**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANDRÉA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI

**Alterações histológicas nasossinusais induzidas por
toxinas bacterianas: proposta de modelos
experimentais de rinossinusite crônica em coelhos**

RIBEIRÃO PRETO

2018

ANDRÉA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI

**Alterações histológicas nasossinusais induzidas por
toxinas bacterianas: proposta de modelos
experimentais de rinossinusite crônica em coelhos**

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

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

**Orientador: Prof. Dr. Edwin
Tamashiro**

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Biagiotti, Andréa Arantes Braga

Alterações histológicas nasossinusais induzidas por toxinas bacterianas: proposta de modelos experimentais de rinossinusite crônica em coelhos. Andréa Arantes Braga Biagiotti / Orientador: Edwin Tamashiro, Ribeirão Preto - 2018.

101p.: 34il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

1. Rinossinusite crônica. 2. Toxinas bacterianas. 3. Enterotoxina estaflocócica. 4. Superantígeno. 5. Lipopolissacáride. 6. Ácido lipoteicoico. 7. Ovalbumina. 8. Modelo animal. 9. Coelhos. 10. Histopatologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: BIAGIOTTI, Andréa Arantes Braga

Título: Alterações histológicas nasossinusais induzidas por toxinas bacterianas:
proposta de modelos experimentais de rinosinusite crônica em coelhos.

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

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Conduzir e terminar este doutorado foi um grande desafio, principalmente pela fase da minha vida em que ele aconteceu. “Um doutorado e três filhos; dois de sangue e um de papel”. Por diversas vezes achei que não conseguiria acabar antes do Tiago nascer. Porém, existem poucas coisas na vida que não conseguimos contornar... Durante a fase final do meu doutorado, em meio a muitas lâminas, células, gráficos e pensamentos, coisas ruins aconteceram. A vida sempre se supera! Depois disso eu soube que este desafio que eu estava enfrentando, de tão pequeno, nem chegava a ser desafio. É uma oportunidade de aprimoramento que eu escolhi enfrentar. Meu primo e sua família sim estão me mostrando o verdadeiro significado da palavra desafio e de como enfrenta-lo com fé e perseverança. Sei que a vida ainda vai me trazer muitas surpresas, boas e ruins. E eu só tenho uma certeza: meus filhos são as melhores! É verdade que junto com eles (a maior felicidade do mundo) vem os maiores medos também, mas se esse é o preço, eu pago! A frase da minha avó Iolanda dita nos seus últimos dias de vida não me sai da cabeça “Se eu pudesse mudar alguma coisa na minha vida teria mais filhos”. Isso porque ela teve seis! Hoje que sou mãe, concordo com ela. Filho é o maior impulso que uma pessoa pode ter para se tornar o melhor que consegue ser. São nossa motivação eterna. Por isso, dedico esta tese em primeiro lugar aos meus filhos Luíza e Tiago (e aos próximos que quiserem vir), que são minha melhor parte e me fazem querer ser melhor a cada dia.

Dedico também aos meus pais Eliane e Basílio que, com exemplo de cada dia, me ensinam a ser o melhor que consigo ser. Eles me deram “asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar” (Dalai Lama) e todos os dias rezo para conseguir

fazer isso com meus filhos. À minha mãe que sempre me incentivou a fazer pesquisa (principalmente por a melhor pesquisadora que conheço) e ao meu pai que sempre me ensinou a pensar na vida e tentar enxergá-la de forma mais suave.

Dedico ao meu marido pela paciência, ajuda diária por mais que a distância e pelo incentivo. Já me disseram um dia que um dos passos para ser feliz é se casar com alguém gentil. Meu melhor amigo e companheiro para a vida!

Dedico às minhas irmãs Marina, Juliana e Laura, que junto comigo trilham este caminho em busca da superação e felicidade.

Dedico às minhas avós que são meus exemplos de vida e que todos os dias tornam minha caminhada mais leve e tranquila.

Dedico aos meus sobrinhos: Helena, João Miguel e Alisson (e todos os outros que ainda virão), por todo amor que nos ensinam a dar.

Dedico aos meus sogros Maria e José Roberto, que tanto me ajudam e ainda vão ajudar com seus netos que eles tanto amam.

Dedico aos meus cunhados e cunhadas, por cuidarem bem e fazerem parte do meu maior tesouro: a família.

A toda minha família, que além de ser muito grande, é muito unida e é a melhor que existe.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Edwin Tamashiro, por ter sido perfeito durante todo o doutorado. Genial, eficiente, pertinente, compreensivo, agradável... amigo. É um dos grandes exemplos de pessoa, profissional e pesquisador em quem procuro me espelhar. “Elogie em público e corrija em particular. Um líder corrige sem ofender e orienta sem humilhar” (Mário Sérgio Cortella). Com a vida meu vô Chico nos ensinava isso todos os dias “O elogio tem um poder inacreditável”. Meu orientador segue esta filosofia e também por isso tem minha admiração mais sincera.

Agradeço a minha grande amiga Danielle Leite Cunha por ter dado os primeiros passos desse projeto de forma tão competente.

Agradeço a Dra. Francesca Maia Faria, médica contratada do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por todos ensinamentos, pela paciência e ajuda imprescindível na conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilização de seus equipamentos e pelo fundamental trabalho de seus técnicos Maria Rossato, Marina Fantucci, Adriana Murashima e Maria Cecília Onofre na realização da pesquisa. Em especial para Maria que, além de ótima profissional, é um exemplo de competência, perseverança, integridade; um exemplo de vida.

Agradeço ao Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilização dos seus equipamentos e pelo trabalho de seus técnicos Danniely Barros, Ariane Sant'Ana, Jose Carlos Vanni e Paulo Castilho.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilização dos seus equipamentos e pelo trabalho de seu técnico José Augusto Maulin.

Agradeço ao Biotério do Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilização dos seus equipamentos e pelo trabalho de seu técnico Francisco Carlos Mazzocato.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilização dos seus equipamentos e pelo trabalho de sua técnica Lillian Eslaine.

Agradeço ao Professor Fernando Chahud do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela disponibilização dos seus equipamentos e pelo trabalho de suas técnicas Mônica de Abreu e Ana Carolina Veloni.

Agradeço ao estatístico Davi Casale Aragon do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela ajuda com as análises estatísticas.

Agradeço a Professora Wilma Terezinha Anselmo-Lima e Fabiana Cardoso Pereira Valera pelo incentivo, por serem exemplo de profissionais e pessoas e por me guiarem durante toda a formação profissional.

Agradeço ao Professor Francisco Guimarães por todos ensinamentos durante a iniciação científica que me ajudaram muito na condução e conclusão desta tese.

Apoio Financeiro

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro, disponibilizando a bolsa de estudos durante os anos de 2015 a 2018.

Resumo

Biagiotti AAB. **Alterações histológicas nasossinusais induzidas por toxinas bacterianas: proposta de modelos experimentais de rinosinusite crônica em coelhos.** Tese (Doutorado) Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

Introdução: O tratamento da Rinosinusite Crônica (RSC) tem sofrido poucos avanços nas últimas décadas. Uma das barreiras na aquisição de novas terapias é a falta de conhecimento pleno sobre sua fisiopatogenia. A carência de avanço decorre principalmente da complexa e provável multifatorialidade da RSC, associada à inexistência de um bom modelo animal que possa mimetizar os fenômenos biológicos que ocorrem em humanos. A maioria dos modelos animais de RSC descrita na literatura mimetiza uma infecção aguda ou promove bloqueio das vias de drenagem que, na maioria das vezes, não corresponde aos mecanismos encontrados nas RSC em humanos. Por outro lado, diversas evidências indicam que as bactérias exercem importante papel na fisiopatogenia da RSC, possivelmente pela presença de biofilmes ou indução de inflamação crônica promovida por endo e exotoxinas. **Objetivo:** Neste estudo avaliou-se a viabilidade de um modelo experimental de RSC em coelhos, utilizando-se a exposição crônica de toxinas bacterianas em animais previamente sensibilizados à ovalbumina (OVA), analisando seus efeitos histopatológicos sobre a mucosa nasossinusal. **Material e Métodos:** Após indução de sensibilização com injeção subcutânea de OVA 2,5% e 0,4% de hidróxido de alumínio por duas semanas, os coelhos foram submetidos à implantação de cateter de longa duração em seio maxilar direito. Após, foram submetidos à irrigação nasossinusal com OVA 2,5% três vezes por semana, por duas semanas, e em seguida, irrigação de soluções contendo diferentes toxinas bacterianas (enterotoxina estafilocócica B (SEB) 1 µg/mL, lipopolissacáride (LPS) 100 ng/mL e ácido lipotecóico (LTA) 100 ng/mL) por quatro semanas. Os animais foram sacrificados 24 horas após a última irrigação e a mucosa do seio maxilar direito (teste) e esquerdo (controle interno) foi coletada para avaliação histopatológica. **Resultados:** A exposição nasossinusal ao SEB causou espessamento epitelial, infiltração celular, eosinofilia e neutrofilia tecidual, além de redução do epitélio ciliado. A exposição ao LPS causou espessamento epitelial e subepitelial, infiltração celular, eosinofilia epitelial e subepitelial e aumento da fibrose subepitelial. O LTA causou espessamento epitelial e subepitelial, infiltração celular e eosinofilia subepitelial e aumento da fibrose subepitelial. **Conclusão:** A exposição crônica de toxinas bacterianas na mucosa nasossinusal promoveu alterações histológicas, como espessamento da mucosa e infiltração celular, semelhantes às encontradas em pacientes com RSC. O presente estudo demonstrou que este é um modelo animal viável de RSC. Mais estudos serão necessários para elucidar se os mecanismos patogênicos deste modelo são semelhantes aos observados em humanos.

Palavras-chave: Rinosinusite crônica. Toxinas bacterianas. Enterotoxina estafilocócica. Superantígeno. Lipopolissacáride. Ácido lipoteicoico. Ovalbumina. Modelo animal. Coelhos. Histopatologia.

Abstract

Biagiotti AAB. **Sinonasal histopathological changes induced by bacterial toxins: proposal of experimental models of chronic rhinosinusitis in rabbits.** Tese (Doutorado) Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

Background: The treatment of chronic rhinosinusitis (CRS) has had little involvement in the last decades. One of the barriers to the development of new therapies is the lack of knowledge about CRS pathophysiology. The complexity and multifactoriality of this disease, together with the inexistence of a proper animal model of CRS, are probably the causes for the few advances in CRS therapy. Most of the animal models of CRS resemble acute infection or promote sinonasal obstructions, which are not a very common etiologies in CRS patients. However, there has been a lot of evidence that bacteria play an important role in the pathophysiology of CRS, probably due to the presence of biofilms, or the chronic inflammation induced by endo e exotoxins. **Objective:** This study aims to evaluate the viability of an experimental model of CRS in rabbits through the use of bacterial toxins in previously sensitized animals with ovalbumin, analyzing its histopathological effects onto the sinonasal mucosa. **Materials and Methods:** After inducing ovalbumin (OVA) sensitization by intradermic injection of OVA 2,5% and 0,4% aluminum hydroxide for 2 weeks, rabbits underwent maxillary sinus instillation of OVA 2,5% three times a week for 2 weeks followed by sinus lavage with either one bacterial toxin (*Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) 1 µg/mL, lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/mL, lipoteichoic acid (LTA), 100 ng/mL) for 4 weeks. Rabbits were euthanised 24 hours after the last sinus lavage and the mucosa of right maxillary sinus (tested side) and left side (control) were collected for histopathological evaluation. **Results:** The sinonasal exposure to SEB resulted in epithelial thickening, inflammatory cells infiltration (tissue eosinophilia and neutrophilia) and reduction of ciliated cells. The exposure to LPS resulted in epithelial and subepithelial thickening, inflammatory cells infiltration, epithelial and subepithelial eosinophilia and increased subepithelial fibrosis. The exposure to LTA resulted in epithelial and subepithelial thickening, subepithelial inflammatory cells infiltration and eosinophilia and increased subepithelial fibrosis. **Conclusion:** This study reported the effects of bacterial toxins on the the sinonasal mucosa of ovalbumin-sensitized rabbits, demonstrating similar changes that are observed in CRS patients. Our results show that this is a viable animal model of CRS. Further studies are need to elucidate whether the pathomechanisms in this model are similar to what are observed in humans.

Keywords: Chronic rhinosinusitis. Bacterial toxins. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. superantigen lipopolysaccharide. Lipoteichoic acid. Superantigen. Ovalbumin. Animal model. Rabbits. histopathology.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Cirurgia para exposição do seio maxilar direito e implantação de cateter para irrigação: (A) incisão vertical em dorso nasal, (B) confecção de retalho de periósteo, (C) abertura brocada na face anterior do seio maxilar direito, (D) lavagem do seio maxilar direito para coleta de material para cultura, (E) trocar em dorso nasal para transfixação de cateter com abertura entre as orelhas, (F) cateter posicionado na abertura do seio maxilar, ancorado em alça de periósteo, (G) sutura do periósteo sobre cateter, (H) sutura de pele com abertura de cateter localizado entre as orelhas36
Figura 2 -	Representação esquemática do protocolo experimental38
Figura 3 -	(A) Dissecção da região nasal anterior com exposição do cateter de irrigação sinusal, (B) Parede anterior do seio maxilar brocado, (C) Exposição da parede medial do seio maxilar direito, (D) Remoção da parede medial do seio maxilar direito para avaliação histopatológica.....39
Figura 4 -	Representação esquemática das medidas realizadas nas avaliações histológicas em lâminas coradas com hematoxilina-eosina41
Figura 5 -	Exemplos de células avaliadas nos compartimentos epitelial e subepitelial: (A) eosinófilo, (B) neutrófilo, (C) linfócito, (D) plasmócito, (E) mastócito, (F) exemplo de área com visualização de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos42
Figura 6 -	Porcentagem de células caliciformes: (A) exemplo com 0% de células caliciformes, (B) exemplo com 5% de células caliciformes, (C) exemplo com 10% de células caliciformes, (D) exemplo com 25% de células caliciformes43
Figura 7 -	Classificação de epitélio ciliado: (A) categoria 0 com presença normal de cílios, (B) categoria '1' com perda leve/focal de cílios, (C) categoria '2' com perda moderada/difusa de cílios, (D) categoria '3' com perda acentuada/extensa de cílios44
Figura 8 -	Classificação de edema subepitelial: (A) categoria '0' sem edema, (B) categoria '1' com edema leve/focal, (C) categoria '2' com edema moderado/difuso, (D) categoria '3' com edema acentuado/extenso45
Figura 9 -	Classificação de fibrose subepitelial: (A) categoria '0' sem fibrose, (B) categoria '1' com fibrose leve/focal, (C) categoria '2' com fibrose moderada/difusa, (D) categoria '3' com fibrose acentuada/extensa45

Figura 10 -	Classificação de tecido glandular subepitelial: (A) categoria '0' sem aumento de tecido glandular, (B) categoria '1' com aumento de tecido glandular leve/focal, (C) categoria '2' com aumento de tecido glandular moderado/difuso, (D) categoria '3' com aumento de tecido glandular acentuado/extenso46
Figura 11 -	Valores de média e erro padrão da média da variação de peso. Avaliação estatística pelo teste de Mann-Whitney comparando variação de peso dos coelhos nos diferentes grupos51
Figura 12 -	Espessura epitelial e subepitelial. (A) Valores de média e erro padrão da média da espessura epitelial (teste de Mann-Whitney); (B) Valores de média e erro padrão da média da espessura subepitelial (teste de Mann-Whitney); (C) Exemplos de mucosa do seio maxilar que representam a média da espessura de epitélio e subepitélio para cada grupo53
Figura 13 -	Porcentagem de epitélio, representada pelos valores de média e erro padrão da média da porcentagem de epitélio entre os diferentes grupos (teste de Mann-Whitney)54
Figura 14 -	Porcentagem de células caliciformes. Valores de média e erro padrão da média da porcentagem de células caliciformes (teste de Mann-Whitney)55
Figura 15 -	Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de perda de cílios. Categoria 0 se normal, 1 se perda leve/focal de cílios, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/extensa56
Figura 16 -	Valores médios do infiltrado celular epitelial (A) e subepitelial (B) . (Média $\pm$ Erro padrão da média, Teste de Mann-Whitney). (C) Imagens representativas de mucosa do seio maxilar que representam a média de infiltrado epitelial para cada grupo; (D) Exemplos de mucosa do seio maxilar que representam a média de infiltrado celular subepitelial para cada grupo. Em vermelho estão marcados os eosinófilos, em amarelo neutrófilos, em azul linfócitos e em verde plasmócitos58
Figura 17 -	Representação gráfica do infiltrado eosinofílico epitelial (A) e subepitelial (B) . (Média $\pm$ erro padrão da média, teste de Mann-Whitney). Histologia representativa da média de infiltrado eosinofílico epitelial (C) e subepitelial (D) , para cada grupo60
Figura 18 -	Infiltrado neutrofílico epitelial (A) e subepitelial (B) , representado por valores da média $\pm$ erro padrão da média (Mann-Whitney). Imagens histológicas representativas do infiltrado neutrofílico no epitélio (C) e região subepitelial (D) , de cada grupo62

Figura 19 -	Valores de média $\pm$ erro padrão da média do infiltrado linfocítico epitelial (A) e subepitelial (B) (Mann-Whitney). Imagens histológicas representativas de mucosa do seio maxilar que representam a média de infiltrado linfocítico epitelial (C) e subepitelial (D) , para cada grupo.....	64
Figura 20 -	Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de edema subepitelial. Categoria 0 se normal, 1 se edema leve/focal, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/extenso	66
Figura 21 -	Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de fibrose subepitelial. Categoria 0 se normal, 1 se fibrose leve/focal, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/ extensa	67
Figura 22 -	Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de tecido glandular subepitelial. Categoria 0 se normal, 1 se aumento de tecido glandular leve/focal, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/ extenso	68
Figura 23 -	Exemplos histológicos de pólipos presentes no seio maxilar obtidos no grupo LPS (A) e LTA (B)	70
Figura 24 -	Comparação da espessura epitelial (A) e subepitelial (B) da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test).....	71
Figura 25 -	Comparação da porcentagem de epitélio da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)	72
Figura 26 -	Comparação da porcentagem de células caliciformes da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test).....	73
Figura 27 -	Comparação da perda de cílios da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se perda leve/focal de cílios, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/extensa	74
Figura 28 -	Comparação do infiltrado celular epitelial (A) e subepitelial (B) da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)	75
Figura 29 -	Comparação do infiltrado eosinofílico epitelial (A) e subepitelial (B) da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)	76

Figura 30 -	Comparação do infiltrado neutrofílico epitelial (A) e subepitelial (B) da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. (Wilcoxon signed rank test)	77
Figura 31 -	Comparação do infiltrado linfocítico epitelial (A) e subepitelial (B) da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. (Wilcoxon signed rank test)	77
Figura 32 -	Comparação da fibrose subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se leve/focal, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/extensa.....	78
Figura 33 -	Comparação do edema subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se leve/focal de cílios, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/extenso	79
Figura 34 -	Comparação do tecido glandular subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se leve/focal de cílios, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/extenso	80

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características das células identificadas em áreas epiteliais e subepiteliais (56)	42
Tabela 2 -	Distribuição das categorias de perda de cílios entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher, p-valor=0,11	56
Tabela 3 -	Distribuição das categorias de edema subepitelial entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher: p-valor= 0,02	66
Tabela 4 -	Distribuição das categorias de fibrose subepitelial entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher: p-valor<0,01	68
Tabela 5 -	Distribuição das categorias de tecido glandular entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher: p-valor=0,11	69
Tabela 6 -	Médias e erro padrão da média para variáveis contínuas e porcentagem de categorias 2 ou 3 para variáveis categóricas (edema, fibrose e tecido glandular subepitelial e perda de epitélio ciliado)	81
Tabela 7 -	Diferenças na comparação dos grupos controle OVA, SEB, LPS e LTA em relação ao grupo controle sem cirurgia	82
Tabela 8 -	Diferenças na comparação dos grupos SEB, LPS e LTA em relação ao grupo controle OVA (resposta alérgica isolada)	83
Tabela 9 -	Diferenças na comparação da mucosa maxilar do lado direito com o lado esquerdo de cada grupo	84

Lista de Símbolos e Abreviaturas

CETEA-	Comitê de Ética em Experimentação Animal
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HE-	Hematoxilina e eosina
IM-	Intramuscular
IP-	Intraperitoneal
LMEL-	Laboratório Multiusuário de escaneamento de lâminas
LPS-	Lipopolissacáride
LTA-	Ácido lipoteicoico
MHC II-	Molécula de histocompatibilidade do tipo II
NF-κB-	Fator nuclear kappa B
OVA-	Ovalbumina
PBS-	Tampão fosfato salino
PVPI-	Polivinil Pirrolidona Iodo
RSA-	Rinossinusite aguda
RSC-	Rinossinusite crônica
RSCcPN-	Rinossinusite crônica com polipose nasal
RSCsPN-	Rinossinusite crônica sem polipose nasal
<i>S. aureus-</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pyogenes-</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SEA-	Enterotoxina estafilocócica A
SEB-	Enterotoxina estafilocócica B
SEC-	Enterotoxina estafilocócica C
SED-	Enterotoxina estafilocócica D
TCR-	Receptores de células T
TSST-1-	Toxina da Síndrome do choque tóxico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Definição e epidemiologia da rinossinusite crônica	25
1.2. Fisiopatogenia da RSC	25
1.3. Papel das bactérias na fisiopatogenia da RSC.....	27
1.4. Modelos experimentais de RSC	29
 2. OBJETIVO	 31
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 33
3.1. Considerações éticas	34
3.2. Protocolo experimental.....	34
3.3. Aspectos éticos na experimentação animal.....	46
3.4. Análise dos dados e teste estatístico	47
 4. RESULTADOS.....	 49
4.1. Coelhos.....	50
4.1.1. Coelhos excluídos	50
4.1.2. Coelhos analisados	50
4.2. Comparação da mucosa do seio maxilar direito entre os diferentes grupos	52
4.2.1. Espessura.....	52
4.2.2. Porcentagem de epitélio	54
4.2.3. Características epiteliais	55
4.2.4. Infiltrado celular	57
4.2.4.1. Infiltrado celular total	57
4.2.4.2. Infiltrado celular eosinofílico	59
4.2.4.3. Infiltrado celular neutrofílico.....	61
4.2.4.4. Infiltrado celular linfocítico	63
4.2.4.5. Outros infiltrados celulares	65
4.2.5. Características subepiteliais	65
4.3. Comparação da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo.....	70
4.3.1. Espessura.....	70
4.3.2. Porcentagem de epitélio	71
4.3.3. Características epiteliais	72
4.3.4. Infiltrado celular	74
4.3.5. Características subepiteliais	78
 5. DISCUSSÃO	 85
 6. CONCLUSÃO	 92
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 94
 8. ANEXO.....	 100

1- Introdução

1.1 Definição e epidemiologia da rinossinusite crônica

A rinossinusite crônica (RSC) é uma doença que afeta cerca de 2-15% da população, com altas taxas de morbidade e elevados custos em saúde pública (1-3). Levantamentos financeiros realizados nos Estados Unidos estimam que cerca de 21 bilhões de dólares são gastos no tratamento de pacientes com RSC anualmente. Além disso, a RSC traz grande impacto negativo na qualidade de vida e produtividade dos indivíduos afetados, inclusive com pior impacto do que outras doenças crônicas de alta prevalência, tais como insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite, asma, doença inflamatória intestinal e câncer (4-6). Os atuais consensos e diretrizes definem a RSC como uma inflamação crônica da cavidade nasossinusal, caracterizada pela presença persistente de sintomas, como obstrução nasal, secreção nasal, dor facial em peso e alteração do olfato por mais de 12 semanas, confirmada por alterações endoscópicas nasais ou tomográficas (7,8).

1.2 Fisiopatogenia da RSC

O tratamento da RSC continua sendo um desafio nos dias atuais, pois grande quantidade de pacientes persiste com a doença mesmo com o tratamento clínico e cirúrgico maximizados (7). Um dos motivos do insucesso terapêutico deve-se a não compreensão exata dos mecanismos fisiopatogênicos (7,8). Ao longo dos anos, observou-se que vários fatores contribuem para o desencadeamento e perpetuação do quadro de RSC, entre eles alterações anatômicas, infecções bacterianas, fúngicas e virais, processos alérgicos, biofilmes e fatores genéticos (7-9). Ademais, várias teorias foram desenvolvidas para explicar a etiologia e fisiopatogenia da RSC. Historicamente, a RSC sem polipose nasal (RSCsPN) era vista no passado como perpetuação de um quadro de rinossinusite aguda (RSA), enquanto que a RSC com polipose nasal (RSCcPN) era a evolução de um quadro de atopia grave (7). Paralelamente, outras hipóteses para esclarecer a fisiopatogenia da RSC foram aventadas, como a hipótese da teoria da etiologia fúngica, do superantígeno

estafilocócico, da biossíntese dos eicosanoides e os distúrbios da barreira epitelial (7).

Atualmente, a hipótese mais provável da fisiopatogenia das RSC é que não há um único fator desencadeante da doença, mas sim uma interação complexa de múltiplos fatores individuais e ambientais (7,9). A ação de fatores exógenos, associada ao grau e tipo de resposta inflamatória do hospedeiro, é determinante na instalação e perpetuação da doença. Há cerca de 30 anos vários estudos vêm tentando avaliar os tipos de resposta inflamatória encontrados nos subtipos de rinossinusite para melhor entender a fisiopatogenia da doença, inclusive com identificação e classificação de diferentes marcadores moleculares que estariam envolvidas nesse processo (10). Estudos iniciais defendiam a visão dicotômica de que os pacientes com RSCsPN apresentam infiltração neutrofílica e aumento da resposta inflamatória do tipo Th1, enquanto que aqueles com RSCcPN apresentam intensa infiltração eosinofílica e aumento de resposta inflamatória do tipo Th2 (7,10-13). Com a demonstração de que pacientes orientais com RSCcPN apresentavam infiltração menos eosinofílica e aumento da resposta inflamatória do tipo Th1/Th17, concluiu-se que esta doença é bastante heterogênea a depender da localidade geográfica (7,10-13). Evidências mais atuais apontam para uma teoria inflamatória menos polarizada, em que os mecanismos e marcadores inflamatórios de cada subgrupo podem ser variáveis de acordo com as características clínicas e geográficas de cada subgrupo de pacientes com RSC (7,14).

Por ser uma doença multifatorial, a correlação entre gravidade dos sintomas e gravidade dos sinais da doença (tomográficos ou endoscópicos) pode ser muito variável (15). Acredita-se que a classificação da doença em subtipos pode facilitar a previsão de prognóstico e, portanto, melhor predizer a reposta clínica ou cirúrgica desses pacientes (15-19). A coexistência de asma, intolerância à aspirina, atopia e determinadas alterações histopatológicas são preditores de pior prognóstico. Dentre as alterações histopatológicas estão a formação de pólipos (espessamento da mucosa com edema, fibrose subepiteliais ou aumento de tecido glandular), as alterações epiteliais (hiperplasia de células caliciformes, metaplasia escamosa e espessamento de membrana basal) e a infiltração celular (especialmente eosinófilos, mas também neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos) (15-20).

1.3 Papel das bactérias na fisiopatogenia da RSC

Dentre as numerosas hipóteses para justificar a gênese e perpetuação do processo inflamatório crônico nasossinusal, as bactérias têm sido consideradas possíveis desencadeadores da resposta inflamatória na RSC (7-9,14,21-23). Embora alguns estudos tenham mostrado que não existe diferença entre a microbiota nasal de pacientes com RSC comparados a controles, outros demonstram que pacientes com esta doença podem ser mais colonizados por microrganismos como *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e bactérias anaeróbicas (7,24). No entanto, a variabilidade de dados referentes à porcentagem de culturas positivas e grau de colonização em pacientes com RSC é extremamente variável entre os autores, mesmo porque dependem muito do método utilizado para coleta e cultivo da secreção (7). A porcentagem de pacientes com RSC e cultura nasal positiva para bactérias anaeróbicas, por exemplo, varia de 0 a 100% na literatura (7). Alguns autores defendem a hipótese de que a colonização bacteriana da mucosa das vias aéreas, além de modular o crescimento de outros patógenos, poderia alterar a resposta imune do hospedeiro (7,25). A formação de biofilmes bacterianos, apesar de ainda não ter evidências clínicas que comprovem sua atuação na RSC, apresenta atributos teoricamente favoráveis à perpetuação da inflamação que ocorre nesta doença, já que se caracteriza por um método de resistência bacteriana à resposta imune do hospedeiro e da ação dos antibióticos (7,8,24).

Parte da ação pró-inflamatória das bactérias encontradas na mucosa nasossinual ocorre por meio de suas toxinas constitucionais, não secretadas (endotoxinas), além de toxinas secretadas (exotoxinas). Entre as endotoxinas mais amplamente estudadas, o ácido lipoteicoico (LTA) – presente na parede celular de bactérias gram-positivas, assim como o lipopolissacáride (LPS) – presente em parede celular de bactérias gram-negativas, são importantes estimuladores de resposta inflamatória (26,27). Alguns estudos mostram que tanto o LPS quanto o LTA alteram o transporte mucociliar do epitélio respiratório, e são capazes de causar metaplasia escamosa, aumentar a quantidade de células caliciformes e a produção de muco, assim como causar danos diretos ao epitélio ciliado por efeitos tóxicos

(26,27). Tanto o LPS como o LTA aparentemente causam esses efeitos a partir da indução de uma cascata de sinalização intracelular por meio de receptores Toll-like, que acarreta na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e subsequente transcrição de diferentes proteínas inflamatórias e mucinas (26,28-30). Como uma função mucociliar adequada é necessária para manter a mucosa nasossinusal limpa e protegida, alterações nesta função poderiam justificar a indução de doenças inflamatórias crônicas como a RSC (26).

Dentre as exotoxinas bacterianas, os superantígenos de *S. aureus* têm se destacados como importantes agentes imunomoduladores e pró-inflamatórios em doenças crônicas das vias aéreas (31,32). Vários estudos têm demonstrado aumento de IgE específica para enterotoxina estafilocócica no sangue de pacientes com doenças alérgicas (dermatite atópica, rinite alérgica e RSCcPN), e também em pólipos de pacientes com RSCcPN (31). Devido à sua capacidade de ligação polivalente aos receptores de células T (TCR) e à molécula de histocompatibilidade do tipo II (MHC II), as enterotoxinas de *S. aureus* são capazes de ativar de maneira maciça a população linfocitária local, o que resulta na produção exacerbada de citocinas e mediadores locais que recrutam células inflamatórias e perpetuam a inflamação na mucosa nasal (9,24,31,32).

O *S. aureus* é capaz de produzir vários tipos de superantígenos, dentre eles a enterotoxina estafilocócica A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) e a toxina da Síndrome do choque tóxico (TSST-1) (32,33). A SEB, por exemplo, pode atuar no epitélio, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas que atraem células T, monócitos e granulócitos (32). Da mesma forma, alguns autores relatam o poder facilitador da SEB no processo de sensibilização a alérgenos em modelos experimentais animais (31). Inclusive, a exposição a esse superantígeno pode induzir a formação de pólipos nasais eosinofílicos (34,35). Existem também estudos que evidenciam seu poder de reduzir a resposta ao tratamento com corticoesteroides em pacientes com RSCcPN (36). Portanto, há diversas evidências na literatura de que a SEB apresenta ações sobre a resposta imunomodulatória e pró-inflamatória na mucosa nasossinusal que se aproxima ao que se conhece sobre RSC em humanos, especialmente no quadro de RSCcPN eosinofílico (formação de

pólipos, eosinofilia, aumento de células caliciformes e aumento da fibrose subepitelial) (33,35).

1.4 Modelos experimentais de RSC

Dentre as doenças de maior prevalência, a RSC talvez seja a doença que menos se conheça os mecanismos fisiopatogênicos. Grande parte do conhecimento sobre sua fisiopatogenia tem sido obtida a partir de estudos em humanos, em que questões éticas muitas vezes limitam a experimentação que poderia desvendar mecanismos da doença (37). Uma das alternativas seria obter um modelo experimental de RSC que pudesse mimetizar e representar essa doença em outros animais, a fim de possibilitar avanços mais rápidos no entendimento da doença, assim como o desenvolvimento de novas armas terapêuticas. Uma das vantagens de modelos animais é o melhor controle sobre fatores que em humanos são extremamente variáveis, como a questão genética e a exposição aos agentes ambientais (20,38).

Modelos experimentais de RSC têm sido descritos em ovelhas, camundongos e coelhos (39). A utilização de ovelhas como modelo animal tem como vantagem a favorável resposta imune e anatomia semelhante à dos humanos. Entretanto, possui elevado custo de aquisição e cuidados com o animal durante a experimentação. Apesar de serem pouco comuns, os estudos com este animal são muito vantajosos, especialmente quando se deseja avaliar procedimentos cirúrgicos. Mais recentemente, as ovelhas têm sido bastante utilizadas em pesquisas envolvendo biofilmes bacterianos em RSC (39-41).

Camundongos, por sua vez, apresentam baixo custo, grande facilidade de manipulação e fácil controle genético, de acordo com a necessidade da pesquisa (camundongos transgênicos) (38). Ainda, dentre os diferentes animais, são os que possuem o maior painel de anticorpos para estudos envolvendo técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência. No entanto, apresentam a desvantagem de não possuírem uma anatomia nasossinusal ou resposta imune semelhantes à de humanos e a dificuldade técnica para experimentação dos seios paranasais, com risco, inclusive, de aspiração e pneumonia (20,37-39,42). Ainda, a composição

histológica do epitélio nasal é diferente dos humanos, pois mais da metade do epitélio nasal do camundongo corresponde à mucosa olfatória (20).

Coelhos têm sido muito utilizados como modelos experimentais em rinossinusites por serem animais de fácil manipulação, terem seios paranasais bem pneumatizados, anatomia e atividade imunológica muito próximas às dos humanos (20,39,42). No entanto, são animais muito sensíveis a infecções, principalmente do trato respiratório e intestinal. *Pasteurella multocida* é uma bactéria gram-negativa que faz parte da microbiota respiratória de coelhos, porém pode causar doenças respiratórias muito debilitantes. A pasteurelose nasal, por exemplo, é caracterizada por rinite mucopurulenta em que ocorre redução de células ciliadas, aumento de células caliciformes, edema e fibrose subepitelial e infiltração celular epitelial e subepitelial (43-45).

Dentre os inúmeros modelos experimentais de RSC já descritos, nenhum deles consegue reproduzir de modo fiel o que ocorre em humanos, cuja principal hipótese é a de que seja multifatorial (37). A maioria desses modelos experimentais se aproxima mais de um quadro de infecção aguda do que de um processo inflamatório crônico, pois envolvem a inoculação de microrganismos ou a obstrução do óstio de drenagem (20,42,46-52). Contudo, é sabido que os processos inflamatórios crônicos da cavidade nasossinusal provavelmente não estão relacionados a episódios agudos de infecção ou obstrução de óstios de drenagem, e nem sempre estão associados com a presença de um microorganismo cultivável (24,37).

Assim, um importante passo para o progresso nos estudos em RSC é a criação de um modelo animal experimental que se aproxime dos reais mecanismos patogênicos que acontecem em humanos. Dificilmente existirá um modelo animal ideal de RSC que consiga abranger todos os aspectos multifatoriais da doença. Entretanto, se forem desenvolvidos modelos experimentais que visem explorar aspectos específicos e mais conhecidos da doença, esta meta pode ser atingida com mais facilidade. Dessa forma, buscando atingir características mais semelhantes às de humanos, acredita-se que o modelo experimental animal de RSC ideal não deva envolver obstrução de óstio de drenagem ou inoculação de patógeno específico. Além disso, o modelo animal ideal deve apresentar anatomia e resposta imune semelhantes às do ser humano, com viabilidade de execução.

2. Objetivo

Neste estudo avaliou-se a viabilidade de um modelo experimental de RSC em coelhos, utilizando-se a exposição crônica de toxinas bacterianas em animais, previamente sensibilizados à ovalbumina (OVA).

3. Materiais e Métodos

3.1 Considerações éticas

Este estudo seguiu os princípios éticos em experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), sob número de protocolo 076/2013.

3.2 Protocolo experimental

Foram utilizados coelhos machos Nova Zelândia brancos, com massa corporal entre 2,0 a 3,5 Kg. Durante a experimentação, os animais foram mantidos no biotério da Cirurgia Experimental ou da Bioengenharia da FMRP-USP, sem ruídos e com iluminação e temperatura apropriadas (45).

Os animais foram alojados em caixas com fio galvanizado de ferro (diâmetro do fio de 3 mm), com 50 cm de largura, 60 cm de comprimento e 50 cm de altura, com base fenestrada para recolhimento dos seus excrementos. Foram fornecidas ração e água potável *ad libitum*. A limpeza das caixas foi feita diariamente. Todos os animais foram recebidos no biotério da Cirurgia Experimental ou da Bioengenharia e ficaram alojados por três dias antes do início do experimento para que pudessem se habituar ao ambiente. Os coelhos foram divididos em cinco grupos:

- 1) Grupo controle sem cirurgia (naive);
- 2) Grupo controle sensibilizado à OVA (controle OVA - com resposta alérgica);
- 3) Grupo teste exposto à SEB;
- 4) Grupo teste exposto ao LPS;
- 5) Grupo teste exposto ao LTA.

Os coelhos do grupo controle sem cirurgia (n=4) foram mantidos no biotério por oito semanas e em seguida foram eutanasiados. Os demais foram sensibilizados com injeção subcutânea de 1 mL de solução salina contendo 2,5% de OVA (Sigma-Aldrich) e 0,4% de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich) nos dias 0 e 7. No 14º dia

de experimento, foram submetidos a procedimento cirúrgico para exposição do seio maxilar direito e implantação de cateter de polipropileno para irrigação.

Para realização do procedimento, os coelhos foram anestesiados com 5 mg/kg de xilazina (Horlândia-SP, Rhobifarma) (20 mg/mL de relaxante muscular) e 30 mg/kg de cloridrato de dextroetamina (Horlândia-SP, Rhobifarma) (50 mg/mL de anestésico geral) intramuscular (IM) na região do quadríceps e região posterior da coxa, utilizando-se agulhas 25x8 mm (45). Um acesso venoso na orelha foi mantido para administração de tiopental sódico (Thiopentax®, Itapira-SP, Cristália), a fim de se manter a sedação (25mg/ml - 1 a 2 mL a cada 15 a 20 minutos) (45). Trata-se de um barbitúrico de curta duração que causa sonolência, sedação e hipnose. Após, receberam dose dobrada (0,6 mL) de antibioticoterapia IM (Pentabiótico® veterinário pequeno porte, São Paulo-SP, Eurofarma) (cada ampola de 3 mL contendo benzilpenicilina benzatina 600000 UI, benzilpeniciloina procaína 300000 UI, benzilpenicilina potássica 300000 UI, diidroestreptomicina base 250 mg e estreptomicina base 250 mg) e foram mantidos em ventilação espontânea, sem necessidade de intubação traqueal.

Após anestesia, foi realizada assepsia com PVPI (Polivinil Pirrolidona Iodo) tópico, infiltração do dorso com 1 mL de lidocaína 2% + adrenalina 1:200.000, com incisão do dorso nasal, verticalmente, de aproximadamente 3 cm (Figura 1A). Um retalho de periósteo foi confeccionado mantendo fixado no lado direito do dorso nasal (Figura 1B), sendo realizada, a seguir, uma abertura na face anterior do seio maxilar direito de aproximadamente 3x3 mm (Figura 1C). A mucosa do seio maxilar foi aberta com lâmina de bisturi, e por meio desta abertura foi realizada lavagem do seio para coleta de material para cultura (Figura 1D). Em seguida, um cateter de polipropileno (10,5 cm comprimento e 2,3 mm de diâmetro) foi posicionado a 0,2 mm no interior do seio maxilar direito. O cateter para irrigação sinusal foi transfixado subcutaneamente por um trocater no dorso nasal com saída entre as orelhas (Figura 1E). Este cateter foi fixado com cola instantânea (Super Bonder®) no osso, ancorado e recoberto em alça de periósteo (Figura 1F) e suturado na pele com nylon 4-0 (Figura 1G). A patência do cateter foi verificada pela instilação de 5 mL de soro fisiológico e verificação de saída de líquido pela narina direita. As incisões criadas

foram fechadas por planos, utilizando-se vycril 3-0 para fechamento do plano periosteal e nylon 4-0 para fechamento do plano cutâneo (Figura 1H) (53).

Figura 1 - Cirurgia para exposição do seio maxilar direito e implantação de cateter para irrigação: **(A)** incisão vertical em dorso nasal, **(B)** confecção de retalho de periosteio, **(C)** abertura brocada na face anterior do seio maxilar direito, **(D)** lavagem de seio maxilar direito para coleta de material para cultura, **(E)** trocater em dorso nasal para transfixação de cateter com abertura entre as orelhas, **(F)** cateter posicionado na abertura do seio maxilar, ancorado em alça de periosteio, **(G)** sutura de periosteio sobre cateter, **(H)** sutura de pele com abertura do cateter localizado entre as orelhas

Após conclusão do procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em suas gaiolas para a recuperação anestésica, em local silencioso e com pouca luz e pesados semanalmente para monitorização de ganho de peso. No quinto dia após a cirurgia, os coelhos receberam a segunda dose de antibioticoterapia IM (0,6 mL).

Durante as duas semanas de pós-operatório, o seio maxilar direito foi irrigado com 0,5 mL de OVA 2,5% (diluída em solução fisiológica), três vezes por semana. Em seguida, os coelhos foram selecionados em cada grupo por meio de sorteio. Como existia restrição de gaiolas nos biotérios, cada experimento foi realizado em média com seis coelhos, sendo um coelho pelo menos do grupo controle OVA. A seguir, os animais foram abordados de acordo com a alocação em cada grupo (Figura 2):

- Grupo B (controle OVA): administração intrassinusal de 0,5 mL de solução de tampão fosfato salino (PBS) 3x/semana, por quatro semanas seguidas;
- Grupo C (SEB) (Sigma-Aldrich): administração intrassinusal de 0,5 mL de solução de PBS contendo 1 µg/mL de SEB, 3x/semana, por quatro semanas seguidas (32);
- Grupo D (LPS) (Sigma-Aldrich): administração intrassinusal de 0,5 mL de solução de PBS contendo 100 ng/mL de LPS de *E. coli*, 3x/semana, por quatro semanas seguidas (26, 27);
- Grupo E (LTA): administração intrassinusal de 0,5 mL de solução de PBS contendo 100 ng/mL de LTA (Sigma-Aldrich) purificado de *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), 3x/semana, por quatro semanas seguidas (26).

Figura 2 - Representação esquemática do protocolo experimental

Vinte e quatro horas após a última administração intrassinusal, os coelhos foram sacrificados por injeção endovenosa de tiopental (5 mL de solução 25 mg/mL) (45,54). Após confirmação de óbito do animal, a região nasal anterior foi dissecada, sendo coletado lavado de seio maxilar direito pelo óstio aberto em dorso nasal para cultura. Após ampla exposição da parede anterior do seio maxilar, a parede medial do seio maxilar foi removida e processada para análise histopatológica (Figura 3). Os mesmos passos foram realizados no seio maxilar esquerdo para extração de tecido nasossinusal não irrigado como parâmetro de controle.

Figura 3 - (A) Dissecção da região nasal anterior com exposição do cateter de irrigação sinusal, **(B)** Parede anterior do seio maxilar brocado, **(C)** Exposição da parede medial do seio maxilar direito, **(D)** Remoção da parede medial do seio maxilar direito para avaliação histopatológica

Para análise histopatológica, as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, por 24h, a 4°C. Em seguida, o material foi desidratado em uma série crescente de etanol (50% a 100%), diafanizado em xilol e embebido em parafina a 60°C para posterior inclusão em blocos. Foram realizados cortes de 6 µm de espessura em micrótomo Leica Jung RM2065 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e preparados sobre lâminas de vidro silanizado StarFrost (Knittel Glass). As lâminas passaram por desparafinação em xilol, reidratação em série decrescente de etanol, lavagem em água destilada e coloração por Hematoxilina e eosina (HE) e Giemsa.

Para HE, os cortes foram corados em solução de Hematoxilina por 1,5 minutos, lavados em água corrente, corados em Eosina por dois minutos, imersos em etanol acetificado por dois minutos. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol até 100%, diafanizadas em xilol e montadas com *Tissue Mount* (Tissue Tek® Glas™ Mounting Media, Sakura, Finetek USA). Para Giemsa, as lâminas foram fixadas em álcool metílico por três minutos, coradas com solução Giemsa por 20 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas para secar em estufa a 60°C,

imersas em banho rápido de xilol e montadas com *Permout* (Fisher Chemical™ *Permout*™ Mounting Medium, Fischer Scientifics, New Jersey, USA)

As imagens das lâminas foram adquiridas em aumento de 40x, utilizando-se um sistema VS120 da Olympus em um microscópio BX61 do Laboratório Multiusuário de escaneamento de lâminas (LMEL), pertencente ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patógenos da FMRP-USP (17). Foram realizadas as seguintes avaliações:

- 1- Espessura epitelial- Realizada uma medida da espessura epitelial a cada 400 μm , quantas medidas fossem possíveis, e depois calculada a média (Figura 4) (55).
- 2- Espessura subepitelial- Realizada uma medida da espessura subepitelial a cada 400 μm , quantas medidas fossem possíveis, e depois calculada a média (55).
- 3- Infiltrado celular epitelial por eosinófilo, neutrófilo, linfócito, plasmócito e mastócitos. Tais células foram diferenciadas segundo as características citológicas (Tabela 1 e Figura 5) (56). Em cada terço da amostra foi selecionada uma área epitelial de 200 μm de extensão onde foi computado o número de cada tipo de célula. Quando houve dúvida, a lâmina também foi analisada com coloração Giemsa. A média foi expressa em número total de células por 200 μm de epitélio.
- 4- Infiltrado celular subepitelial por eosinófilo, neutrófilo, linfócito, plasmócito e mastócitos- Tais células foram diferenciadas de acordo com as características citológicas (Tabela 1 e Figura 5) (56). Em cada terço da amostra foi selecionada uma área subepitelial de 10000 μm^2 (100 μm x 100 μm), logo abaixo do epitélio (17), onde foi computado o número de cada tipo de célula infiltrada. Quando houve dúvida, a lâmina também foi analisada com coloração Giemsa. A média foi expressa em número total de células por 10000 μm^2 (55).
- 5- Infiltrado celular epitelial total- Em cada terço da amostra foi selecionada uma área epitelial de 200 μm de extensão, onde foi quantificado o número de células infiltradas (eosinófilo, neutrófilo, linfócito, plasmócito

ou mastócitos). Da mesma forma, em casos de dúvida, cortes histológicos sequenciais foram corados com Giemsa para fins comparativos. A média foi expressa em número total de células por 200 μm de epitélio.

6- Infiltrado celular subepitelial total- Em cada terço da amostra foi selecionada uma área subepitelial de 10000 μm^2 (100 μm x 100 μm), logo abaixo do epitélio (17), onde foi computado o número de células infiltradas (eosinófilo, neutrófilo, linfócito, plasmócito ou mastócitos). A média foi expressa em número total de células por 10000 μm^2 (55).

7- Porcentagem de desepitelização- A cada 400 μm foi calculada a porcentagem de desepitelização, quantas medidas forem possíveis, e depois calculada a média (55).

Figura 4 - Representação esquemática das medidas realizadas nas avaliações histológicas em lâminas coradas com hematoxilina-eosina

Tabela 1 - Características das células identificadas em áreas epiteliais e subepiteliais (56)

Célula	Características
Neutrófilo	Núcleos formados por dois a cinco lóbulos (3 lóbulos normalmente) e citoplasma claro com grânulos pequenos.
Eosinófilo	Mesmo tamanho dos neutrófilos com núcleo bilobulado e granulações grosseiras que se coram intensamente com eosina. Grânulos maiores que os dos neutrófilos.
Mastócito	Célula globosa, grande, com citoplasma repleto de grânulos, núcleo pequeno, esférico e central.
Linfócito	Células pequenas, com citoplasma muito escasso e núcleo escuro e esférico.
Plasmócito	Células grandes e ovoides de citoplasma basófilo e com complexo de Golgi e centríolos próximos do núcleo que se apresentam como área mais clara nas colorações mais comuns. Núcleo esférico, excêntrico e com grumos de cromatina.

Figura 5 - Exemplos de células avaliadas nos compartimentos epitelial e subepitelial: **(A)** eosinófilo, **(B)** neutrófilo, **(C)** linfócito, **(D)** plasmócito, **(E)** mastócito, **(F)** exemplo de área com visualização de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos

- 8- Porcentagem de células caliciformes- Em cada terço da amostra foi selecionada uma área com 200 μm de extensão de epitélio, calculada a porcentagem de células caliciformes e depois calculada a média (Figura 6) (16);
- 9- Epitélio ciliado- Em toda a extensão da amostra foi avaliada a presença de cílios e categorizada em '0' se normal, '1' se ausência de cílios leve/focal (menos de 50%), '2' se moderada/difusa (mais de 50%) e '3' se acentuada/extensa (100%) (Figura 7) (57).

Figura 6 - Porcentagem de células caliciformes: **(A)** exemplo com 0% de células caliciformes, **(B)** exemplo com 5% de células caliciformes, **(C)** exemplo com 10% de células caliciformes, **(D)** exemplo com 25% de células caliciformes

Figura 7 - Classificação de epitélio ciliado: **(A)** categoria 0 com presença normal de cílios, **(B)** categoria '1' com perda leve/focal de cílios, **(C)** categoria '2' com perda moderada/difusa de cílios, **(D)** categoria '3' com perda acentuada/extensa de cílios

10- O grau de edema, fibrose e de tecido glandular subepitelial (Figuras 8, 9 e 10) e de metaplasia escamosa do epitélio foi categorizado em '0' se normal, '1' se leve/focal, '2' se moderada/difusa e '3' se acentuada/extensa (16).

Figura 8 - Classificação de edema subepitelial: **(A)** categoria '0' sem edema, **(B)** categoria '1' com edema leve/focal, **(C)** categoria '2' com edema moderado/difuso, **(D)** categoria '3' com edema acentuado/extenso

Figura 9 - Classificação de fibrose subepitelial: **(A)** categoria '0' sem fibrose, **(B)** categoria '1' com fibrose leve/focal, **(C)** categoria '2' com fibrose moderada/difusa, **(D)** categoria '3' com fibrose acentuada/extensa

Figura 10 - Classificação de tecido glandular subepitelial: **(A)** categoria '0' sem aumento de tecido glandular, **(B)** categoria '1' com aumento de tecido glandular leve/focal, **(C)** categoria '2' com aumento de tecido glandular moderado/difuso, **(D)** categoria '3' com aumento de tecido glandular acentuado/extenso

11- Contagem de pólipos- Ao longo de todas as amostra de mucosa foi verificada a existência de pólipos definidos como elevação do epitélio e subepitélio em direção ao seio, mantendo regular a linha de base do periósteo.

As avaliações foram realizadas por dois observadores de forma cega (16,34,35,58). Quando houve discordância maior de cinco células ou maior que uma categoria em cada avaliação, foi realizada reunião entre os dois observadores para se definirem as medidas em comum acordo.

3.3 Aspectos éticos na experimentação animal

A eutanásia foi realizada por ocasião do término do experimento ou quando níveis de estresse, dor ou sofrimento excederam o previsto. Animais com infecção de sítio cirúrgico ou com sinais de dor e sofrimento, como perda de mais de 10% do

peso corporal foram excluídos do experimento e eutanasiados. Para a eutanásia, foi utilizada a injeção endovenosa de tiopental (5 mL de solução 25 mg/mL). Os indicativos de morte foram ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos (54). Após a eutanásia, os animais foram acondicionados em sacos plásticos identificados com símbolo de risco biológico e levados ao freezer onde permaneceram até a coleta do lixo. Coelhos com cultura positiva para *Pasteruella sp.*, coletada durante a eutanásia, foram excluídos da análise devido à possibilidade de estarem com quadro de pasteurelose, que por si só justificaria uma possível reação inflamatória.

3.4 Análise dos dados e teste estatístico

Todas as alterações histopatológicas avaliadas na mucosa do seio maxilar direito foram comparadas entre os grupos de estudo. Da mesma forma, todas as alterações histopatológicas avaliadas foram comparadas entre mucosa do seio maxilar direito (teste) e esquerdo (controle) dentro de cada grupo. O padrão histológico encontrado nos coelhos não submetidos à cirurgia (Grupo A) foi tomado como parâmetro de base para fins comparativos.

Para comparação da mucosa do seio maxilar direito entre os grupos de estudo, foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Mann-Whitney para as variáveis contínuas, tomando com nível de significância $p\text{-valor} < 0,05$. Para as variáveis categóricas (Fibrose, Edema, Tecido Glandular e Cílios), foi aplicado o teste exato de Fisher, tomando com nível de significância $p\text{-valor} < 0,05$. Para análise das variáveis categóricas, os lados com alteração histopatológica 0 (normal) e 1 (alteração leve/focal) foram agrupados, assim como aqueles com grau 2 (alteração moderada/difusa) e 3 (alteração acentuada/extensa).

Para comparação da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo, foi utilizado o *Wilcoxon signed rank test* (teste pareado não paramétrico) para as variáveis contínuas, fixando como nível de significância $p\text{-valor} < 0,05$. Para avaliação de similaridade entre os lados direito (teste) e esquerdo (controle) das variáveis categóricas (Fibrose, Edema, Tecido Glandular e Cílios), aplicou-se o teste de concordância de Kappa. Foram considerados diferentes quando o coeficiente

kappa foi menor ou igual a 0,4 (concordância razoável, fraca ou insignificante) e o intervalo de confiança não englobando o valor 1. Para análise das variáveis categóricas, o grau de alteração histopatológica '0' (normal) e '1' (alteração leve/focal) foi agrupado em uma única categoria, assim como os graus '2' (alteração moderada/difusa) e '3' (alteração acentuada/extensa) foram reunidos em uma nova categoria.

4. Resultados

4.1 Coelhos

Foram operados 62 coelhos, sendo que 25 foram excluídos. Houve, portanto, um aproveitamento de 60% dos animais.

4.1.1 Coelhos excluídos

Dentre os 25 excluídos, alguns vieram a óbito antes da cirurgia (n=2), outros vieram a óbito durante o intraoperatório (n=1), ou foram eutanasiados antes do término do experimento por infecção no sítio operatório (n=6 por abscesso no dorso) ou por outras complicações (n=1 por hematúria e perda de peso; n=1 por paraplegia, n=1 saída do cateter). Os outros 13 coelhos foram excluídos, pois apresentaram abscesso em dorso nasal na ferida operatória, observado apenas durante a eutanásia no fim do experimento (n=2), implantação errônea no seio etmoidal (n=1), perda de peso >10% ao fim do experimento (n=1), perda do material coletado (n=1) e infecção por *Pasteurella multocida*, confirmada por cultura do lavado de seio maxilar, colhido durante a eutanásia (n=8). Sumariamente, nove animais foram excluídos por problemas técnicos (16%, perda da amostra, cateter removido antes da eutanásia, ou posicionado de forma errada e morte no intraoperatório) ou morte/sofrimento (20%, dois morreram antes da cirurgia, dois foram eutanasiados por perda de peso e um por paraplegia) e 16 por motivos infecciosos (64%, abscesso em dorso nasal ou infecção por *P. multocida*). Em relação aos oito coelhos com cultura positiva para *P. multocida*, três pertenciam ao grupo controle OVA, quatro ao grupo SEB e um coelho ao grupo LPS.

4.1.2 Coelhos analisados

Foram avaliados 37 coelhos distribuídos da seguinte forma: quatro no grupo controle sem cirurgia (como não houve cirurgia em nenhum dos seios maxilares, tanto lado direito como esquerdo foram agrupados para a análise estatística, portanto, com n=8 lados), nove no grupo controle com sensibilização à OVA (controle OVA), seis foram expostos ao SEB, 12 ao LPS e seis ao LTA.

O peso inicial médio foi de 2755 g e final de 2940 g, o que corresponde ao ganho de 7% de peso ao longo do experimento. Essas medidas foram semelhantes quando avaliadas em cada grupo separadamente (grupo controle sem cirurgia com média de peso inicial de 2957 g, peso final de 3066 g e ganho de peso de 4%; grupo controle OVA, com média de peso inicial de 2869 g, peso final de 3037 g e ganho de peso de 7%; grupo SEB, com média de peso inicial de 2609 g, peso final de 3104 g e ganho de peso de 20%; grupo LPS, com média de peso inicial de 2732 g, peso final de 2889 g e ganho de peso de 6%; grupo LTA, com média de peso inicial de 2647 g, peso final de 2669 g e ganho de peso de 1%). Em relação à comparação de variação de peso, o grupo controle OVA apresentou ganho de peso estatisticamente maior que o grupo LTA (Figura 11).

Figura 11 - Valores de média e erro padrão da média da variação de peso. Avaliação estatística pelo teste de Mann-Whitney comparando variação de peso dos coelhos nos diferentes grupos

4.2 Comparação da mucosa do seio maxilar direito entre os diferentes grupos

4.2.1 Espessura

Em relação à avaliação da espessura epitelial, foi observada espessura significativamente maior nos grupos SEB, LPS e LTA em relação ao grupo sem cirurgia. A média da espessura epitelial também foi menor no grupo controle OVA, quando comparado com o grupo LPS. Quanto à avaliação subepitelial, foi observada espessura significativamente maior nos grupos LPS e LTA em relação aos grupos controle sem cirurgia e controle OVA (Figura 12).

Figura 12 - Espessura epitelial e subepitelial. **(A)** Valores de média e erro padrão da média da espessura epitelial (teste de Mann-Whitney); **(B)** Valores de média e erro padrão da média da espessura subepitelial (teste de Mann-Whitney); **(C)** Exemplos de mucosa do seio maxilar que representam a média da espessura de epitélio e subepitélio para cada grupo

4.2.2 Porcentagem de epitélio

Observou-se porcentagem de epitélio significativamente menor no grupo LTA, quando comparado com os grupos SEB e LPS (Figura 13). A média de porcentagem de epitélio variou entre 40 e 30% nos grupos controle sem cirurgia, controle OVA, SEB e LPS e no grupo LTA foi de apenas 8%, mostrando alto grau de desepitelização em todos os grupos, mas especialmente no grupo LTA. É importante notar que este alto índice de desepitelização pode ter prejudicado as avaliações do epitélio neste estudo, em especial no grupo LTA.

Figura 13 - Porcentagem de epitélio, representado pelos valores de média e erro padrão da média da porcentagem de epitélio entre os diferentes grupos (teste de Mann-Whitney)

4.2.3 Características epiteliais

Em relação à porcentagem de células caliciformes entre os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles (teste de Kruskal-Wallis p-valor=0,115) (Figura 14).

Figura 14 - Porcentagem de células caliciformes. Valores de média e erro padrão da média da porcentagem de células caliciformes (teste de Mann-Whitney)

Quanto à comparação da perda de cílio entre os grupos, não se observou diferença significativa entre eles (Teste exato de Fisher, p-valor=0,11) (Figura 15 e Tabela 2).

Figura 15 - Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de perda de cílios. Categoria 0 se normal, 1 se perda leve/focal de cílios, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/extensa

Tabela 2 - Distribuição das categorias de perda de cílios entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher, p-valor=0,11

Grupos	Categorias		Total
	0 e 1	2 e 3	
Controle sem cirurgia	7 (100%)	0 (0%)	7
Controle OVA	4 (57.14%)	3 (42.86%)	7
SEB	2 (33.33%)	4 (66.67%)	6
LPS	5 (50%)	5 (50%)	10
LTA	1 (25%)	3 (75%)	4
Total	19	15	34

Em relação à metaplasia escamosa, não verificou nenhuma alteração em todas as amostras avaliadas.

4.2.4 Infiltrado celular

4.2.4.1 Infiltrado celular total

Em relação ao epitélio, observou-se maior infiltração de células inflamatórias nos grupos SEB e LPS, especialmente em relação ao grupo controle sem cirurgia (Figura 16). Quanto ao subepitélio, foi observada infiltração significativamente menor nos grupos controle sem cirurgia e controle OVA, quando comparados com os grupos SEB, LPS e LTA.

Figura 16 - Valores médios do infiltrado celular epitelial **(A)** e subepitelial **(B)**. (Média $\pm$ Erro padrão da média, Teste de Mann-Whitney). **(C)** Imagens representativas de mucosa do seio maxilar que representam a média de infiltrado epitelial para cada grupo; **(D)** Exemplos de mucosa do seio maxilar que representam a média de infiltrado celular subepitelial para cada grupo. Em vermelho estão marcados os eosinófilos, em amarelo neutrófilos, em azul linfócitos e em verde plasmócitos

4.2.4.2 Infiltrado celular eosinofílico

Em relação ao epitélio, notou-se infiltração significativamente maior nos grupos SEB e LPS, quando comparados os grupos controle sem cirurgia e menor no grupo OVA, quando comparado com o grupo SEB. Em relação ao subepitélio, observou-se infiltração significativamente maior nos grupos controle OVA, SEB, LPS e LTA, quando comparados com o grupo controle sem cirurgia. Da mesma maneira, evidenciou-se maior infiltrado eosinofílico nos grupos SEB e LTA, quando comparados ao grupo controle OVA (Figura 17).

Figura 17 - Representação gráfica do infiltrado eosinofílico epitelial **(A)** e subepitelial **(B)**. (Média $\pm$ erro padrão da média, teste de Mann-Whitney). Histologia representativa da média de infiltrado eosinofílico epitelial **(C)** e subepitelial **(D)**, para cada grupo

4.2.4.3 Infiltrado celular neutrofílico

Os resultados referentes à comparação da infiltração epitelial e subepitelial neutrofílica entre os grupos estão expressos na Figura 18. Em relação ao epitélio, observou-se infiltração significativamente menor no grupo controle sem cirurgia, quando comparados com o grupo SEB. Em relação ao subepitélio, foi observada infiltração significativamente menor no grupo controle sem cirurgia, quando comparado com o grupo SEB e infiltração menor no grupo controle OVA, quando comparado com os grupos SEB, LPS e LTA.

Figura 18 - Infiltrado neutrofílico epitelial **(A)** e subepitelial **(B)**, representado por valores de média $\pm$ erro padrão da média (Mann-Whitney). Imagens histológicas representativas do infiltrado neutrofílico no epitélio **(C)** e região subepitelial **(D)**, de cada grupo

4.2.4.4 Infiltrado celular linfocítico

Em relação ao epitélio, não houve diferenças estatísticas entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, $p\text{-valor}=0,1415$). Quanto ao subepitélio, foi observada infiltração significativamente maior no grupo SEB, quando comparado com o grupo controle OVA (Figura 19).

Figura 19 - Valores de média $\pm$ erro padrão da média do infiltrado linfocítico epitelial **(A)** e subepitelial **(B)** (Mann-Whitney). Imagens histológicas representativas de mucosa do seio maxilar que representam a média de infiltrado linfocítico epitelial **(C)** e subepitelial **(D)**, para cada grupo

4.2.4.5 Outros infiltrados celulares

No que se refere à infiltração epitelial de plasmócitos, não foi observada diferença estatística entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis p -valor=0,539). Em relação ao subepitélio, foi observada infiltração significativamente maior no grupo SEB, quando comparado com o grupo sem cirurgia (teste de Mann-Whitney p -valor=0,039). Quanto à infiltração de mastócitos, não foi possível realizar avaliação estatística, pois foram encontrados apenas quatro mastócitos em todas as áreas observadas, sendo um mastócito no grupo OVA (seio maxilar do lado esquerdo), dois mastócitos no grupo LPS (um no seio maxilar do lado direito e outro do lado esquerdo) e um mastócito no grupo LTA (seio maxilar do lado esquerdo).

4.2.5 Características subepiteliais

Observou-se que os grupos tratados foram diferentes quanto ao edema subepitelial (Teste exato de Fisher, p -valor=0,02) (Figura 20 e Tabela 3). Todos os grupos (controle sem cirurgia, controle OVA, SEB e LPS) apresentaram edema subepitelial com categorias 2 ou 3 em aproximadamente 0% das amostras, com exceção do grupo LTA que em 33,3% das amostras apresentou estas categorias.

Figura 20 - Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de edema subepitelial. Categoria 0 se normal, 1 se edema leve/focal, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/extenso

Tabela 3 - Distribuição das categorias de edema subepitelial entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher: p-valor=0,02

Grupos	Categorias		Total
	0 e 1	2 e 3	
Controle sem cirurgia	8 (100%)	0 (0%)	8
Controle OVA	9 (100%)	0 (0%)	9
SEB	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6
LPS	12 (100%)	0 (0%)	12
LTA	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6
Total	38	3	41

Em relação à fibrose subepitelial, observou-se diferença significativa entre os lados tratados dos diferentes grupos (Teste exato de Fisher, p-valor<0.01) (Figura 21 e Tabela 4). Os grupos controle sem cirurgia, controle OVA e SEB apresentaram

fibrose subepitelial com categorias 2 ou 3 em aproximadamente 0% das amostras, enquanto o grupo LPS apresentou estas duas categorias em 50% das amostras e o grupo LTA em 83,3%.

Figura 21 - Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de fibrose subepitelial. Categoria 0 se normal, 1 se fibrose leve/focal, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/extensa

Tabela 4 - Distribuição das categorias de fibrose subepitelial entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher: p-valor<0,01

Grupos	Categorias		Total
	0 e 1	2 e 3	
Controle sem cirurgia	8 (100%)	0 (0%)	8
Controle OVA	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9
SEB	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6
LPS	6 (50%)	6 (50%)	12
LTA	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6
Total	32	13	41

A análise da quantidade de tecido glandular subepitelial não foi diferente entre os diferentes grupos (Teste exato de Fisher, p-valor=0,11; Figura 22 e Tabela 5).

Figura 22 - Valores de porcentagem de coelhos, cujas amostras foram classificadas em cada categoria de tecido glandular subepitelial. Categoria 0 se normal, 1 se aumento de tecido glandular leve/focal, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/extenso

Tabela 5 - Distribuição das categorias de tecido glandular entre os diferentes grupos, representados em número absoluto e porcentagem. Teste exato de Fisher: p-valor=0,11

Grupos	Categorias		Total
	0 e 1	2 e 3	
Controle sem cirurgia	8 (100%)	0 (0%)	8
Controle OVA	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9
SEB	6 (100%)	0 (0%)	6
LPS	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12
LTA	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6
Total	33	8	41

Em relação à formação de pólipos, foram identificadas sete lâminas com esta alteração, sendo seis contendo mucosa do seio maxilar direito (dois do grupo LTA e quatro do grupo LPS) e uma mucosa do seio maxilar esquerdo (grupo LTA) (Figura 23). Em todas as lâminas foi observado apenas um pólipo, com exceção de uma mucosa do grupo LPS em que foram identificados dois pólipos. Os três pólipos encontrados no grupo LTA eram de aspecto fibroso e com pouco edema (Figura 23); dentre os pólipos encontrados no grupo LPS, três eram de aspecto fibroso e com pouco edema (Figura 23) e dois com aumento de tecido glandular.

Figura 23 - Exemplos histológicos de pólipos presentes no seio maxilar obtidos nos grupos LPS (A) e LTA (B)

4.3 Comparação da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo

4.3.1 Espessura

Resultados referentes à comparação da espessura epitelial e subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo estão apresentados na Figura 24. Em relação ao epitélio, houve diferença estatística entre os seios no grupo controle OVA, de forma que o lado direito (teste) se mostrou mais espesso que o esquerdo (controle). Quanto ao subepitélio, houve diferença estatística entre os seios no grupo exposto ao LTA, de forma que o lado direito (teste) se apresentou mais espesso que o esquerdo (controle).

Figura 24 - Comparação da espessura epitelial **(A)** e subepitelial **(B)** da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)

4.3.2 Porcentagem de epitélio

Resultados referentes à comparação da porcentagem de epitélio da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo estão expressos na Figura 25. Não houve diferença estatística em nenhum dos grupos, quando comparada a porcentagem de epitélio na mucosa do seio maxilar direito com a do seio maxilar esquerdo.

Figura 25 - Comparação da porcentagem de epitélio da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)

4.3.3 Características epiteliais

Não se observou diferença estatística em nenhum dos grupos, quando comparada a porcentagem de células caliciformes na mucosa do seio maxilar direito com a do seio maxilar esquerdo (Figura 26).

Figura 26 - Comparação da porcentagem de células caliciformes da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)

Na análise pelo coeficiente de concordância de kappa, apenas o grupo SEB apresentou discordância entre os lados direito e esquerdo (kappa 0,4 e IC -0,14 +0,94), de modo que o lado direito (teste) apresentou maior perda de cílios em relação ao lado esquerdo (controle) (Figura 27).

Figura 27 - Comparação da perda de cílios da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se perda leve/focal de cílios, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/extensa

4.3.4 Infiltrado celular

Resultados referentes à comparação do infiltrado celular total no epitélio e subepitélio da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo estão expressos na Figura 28. Em relação ao epitélio, não houve diferença estatística entre os seios nos diferentes grupos. Quanto ao subepitélio, houve diferença estatística entre os seios no grupo exposto à SEB, de forma que o lado direito (teste) se mostrou mais infiltrado que o esquerdo (controle).

Figura 28 - Comparação do infiltrado celular epitelial **(A)** e subepitelial **(B)** da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)

Em relação ao infiltrado eosinofílico do epitélio, verificou-se diferença estatística entre os seios apenas no grupo LPS, de forma que o lado direito (teste) apresentou mais infiltrado eosinofílico que o esquerdo (controle) (Figura 40). Já no subepitélio, observou-se diferença estatística apenas entre os seios nos grupos controle OVA e LPS, de forma que o lado direito (teste) mostrou mais infiltrado que o esquerdo (controle) (Figura 29).

Figura 29 - Comparação do infiltrado eosinofílico epitelial (A) e subepitelial (B) da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo (Wilcoxon signed rank test)

Em relação ao infiltrado neutrofílico, não se observou diferença estatística entre os seios direito e esquerdo, tanto no compartimento epitelial quanto subepitelial (Figura 30). Da mesma forma, não se notou diferença estatística quanto ao infiltrado linfocítico entre os dois seios (Figura 31).

Figura 30 - Comparação do infiltrado neutrofílico epitelial **(A)** e subepitelial **(B)** da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. (Wilcoxon signed rank test)

Figura 31 - Comparação do infiltrado linfocítico epitelial **(A)** e subepitelial **(B)** da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. (Wilcoxon signed rank test)

No que se refere à infiltração epitelial e subepitelial de plasmócitos, não foi observada diferença estatística entre a mucosa do seio maxilar direito e esquerdo nos diferentes grupos. Quanto à infiltração de mastócitos, não foi possível realizar avaliação estatística, pois foram encontrados apenas quatro mastócitos em todas as áreas observadas, como descrito anteriormente.

4.3.5 Características subepiteliais

Resultados referentes à comparação da fibrose subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo estão demonstrados na Figura 32. Na análise pelo coeficiente de concordância de kappa, apenas os grupos LPS e LTA apresentaram diferença significativa entre os lados (kappa 0,16 e IC -0,31 +0,64/ kappa 0,33 e IC -0,22 +0,89, respectivamente), de modo que o lado esquerdo apresentou menor fibrose subepitelial em relação ao lado direito.

Figura 32 - Comparação da fibrose subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se leve/focal, 2 se moderada/difusa e 3 se acentuada/extensa

Em relação ao edema e tecido glandular subepitelial, não houve diferença significativa entre os lados direito e esquerdo (Figuras 33 e 34) nos diferentes grupos.

Figura 33 - Comparação do edema subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se leve/focal de cílios, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/extenso

Figura 34 - Comparação do tecido glandular subepitelial da mucosa do seio maxilar direito e esquerdo dentro de cada grupo. Categoria 0 se normal, 1 se leve/focal de cílios, 2 se moderado/difuso e 3 se acentuado/extenso

O resumo dos resultados obtidos está demonstrado nas Tabelas 6, 7 e 8. Após comparação histopatológica dos cinco grupos estudados, constatou-se que:

- 1- A sensibilização à OVA (grupo controle OVA), comparada ao grupo controle sem cirurgia, causou infiltração eosinofílica subepitelial.
- 2- A exposição nasossinusal à SEB, comparada ao grupo controle sem cirurgia, causou espessamento epitelial, infiltração celular, eosinofílica e neutrofílica, epitelial e subepitelial e infiltração plasmocítica subepitelial.
- 3- A exposição nasossinusal ao LPS, comparada ao grupo controle sem cirurgia, causou espessamento epitelial e subepitelial, infiltração celular, eosinofílica epitelial e subepitelial e aumento da fibrose subepitelial.
- 4- A exposição nasossinusal ao LTA, comparada ao grupo controle sem cirurgia, causou espessamento epitelial e subepitelial, infiltração celular e eosinofílica subepitelial e aumento da fibrose e edema subepitelial.

- 5- A alta taxa de desepitelização em todos os grupos, inclusive no grupo controle sem cirurgia, e em especial no grupo LTA, prejudicou a análise das variáveis epiteliais.

Tabela 6 - Médias e erro padrão da média para variáveis contínuas e porcentagem de categorias 2 ou 3 para as variáveis categóricas (edema, fibrose e tecido glandular subepitelial e perda de epitélio ciliado)

	Controle sem cirurgia	Controle OVA	SEB	LPS	LTA
1- Peso (gramas)	2958 ± 154	2869 ± 195	2609 ± 199	2732 ± 108	2647 ± 91
2- Variação de Peso	104,0 ± 2,3	107,1 ± 3,2	120,1 ± 5,3	106,8 ± 3,1	101,0 ± 4,0
Subepitélio					
3- Espessura subepitelial	116,6 ± 19,4	121,2 ± 5,4	180,8 ± 43,9	257,4 ± 40,9	311,9 ± 42,7
4- Edema subepitelial	0%	0%	16.67%	0%	33.33%
5- Fibrose subepitelial	0%	11.11%	16.67%	50%	83.33%
6- Tecido glandular subepitelial	0%	11.11%	0%	41.67%	33.33%
7- Infiltrado celular total de células	7,04 ± 2,6	8,72 ± 1,9	27,94 ± 7,4	22,69 ± 5,3	31,03 ± 5,4
8- Infiltrado subepitelial eosinofílico	0,61 ± 0,3	3,438 ± 1,8	14,50 ± 4,6	11,67 ± 4,7	22,25 ± 4,2
9- Infiltrado subepitelial neutrofílico	0,261 ± 0,13	0,187 ± 0,07	1,444 ± 0,49	0,816 ± 0,24	0,972 ± 0,35
10- Infiltrado subepitelial linfocítico	5,69 ± 1,9	4,06 ± 0,5	8,50 ± 1,6	6,70 ± 1,0	4,41 ± 0,3
11- Infiltrado subepitelial plasmocítico	0,476 ± 0,3	1,04 ± 0,4	3,50 ± 1,1	1,80 ± 0,6	3,38 ± 1,7
12- Infiltrado subepitelial mastocítico	0	0	0	2	1
(número total)					
Epitélio					
13- Porcentagem de epitélio	31,66 ± 9,3	31,29 ± 9,5	40,16 ± 10,7	33,14 ± 9,0	7,66 ± 2,6
14- Espessura epitelial	22,19 ± 1,0	26,35 ± 1,4	36,14 ± 5,9	35,80 ± 2,6	30,3 ± 2,4
15- % de células caliciformes	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,126 ± 0,09	0,005 ± 0,0	1,54 ± 1,4
16- Perda de epitélio ciliado	0%	42.86%	66.67%	50%	75%
17- Infiltrado epitelial total de células	1,67 ± 0,8	3,72 ± 1,9	18,68 ± 5,5	13,73 ± 4,5	6,62 ± 2,1
18- Infiltrado epitelial eosinofílico	1,20 ± 0,8	2,51 ± 1,3	14,83 ± 4,1	11,19 ± 4,0	5,56 ± 1,9
19- Infiltrado epitelial neutrofílico	0,12 ± 0,07	0,37 ± 0,20	2,25 ± 1,16	0,39 ± 0,17	0,56 ± 0,21
20- Infiltrado epitelial linfocítico	0,23 ± 0,16	0,83 ± 0,41	1,600 ± 0,82	0,17 ± 0,12	0,50 ± 0,0
21- Infiltrado epitelial plasmocítico	0,111 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,400 ± 0,2	0,0 ± 0,0
22- Infiltrado epitelial mastocítico	0	0	0	0	0
(número total)					
23- Pólipos (número total)	0	0	0	5	2

Tabela 7 - Diferenças na comparação dos grupos controle OVA, SEB, LPS e LTA em relação ao grupo controle sem cirurgia

	Controle OVA	SEB	LPS	LTA
1- Variação de Peso				
Subepitélio				
2- Espessura subepitelial			xx	xx
3- Edema subepitelial				*
4- Fibrose subepitelial			*	*
5- Tecido glandular subepitelial				
6- Infiltrado subepitelial total de células		x	x	xx
7- Infiltrado subepitelial eosinofílico	x	xx	x	xx
8- Infiltrado subepitelial neutrofílico		x		
9- Infiltrado subepitelial linfocítico				
10- Infiltrado subepitelial plasmocítico		x		
11- Infiltrado subepitelial mastocítico				
Epitélio				
1- Porcentagem de desepitelização				
2- Espessura epitelial		x	xx	x
3- Porcentagem de células caliciformes				
4- Perda de epitélio ciliado				
5- Infiltrado epitelial total de células		x	x	
6- Infiltrado epitelial eosinofílico		x	x	
7- Infiltrado epitelial neutrofílico		x		
8- Infiltrado epitelial linfocítico				
9- Infiltrado epitelial plasmocítico				
10- Infiltrado epitelial mastocítico				
11- Pólipos				

x - $p < 0,05$ / xx- $p < 0,01$ / xxx- $p < 0,001$ pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney. *maior frequência (teste exato de Fisher)

Tabela 8 - Diferenças na comparação dos grupos SEB, LPS e LTA em relação ao grupo controle OVA (resposta alérgica isolada)

	SEB	LPS	LTA
Subepitélio			
1- Espessura subepitelial		xx	xxx
2- Edema subepitelial			*
3- Fibrose subepitelial		*	*
4- Tecido glandular subepitelial			
5- Infiltrado subepitelial total de células	x	x	xx
6- Infiltrado subepitelial eosinofílico	x		xx
7- Infiltrado subepitelial neutrofílico	xx	x	x
8- Infiltrado subepitelial linfocítico	x		
Epitélio			
1- Porcentagem de desepitelização			
2- Espessura epitelial		x	
3- Porcentagem de células caliciformes			
4- Perda de epitélio ciliado			
5- Infiltrado epitelial total de células	x		
6- Infiltrado epitelial eosinofílico	x		
7- Infiltrado epitelial neutrofílico			
8- Infiltrado epitelial linfocítico			

x - $p < 0,05$ / xx $p < 0,01$ / xxx $p < 0,001$ pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.

A compilação dos resultados encontrados na comparação do lado direito (teste) com o lado esquerdo (controle) está resumida na Tabela 9. Foram encontradas as seguintes diferenças:

- No grupo controle OVA, o lado direito apresentou maior infiltrado subepitelial eosinofílico e maior espessamento epitelial que o lado esquerdo.

- No grupo SEB, o lado direito apresentou maior infiltrado subepitelial total e maior perda de epitélio ciliado que o esquerdo.
- No grupo LPS, o lado direito apresentou maior infiltrado epitelial e subepitelial eosinofílico e maior fibrose subepitelial que o esquerdo.
- No grupo LTA, o lado direito apresentou maior espessamento subepitelial e maior fibrose subepitelial que o esquerdo.

Tabela 9 - Diferenças na comparação da mucosa maxilar do lado direito com o esquerdo de cada grupo

	Controle OVA	SEB	LPS	LTA
Subepitélio				
1- Espessura subepitelial				x
2- Edema subepitelial				
3- Fibrose subepitelial			*	*
4- Tecido glandular subepitelial				
5- Infiltrado subepitelial total de células		x		
6- Infiltrado subepitelial eosinofílico	xx		x	
7- Infiltrado subepitelial neutrofílico				
8- Infiltrado subepitelial linfocítico				
Epitélio				
1- Porcentagem de desepitelização				
2- Espessura epitelial	xxx			
3- Porcentagem de células caliciformes				
4- Perda de epitélio ciliado		*		
5- Infiltrado epitelial total de células				
6- Infiltrado epitelial eosinofílico			x	
7- Infiltrado epitelial neutrofílico				
8- Infiltrado epitelial linfocítico				

x - $p < 0,05$ / xx- $p < 0,01$ / xxx- $p < 0,001$ pelo Wilcoxon signed rank test. *Correspondência fraca ou razoável (coeficiente kappa $\leq 0,4$) com intervalo de confiança não englobando o 1.

5. Discussão

Embora a RSC seja uma doença altamente prevalente na comunidade geral, ela ainda continua sendo pouco conhecida. Grande parte do conhecimento sobre sua fisiopatogenia foi obtida a partir de estudos em humanos, nos quais limitações éticas impedem certas investigações experimentais (37). Com o intuito de se testarem novos tratamentos e se elucidarem os mecanismos fisiopatogênicos da RSC, controlando fatores de confusão, variabilidade genética e fatores ambientais, tem se buscado a obtenção de modelos animais de RSC para experimentação e extrapolação dos resultados em humanos.

O modelo animal experimental ideal deve se aproximar ao máximo dos mecanismos patogênicos que ocorrem em humanos. Provavelmente, este modelo ideal de RSC dificilmente será atingido, em virtude do aspecto multifatorial da doença. Porém, buscando atingir este propósito, acredita-se que o modelo experimental animal de RSC ideal, envolva a utilização de animais com perfil anatômico e imune semelhante ao do humano e que não deva envolver obstrução de óstio de drenagem ou inoculação de patógeno específico, visto que estes não são fatores imprescindíveis para o desenvolvimento da RSC. As endo e exotoxinas bacterianas provavelmente exercem papel importante na fisiopatologia da RSC. A presença dessas toxinas pode ter efeitos deletérios sobre a mucosa respiratória, mesmo na ausência de bactérias viáveis (28,43,59).

Dentre os subtipos de RSC, os relacionados com resposta eosinofílica tecidual frequentemente são mais sintomáticos e mais refratários a tratamento clínico e, portanto, merecem atenção especial. As alterações histopatológicas observadas na mucosa de pacientes com esta doença, apesar de variáveis dependendo do subtipo avaliado, seguem um padrão de espessamento epitelial, submucosa, infiltração celular e alterações epiteliais.

Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo experimental utilizando coelhos com resposta alérgica (previamente sensibilizados à OVA) por meio da exposição nasossinusal a toxinas bacterianas (SEB, LPS e LTA) e avaliar as alterações histopatológicas encontradas.

Os resultados encontrados no grupo controle OVA estão condizentes com os dados da literatura. Kim et al. (34), Saito et al. (60) e Kim et al. (61) realizaram estudo em camundongos, e Sejima et al. (62) em coelhos, utilizando-se esquema de sensibilização à OVA com pelo menos duas injeções intraperitoneais/subcutânea de

OVA + Hidróxido de Alumínio, seguidas de exposição nasal à OVA por pelo menos mais seis semanas, assim como foi realizado neste estudo. Kim et al. (34) e Saito et al. (60) relataram aumento de infiltração eosinofílica subepitelial, inclusive com números bem próximos aos achados deste estudo (este estudo 342/mm², Kim et al. (34), considerando que utilizaram campo de maior aumento com 0,5 mm de diâmetro, com aproximadamente 350/mm², e Saito et al. (60) 396/mm²). Porém, esses estudos foram realizados em camundongos, enquanto que o presente estudo utilizou coelhos.

Da mesma forma, os resultados encontrados no grupo SEB são compatíveis com os dados da literatura. Kim et al. (34) e Khalmuratova et al. (35) realizaram estudo em camundongos e utilizaram esquema de sensibilização à OVA seguido de exposição nasal à SEB, semelhante ao esquema do presente estudo. Kim et al. (34) utilizaram a dose de 5 e 500 ng e Khalmuratova et al. (35) 10 ng, enquanto que neste estudo aplicou-se a dose de 500 ng. Nos estudos de Kim et al. (34) e Khalmuratova et al. (35), a exposição à SEB foi mais prolongada (103 dias), encontrando aumento de infiltração celular (34) e infiltração eosinofílica (34,35), assim como neste estudo, em que foi observada infiltração eosinofílica numericamente superior à que eles encontraram. Entretanto, não se sabe o diâmetro do campo de maior aumento utilizado por eles, para fins comparativos. Além disso, ambos foram realizados em camundongos, enquanto este estudo avaliou coelhos. Diferente deste estudo, Kim et al. (34) e Khalmuratova et al. (35) também encontraram aumento de células caliciformes e espessamento subepitelial. É importante salientar que Kim et al. (34) reportaram maiores alterações histopatológicas no grupo exposto à menor dose de SEB (5 ng) em relação ao grupo exposto à maior dose (500 ng). Quanto à infiltração neutrofílica, Huvenne et al. (31) realizaram aplicações nasais de SEB em camundongos em dias alternados por 14 dias e encontraram aumento de neutrófilos em lavado bronco alveolar, mas não na mucosa nasal. Não foram encontrados resultados semelhantes aos achados de espessamento epitelial e aumento da infiltração plasmocítica causada pela exposição à SEB deste estudo

Em relação aos resultados encontrados no grupo exposto à LPS, existem achados semelhantes descritos na literatura, porém obtidos por meio de técnicas diferentes da utilizada no presente estudo. Nenhum estudo foi realizado com

estimulação de resposta alérgica prévia e exposição nasal à toxina por tempo prolongado (4 semanas) (26-28,30,31,59,63,64). Nell et al. (26) relataram várias alterações epiteliais após exposição ao LPS de cultura de células obtidas do esfenoide, porém não observaram espessamento epitelial, como verificado neste estudo. Wang et al. (28) e Kim et al. (59), assim como no presente estudo, descreveram espessamento subepitelial em exposição nasal ao LPS em ratos e em camundongos, respectivamente, sendo que Wang et al. (28) encontraram, inclusive, pólipos caracterizados por aumento de fibrose e edema. Semelhante a este estudo, Wang et al. (28), Bae et al. (30) e Gallego et al. (64) detectaram aumento de infiltração celular após exposição ao LPS, sendo que Wang et al. (28) e Bae et al. (30) realizaram experimento em camundongos e Gallego et al. (64) em mucosa septal de fetos de coelhos. Wang et al. (28) utilizaram dose de 5 e 10 µg (100 e 200 vezes maior do que a deste estudo) de LPS nasal em camundongos 3x/semana por três meses, encontrando acentuado dano celular, pólipos neutrofílicos, aumento de células caliciformes e aumento de citocinas de perfil inflamatório Th17, compatível com um modelo experimental animal de RSCcPN neutrofílico. Bae et al. (30) realizaram experimento de rinite em camundongos por meio de sensibilização intraperitoneal (IP) com OVA acrescida de LPS na dose de 1 e 10 µg (20 a 200 vezes maior do que a utilizada no presente estudo), e depois OVA nasal por uma semana. Observaram, principalmente, aumento de neutrófilos (500/mm²), mas também de eosinófilos (350/mm²). Comparativamente, encontrou-se neste estudo infiltração menor de neutrófilos (80/mm²) e maior de eosinófilos (1160/mm²), considerando que eles utilizaram um campo de maior aumento de 0,5 mm de diâmetro. Possíveis explicações para esta divergência são: o fato de os autores terem usado maior dose de LPS IP, do experimento do presente estudo ter sido mais prolongado (duas semanas de exposição à OVA) e de também ter realizado exposição nasal ao LPS (quatro semanas) e não apenas sistêmica (intraperitoneal/subcutânea).

Estudos sobre o efeito da exposição nasal ao LTA são muito raros na literatura (26,29,65,66). Nell et al. (26) destacaram várias alterações epiteliais após exposição ao LTA de cultura de células de esfenoide utilizando a mesma dose usada na presente pesquisa (100 ng/mL), porém não notaram espessamento epitelial como observado neste estudo. Finney et al. (29) encontraram aumento de

várias citocinas inflamatórias após exposição IP de camundongos ao LTA ou em cultura de células, mas não avaliaram alterações histopatológicas. Da mesma forma, Patou et al. (65) analisaram o efeito de LTA em fragmento de pólipó nasal e em mucosa de corneto inferior sem doença, porém avaliaram apenas a produção de citocinas e não as alterações histopatológicas. Yokoyama et al. (66) avaliaram o efeito do LTA intranasal em camundongos com intuito de verificar se produziria imunização a esta toxina, potencialmente apresentando um papel na prevenção de tonsilites espretozóccicas. Obtiveram resultados positivos, porém não realizaram nenhuma avaliação histopatológica. Portanto, este é o primeiro estudo que avaliou as alterações histopatológicas provocadas pela exposição nasal ao LTA em animais com resposta alérgica (sensibilizados à OVA).

Em relação à infiltração celular epitelial causada pelas toxinas, não foram encontrados estudos na literatura que descrevessem achado semelhante. Muitos referem alterações epiteliais como desepitelização, perda de cílios, alteração de células caliciformes e de produção de muco, mas nenhum descreve infiltração celular epitelial separada da subepitelial. (26-28,34,35,61,63) Como encontrou-se aumento importante da infiltração celular epitelial após exposição das toxinas, este estudo alerta para um novo ramo de alterações que deve ser investigado, inclusive em humanos.

Outro aspecto que se buscou neste estudo foi a obtenção de maior número de controles possíveis, a fim de garantir que possíveis alterações encontradas no seio tratado (lado direito) fossem realmente causadas pela exposição às toxinas bacterianas. Nesse sentido, utilizou-se o seio maxilar contralateral (esquerdo) como controle interno do animal, que não foi exposto à toxina ou à manipulação cirúrgica, embora sofresse todas as consequências sistêmicas da sensibilização prévia com OVA ou mesmo a influência de fatores ambientais. Curiosamente, ao contrário das expectativas, a maioria das variáveis histológicas analisadas foram semelhantes nos lados direito e esquerdo. Essa semelhança entre os dois lados pode ter sido devido ao refluxo nasal contralateral do lavado sinusal, ou por alguma reação sistêmica que acarretou em inflamação semelhante do outro lado. As diferenças encontradas entre os lados no grupo controle OVA, SEB, LPS e LTA poderiam ter sido pelo efeito da resposta alérgica/inflamatória local, como esperado.

Este estudo apresentou algumas limitações, como a alta taxa de perda de animais com redução da amostra, alta taxa de desepitelização e a não utilização de métodos mais específicos para avaliação do tipo celular infiltrado. Em relação às perdas de animais, além das decorrentes de erros de técnica, que são intrínsecos a um experimento que envolve cirurgia, a maioria ocorreu por infecção da ferida operatória e infecções sistêmicas, descritas em estudos que utilizaram a mesma técnica cirúrgica, porém em proporções menores. Jia et al. (51), por exemplo, observaram cinco abscessos em dorso nasal no pós-operatório de 20 animais e Jia et al. (67) perderam apenas dois de 24 coelhos por infecção sistêmica (pneumonia). Não se verificou associação clínica a outros fatores (dados não mostrados), como peso ou presença de pus nasal/nasossinusal, que pudesse prever este desfecho, mas se fossem fornecidos de coelhos livres de *Pasteurella multocida* (três culturas de secreção nasal negativas para a bactéria e sem anticorpo sérico específico), como ocorre em alguns países, provavelmente as perdas seriam menores (44). Coelhos com esta infecção não foram avaliados e, portanto, não foram excluídos nos estudos anteriormente citados (51,53,67). No entanto, considerando o possível efeito deletério desta bactéria sobre a mucosa nasal de coelhos (redução de células ciliadas, aumento de células caliciformes edema e fibrose subepitelial e infiltração celular subepitelial), achamos prudente excluí-los para não trazer vieses para o estudo (42-45).

Em relação à alta taxa de desepitelização, uma possibilidade seria extrair todo o segmento facial anterior do coelho e fazer análise histopatológica depois da descalcificação da peça (34,35,62). Neste estudo, esta técnica não foi cogitada, pois também se extraiu mucosa do restante dos seios maxilares para posterior avaliação de citocinas e expressão gênica de citocinas.

Referente à contagem de células em lâminas coradas por HE, apesar de não ter encontrado grandes dificuldades para identificação das mesmas (discordância entre avaliadores foi igual a 5,7% = 68/1184 itens avaliados), uma forma de aumentar a especificidade seria fazer colorações e avaliação imuno-histoquímica específica para cada célula e contar a densidade dessas marcações (20,33,34,59,61).

Como perspectivas para o estudo pode-se propor pesquisa semelhante, porém com tempo de exposição às toxinas mais prolongado, doses de toxinas

diferentes e avaliação da ação de mediadores inflamatórios na mucosa nasossinusal.

Alguns autores provocaram exposição a toxinas por oito e não por quatro semanas, como neste estudo (20,34,35). Talvez a exposição mais prolongada a tais toxinas poderia acentuar as diferenças encontradas, ou mesmo tornar significativas algumas alterações que foram discretas. Entretanto, a experimentação mais prolongada também poderia tornar o animal mais susceptível a influências externas, inclusive com aumento de risco da perda desses animais por quadros infecciosos.

Em relação às doses e concentrações das toxinas, foram utilizadas doses de OVA e SEB condizentes com estudos prévios. Quanto ao LPS, doses muito maiores têm sido reportadas na literatura (28,30,59). Estudos com LTA são escassos, mas acreditando que por atuar de forma semelhante ao LPS, doses maiores também são uma possibilidade. Optou-se por utilizar doses que ficassem na faixa de nanogramas a microgramas para todas as drogas, o que provavelmente deve ser o mais condizente com o ambiente real, seja em um quadro de colonização ou mesmo infecção bacteriana.

E, finalmente, pensando em expandir a análise das alterações causadas por estas toxinas, novos estudos poderiam quantificar a presença e expressão gênica de mediadores inflamatórios na mucosa nasossinusal a fim de se aprofundar o conhecimento dos mecanismos de ação na resposta imune e inflamatória dessas toxinas.

Com isso, é possível concluir que o presente estudo demonstrou novas informações sobre os efeitos histológicos que as toxinas bacterianas exercem sobre a mucosa nasossinusal (principalmente em relação ao efeito de infiltração celular epitelial e também quanto aos efeitos do LTA, que foram pouco estudados neste cenário), e também sugerir que este modelo de experimentação possa servir como base para elucidação de processos inflamatórios crônicos do trato aéreo superior relacionados com toxinas bacterianas.

6. Conclusão

Após análise dos resultados, concluiu-se que a exposição crônica da mucosa nasossinusal às toxinas SEB, LPS e LTA em coelhos previamente sensibilizados promove alterações histológicas significativas (espessamento da mucosa e infiltração de células inflamatórias), muitas vezes semelhantes às encontradas em pacientes com RSC. Dessa forma, os achados do presente estudo sugerem que este modelo experimental poderá servir como base para outros estudos relacionados à elucidação da fisiopatogenia e terapêutica das formas de RSC influenciadas por toxinas bacterianas.

7. Referências Bibliográficas

- 1 Pilan RR, et al. Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. *Rhinology*. 2012;50(2):129-38.
- 2 Bhattacharyya N, Gilani S. Prevalence of Potential Adult Chronic Rhinosinusitis Symptoms in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;194599818774006.
- 3 Halawi AM, Smith SS, Chandra RK. Chronic rhinosinusitis: epidemiology and cost. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*. 2013;34(4):328-34.
- 4 Durr DG, Desrosiers MY, Dassa C. Impact of rhinosinusitis in health care delivery: the Quebec experience. *J Otolaryngol*. 2001;30(2):93-7.
- 5 Murphy MP, et al. Health care utilization and cost among adults with chronic rhinosinusitis enrolled in a health maintenance organization. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2002;127(5):367-76.
- 6 Lund VJ. Impact of chronic rhinosinusitis on quality of life and health care expenditure. *Clinical allergy and immunology*. 2007;20:15-24.
- 7 Fokkens WJ, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol Suppl*. 2012;23:3 p preceding table of contents, 1-298.
- 8 Orlandi RR, et al. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6 Suppl 1:S22-209.
- 9 Daines SM, Orlandi RR. Chronic rhinosinusitis. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2012;20(1):1-10.
- 10 Kuehnemund M, et al. Untreated chronic rhinosinusitis: a comparison of symptoms and mediator profiles. *The Laryngoscope*. 2004;114(3):561-5.
- 11 Van Zele T, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy*. 2006;61(11):1280-9.
- 12 Bachert C, et al. Rhinosinusitis and asthma: a link for asthma severity. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10(3):194-201.
- 13 Zhang N, et al. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(5):961-8.
- 14 Wang X, et al. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5):1344-53.

- 15 Kountakis SE, et al. Molecular and cellular staging for the severity of chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*. 2004;114(11):1895-905.
- 16 Soler ZM, et al. Relationship between clinical measures and histopathologic findings in chronic rhinosinusitis. *Otolaryng Head Neck*. 2009;141(4):454-61.
- 17 Bassiouni A, et al. Subepithelial inflammatory load and basement membrane thickening in refractory chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: a histopathological study. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(3):248-55.
- 18 Baudoin T, et al. Histopathologic parameters as predictors of response to endoscopic sinus surgery in nonallergic patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(5):761-6.
- 19 Soy FK, et al. Histopathologic parameters in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: impact on quality of life outcomes. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(10):828-33.
- 20 Lindsay R, et al. Development of a murine model of chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(5):724-30; discussion 31-2.
- 21 Park SJ, et al. Chronic rhinosinusitis with polyps and without polyps is associated with increased expression of suppressors of cytokine signaling 1 and 3. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):772-80.
- 22 van Drunen CM, et al. Inflammation in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29(4):621-9.
- 23 Lee JT, Frank DN, Ramakrishnan V. Microbiome of the paranasal sinuses: Update and literature review. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(1):3-16.
- 24 Meltzer EO, et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6 Suppl):155-212.
- 25 Herbst T, Set al. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(2):198-205.
- 26 Nell MJ, Grote JJ. Effects of bacterial toxins on air-exposed cultured human respiratory sinus epithelium. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 2003;112(5):461-8.
- 27 Smirnova MG, et al. LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol*. 2003;221(1):42-9.
- 28 Wang S, et al. Establishment of a mouse model of lipopolysaccharide-induced neutrophilic nasal polyps. *Exp Ther Med*. 2017;14(6):5275-82.

-
- 29 Finney SJ, et al. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. *Intensive Care Med.* 2012;38(2):324-32.
 - 30 Bae JS, et al. The Role of IL-17 in a Lipopolysaccharide-Induced Rhinitis Model. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2017;9(2):169-76.
 - 31 Huvenne W, et al. Staphylococcus aureus enterotoxin B facilitates allergic sensitization in experimental asthma. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(7):1079-90.
 - 32 Huvenne W, et al. Staphylococcus aureus enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airway epithelial cell activation. *Allergy.* 2010;65(8):1013-20.
 - 33 Cheng KJ, Wang SQ, Xu YY. Different roles of Staphylococcus aureus enterotoxin in different subtypes of nasal polyps. *Experimental and therapeutic medicine.* 2017;13(1):321-6.
 - 34 Kim DW, et al. Staphylococcus aureus enterotoxin B contributes to induction of nasal polypoid lesions in an allergic rhinosinusitis murine model. *Am J Rhinol Allergy.* 2011;25(6):e255-61.
 - 35 Khalmuratova R, et al. Induction of nasal polyps using house dust mite and Staphylococcal enterotoxin B in C57BL/6 mice. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2016;44(1):66-75.
 - 36 Wang M, et al. Superantigen-induced glucocorticoid insensitivity in the recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;145(5):717-22.
 - 37 Al-Sayed AA, Agu RU, Massoud E. Models for the study of nasal and sinus physiology in health and disease: A review of the literature. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2017;2(6):398-409.
 - 38 Cho SH, et al. Spontaneous eosinophilic nasal inflammation in a genetically-mutant mouse: comparative study with an allergic inflammation model. *Plos One.* 2012;7(4):e35114.
 - 39 Shin HW. Animal Models in CRS and Pathophysiologic Insights Gained: A Systematic Review. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2016;1(5):116-23.
 - 40 Athanasiadis T, et al. Effects of a novel chitosan gel on mucosal wound healing following endoscopic sinus surgery in a sheep model of chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope.* 2008;118(6):1088-94.
 - 41 Rajiv S, et al. Topical colloidal silver as an anti-biofilm agent in a Staphylococcus aureus chronic rhinosinusitis sheep model. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2015;5(4):283-8.

-
- 42 Liang KL, et al. Developing a rabbit model of rhinogenic chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*. 2008;118(6):1076-81.
 - 43 Esquinas P, et al. Ultrastructural Comparison of the Nasal Epithelia of Healthy and Naturally Affected Rabbits with *Pasteurella multocida* A. *Vet Med Int*. 2013;2013:321390.
 - 44 Al-Haddawi MH, et al. Ultrastructural pathology of nasal and tracheal mucosa of rabbits experimentally infected with *Pasteurella multocida* serotype D:1. *Res Vet Sci*. 2001;70(3):191-7.
 - 45 Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratórios: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro, 2002.
 - 46 Ahn BH, Park YH, Shin SH. Mouse model of *Aspergillus* and *Alternaria* induced rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx*. 2009;36(4):422-6.
 - 47 Migliavacca R de O, et al. An experimental model of chronic rhinosinusitis in rabbits without bacterial inoculation. *Acta Cir Bras*. 2014;29(5):313-9.
 - 48 Dolci ELL, et al. Evaluation of the ability of an experimental model to induce bacterial rhinosinusitis in rabbits. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2014;80(6):480-9.
 - 49 Shin SH, Heo WW. Effects of unilateral naris closure on the nasal and maxillary sinus mucosa in rabbit. *Auris Nasus Larynx*. 2005;32(2):139-43.
 - 50 Lee SB, et al. Rhinovirus infection in murine chronic allergic rhinosinusitis model. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(11):1131-8.
 - 51 Jia M, et al. A simple animal model of *Staphylococcus aureus* biofilm in sinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(2):e115-9.
 - 52 Cho DY, et al. Sinus Microanatomy and Microbiota in a Rabbit Model of Rhinosinusitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:540.
 - 53 Tamashiro E, et al. In vivo effects of citric acid/zwitterionic surfactant cleansing solution on rabbit sinus mucosa. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(6):597-601.
 - 54 Leary S. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition.
 - 55 Min YG, et al. Effects of staphylococcal enterotoxin on ciliary activity and histology of the sinus mucosa. *Acta Otolaryngol*. 2006;126(9):941-7.
 - 56 JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia Básica - texto e atlas*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

- 57 Soler ZM, et al. Relationship between clinical measures and histopathologic findings in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;141(4):454-61.
- 58 Bhattacharyya N, et al. Tissue eosinophilia in chronic sinusitis: quantification techniques. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery.* 2001;127(9):1102-5.
- 59 Kim DH, et al. Effects of a tumor necrosis factor-alpha antagonist on experimentally induced rhinosinusitis. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:360457.
- 60 Saito H, et al. Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis. *Immunology.* 2001;104(2):226-34.
- 61 Kim JH, et al. Development of *Aspergillus* protease with ovalbumin-induced allergic chronic rhinosinusitis model in the mouse. *Am J Rhinol Allergy.* 2014;28(6):465-70.
- 62 Sejima T, et al. Experimentally induced eosinophilic polyps in rabbit sinuses. *Am J Rhinol Allergy.* 2010;24(5):341-7.
- 63 Shimizu T, Shimizu S. Differential properties of mucous glycoproteins produced by allergic inflammation and lipopolysaccharide stimulation in rat nasal epithelium. *Adv Otorhinolaryngol.* 2011;72:107-9.
- 64 Gallego C, et al. Interaction of *Bordetella bronchiseptica* and Its Lipopolysaccharide with In Vitro Culture of Respiratory Nasal Epithelium. *Vet Med Int.* 2013;2013:347086.
- 65 Patou J, et al. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(1):110-5.
- 66 Yokoyama Y, Harabuchi Y. Intranasal immunization with lipoteichoic acid and cholera toxin evokes specific pharyngeal IgA and systemic IgG responses and inhibits streptococcal adherence to pharyngeal epithelial cells in mice. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2002;63(3):235-41.
- 67 Jia M, et al. Efficacy of silk fibroin-nano silver against *Staphylococcus aureus* biofilms in a rabbit model of sinusitis. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:2933-9.

8. Anexo

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 076/2013, sobre o projeto intitulado "*Indução de polipose nasossinusal em um modelo experimental em coelhos*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Edwin Tamashiro** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 02 de outubro de 2013.

We certify that the protocol n° 076/2013, entitled "*Induction of nasal polypsis in a experimental model in rabbits*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 10/02/2013.

Ribeirão Preto, 02 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP