *Virus Res*, 1987. 7(1): p. 93-7.

Nothelfer K, Sansonetti PJ, Phalipon A. Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Mar;13(3):173-84.

Okamoto M, Dapat CP, Sandagon AMD, Batangan-Nacion LP, Lirio IC, Tamaki R, Saito M, Saito-Obata M, Lupisan SP, Oshitani H. Molecular Characterization of Respiratory Syncytial Virus in Children with Repeated Infections with Subgroup B in the Philippines. *J Infect Dis*. 2018 May 2, p. 1-9.

Otto, B.A. and S.E. Wenzel, The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008. 16(3): p. 270-4.

Ozturk F, Bakirtas A, Ileri F, Turkas I. Efficacy and tolerability of systemic methylprednisolone in children and adolescents with chronic rhinosinusitis: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 128(2): p. 348-52.

O'Donnell DR, Carrington D. Peripheral blood lymphopenia and neutrophilia in children with severe respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Aug;34(2):128-30.

Parry DE, Busse WW, Sukow KA, Dick CR, Swenson C, Gern JE. Rhinovirus-induced PBMC responses and outcome of experimental infection in allergic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 692–698 (2000).

Perez, A.C., Buzatto GP, Dantas IP, Dorgam JV, Valera FCP, Tamashiro E, Anselmo Lima WT. et al., [Review of experimental models: sinusitis in rabbits]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2014. 80(5): p. 435-40.

Pilan RR, Pinna FR, Bezerra TF, Mori RL, Padua FG, Bento RF, et al. Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. *Rhinology*. 2012;50:129-38.

Pitkäranta A, Starck M, Savolainen S, Pöyry T, Suomalainen I, Hyypiä T, Carpen O, Vaheri A. Rhinovirus RNA in the maxillary sinus epithelium of adult patients with acute sinusitis. *Clin Infect Dis.* 2001 Sep 15;33(6):909-11. Epub 2001 Aug 10

Pleis, J.R., B.W. Ward, and J.W. Lucas, Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2009. *Vital Health Stat* 10, 2010(249): p. 1-207.

Ramadan, H.H., R.W. Farr, and S.J. Wetmore, Adenovirus and respiratory syncytial virus in chronic sinusitis using polymerase chain reaction. *Laryngoscope*, 1997. 107(7): p. 923-5.

Ramaswamy M, Groskreutz DJ, Look DC. Recognizing the importance of respiratory syncytial virus in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2009 Feb;6(1):64-75.

Ray, N.F., Baraniuk JN, Thamer M, Rinehart CS, Gergen PJ, Kaliner M, Josephs S, Pung YH. Healthcare expenditures for sinusitis in 1996: contributions of asthma, rhinitis, and other airway disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. 103(3 Pt 1): p. 408-14.

Rowan NR, Lee S, Sahu N, Kanaan A, Cox S, Phillips CD, Wang EW. The role of viruses in the clinical presentation of chronic rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology & Allergy*. 2015, Vol. 29, No. 6, pp. 197-200.

Sakano E, Sarinho ESC, Cruz AA, Pastorino AC, Tamashiro E, Kuschnir F, Castro FFM, Romano FR, Wandalsen GF, Chong-Neto HJ, Mello JF Jr, Silva LR, Rizzo MC, Miyake MAM, Rosário Filho NA, Rubini NPM, Mion O, Camargos PA, Roithmann R, Godinho RN, Pignatari SSN, Sih T, Anselmo-Lima WT, Solé D. IV Brazilian Consensus on Rhinitis - an update on allergic rhinitis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2018;84(1):3-14.

Schneider D, Hong JY, Popova AP, Bowman ER, Linn MJ, McLean AM, Zhao Y, Sonstein J, Bentley JK, Weinberg JB, Lukacs NW, Curtis JL, Sajjan US, Hershenon MB. Neonatal rhinovirus infection induces mucous metaplasia and airways hyperresponsiveness. *J Immunol*. 2012 Mar 15;188(6):2894-904.

Sherry C. Wen Lung CD8₊ T Cell Impairment Occurs during Human Metapneumovirus Infection despite Virus-Like Particle Induction of Functional CD8₊ T Cells. *J. Virol*. September 2015 vol. 89no. 17 8713-8726.

Sejima, T., G. Holtappels, and C. Bachert, The expression of fibrinolytic components in chronic paranasal sinus disease. *Am J Rhinol Allergy*, 2011. 25(1): p. 1-6.

Sigurs, N. Epidemiologic and clinical evidence of a respiratory syncytial virus-reactive airway disease link. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. v. 163, p. S2-S6.

Shin SH, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;114(6):1369-75.

Sung RY, Chan PK, Tsen T, Li AM, Lam WY, Yeung AC, Nelson EA. Identification of viral and atypical bacterial pathogens in children hospitalized with acute respiratory infections in Hong Kong by multiplex PCR assays. *J Med Virol*. 2009 Jan;81(1):153-9.

Takeno S, Hirakawa K, Ueda T, Furukido K, Osada R, Yajin K. Nuclear factor-kappa B activation in the nasal polyp epithelium: relationship to local cytokine gene expression. *Laryngoscope*, 2002. 112(1): p. 53-8.

Tan KS, Yan Y, Ong HH, Chow VTK, Shi L, Wang DY. Impact of Respiratory Virus Infections in Exacerbation of Acute and Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2017. 17(4): p. 24.

Tan KS, Ong HH, Yan Y, Liu J, Li C, Ong YK, Thong KT, Choi HW, Wang DY, Chow VT. In Vitro Model of Fully Differentiated Human Nasal Epithelial Cells Infected With Rhinovirus Reveals Epithelium-Initiated Immune Responses. *J Infect Dis*. 2018, 5;217(6):906-915.

Tieu, DD, Kern RC, and Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. 124(1): p. 37-42.

Valera FC, Queiroz R, Scrideli C, Tone LG, Anselmo-Lima WT. Expression of transcription factors NF-kappaB and AP-1 in nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*, 2008. 38(4): p. 579-85.

Van Bruaene, N, Bachert C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011. 11(1): p. 8-11.

Van Drunen, CM, Mjösberg JM, Segboer CL, Cornet ME, Fokkens WJ. Role of innate immunity in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis: progress and new avenues. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2012. 12(2): p. 120-6.

Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, 2001. 7(6): p. 719-24.

Veskitkul J, Wongkaewpothong P, Thaweethamchareon T, Ungkanont K, Visitsunthorn N, Pacharn P, Vichyanond P, Jirapongsananuruk O. Recurrent Acute Rhinosinusitis Prevention by Azithromycin in Children with Nonallergic Rhinitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2017.

Villanave R, Thavagnanam S, Sarlang S, Parker J, Douglas I, Skibinski G, Heaney LG, McKaigue JP, Coyle PV, Shields MD, Power UF. In vitro modeling of respiratory syncytial virus infection of pediatric bronchial epithelium, the primary target of infection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 27;109(13):5040-5.

Villanave R, Shields MD, Power UF. Respiratory syncytial virus interaction with human airway epithelium. *Trends Microbiol.* 2013 May;21(5):238-44.

Voegels, R.L. and de Melo Padua FG. Expression of interleukins in patients with nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005. 132(4): p. 613-9.

Wang, Y.H., et al., IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*, 2007. 204(8): p. 1837-47.

Welliver TP, Garofalo RP, Hosakote Y, Hintz KH, Avendano L, Sanchez K, Velozo L, Jafri H, Chavez-Bueno S, Ogra PL, McKinney L, Reed JL, Welliver RC Sr. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J Infect Dis.* 2007 Apr 15;195(8):1126-36.

Westerly BD, Peebles RS. Respiratory syncytial virus infections in the adult asthmatic—mechanisms of host susceptibility and viral subversion. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010 November ; 30(4): 523–539.

Wood AJ, Antoszewska H, Fraser J, Douglas RG. Is chronic rhinosinusitis caused by persistent respiratory virus infection? *International Forum of Allergy & Rhinology*, 2011, Vol. 1, No. 2, pp 95-100.

Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL, Pickles RJ. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol.* 2002 Jun;76(11):5654-66.

Zhang X, Wang Y, Yamamoto G, Tachikawa T. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathology.* 2009;55:250–60.

Zheng XY, Xu YJ, Guan WJ, Lin LF., Regional, age and respiratory-secretion-specific prevalence of respiratory viruses associated with asthma exacerbation: a literature review. *Arch Virol.* 2018, 163(4):845-853.