

**THIAGO CARVALHO**

**Estudo transversal: composição neural da mucosa nasal das conchas inferiores de pacientes com rinite alérgica e idiopática**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Richard Louis Voegels

Versão corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2022**

**THIAGO CARVALHO**

**Estudo transversal: composição neural da mucosa nasal das conchas inferiores de pacientes com rinite alérgica e idiopática**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Richard Louis Voegels

Versão corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Thiago

Estudo transversal: composição neural da mucosa nasal das conchas inferiores de pacientes com rinite alérgica e idiopática / Thiago Carvalho. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Richard Louis Voegels.

Descritores: 1.Rinite alérgica 2.Hiper-reatividade 3.Fator de crescimento neural 4.Neurotrofinas 5.Inervação 6.Eosinófilos 7.Inflamação neurogênica

USP/FM/DBD-038/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

Para esta tese foram utilizadas as normas vigentes no momento de sua elaboração:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro et al. 3ª ed. rev. ampl. mod. São Paulo: SIBiUSP, 2016. 100p.

Referências: realizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023) seguindo o sistema numérico.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## **DEDICATÓRIA**

À minha esposa Juliana, meu amor, por seu apoio incondicional, críticas construtivas e força nos momentos difíceis. Ao meu filho Vitória e à minha filha Maria Liz, por me inspirarem a ser uma pessoa melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Sérgio e Marlene, por ter me educado com muito amor, carinho e paciência e proporcionado uma base sólida para eu ser quem sou hoje e chegar onde cheguei.

Ao Prof. Dr. João Ferreira de Mello Júnior, por abrir as portas da Universidade de São Paulo para mim, por sua confiança e seu apoio.

Ao Prof. Dr. Richard Louis Voegels, por me orientar e compartilhar sua grande experiência no enriquecimento desta tese.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me receber nesta instituição.

Ao Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes, Coordenador do Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de participar deste programa.

À Prof. Dra. Elia Tamasso Espin Garcia Caldini, Chefe do Laboratório de Investigação Médica "Biologia Celular", por me receber com tanto carinho e me apresentar um novo olhar sobre ensinar e aprender, além de uma percepção mais humana sobre a relação estudante e professor.

À Nilsa, incansável na confecção das lâminas, sempre buscando a excelência naquilo que faz.

À Angela Santos, do Laboratório de Imuno-histoquímica, por sua dedicação buscando a melhor titulação, mesmo com a falta de dados nas referências.

Aos estatísticos Marcelo e Janaína, pela disponibilidade, competência e paciência em me guiar pelo universo das análises estatísticas, essenciais em uma pesquisa científica.

À Nicole Mary Garcia de Carvalho, acadêmica de iniciação científica, por seu interesse, dedicação e competência.

Ao amigo Dr. Daniel Cauduro Salgado, grande amigo e companheiro de pós-graduação, por ceder gentilmente o material para esta pesquisa.

À Universidade do Vale do Taquari (Univates), em especial ao Laboratório de Biologia, por ceder gentilmente os equipamentos do laboratório para leitura e digitalização de parte do material desta pesquisa.

Às secretárias Marilede, Luci e Márcia, pelo suporte, carinho, cordialidade e competência.

## **EPIGRAFE**

“Obstáculo é aquilo que você enxerga quando tira os olhos do seu objetivo.”

**Henry Ford**

## RESUMO

Carvalho T. *Estudo transversal: composição neural da mucosa nasal das conchas inferiores de pacientes com rinite alérgica e idiopática* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**INTRODUÇÃO:** A hiper-reatividade inespecífica das rinites tem sido atribuída às neurotrofinas ativando os nervos sensoriais e células inflamatórias. A relação destes marcadores com a intensidade dos sintomas não está bem estabelecida e poucos estudos avaliaram indivíduos com rinite idiopática (RI). O objetivo deste estudo é avaliar se os indivíduos com rinite alérgica (RA) possuem maior quantidade de *nerve growth factor* (NGF), fibras nervosas, eosinófilos e mastócitos do que aqueles com RI e se intensidade dos sintomas está associada a tais características, além de descrever a distribuição do NGF e fibras nervosas na mucosa nasal. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram selecionados 15 pacientes com RA e 15 pacientes com RI com indicação de turbinectomia inferior, associada ou não à septoplastia. Os pacientes foram submetidos a uma escala de sinais e sintomas. Após a cirurgia, quantificamos eosinófilos, mastócitos, NGF e fibras nervosas nas conchas nasais. **RESULTADOS:** A pontuação do escore de sinais de sintomas foi maior no grupo com RA, principalmente as custas dos sintomas de espirros/prurido, quanto à coloração das conchas e presença de secreção nasal. O NGF foi encontrado no citoplasma de células inflamatórias na submucosa em maior quantidade no grupo RA. A quantidade de mastócitos foi maior no grupo com RI e não houve diferença quanto aos eosinófilos. As fibras nervosas estavam distribuídas por todo tecido, principalmente nas regiões subepitelial, glandular e vascular e não apresentou diferença entre os grupos. A maior inervação perivascular foi relacionada com maior pontuação do escore de sinais e sintomas. **CONCLUSÕES:** Os indivíduos com RA apresentam maior quantidade de NGF na mucosa nasal. Aqueles com RI apresentam maior quantidade de mastócitos. O NGF é encontrado em células inflamatórias pela submucosa e as fibras nervosas na região periglandular e perivascular. A inervação perivascular das conchas nasais tem relação direta com a gravidade da rinite, tanto na RI quanto na RA.

**Descritores:** Rinite alérgica; Hiper-reatividade; Fator de crescimento neural; Neurotrofinas; Inervação; Eosinófilos; Inflamação neurogênica.

## ABSTRACT

Carvalho T. *Cross-sectional study: neural composition of the nasal mucosa of the inferior turbinates of patients with allergic and idiopathic rhinitis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

**INTRODUCTION:** The non-specific hyperreactivity of rhinitis has been attributed to neurotrophins activating sensory nerves and inflammatory cells. The relationship of these markers with the intensity of symptoms is not well established and few studies have evaluated individuals with idiopathic rhinitis (IR). The aim of this study is to assess whether individuals with allergic rhinitis (AR) have a greater amount of nerve growth factor (NGF), nerve fibers, eosinophils and mast cells than those with IR, whether the intensity of symptoms is associated with such characteristics and describe the distribution of NGF and nerve fibers in the nasal mucosa. **MATERIALS AND METHODS:** 15 patients with AR and 15 patients with IR with indication for inferior turbinectomy were selected, associated or not with septoplasty. The patients underwent a score of signs and symptoms. After surgery, we quantified eosinophils, mast cells, NGF and nerve fibers in the nasal turbinate. **RESULTS:** The score of the symptom sign was higher in the AR group, mainly due to the symptoms of sneezing/pruritus, regarding the color of the nasal turbinate and the presence of nasal discharge. NGF was found in cytoplasmic granules of inflammatory cells in the submucosa in greater quantity in the AR group. The number of mast cells was higher in the group with IR and there was no difference regarding eosinophils. The nerve fibers were distributed throughout the tissue, mainly in the subepithelial, glandular and vascular regions and there was no difference between the groups. Greater perivascular innervation was associated with higher signs and symptoms score. **CONCLUSIONS:** Individuals with AR have a greater amount of NGF in the nasal mucosa when compared to those with IR. Those with IR have a greater number of mast cells. NGF is found in inflammatory cells in the submucosa and nerve fibers is found in the periglandular and perivascular region. Perivascular innervation in the submucosa of the nasal turbinate is directly related to the severity of rhinitis, in both IR and AR.

**Descriptors:** Rhinitis, allergic; Hiperreativity; Nerve growth factor; Neurotrophins; Innervation; Eosinophils; Neurogenic inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das rinites alérgicas segundo ARIA 2008.....	20
Figura 2 - Representação esquemática mostrando a fisiopatologia da rinite alérgica .....	22
Figura 3 - Representação esquemática de como as células circulantes participam do processo alérgico .....	26
Figura 4 - Ilustração esquemática da anatomia nervosa nasal e adjacente .....	29
Figura 5 - Ilustração esquemática da anatomia nervosa mostrando nervo vidiano...	30
Figura 6 - Apresentação esquemática da inflamação neurogênica .....	32
Figura 7 - Ilustração esquemática sobre a interação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico .....	34
Figura 8 - Apresentação esquemática da fisiopatologia do prurido .....	36
Figura 9 - Representação esquemática das vias paralelas para irritação das vias aéreas.....	38
Figura 10 - Imagem ilustrativa da quantificação da inervação perivascular .....	48
Figura 11 - Imagem ilustrativa da quantificação da inervação perivascular .....	48
Figura 12 - Imagem ilustrativa da quantificação da marcação imuno-histoquímica no ImageJ.....	49
Figura 13 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (objetiva 40x).....	53
Figura 14 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de em um paciente com Rinite Alérgica (objetiva 40x) .....	54
Figura 15 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (objetiva 10x).....	54
Figura 16 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (objetiva 10X).....	55
Figura 17 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (objetiva 10x) .....	55
Figura 18 - Fotomicroscopia mostrando eosinófilo na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (coloração HE, objetiva 40x) .....	56
Figura 19 - Fotomicroscopia mostrando eosinófilo na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (coloração HE, objetiva 40x) .....	57
Figura 20 - Fotomicroscopia mostrando mastócitos na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (coloração azul de toluidina, objetiva 40x).....	58
Figura 21 - Fotomicroscopia mostrando mastócitos na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (coloração azul de toluidina, objetiva 40x) .....	58
Figura 22 - Fotomicroscopias mostrando a marcação imuno-histoquímica para UCHL nas conchas nasais de indivíduos com Rinite Alérgica (objetiva 40x).....	59
Figura 23 - Fotomicroscopias da marcação muno-histoquímica para UCHL nas conchas nasais de indivíduos com Rinite Idiopática (objetiva de 40x).....	60
Figura 25 - Regressão Linear Múltipla para escore parcial .....	61

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das rinites segundo o seu agente etiológico .....	19
Quadro 2 - Endótipos conhecidos das rinites .....	21
Quadro 3 - Comparativo das principais características clínicas da rinite não alérgica e da rinite alérgica.....	28
Quadro 4 - Neuropeptídeos relacionados com sintomas nasais .....	39
Quadro 5 - Escore de sinais de sintomas nasais .....	44
Quadro 6 - Antígenos inalatórios testados .....	45
Quadro 7 - Anticorpos usados na imuno-histoquímica .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização das amostras de pacientes com Rinite Idiopática e Rinite Alérgica.....	51
Tabela 2 - Média ( $\pm$ Desvio Padrão) da pontuação dos sinais e dos sintomas por tipos de rinite (idiopática e alérgica) .....	52
Tabela 3 - Associação entre os sintomas e sinais e os tipos de rinite (idiopática e alérgica).....	52
Tabela 4 - Regressão Linear Múltipla da gravidade da doença (escore parcial) com gênero, tipos de rinite e UCHL perivascular (densidade) .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AIC	Critério de Informação de Akaike
ARIA	<i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Pattern Molecules</i>
ECP	Proteína Catiônica
EPO	Peroxidase Eosinofílica
FcεR1	Receptor Fcε de Alta Afinidade
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos
HE	Hematoxina-eosina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IL-25	Interleucina 25
IL-4	Interleucina 4
LFA-1	Antígeno Associado à Função Linfocitária-1
LIM/59	Laboratório de Investigação Médica, Laboratório de Biologia Celular
MBP	Proteína Básica Principal
MCP	Proteína Quimiotática de Monócitos
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MIP-1α	Proteína Inflamatória de Macrófagos-1α
MMPs	Metaloprotease de Matriz
NAR	Rinite Não Alérgica
NARES	Rinite Não Alérgica Infiltrada por Eosinófilos
NARESMA	Rinite Não Alérgica Infiltrada por Eosinófilos e Mastócitos
NARMA	Rinite Não Alérgica Infiltrada por Mastócitos
NARNE	Rinite Não Alérgica Infiltrada por Neutrófilos
NETs	Armadilha Extracelular De Neutrófilos
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NKA	Neurocinina A
p75NTR	Receptor da Neurotrofina p75
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PGP 9.5	Produto Proteico do Gene 9.5
RA	Rinite Alérgica
RAL	Rinite Alérgica Local
RBC	Glóbulo Vermelho
RI	Rinite Idiopática
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SCC	<i>Solitary Chemoreceptor Cells</i>
sLT	Leucotrieno Sulfido
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TARC	Timo e Quimiocina Regulada por Ativação
TCR	Receptor de Células T

TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
TrkA	Tropomiosina Quinase A
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA1	<i>Transient Receptor Potential Ankyrin 1</i>
TRPM5	<i>Transient Receptor Potential Melastatin-5</i>
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
TSLP	Linfopoiética Estromal Tímica
TxA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UCHL	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase L1</i>
VCAM-1	Molécula de Adesão de Células Vasculares-1
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{m}$  micrometros

$\mu\text{m}^2$  micrometros cuadrados

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	Rinite Definição.....	19
2.2	Classificação.....	19
2.3	Rinite alérgica.....	21
2.3.1	Fisiopatologia.....	21
2.3.2	Rinite alérgica local.....	26
2.5	Rinite Idiopática.....	27
2.6	Fisiopatologia neural das rinites.....	29
2.6.1	Inervação nasal.....	29
2.6.2	Rinites e os nervos.....	31
2.6.3	Reflexo axonal.....	32
2.6.4	Inflamação neurogênica.....	34
2.6.5	Receptores de Potenciais Transitórios (TRP).....	36
2.6.6	Neuropeptídeos e neurotrofinas.....	39
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>42</b>
3.1	Casuística.....	42
3.2	Coleta do material.....	45
3.3	Confecção das lâminas.....	46
3.4	Quantificação de células inflamatórias.....	46
3.5	Processamento das imagens e análise.....	47
3.6	Análise estatística.....	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1	Caracterização da amostra.....	51
4.2	Comparação entre os grupos.....	52
4.3	Variáveis associadas à gravidade da doença.....	60
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
5.1	Descritiva da amostra.....	62
5.2	Metodologia.....	62
5.3	Inervação.....	63
5.4	NGF.....	64
5.5	Inervação x sintomas.....	64
5.6	Eosinófilos.....	65
5.7	Mastócitos.....	66
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

<b>APÊNDICE – Metodologia Técnica.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq.....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A RA é a doença crônica mais prevalente e gera impacto sócio econômico considerável na população, tanto adulta quanto pediátrica.<sup>1</sup> As suas repercussões gerais como o prejuízo do sono, a queda na produtividade de trabalho e no desempenho escolar, a alteração de comportamento e o dano psicológico não podem ser subestimados. Pacientes com rinite grave apresentam uma queda significativa na qualidade de vida.<sup>2</sup>

A RA é uma reação de hipersensibilidade tipo I caracterizada por inflamação onde predominam os eosinófilos, imunoglobulina E (IgE) e mediadores inflamatórios responsáveis pela sintomatologia. O indivíduo é exposto ao alérgeno, que é absorvido pelas células apresentadoras de antígenos e apresentado às células T auxiliares, que se diferencia em Th2. Desta forma, uma sequência de reações envolvendo células inflamatórias e mediadores inflamatórios (principalmente a histamina) resultam na sintomatologia.<sup>3,4</sup> O indivíduo sensibilizado apresenta sintomas muito rapidamente quando exposto ao alérgeno, mesmo em pequenas concentrações.<sup>5</sup> Também ocorre a hiper-reatividade a estímulos inespecíficos. Agentes como odores, mudanças climáticas e poluição são capazes de desencadear toda a sintomatologia da rinite sem atuarem diretamente como alérgenos.

Além do processo inflamatório, existem alterações neurais que regulam a sintomatologia da rinite alérgica e de alguns tipos de rinites não alérgicas. O sistema nervoso autônomo atua na fisiologia nasal diminuindo a resistência aérea e aumentando a secreção nasal através de suas vias simpáticas e parassimpáticas, respectivamente. Alguns estudos sugerem a existência de um desbalanço autonômico na rinite idiopática ou vasomotora, com inibição da resposta do sistema nervoso simpático no nariz e hiper-reatividade do sistema parassimpático.<sup>6-8</sup> A inflamação crônica leva à *up-regulation* dos componentes neurais do nariz que se apresenta como hiper-responsividade neural.<sup>2,9</sup> Esta alteração pode envolver vários aspectos do sistema nervoso, como a função aferente das terminações nervosas sensoriais, a eferência, os reflexos parassimpáticos (controlando principalmente as glândulas do nariz), o tônus simpático (que primariamente controla anastomoses arteriovenosas e ingurgitamento vascular) e até mesmo a sensibilização neural central.<sup>10</sup> Um aspecto adicional da hiper-responsividade neural pode ser a liberação de quantidades aumentadas de neuropeptídeos inflamatórios pelas terminações nervosas sensoriais,

levando à inflamação neurogênica.<sup>2</sup> Além disso, a superexpressão dos receptores de potenciais transitórios vanilóides ou *transient receptor potential vanilloid* (TRPV), está envolvida nestes mecanismos.<sup>6,9,11</sup>

Mudanças na estrutura e função dos nervos (plasticidade neuronal) podem contribuir para a fisiopatologia da rinite alérgica e de alguns tipos de rinites não alérgicas. Alguns autores sugerem o envolvimento das neurotrofinas na ativação dos nervos sensoriais e das principais células da resposta inflamatória das vias aéreas superiores.<sup>12,13</sup> Uma das neurotrofinas mais importantes envolvidas neste processo é o fator de crescimento neural ou *nerve growth factor* (NGF). Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1 ou UCHL) ou produto protéico do gene 9.5 (PGP 9.5) é um marcador pan neuronal e tem sido utilizado para demonstrar a presença de neurônios nos tecidos. Na rinite alérgica, o número de fibras nervosas positivas para PGP 9.5/UCHL está aumentado no epitélio, subepitélio, e nas glândulas mucosas mais profundas e regiões dos vasos sanguíneos.<sup>14</sup>

O funcionamento neural da rinite alérgica, tampouco das não alérgicas, ainda não está bem esclarecido. A literatura recente tem mostrado o aumento da atividade neural na mucosa nasal dos indivíduos com rinite alérgica através de neurotrofinas, neuropeptídeos, fibras nervosas e canais de sódio, relacionando com a hipersensibilidade inespecífica. No entanto, faltam pesquisas que relacionem a quantidade destes marcadores com a intensidade dos sintomas e poucos estudos avaliaram indivíduos com rinite não alérgica.

Os objetivos são:

- a) avaliar se há diferença entre a rinite alérgica e a rinite idiopática quanto a presença de NGF, de fibras nervosas, mastócitos e eosinófilos nas conchas nasais;
- b) descrever a distribuição de NGF e das fibras nervosas na mucosa nasal;
- c) avaliar se há relação destes achados com a intensidade dos sintomas de rinite.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Rinite Definição

A rinite é definida como processo inflamatório na mucosa nasal, acompanhada dos sintomas de obstrução nasal, prurido, espirros e secreção.<sup>3</sup> Apesar disso, o termo rinite tem sido utilizado em doenças onde o processo inflamatório não está presente (ex: rinite do idoso), ou em situações onde apenas um dos sintomas estão presentes (ex: rinite medicamentosa, onde muitas vezes apenas a obstrução nasal está presente). O termo rinopatia tem sido proposto como mais adequado nestes casos, sugerindo uma disfunção da fisiologia da mucosa nasal.<sup>6,15</sup>

### 2.2 Classificação

A principal classificação das rinites considera a etiologia e a fisiopatologia envolvida, dividindo em infecciosas e não infecciosas. Estas são divididas em alérgicas e não alérgicas.<sup>6,16</sup> A Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica classificou as rinites de acordo com seu agente etiológico em 4 tipos<sup>4,6</sup>: As Rinites Não Alérgicas Não Infecciosas foram subdivididas de acordo com seus tipos clínicos.<sup>6,17</sup> O quadro 1 demonstra estas classificações. Entre os pacientes com rinite crônica, estima-se que 23% tenham rinite não alérgica, 34% rinite mista e 43% rinite alérgica.<sup>15</sup>

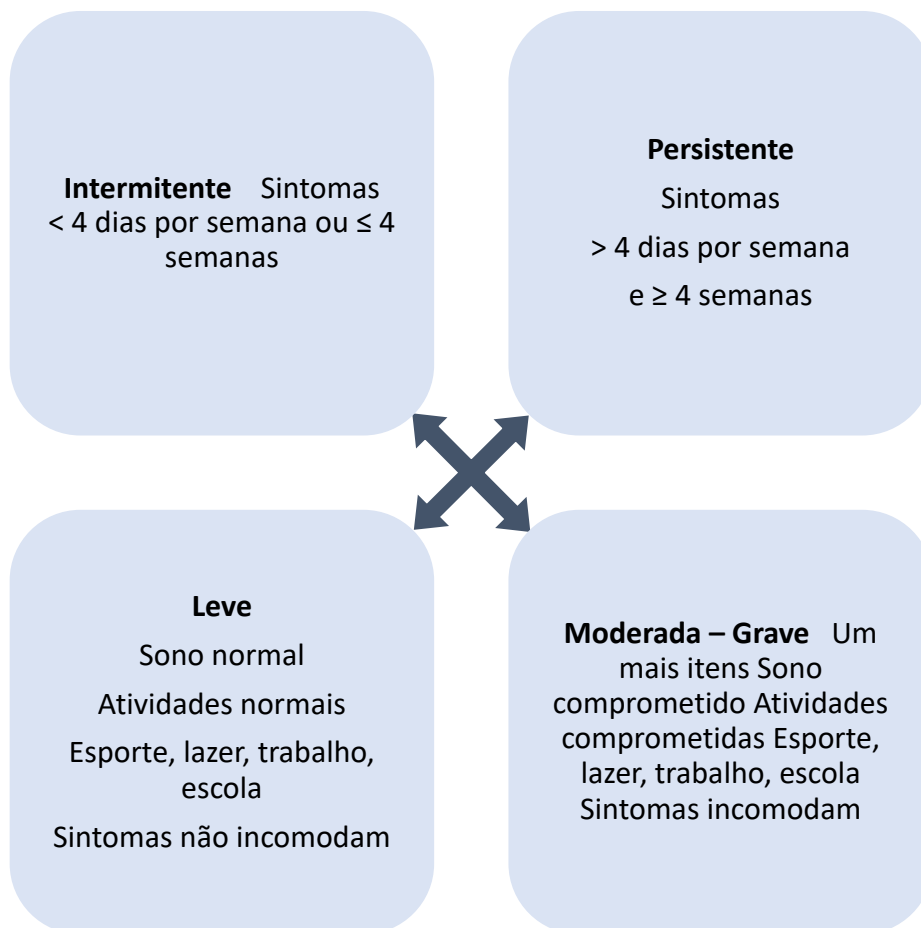
Quadro 1 - Classificação das rinites segundo o seu agente etiológico

Infecciosas	
<b>Alérgica</b>	
Não alérgicas não infecciosas	Rinite induzida por drogas/medicamentos Rinite medicamentosa (vasoconstritor tópico) Rinite do idoso Rinite hormonal (gestacional) Rinite não alérgica ocupacional Rinite gustatória Rinite por irritantes Rinite emocional Rinite atrófica <b>Rinite idiopática</b> Rinite eosinofílica não alérgica
Mista	

Fonte: Adaptado de Hellings (2017)<sup>18</sup>, Wise (2018)<sup>1</sup>, Sakano (2017)<sup>4</sup>

As classificações utilizadas são baseadas nos fenótipos, ou seja, nas características clínicas observáveis. A iniciativa *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma* (ARIA) propôs a classificação da rinite alérgica de acordo com a frequência: sazonal (intermitente) ou perene (persistente), e conforme a intensidade dos sintomas: leve e moderada/grave, conforme demonstrado na Figura 1. A classificação pelo endótipo tem sido proposta, baseada em mecanismos fisiopatológicos envolvidos, conforme descrito no Quadro 2. A classificação pelo endótipo tem potencial para explicar algumas variações na apresentação clínica e na resposta ao tratamento.

Figura 1 - Classificação das rinites alérgicas segundo ARIA 2008



Fonte: Adaptado de Bousquet et al. (2008)<sup>3</sup>

Quadro 2 - Endótipos conhecidos das rinites

<b>Rinite de resposta imune tipo 2</b> <b>Rinite de resposta imune tipo 1</b> <b>Rinite neurogênica</b> inflamação neurogênica desbalanço neurogênico (sem inflamação) <b>Disfunção epitelial</b>
--

Fonte: Adaptado de Papadopoulos (2015)<sup>2</sup> e Muraro (2016)<sup>9</sup>

## 2.3 Rinite alérgica

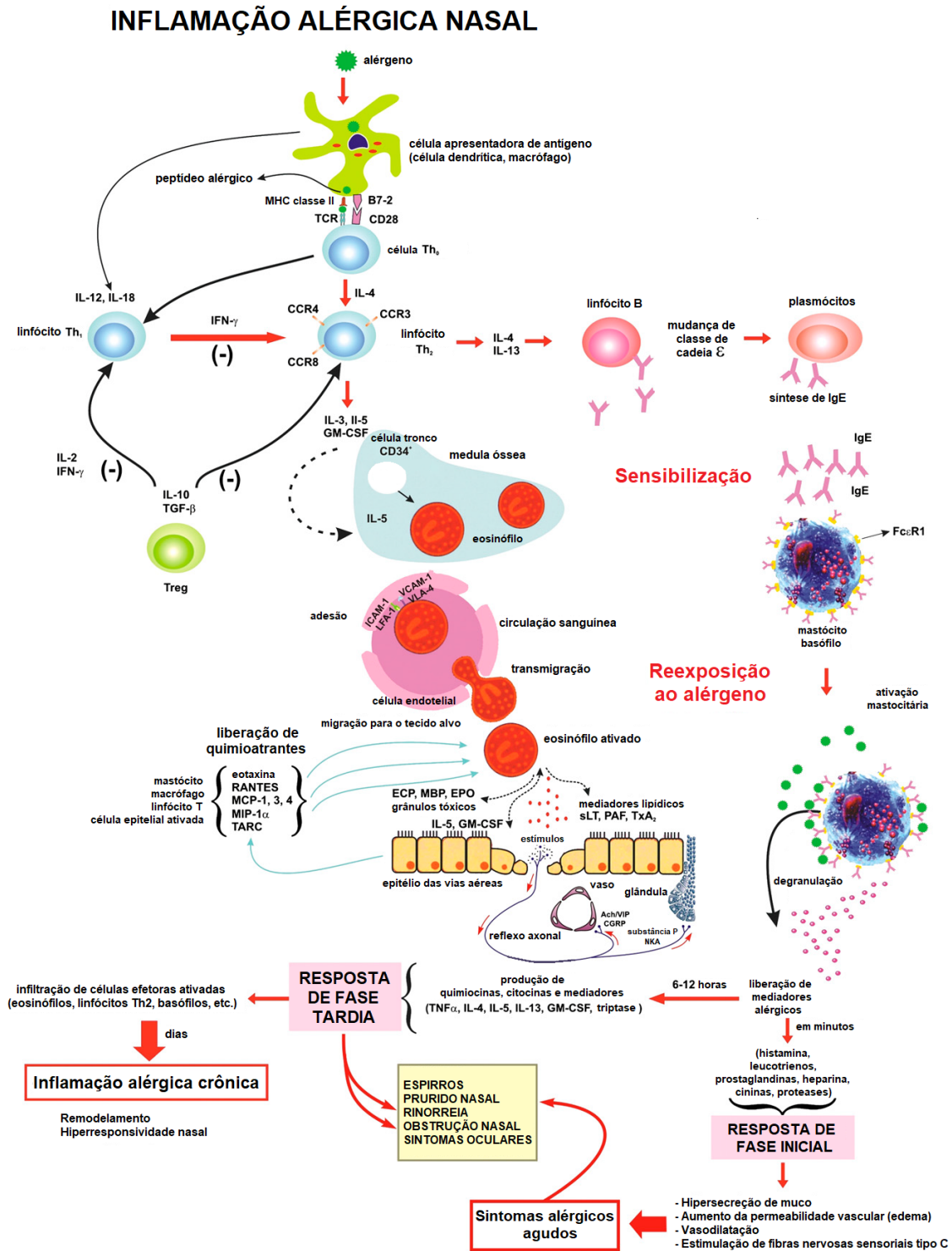
A RA é uma inflamação nasal mediada por IgE desencadeada pela exposição ao alérgeno em um indivíduo sensibilizado. A prevalência é de aproximadamente 10% a 40%, com a maior incidência em crianças.<sup>19</sup> No entanto, a RA é quase ausente em bebês, geralmente não se manifestando até o segundo ano de vida. Clinicamente manifesta-se com os sintomas de rinite como congestão, espirros, rinorréia e coceira nasal, muitas vezes associados com queixas de conjuntivite ocular como lacrimejamento e coceira.<sup>20</sup> Os principais alérgenos envolvidos são pólenes, ácaros, baratas, pêlos de animais, fungos e alérgenos ocupacionais.

O diagnóstico é clínico, com história e achados de exame físico, principalmente excluindo os diagnósticos diferenciais. A pesquisa de IgE específica (sérica ou teste cutâneo) pode confirmar o alérgeno suspeito.

### 2.3.1 Fisiopatologia

A rinite alérgica é uma reação de hipersensibilidade tipo I caracterizada por inflamação onde predominam os eosinófilos, mediada por imunoglobulina E<sup>4</sup>. A fisiopatologia completa está representada na Figura 2. O processo começa com a exposição da mucosa nasal a alérgenos inalantes. As células epiteliais da mucosa não são apenas uma barreira mecânica à penetração de alérgenos, mas também desempenham um papel muito mais sofisticado no desenvolvimento da alergia, através da secreção de numerosos mediadores inflamatórios, up-regulation das moléculas de adesão celular, liberação de metaloproteinases e de linfopietina estromal tímica (TSLP).<sup>1</sup>

Figura 2 - Representação esquemática mostrando a fisiopatologia da rinite alérgica



ACh, Acetilcolina; ECP, Proteína Catiônica; EPO, Peroxidase Eosinofílica; FcεR1, Receptor Fcε de Alta Afinidade; GM-CSF, Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos; ICAM-1, Molécula de Adesão Intercelular-1; IFN, Interferon; IL, Interleucina; LFA-1, Antígeno Associado à Função Linfocitária-1; MBP, Proteína Básica Principal; MCP, Proteína Quimiotática de Monócitos; MHC, Major Histocompatibility Complex; MIP-1α, Proteína Inflamatória de Macrófagos-1α; NKA, Neurocinina A; PAF, Fator de Ativação Plaquetária; sLT, Leucotrieno Sulfido; TARC, Timo e Quimiocina Regulada por Ativação; TCR, Receptor de Células T; TNFα, Fator de Necrose Tumoral-α; TxA<sub>2</sub>, Tromboxano A<sub>2</sub>; VCAM-1, Molécula de Adesão de Células Vasculares-1; VIP, Peptídeo Intestinal Vasoativo.

Fonte: Adaptado de Sin (2011)<sup>21</sup>

Os alérgenos são absorvidos pelas células apresentadoras de antígenos, que migram para os órgãos linfoides, onde o antígeno é apresentado às células T auxiliares (ou linfócitos Th0), que se diferencia em Th2. Então passam a produzir diversas interleucinas e outros mediadores que estimulam a diferenciação em plasmócitos produtores de IgE. A IgE produzida liga-se aos receptores de alta afinidade existentes nos mastócitos liberando diversos mediadores inflamatórios (principalmente a histamina) responsáveis pela sintomatologia.<sup>3,4</sup> Inicia o recrutamento celular com o aumento de moléculas de adesão, principalmente a molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), específica para eosinófilos, favorecendo a sua adesão ao endotélio e diapedese para a submucosa.

Na rinite alérgica ocorre também a hiper-reatividade a estímulos inespecíficos como odores, mudanças climáticas e poluição, que não atuam diretamente como alérgenos.<sup>3</sup> A hiper-reatividade a estímulos inespecíficos ocorre possivelmente devido ao aumento dos circuitos reflexos neuronais controlando as funções das vias aéreas.<sup>3,6</sup>

Mesmo na ausência de sintomas ocorre um aumento na expressão de moléculas de adesão e de marcadores inflamatórios, condição chamada de inflamação mínima persistente. Esta inflamação favorece o aparecimento de uma resposta nasal rápida e intensa quando ocorre o contato com o alérgeno.<sup>5</sup>

Os eosinófilos e os mastócitos desempenham papéis importantes no processo inflamatório alérgico, inclusive sendo marcadores de maior gravidade e pior prognóstico nos quadros de rinite.<sup>22</sup>

## **Mastócitos**

O interesse científico pelos mastócitos aumentou muito nas últimas décadas e pesquisas recentes conseguiram comprovar suas implicações mais complexas nas doenças como câncer, infecções, doenças cardiovasculares e diversos distúrbios sistêmicos.<sup>23</sup> Em todos os tecidos conjuntivos, especialmente nos epitélios, e adjacentes aos vasos sanguíneos, o mastócito participa na imunidade e na cicatrização de feridas.<sup>24</sup>

As aminas vasoativas, como histamina, presentes em seus grânulos causam vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar. As enzimas proteolíticas, mediadores lipídicos, quimiocinas e citocinas, fornecem defesa contra helmintos,

outros patógenos e venenos de animais e que também são responsáveis para sintomas alérgicos de início precoce através da reação cruzada de IgE induzida por antígeno.<sup>24</sup>

Os mastócitos desempenham papéis imunomoduladores importantes, liberando uma ampla gama de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que influenciam a interação do sistema imunológico com o meio ambiente. Sua localização predominante na pele, no trato gastrointestinal e no sistema respiratório permite que os mastócitos reajam como os primeiros a responder a qualquer mudança no ambiente.<sup>25</sup>

Reconhecidos por seu papel na alergia e anafilaxia, evidências crescentes apoiam o papel dos mastócitos também na inflamação neurogênica que causa dor e coceira<sup>26</sup>. Atuam liberando mediadores que iniciam uma comunicação recíproca com nociceptores específicos nas fibras nervosas sensoriais. Conseqüentemente, as fibras nervosas liberam neuropeptídeos inflamatórios e vasoativos, que por sua vez ativam os mastócitos em um mecanismo de feedback, promovendo assim um ciclo vicioso de ativação dos mastócitos e dos nociceptores levando à inflamação neurogênica e dor/prurido.<sup>26</sup>

Os mastócitos sintetizam NGF pela clivagem do pró-NGF pela triptase e, após estimulação, o que está armazenado é liberado. De maneira autócrina, estimula os mastócitos a liberarem mediadores pró-nociceptivos, incluindo histamina e mais NGF, sustentando um ciclo de feedback positivo.<sup>26</sup>

O NGF e seu receptor tropomiosina quinase A (TrkA) evocam hipersensibilidade à dor sustentada por meio dos canais TRPV1 nos neurônios da periferia e do sistema nervoso central (SNC). Está presente em níveis elevados no tecido inflamado e nos estados de dor persistente. Uma vez ativados, os mastócitos e o NGF podem interagir entre eles, resultando em um microambiente altamente nocivo que leva a um estado de hipersensibilidade.<sup>26,27</sup>

## **Eosinófilos**

Os eosinófilos são células inflamatórias do sistema imunológico inato com um papel bem conhecido na inflamação alérgica, onde promovem a polarização Th2 pela liberação de interleucina (IL) 4 e IL-25, mas também a proliferação de células B e a

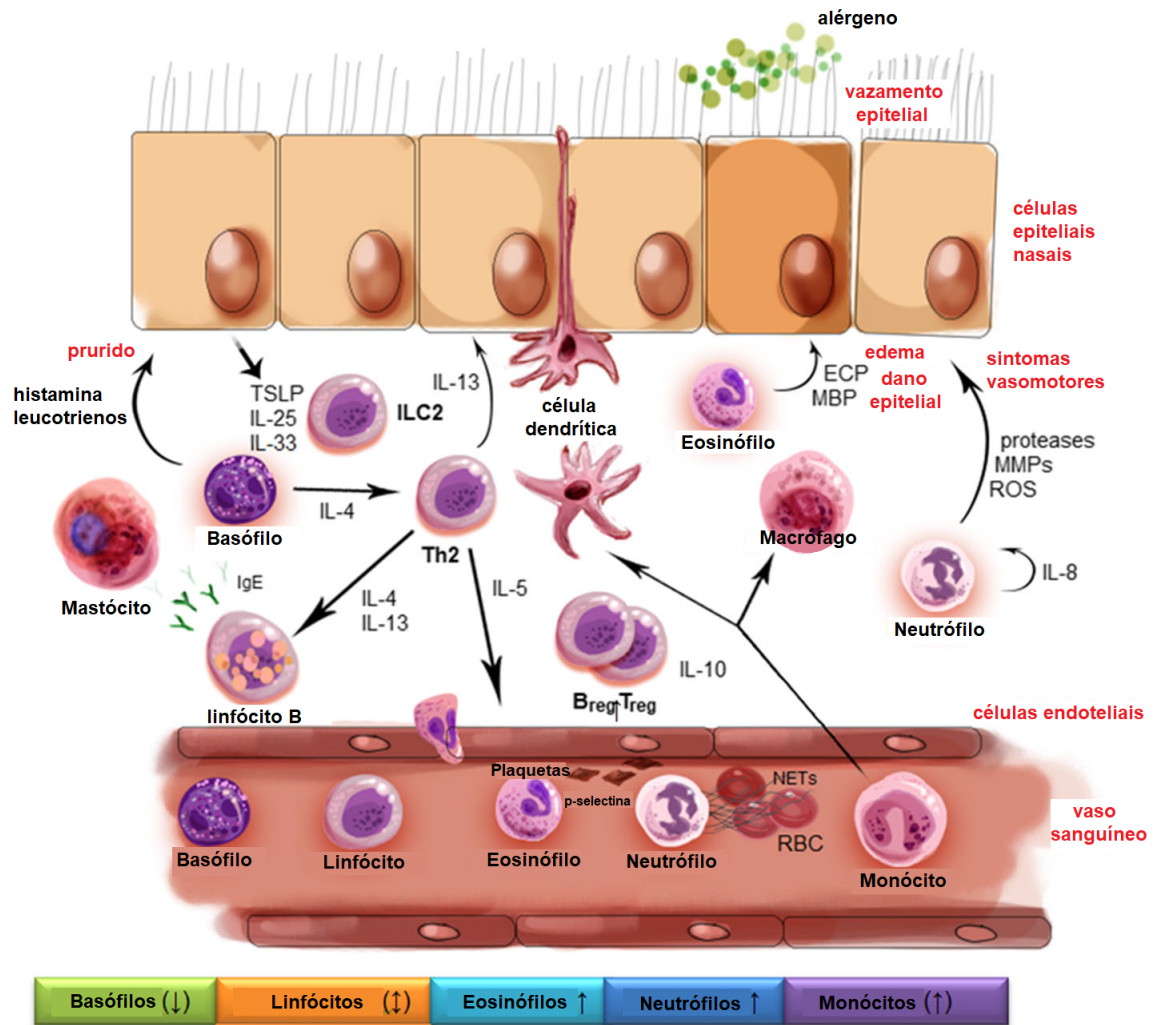
indução de anticorpos. Também promovem o recrutamento de células Th2 e interações com células dendríticas.<sup>28</sup>

Indivíduos atópicos com RA apresentam aumento significativo no número de eosinófilos na mucosa nasal em comparação com indivíduos saudáveis.<sup>29</sup> O aumento de eosinófilos da mucosa nasal foi encontrado dias após, mas não nas primeiras 24 horas após provocação com alérgeno, em indivíduos com RA sensibilizados com pólen, enquanto a provocação com placebo nas vias aéreas não induziu o aumento do número de eosinófilos na mucosa nasal de alérgicos.<sup>28</sup>

A Figura 3 mostra como as células circulantes participam da inflamação alérgica. Os eosinófilos circulantes retêm seu conteúdo de grânulos até chegarem aos tecidos-alvo. A exposição ao alérgeno inicia uma resposta inflamatória local envolvendo o recrutamento de células sanguíneas circulantes para a mucosa nasal. Na fase inicial, os neutrófilos são mobilizados como resposta de primeira linha do sistema imune inato e contribuem para o dano epitelial e nervoso por meio da liberação de mediador citotóxico. As células epiteliais danificadas liberam resíduos chamados *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) e citocinas recrutando subtipos de linfócitos circulantes, que se acumulam na mucosa nasal e promovem a resposta inflamatória Th2. Na fase tardia, mediadores liberados de eosinófilos e basófilos recrutados contribuem ainda mais para os sintomas de RA por meio de dano epitelial e extravazamento microvascular. Monócitos derivados do sangue participam da promoção e resolução da resposta alérgica por diferenciação em células dendríticas e macrófagos teciduais.<sup>28</sup>

Na RA, o recrutamento de eosinófilos na mucosa nasal e lúmen é impulsionado por citocinas Th2 e segue a exposição a aeroalérgenos, em um sujeito sensibilizado. A infiltração tecidual por eosinófilos ocorre principalmente durante a resposta de fase tardia, que começa 4–6 horas após a exposição e dura 18–24 horas. Um infiltrado contendo células Th2, eosinófilos e basófilos é característico desta fase. As células Th2 são importantes para a produção das principais citocinas, incluindo IL4, IL5 e IL13. Essas citocinas são cruciais para a regulação da síntese de IgE local e sistêmica, recrutamento de células inflamatórias e sobrevivência de eosinófilos. Indivíduos sensibilizados têm IgE específica detectável capaz de aumentar a degranulação de mastócitos e basófilos após exposição ao alérgeno. Os eosinófilos infiltrados liberam mediadores, que por sua vez lesam as células epiteliais nasais e induzem a hiper-responsividade nasal a vários estímulos irritantes.<sup>29</sup>

Figura 3 - Representação esquemática de como as células circulantes participam do processo alérgico



DAMPs, *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*; ECP, Proteína Catiônica; IgE, Imunoglobulina E; IL, Interleucina; MBP, Proteína Básica Principal; MMP, Metaloprotease de Matriz; NET, Armadilha Extracelular de Neutrófilos; RBC, Glóbulo Vermelho; ROS, Espécies Reativas de Oxigênio; TSLP, Linfopoietina Estromal Tímica.

Fonte: Adaptado de Jordakieva et al. (2018)<sup>28</sup>

### 2.3.2 Rinite alérgica local

Um subgrupo distinto de pacientes com rinite apresenta sintomas sugestivos de RA, sem evidência de atopia sistêmica avaliada por testes cutâneos ou de IgE sérica específica, mas mostra uma exacerbação da rinite após teste de provocação nasal. Acredita-se que esses sintomas representem o fenótipo clínico de uma resposta IgE subjacente, localmente limitada, que, no entanto, também pode ocorrer em pacientes atópicos e em indivíduos saudáveis.<sup>29</sup> De acordo com as definições clínicas acima mencionadas, pacientes com rinite sem evidência de atopia sistêmica devem

se enquadrar na categoria de rinite não alérgica. No entanto, alguns autores afirmam que o termo rinite alérgica local (RAL) deve ser aplicado, quando ocorre uma resposta de IgE local, principalmente para ácaros da poeira doméstica e pólen de grama/oliva.<sup>30,31</sup> A doença parece ter um curso progressivo, evoluindo para RA “sistêmica” em alguns casos e constituir um potencial fator de risco para asma.<sup>30</sup>

A histopatologia é importante para a confirmação diagnóstica, para auxiliar na endotipagem de doenças inflamatórias, direcionando possíveis terapias (biológicos por exemplo) e no prognóstico. A quantidade de infiltração eosinofílica e a intensidade geral da resposta inflamatória estão relacionadas ao prognóstico e gravidade da doença.<sup>22,24</sup>

## **2.5 Rinite Idiopática**

Os critérios diagnósticos para as rinites não alérgicas não são bem claros e padronizados, tornando os dados de prevalência imprecisos. Acredita-se que a proporção entre rinite alérgica e rinite não alérgica varie entre 3:1 e 4:1<sup>15,20</sup>, o que ficaria em torno de 7 a 20% da população mundial com rinite não alérgica.<sup>32</sup>

A rinite idiopática ou vasomotora é a causa mais comum de rinite não alérgica e é encontrada em 50 a 71% dos casos.<sup>6,32,33</sup> O diagnóstico é feito pela exclusão de outros fatores etiológicos como rinossinusite crônica, anormalidades anatômicas, rinorréia do líquido cefalorraquidiano além dos demais tipos de rinites não alérgicas.<sup>20</sup>

Clinicamente apresenta-se como uma doença crônica com sintomas primários de rinorréia. Pode estar associado a sintomas de congestão nasal, gotejamento pós-nasal na ausência de refluxo ácido, pigarro, tosse, disfunção da tuba auditiva, espirros, hiposmia e pressão/cefaleia facial. O prurido não é um sintoma comum nesta condição. Eles podem ser perenes, persistentes ou sazonais e são normalmente provocados por gatilhos como ar frio, mudanças climáticas (ou seja, temperatura, umidade, pressão barométrica), cheiros fortes, fumaça de tabaco, mudanças nos níveis de hormônios sexuais, ambientais poluentes, exercício físico e álcool.<sup>32</sup> O Quadro 3 mostra a comparação dos principais aspectos clínicos entre a RA e a rinite não alérgica. A hiper-reatividade nasal a estímulos inespecíficos pode ocorrer tanto na rinite alérgica quanto na não alérgica<sup>33</sup>. Alguns autores têm demonstrado o aumento de componentes neurais na mucosa nasal relacionando com essa hiper-reatividade inespecífica, ou seja, um estado de hiperexcitabilidade levando aos

sintomas de rinite com estímulos não alérgicos e favorecendo o estado inflamatório nos pacientes alérgicos.<sup>6,33,34</sup>

Quadro 3 - Comparativo das principais características clínicas da rinite não alérgica e da rinite alérgica.

	Rinite Não Alérgica	Rinite Alérgica
História Clínica	Início dos sintomas mais tarde na vida, mais comum após os 20 anos Sem indicação de um padrão familiar Mais comum em mulheres Sintomas perenes pouca variação sazonal	Geralmente se apresenta na infância História familiar de atopia (asma, rinite e dermatite atópica) Afeta mulheres e homens igualmente A maioria tem exacerbação sazonal dos sintomas
Principais queixas	Ampla gama de gatilhos irritantes Os sintomas incluem congestão nasal, drenagem pós-nasal com ou sem tosse Queixas oculares infrequentes Coceira mínima	Aeroalérgenos como gatilhos Os sintomas incluem congestão, espirros, rinorréia e coceira nasal Conjuntivite ocular, lacrimejamento e coceira
Exame Físico	A mucosa nasal pode estar normal com aumento de secreções hialina, pode ser eritematosa ou atrófica	Mucosa nasal edemaciada e pálida Prega horizontal no dorso nasal Olheiras (áreas escuras sob os olhos)
Pesquisa de IgE específica	negativo	positivo

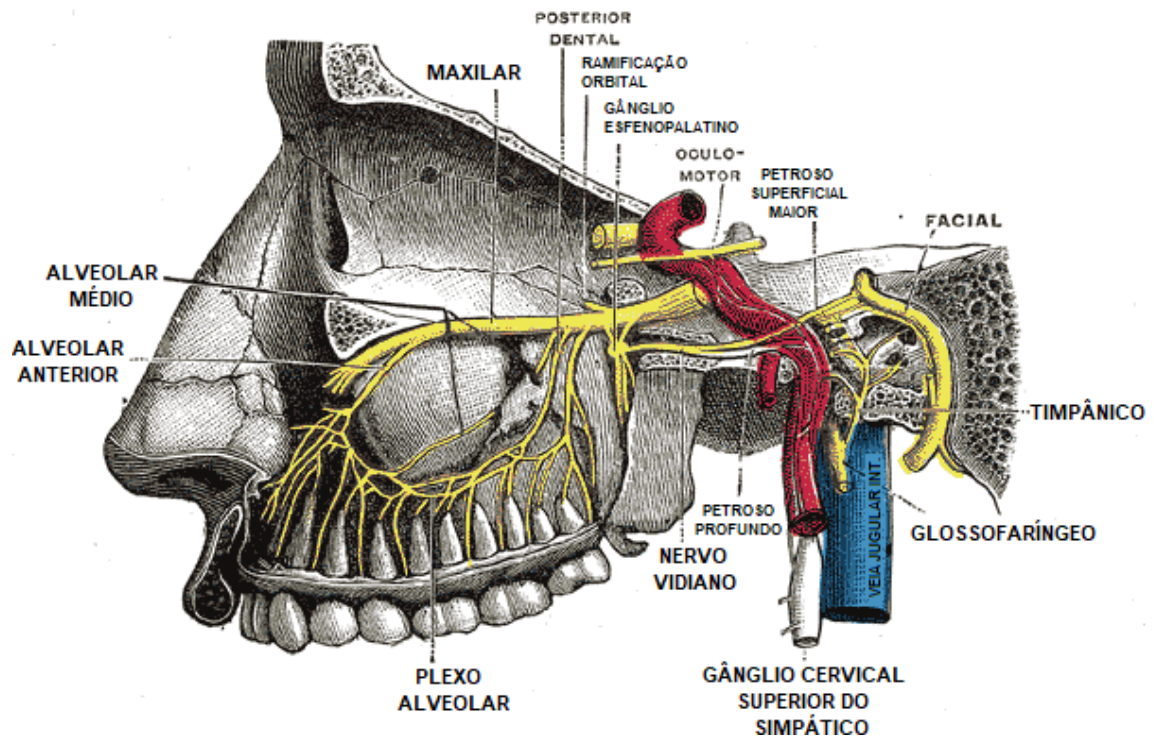
Fonte: Adaptado de Greiwe (2016)<sup>20</sup>

A rinite idiopática predomina na fase adulta, mais no sexo feminino com prevalência estimada de 7% da população.<sup>6,33</sup> A proporção de mulheres para homens de 2:1 a 3:1. No exame físico, a mucosa nasal geralmente parece normal, mas pode mostrar sinais de eritema e rinorreia clara. Embora o teste de alergia sistêmica (teste cutâneo ou in vitro) seja normalmente suficiente para diferenciar entre RA e rinite idiopática, o diagnóstico de LAR pode ser considerado no cenário de teste sistêmico negativo. Indivíduos com LAR sofrem de sintomas alérgicos típicos após exposição ao alérgeno, mas apresentam falta de sensibilização sistêmica por IgE. A provocação local é necessária para excluir definitivamente este diagnóstico.<sup>1</sup>

Embora a fisiopatologia exata da rinite idiopática permaneça descrita de maneira incompleta, acredita-se que as anormalidades sensorineurais desempenhem um papel crucial<sup>7</sup>. Pacientes com rinopatia não alérgica com um



Figura 5 - Ilustração esquemática da anatomia nervosa mostrando nervo vidiano



Fonte: Adaptado de Gray (1918)<sup>35</sup>

O suprimento autonômico é feito através do nervo vidiano, formado pelo nervo petroso superficial maior e petroso profundo, representado nas Figuras 4 e 5. As fibras parassimpáticas pré-ganglionares fazem sinapse no gânglio esfenopalatino e as fibras pós-ganglionares inervam a mucosa nasal, principalmente as glândulas e os vasos. A estimulação parassimpática resulta em vasodilatação, aumento da produção e liberação de secreção. Anticolinérgicos, como a atropina, brometo de ipratropium e a toxina botulínica reduzem a secreção nasal.<sup>33,36,37</sup> As fibras pós-ganglionares simpáticas chegam ao nervo vidiano, atravessam o gânglio esfenopalatino, sem fazer sinapses, para distribuir-se pela mucosa nasal, mais precisamente na vasculatura. A estimulação destas fibras resulta em vasoconstrição e diminuição da resistência ao fluxo aéreo nasal. Não foi estabelecida relação direta das fibras simpáticas com as glândulas nasais ou o controle das secreções.<sup>33</sup>

As divisões oftálmica e maxilar do nervo trigêmeo (V par) fornecem a inervação sensorial para o septo, as paredes laterais, a parte anterior do assoalho nasal e do meato inferior.<sup>33</sup> A inervação sensitiva/nociceptiva chega a medula espinhal pelo núcleo do trigêmeo, V par craniano, corre pelo tracto espinotalâmico lateral até o

núcleo talâmico ascendente, terminando no córtex sensório-motor. As fibras nervosas nociceptivas consistem em dois tipos:

- a) fibra A $\delta$  (delta) fina (*thin A $\delta$ -fibres*), mielinizadas, para as percepções agudas, de rápida adaptação e ativação apenas durante a irritação;
- b) fibras C amielínicas, com adaptação lenta, com sensação de estímulo constante, difícil localização e persistente a dor aguda.

As fibras-C amielínicas são caracterizadas pela condução lenta do estímulo nervoso (0,5 m/s), estão envolvidas na fisiopatologia do prurido na pele e da dor, apesar destas sensações possuírem nociceptores distintos. O processo inflamatório da rinite alérgica resulta em recrutamento e ativação de ambos os tipos de fibras, resultando clinicamente em prurido e espirros. Neuropeptídeos produzidos no corpo celular de neurônios fibra-C podem ser transportados em estruturas granulares pelo citoplasma até terminações nervosas no SNC. Isto leva a "sensibilização central", um fenômeno associado a ativação de fibras-C nociceptivas.<sup>13</sup>

### 2.6.2 Rinites e os nervos

Em 1821, em uma dissertação sobre alterações do olfato, Cloquet descreve o sistema nervoso como componente integrado da mucosa nasal.<sup>38</sup> Pesquisas subsequentes vêm mostrando cada vez mais a presença do sistema nervoso na fisiologia nasal e na fisiopatologia de algumas doenças, principalmente as rinites.

O sistema nervoso autônomo atua diminuindo a resistência aérea e aumentando a secreção nasal<sup>3</sup>. A existência de um desbalanço autonômico na rinite idiopática ou vasomotora, com inibição da resposta do sistema nervoso simpático no nariz e hiper-reatividade do sistema parassimpático são demonstrados em alguns estudos.<sup>15,33</sup>

Mudanças na estrutura e função dos nervos (plasticidade neuronal) podem contribuir para a fisiopatologia da rinite alérgica, bem como a resposta a irritantes exógenos e mediadores endógenos.<sup>12,14</sup> Em 1950, surgiu o termo inflamação neurogênica para explicar alguns achados em algumas doenças. Em 2001, Schmelz e Petersen<sup>39</sup> descreveram a vasodilatação e o extravasamento de proteínas após o estímulo nociceptivo na pele de roedores. Em 2008, Misery observou a proximidade de mastócitos e terminações nervosas em tecido pulmonar e Muraki *et al* descreveram

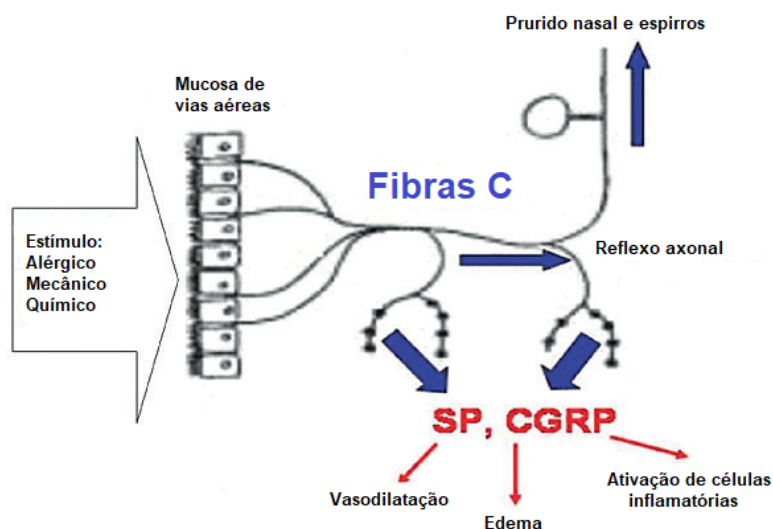
a liberação antidrômica de neuropeptídios através de nociceptores nas vias aéreas causando vasodilatação e edema.<sup>40</sup>

Células imunes e neuronais são encontrados em grande número nas superfícies da barreira da pele e da mucosa e estão em contato próximo entre si formando uma rede celular neuro-imunes.<sup>41</sup> Ambas as células imunológicas e neurais detectam e respondem a ameaças ambientais e estímulos nocivos, incluindo alérgenos.<sup>42</sup> Tais achados sugerem que a comunicação cruzada e a regulação recíproca entre os dois sistemas participam na fisiopatologia das doenças alérgicas.

### 2.6.3 Reflexo axonal

O reflexo axonal (ou *flare response*) é a resposta estimulada por nervos periféricos que correm do corpo celular e ramificações para atingir órgãos alvos. A sinalização começa no meio do axônio no local de estimulação e transmite sinais diretamente ao órgão alvo, ignorando um centro de integração (gânglio) e uma sinapse química, presente no reflexo da medula espinhal. O impulso é limitado a um único axônio bifurcado ou a um neurônio cujo axônio se ramifica em duas divisões e não causa uma resposta geral ao tecido circundante.<sup>39</sup> A Figura 6 ilustra o reflexo axonal.

Figura 6 - Apresentação esquemática da inflamação neurogênica



SP, Substância P; CGRP *Calcitonin Gene-Related Peptide*.  
Fonte: Adaptado de Pfaar (2009)<sup>13</sup>

O arco reflexo axonal é distinto do arco reflexo da medula espinhal. Na via reflexa da medula espinhal, o neurônio aferente transmite a informação aos interneurônios da medula espinhal. Esses interneurônios agem coletivamente, processam o sentido dos estímulos aferentes e estimulam os neurônios eferentes a atuarem/agirem como um centro de integração. Os neurônios eferentes que deixam o centro de integração transmitem uma resposta ao tecido original, onde o reflexo surgiu resultando em uma resposta. O reflexo axonal resulta em uma resposta localizada a apenas as células localmente inervadas do neurônio onde o sinal se originou. O caminho do reflexo axonal não inclui um centro de integração ou sinapse que retransmite a comunicação entre os neurônios da medula espinhal. Portanto, o estímulo é desviado para o órgão efector sem entrar no corpo celular neuronal indicando que o reflexo axonal não é um verdadeiro reflexo onde os impulsos aferentes passam pelo sistema nervoso central antes de estimular os neurônios eferentes.<sup>39</sup>

Na descoberta do reflexo axonal identificou-se que ele ativa as arteríolas locais causando vasodilatação e contração muscular. Essa contração muscular foi observada em pessoas com asma onde os neuropeptídeos liberados levaram a contração do músculo liso na via aérea. Da mesma forma, a liberação de agentes colinérgicos nos terminais nervosos evoca um reflexo axonal que estimula as glândulas sudoríparas induzindo o corpo a suar em resposta ao calor. O reflexo axonal é possível através da transmissão de sinais dos receptores cutâneos na pele. Alguns exemplos de mecanismos mediados por reflexos axonais são prurido, inflamação, dor, asma e circulação dérmica.<sup>39</sup>

Na asma, o reflexo axonal promove a liberação de vários neuropeptídeos, incluindo substância P, neurokinina A e calcitonina, que causam a contração do músculo liso. Na rinite, o estímulo de nociceptores por agentes irritantes (ar frio e seco, capsaicina, bradicinina, poluentes) pode desencadear um reflexo axonal levando à liberação de neuropeptídeos, como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que provocam edema, vasodilatação, maior sensibilização dos nociceptores, recrutamento de células inflamatórias e degranulação de mastócitos.<sup>43,44</sup> Sendo assim, o reflexo axonal apresenta um papel importante nas rinites.

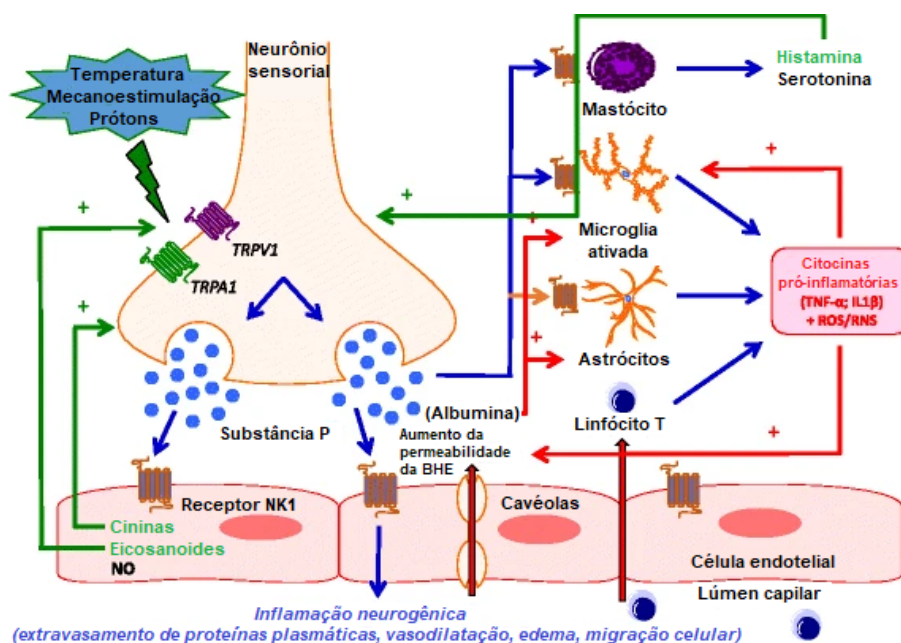
A liberação de peptídeos pelos nervos peptidérgicos induzida por irritantes, através de um reflexo axonal ou reflexo antidrômico, facilita a vasodilatação e

extravasamento de plasma causando edema e hipersecreção glandular neurogênicos. Na rinite não alérgica tal fenômeno desencadeia os sintomas e pioram os sintomas quando presente na rinite alérgica, condição chamada de "rinite mista". A hiperreatividade da parte aferente sensorial ou do arco eferente levam a uma resposta eferente exagerada. A substância P é um neuropeptídeo localizado nas fibras nervosas aferentes abundante ao longo de artérias, algumas veias e glândulas nasais.<sup>15</sup>

#### 2.6.4 Inflamação neurogênica

O termo inflamação neurogênica tem sido adotado para descrever a liberação local de mediadores inflamatórios, como substância P e CGRP pelas terminações periféricas de neurônios aferentes/sensoriais. Foi identificado inicialmente na pele como vasodilatação em resposta ao estímulo nociceptivo<sup>39</sup>, mas atualmente a inflamação neurogênica tem sido identificada por todo corpo.<sup>40</sup>

Figura 7 - Ilustração esquemática sobre a interação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico



NK1, Neurocinina 1; ROS, Espécies Reativas de Oxigênio; TNF $\alpha$ , Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ; TRPA1, *Transient Receptor Potential Ankyrin 1*; TRPV1, *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*.  
Fonte: Adaptado de Corrigan et al. (2016)<sup>45</sup>

A Figura 7 apresenta uma ilustração esquemática da interação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico. A resposta inflamatória causada pela estimulação

de fibras nervosas sensoriais inclui vasodilatação local, extravasamento de plasma, adesão de plaquetas e de leucócitos e degranulação de mastócitos. Entre outras substâncias, os mastócitos liberam histamina, que por sua vez, estimula a liberação de substância P e CGRP, estabelecendo uma relação bidirecional entre a histamina e neuropeptídeos na inflamação neurogênica. Esta relação é reforçada pela presença de receptores para numerosos neuropeptídeos na superfície dos mastócitos (peptídeo intestinal vasoativo (VIP), neuropeptídeo Y, SP, CGRP, pro-opiomelanocortina, *galanin*, *neuromedin U*, *pituitary adenylate cyclase-activating*, neurotensina e *corticotropin-releasing fator*) e pela proximidade de mastócitos e fibras nervosas contendo neuropeptídeos.<sup>40</sup>

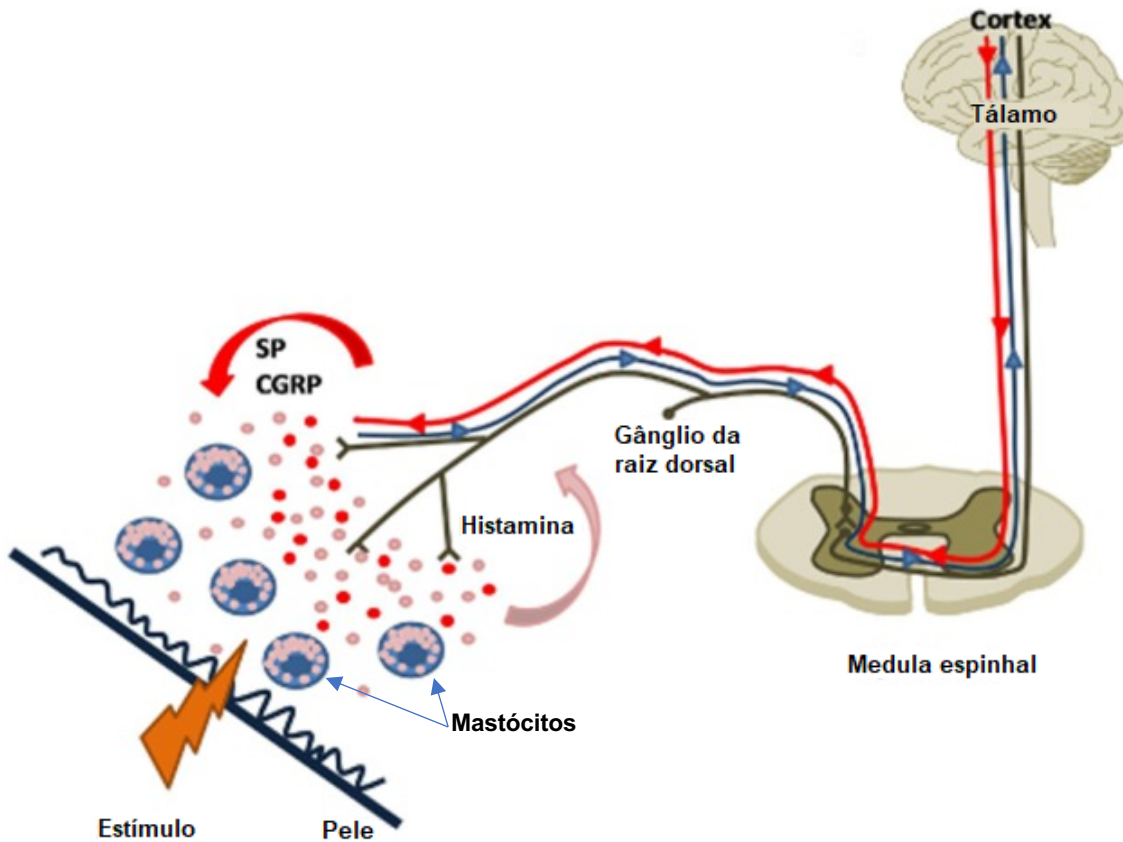
A Figura 6 ilustra os processos envolvidos na “inflamação neurogênica” levando a coceira e espirros. A ativação das fibras C trigeminiais aferentes por vários estímulos, incluindo o contato com o alérgeno, pode resultar em uma liberação eferente da substância P (SP) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) via reflexo axonal. Isso ainda leva à vasodilatação, edema e recrutamento/migração de células inflamatórias.<sup>13</sup>

A histamina tem sido relacionada a nocicepção neuropática e inflamatória. Fibras imunorreativas à histamina foram encontradas na lâmina superficial do corno dorsal, importante local de transmissão nociceptiva. O bloqueio de receptores de histamina foi efetivo na redução de estados de hiperalgesia e alodínia em modelos experimentais.<sup>40</sup>

A sensação de prurido é mediada por fibras nervosas do tipo C amielínicas especializadas, diferentes das fibras C polimodais, uma vez que não respondem a estimulação mecânica. As fibras C sensíveis à histamina constituem 5% das fibras C aferentes dos nervos cutâneos humanos e são caracterizadas pela condução lenta e seus ramos terminais extensos.<sup>46,47</sup>

A fisiopatologia do prurido está representada na Figura 8. A histamina liberada dos mastócitos após um estímulo local ativa os pruriceptores sensíveis à histamina, gerando assim um potencial de ação que ortodromicamente viaja para o corno dorsal da medula espinhal e o tálamo, e para o córtex (linha azul). A estimulação antidrômica seguinte induz a liberação de diferentes mediadores de terminações sensoriais, SP e CGRP. A SP e o CGRP liberados causam mais degranulação dos mastócitos, resultando em vasodilatação (*flare*) e no recrutamento de outros pruriceptores.<sup>40</sup>

Figura 8 - Apresentação esquemática da fisiopatologia do prurido



SP, Substância P; CGRP *Calcitonin Gene-Related Peptide*.

Fonte: Adaptado de Rosa (2013)<sup>40</sup>

Todos os receptores de histamina estão envolvidos na mediação dos sinais neuronais, mas de formas diferentes. Em estudos com bloqueadores destes receptores observou-se que os receptores H1 e H4 estão envolvidos no prurido, mas não o H2. Antagonistas H3 aumentaram de forma importante a ação de coçar em ratos, sugerindo que estes receptores tenham um papel modulatório no prurido.

### 2.6.5 Receptores de Potenciais Transitórios (TRP)

A caracterização dos canais ativados pelos estímulos físicos e químicos tem levado a um melhor entendimento dos mecanismos moleculares e celulares da quimiossensibilidade no sistema trigeminal. Alguns canais sensoriais, especialmente os TRP, exercem um papel significativo na fisiopatologia de alguns tipos de rinites, especialmente as não alérgicas.<sup>15</sup>

Os canais TRP representam um grupo de nociceptores periféricos sempre presentes em todo trato respiratório, que mediam reflexos neurovasculares e tem papéis fisiológicos importantes na detecção e reação a diversos estímulos como mudanças na temperatura, osmolaridade e estresse oxidativo. A regulação da função dos canais TRP pode modificar achados comuns em doenças respiratórias como hipersecreção de muco, inflamação da via aérea, hiperresponsividade assim como remodelamento. A expressão ou atividade dos canais TRP estão alteradas em diversas doenças.<sup>15</sup>

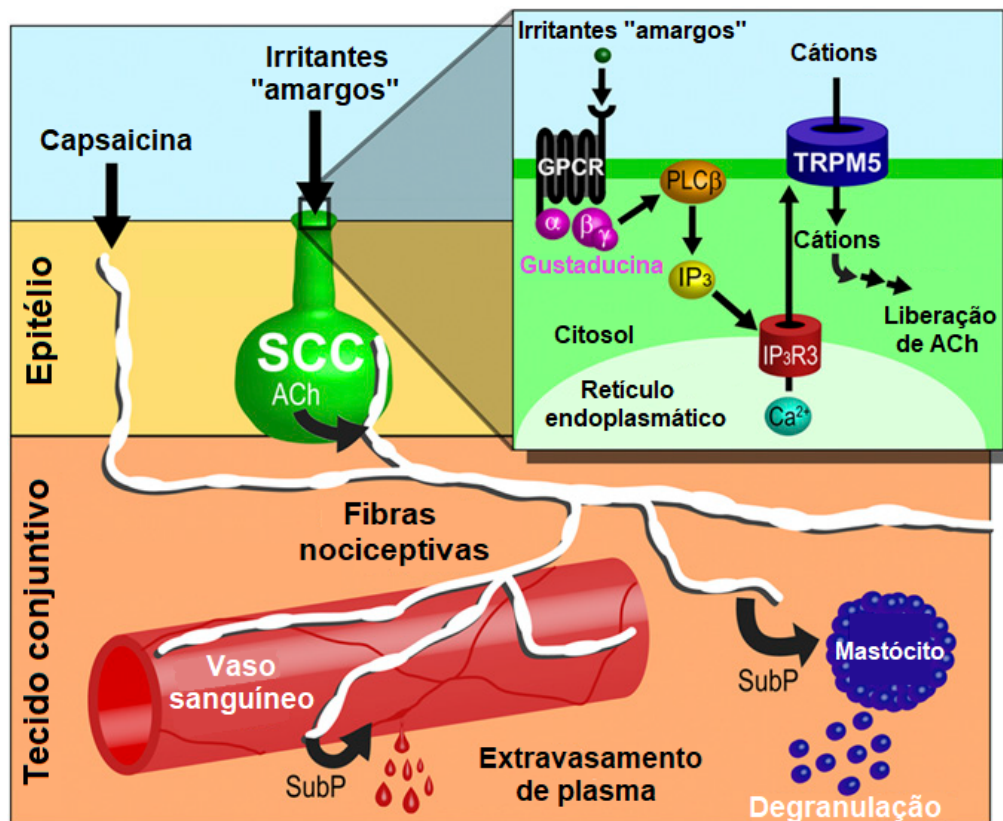
O TRPV1, também conhecido como receptor de capsaicina, é o principal canal TRP envolvido na fisiopatologia da rinite idiopática.<sup>48</sup> A ativação do TRPV1 leva a uma sensação de dor e queimação e não é estática. Com a lesão do tecido e consequente inflamação, mediadores inflamatórios são liberados, como prostaglandinas e bradicinina, que aumentam a sensibilidade dos nociceptores ao estímulo nocivo. Tais alterações podem levar a um estado de hiperalgesia, quando aumenta a sensibilidade a um estímulo doloroso; e alodínea, quando ocorre a sensação de dor a um estímulo não doloroso. O TRPV1 também foi identificado como modulador do prurido.<sup>49</sup> O uso prolongado da capsaicina diminui a atividade do TRPV1 levando ao fenômeno de dessensibilização, onde ocorre um efeito analgésico paradoxal. O uso de um bloqueador de TRPV1 não apresentou efeito sobre os sintomas de pacientes com rinite sazonal submetidos ao teste de provocação com alérgenos.<sup>48</sup> Os achados indicam que o TRPV1 não é um mediador importante nos sintomas da rinite alérgica, mas sim da rinite não alérgica.<sup>49</sup>

O canal *transient receptor potential ankyrin 1* (TRPA1) expressos em neurônios sensoriais fibras-C, inervam a membrana mucosa nasal e são sensores de oxidação em nervos sensoriais terminais. Tais canais iniciam a excitação neuronal e respostas fisiológicas subsequentes mediadas por neuropeptídeos liberados e elevação do cálcio intracelular. Os estímulos deletérios, que incluem frio nocivo, moléculas eletrofílicas reativas produzidas pelo estresse oxidativo e pela inflamação, nicotina e óleo mostarda, ativam esses canais através de modificação proteica covalente. As respostas fisiológicas protetoras a esses estímulos em indivíduos saudáveis incluem rinorréia e aumento da produção de mucina. No entanto, algumas doenças, como na rinite não alérgica onde há o aumento da expressão/atividade do TRPA1 em neurônios nociceptivos, apresentam a sensação exagerada do estímulo nocivo. Esses canais são co-expressos nas membranas mucosas nasais com os canais TRPV1.<sup>15</sup>

As células quimiorreceptoras solitárias ou *solitary chemoreceptor cells* (SCCs), que incluem células sensoriais enriquecida com TRP-melastatin-5 (TRPM5), são células sensoriais importantes e estão distribuídas pela mucosa nasal. Estes receptores fazem sinapse com fibras nervosas trigeminiais e podem responder a irritantes químicos ou sensoriais.<sup>15</sup>

Terminações nervosas livres do nervo trigêmeo estão por todo epitélio respiratório nasal e respondem diretamente a muitos irritantes através dos canais TRP. Outra forma dos irritantes ativarem a via trigeminal é pelos SSCs, presentes em todo epitélio da cavidade nasal, com microvilosidades sensoriais que atingem o lúmen da cavidade nasal e assim tem acesso a irritantes que não podem penetrar a barreira epitelial. Os SSCs usam neurotransmissão colinérgica para ativar nocicepção trigeminal peptidérgica, resultando em uma inflamação local (inflamação neurogênica). Essa inflamação local ocorre através da atividade neural colinérgica e não pela liberação local de mediadores inflamatórios.<sup>44</sup>

Figura 9 - Representação esquemática das vias paralelas para irritação das vias aérea



ACh, Acetilcolina; SCC, *Solitary Chemoreceptor Cells*; SP, Substância P; CGRP *Calcitonin Gene-Related Peptide*; TRPM5 *Transient Receptor Potential Melastatin-5*  
 Fonte: Saunders 2014<sup>44</sup>

A Figura 9 ilustra as vias paralelas para irritação das vias aéreas. Os SCCs respondem a substâncias pungentes como metabólitos bacterianos, por meio da via de transdução do sabor. Os SCCs liberam acetilcolina (ACh), que ativa as fibras do nervo trigêmeo nociceptivo que inervam os SCCs. Essas fibras trigeminais nociceptivas também expressam TRPV1 e TRPA1, dois canais iônicos quimiossensíveis que respondem a irritantes, como a capsaicina. Independentemente de a fibra nociceptiva ser ativada diretamente pelos canais do TRP ou indiretamente pelos SCCs, os terminais colaterais liberam mediadores inflamatórios. Um desses mediadores, a substância P (SP), ativa os receptores nos vasos sanguíneos, resultando em extravasamento de plasma e mastócitos, causando degranulação.<sup>44</sup>

### 2.6.6 Neuropeptídeos e neurotrofinas.

Neurônios aferentes primários do gânglio da raiz dorsal formam uma rede perivascular de fibras ao redor do sistema arterial. Exposição a fatores desencadeantes não alérgicos, como químicos, térmicos ou mecânicos, podem piorar/desencadear a rinite pela ativação de canais TRPA1 e TRPV1 nas fibras nervosas perivasculares da mucosa nasal, que iniciam a liberação de neuropeptídeos como CGRP das terminações nervosas sensoriais.<sup>33</sup>

Quadro 4 - Neuropeptídeos relacionados com sintomas nasais

<p>Fibras amielínicas C:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Taquicininas</li> <li>• CGRP (<i>calcitonin gene-related peptide</i>)</li> <li>• Neuroquinina A</li> <li>• <i>Gastrin-releasing peptide</i></li> </ul>
<p>Terminações nervosas parassimpáticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• VIP (<i>vasoactive intestinal peptide</i>)</li> <li>• <i>Peptide histidine methionine</i></li> </ul>
<p>Terminações nervosas simpáticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuropeptídeo Y</li> </ul>

Fonte: Raap et al. (2010)<sup>12</sup>, Bernstein et al. (2015)<sup>15</sup>

O Quadro 4 relaciona as principais substâncias identificadas em estruturas como vasos, glândulas mucosas e epitélio, além da constatação do potencial de contribuir para o aumento os sintomas nasais.<sup>12,15</sup> Alguns autores sugerem o envolvimento das neurotrofinas na ativação dos nervos sensoriais e das células-alvo principais da resposta inflamatória das vias aéreas superiores. Elas exercem uma variedade de efeitos imunomoduladores sobre as células não neuronais, incluindo eosinófilos e mastócitos, que também produzem neurotrofinas<sup>12</sup>. As principais neurotrofinas envolvidas neste processo são: NGF, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e neurotrofina-3.<sup>12</sup>

#### **2.6.6.1 Fator de crescimento neural**

NGF foi o primeiro membro da família de polipeptídeos neurotrofinas descoberto. A sua produção nos tecidos está correlacionada aos achados no SNC como densidade de inervação, tamanho do corpo celular, ramificação axonal terminal, arborização dendrítica, indução ou inibição dos neuropeptídeos e neurotransmissores. O NGF desempenha um papel fundamental na sobrevivência e função dos neurônios colinérgicos do Complexo Proencefálico Basal. As células do sistema imune hematopoiético também produzem e utilizam esta neurotrofina. O aumento na produção tem sido relatado em tecidos inflamados de pacientes com doenças inflamatórias e autoimunes, mas as razões desta concentração aumentada e como isto afeta as respostas inflamatórias são pouco entendidas. O NGF age sobre as fibras nociceptoras, aumentando a sua atividade e a concentração de substância P e o surgimento de dendritos. Além disso, demonstrou induzir alterações bioquímicas assim como estruturais em nervos que podem levar à hiper-reatividade.<sup>12,27</sup> Neurotrofinas, incluindo NGF e BDNF promovem o crescimento de colônias hematopoiéticas e participam na cicatrização e reparação tecidual, contribuindo para o remodelamento das vias aéreas em condições inflamatórias.<sup>12</sup>

O NGF também é um mediador chave na interlocução entre os sistemas nervoso e o imunológico, influenciando a função das células neuronais e a atividade das células imunológicas. A regulação positiva do NGF descrita em tecidos inflamados de muitas doenças pode regular a inervação e a atividade neuronal de neurônios periféricos, induzindo a liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores imunologicamente ativos, mas também pode influenciar diretamente as respostas

imunes inatas e adaptativas. A expressão dos receptores TrkA e do receptor da neurotrofina p75 (p75NTR) é regulada dinamicamente nas células imunes. Os receptores TrkA e p75NTR são encontrados principalmente no endotélio e na camada basal epitelial. O NGF tem uma variedade de efeitos que podem ser pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios. Esta aparente contradição pode ser explicada considerando o NGF como parte de um mecanismo endógeno que, enquanto ativa as respostas imunes, também ativa as vias necessárias para amortecer a resposta inflamatória e limitar os danos aos tecidos.<sup>27</sup> Alguns autores encontraram o aumento de NGF em pacientes com rinite.<sup>14,50</sup>

### **2.6.6.2 Ubiquitin C-terminal hydrolase L1**

Anteriormente conhecida como produto do gene da proteína (PGP9.5), a UCHL é uma enzima citoplasmática específica para neurônios, representando 1-2% do total das proteínas do cérebro.<sup>51</sup> Esta enzima faz parte da estrutura axonal exercendo papel no transporte axonal.<sup>51</sup> Pode ser detectada nos corpos celulares e nas projeções neurais possuindo forte expressão nos neurônios periféricos e terminações sensoriais<sup>52,53</sup> tornando-se um marcador ideal para estudar as projeções axonais na periferia.<sup>52</sup>

Por ser um marcador pan-neuronal, a UCHL1 é conhecida pela imunohistologia e tem sido utilizada para a visualização das fibras nervosas intraepidérmicas em especial nos processos que comprometem as fibras mielínicas de pequeno calibre e as amielínicas.<sup>53,54</sup> Além disso, é capaz de identificar células endócrinas neuroimunes e pode estar expressa em algumas células não neuronais, como os queratinócitos.<sup>55</sup>

Alguns autores têm usado este marcador para medir a inervação da mucosa nasal no estudo da hipersensibilidade nasal em pacientes com rinite. O número de fibras nervosas positivas para UCHL1 (ou PGP9.5) estava aumentado no epitélio, subepitélio, nas glândulas mucosas mais profundas e regiões dos vasos sanguíneos em pacientes com rinite alérgica.<sup>14,56</sup> Quanto à inervação dos vasos sanguíneos da mucosa nasal, as artérias e anastomoses arteriovenosas exibiam uma inervação mais rica nos indivíduos com rinite do que os vasos sanguíneos dos indivíduos sem rinite.<sup>57</sup> Tais achados sugerem que o aumento da inervação das estruturas da mucosa nasal está relacionado com a fisiopatologia da rinite alérgica.

### 3 METODOLOGIA

Foi utilizado o material coletado na pesquisa (Protocolo de Pesquisa n° 0670/07) "Análise da deposição de colágeno na membrana basal das conchas inferiores de pacientes com rinite alérgica e irritativa" do pesquisador executante Daniel Cauduro Salgado e pesquisador responsável Prof. Dr. Richard Louis Voegels. O material já estava pronto emblocado em parafina.

Um novo projeto foi elaborado e submetido a apreciação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Certificado de Apresentação de Apreciação Ética número 08887712.0.0000.0068, registro on-line número 9215, sendo aprovado sob o parecer número 190.339.

A pesquisa contou com auxílio Fapesp (Projeto de Pesquisa Regular), processo número 2014/12828-6. O processamento do material para a microscopia de luz foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM/59) – Laboratório de Biologia Celular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A digitalização das imagens foi realizada no LIM/59 e no Laboratório de Biologia da Universidade do Vale do Taquari – UNIVATES.

#### 3.1 Casuística

Os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

Grupo 1- Rinite Alérgica (RA):

- a) pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido;
- b) pacientes de ambos os sexos, entre 18 e 50 anos, sem distinção de raça;
- c) pacientes com diagnóstico de rinite persistente há mais de três anos, comprovado por história clínica e exame físico, sem melhora satisfatória após tratamento clínico adequado, mantendo obstrução nasal grau 2 ou

3, segundo escore de sintomas e sinais proposto por Mello Jr<sup>5</sup> detalhado no Quadro 6;

- d) pacientes com indicação para realização de turbinectomia inferior parcial bilateral, associada ou não à septoplastia e que desejaram ser submetidos a este procedimento;
- e) pacientes com teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes positivo (pápula maior ou igual a 3 mm).

#### Grupo 2- Rinite Idiopática (RI):

- a) pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido;
- b) pacientes de ambos os sexos, entre 18 e 50 anos, sem distinção de raça;
- c) pacientes com diagnóstico de rinite persistente há mais de três anos, comprovado por história clínica e exame físico, sem melhora satisfatória após tratamento clínico adequado, mantendo obstrução nasal grau 2 ou 3, segundo escore de sintomas e sinais proposto por Mello Jr<sup>5</sup> detalhado no Quadro 5;
- d) pacientes com indicação para realização de turbinectomia inferior parcial bilateral, associada ou não à septoplastia e que desejaram ser submetidos a este procedimento;
- e) pacientes em que outras etiologias de rinite foram excluídas, como rinite eosinofílica não-alérgica (RENA), gustativa, medicamentosa, hormonal/ gravidez, por drogas e ocupacional por meio da história clínica, exame físico, exame citológico nasal e teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes negativo (pápula menor que 3 mm).

#### **Critérios de exclusão**

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão:

- a) pacientes com outras comorbidades das vias respiratórias, como asma, rinosinusopatia crônica ou polipose nasossinusal, à exceção de desvio de septo nasal;
- b) pacientes com doenças sistêmicas;
- c) tabagistas ou usuários de drogas ilícitas;

- d) pacientes que receberam medicações para rinite, pelo menos, duas semanas antes da operação.

Quadro 5 - Escore de sinais de sintomas nasais

Sintomas	Sinais
<b>Espirros / prurido</b> 0- Ausente 1- 1 a 4 por dia / prurido ocasional 2- 5 a 10 por dia / prurido esporádico por 30 minutos 3- 11 ou mais / interfere com sono e / ou concentração	<b>Coloração das conchas nasais</b> 0- Róseo 1- Avermelhado / rosa pálido 2- Vermelho / pálido 3- Anêmico / azulado
<b>Coriza</b> 0- Ausente 1- Limpeza 1 a 4 vezes ao dia 2- Limpeza 5 a 10 vezes ao dia 3- Limpeza constante	<b>Edema das conchas nasais</b> 0- Ausente 1- Hipertrofia da concha inferior ou média com pequeno bloqueio nasal 2- Congestão comprometendo a respiração em uma ou ambas as fossas nasais 3- Congestão impedindo a respiração em uma ou ambas as fossas nasais
<b>Obstrução nasal</b> 0- Ausente 1- Pequena e não atrapalha 2- Respiração bucal na maior parte do dia 3- Não respira pelo nariz / interfere com sono, olfato ou voz	<b>Secreção</b> 0- Ausente 1- A mucosa parece úmida 2- Secreção visível em conchas ou assoalho da fossa nasal 3- Profusa / drenando
<b>Secreção retro-nasal</b> 0- Ausente 1- Sensação de secreção na garganta 2- Limpeza freqüente da garganta 3- Tosse e incômodo para falar orofaringe	<b>Parede posterior da orofaringe</b> 0- Normal 1- Discretamente vermelha 2- Hiperemiada e folículos linfóides aparentes 3- Muco visível

Fonte: Mello Jr, Mion (2002)<sup>5</sup>

Foram selecionados 15 pacientes com RA e 15 pacientes com RI com indicação de turbinectomia inferior parcial bilateral, associada ou não à septoplastia. Antes da cirurgia, os pacientes foram questionados sobre a idade do início dos sintomas. Os sintomas (espirro/prurido, coriza, obstrução nasal e secreção retro-nasal) também foram questionados e foi preenchido o escore de sintomas de acordo com as respostas de cada paciente. Realizou-se exame físico otorrinolaringológico completo seguido de endoscopia nasal, sendo preenchido o escore de sinais

(coloração, edema, secreção e parede posterior da orofaringe) segundo o Quadro 6. Após esta etapa, todos os pacientes realizaram teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (*prick test*) com antígenos inalatórios (Quadro 7).

Quadro 6 - Antígenos inalatórios testados

Ácaros	- <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> - <i>Dermatophagoides farinae</i> - <i>Blomia tropicalis</i>
Fungos	- <i>Alternaria alternata</i> - <i>Cladosporium herbarum</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i>
Baratas	- <i>Blatella germanica</i> - <i>Periplaneta americana</i>
Antígenos animais	- <i>Canis familiaris</i> - <i>Felis domesticus</i>

### 3.2 Coleta do material

Todas as cirurgias foram realizadas sob anestesia geral, com intubação orotraqueal. Sob visibilização com endoscópio nasal de 0 grau, 4 milímetros, foi feita a vasoconstricção tópica das conchas nasais inferiores por meio de algodões com solução de adrenalina 1:1000, sem infiltração. Foi realizada turbinectomia inferior parcial bilateral com tesoura, seguida de controle hemostático com cauterização do leito cruento das conchas. Os pacientes com desvio de septo nasal foram submetidos a septoplastia, seguindo os princípios e técnicas clássicas.

Como todos os pacientes possuíam indicação de turbinectomia inferior bilateral e seriam operados, não houve risco adicional ao da cirurgia no estudo. Os fragmentos das conchas nasais inferiores foram imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0, por 24 horas, e transferidos para álcool 70° para posterior processamento para estudos morfológicos.

### 3.3 Confeção das lâminas

Os fragmentos das conchas nasais emblocados foram submetidos a dois cortes transversais e um corte longitudinal por sujeito para a confecção das lâminas. Foi feita a coloração pelo método da Hematoxina-eosina para quantificação dos eosinófilos e coloração de azul de toluidina para os mastócitos.

Para obter a melhor marcação, realizou-se a titulação dos anticorpos pela técnica da imuno-histoquímica para NGF e UCHL obtendo-se os valores das concentrações dos respectivos anticorpos descritos no quadro 8. O conhecimento das titulações permite a análise de lâminas com tecido com marcações ideais e uma leitura mais precisa e detalhada.

Quadro 7 - Anticorpos usados na imuno-histoquímica

Anticorpo	Descrição	Fabricante	Titulação
PGP9,5/UCHL	MAB6007 Human UCH-L1 MAb (Clone 671108)	Bio-Techne Minneapolis, MN	1:1000
NGF	AF-256-NA Human beta- NGF Affinity Purified Polyclonal Ab	Bio-Techne Minneapolis, MN	1:20

### 3.4 Quantificação de células inflamatórias

Para a quantificação de células inflamatórias no tecido, foram obtidas imagens digitais com o auxílio do Programa NIS Elements F 3.0; em computador acoplado a um microscópio de luz Nikon Optiphot com câmera de vídeo digital Nikon DXM1200F. Foram obtidas imagens de 12 campos por lâmina utilizando objetiva de 40X. Para quantificação de eosinófilos e mastócitos por área em de cada paciente em estudo, as imagens obtidas foram analisadas utilizando o programa *Image J*, do *National Institute of Health* (NIH), EUA.

Em cada campo, utilizou-se a seleção manual na função *count cells* para obtenção do número de eosinófilos e de mastócitos. Foi obtida a medida da área de tecido em micrometros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ). Estes números foram inseridos em uma planilha e o total de células por área para cada paciente em estudo foi calculado.

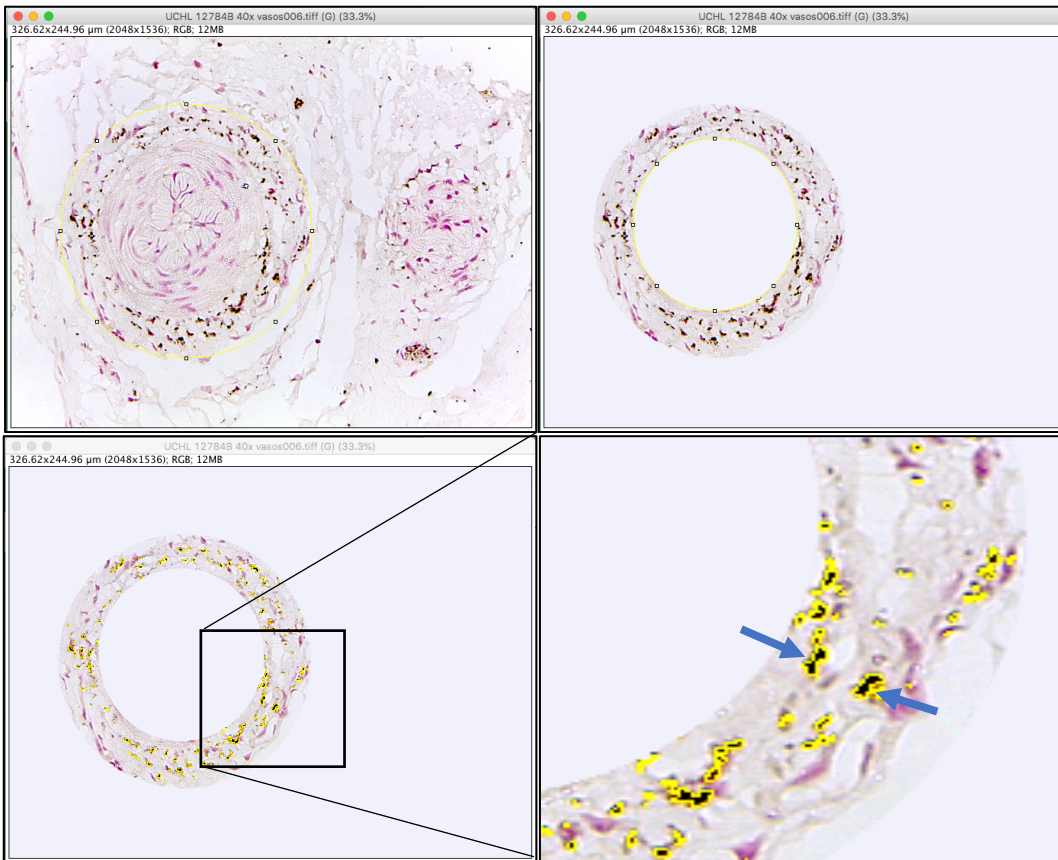
### 3.5 Processamento das imagens e análise

Para análise de imuno-histoquímica, as lâminas foram observadas em microscópio óptico *Leica ICC50 HD*, selecionados os campos fotografados e registrados através do sistema *Leica Acquire* com o auxílio da equipe do Laboratório de Biologia Celular LIM-59. A área viável do tecido de cada lâmina foi dividida pelo número de campos a ser registrado. Os campos registrados foram submetidos à análise no programa *Image-J* NIH, EUA, conforme demonstrado nas figuras 10, 11 e 12.

Em cada corte histológico foram obtidas imagens digitais de 12 campos com intervalos regulares percorrendo toda a extensão do tecido representada, com auxílio do microscópio de luz com objetiva de 40 vezes para o UCHL. Para o estudo do NGF utilizou-se o objetiva de 10 vezes, abrangendo uma área maior, portanto foram obtidas imagens de 5 campos.

Para o estudo do UCHL perivascular foram selecionados 5 a 7 vasos cortados na transversal, medido a área da camada adventícia, conforme exemplo da figura 10. As marcações imuno-histoquímicas foram quantificadas em densidade de área, demonstradas nas Figuras 10, 11 e 12. Para análise das lâminas os avaliadores não tinham acesso aos dados clínicos dos sujeitos.

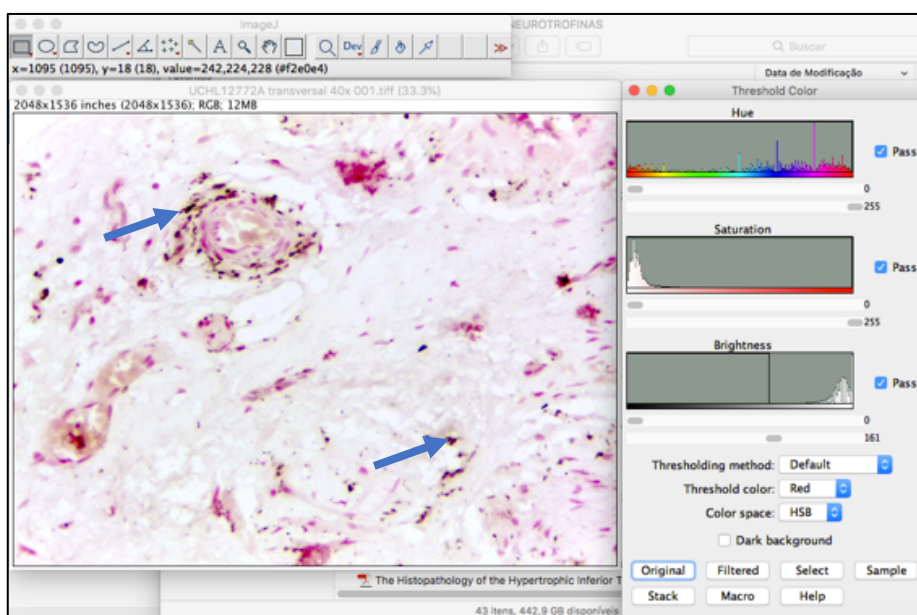
Figura 10 - Imagem ilustrativa da quantificação da inervação perivascular



Fonte: Acervo do autor

As marcações imuno-histoquímicas estão representadas pelas áreas escuras circuladas em amarelo, algumas indicadas pelas setas azuis.

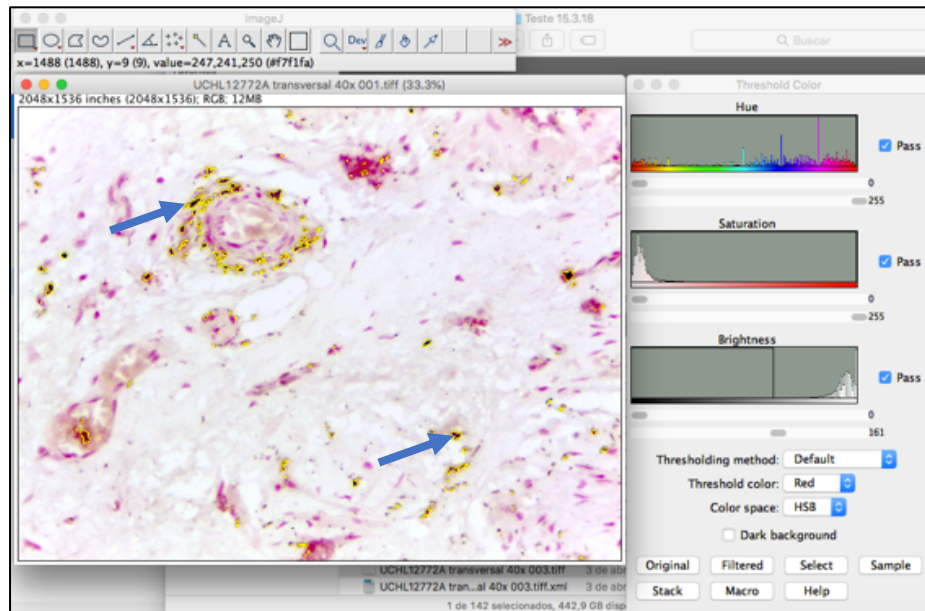
Figura 11 - Imagem ilustrativa da quantificação da inervação perivascular



Fonte: Acervo do autor

Painel do programa *Image-J* mostrando as marcações imuno-histoquímicas, áreas escuras como as indicadas pelas setas azuis.

Figura 12 - Imagem ilustrativa da quantificação da marcação imuno-histoquímica no *ImageJ*



Fonte: Acervo do autor

Painel do programa *Image-J* mostrando as marcações imuno-histoquímicas, áreas escuras circulares em amarelo, como as indicadas pelas setas azuis.

### 3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software R*, versão 4.0.0. Por ser um estudo exploratório, não foi realizado previamente o cálculo de tamanho amostral. Testes de Shapiro-Wilk foram utilizados para a verificação do comportamento dos dados quantitativos quanto à normalidade. Na caracterização da amostra e na comparação entre os grupos de pacientes com Rinite Idiopática e Rinite Alérgica, o teste t de Student foi aplicado para a variável densidade do UCHL tecidual (Shapiro-Wilk:  $W=0,938$ ;  $p$ -valor =  $0,08255$ ), enquanto que para as demais foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Na comparação entre os grupos quanto ao escore de sinais e de sintomas foi utilizada uma extensão do Teste Exato de Fisher. Para a verificação de quais variáveis estariam associadas à gravidade da doença, foi proposto um modelo de regressão linear múltipla. Dentre as variáveis independentes existentes, foi proposta a computação de uma nova variável, denominada de escore parcial. Para essa variável, foram somados os valores correspondentes aos sinais e aos sintomas que apresentaram  $p$ -valor  $\leq 0,10$  (após a correção de Bonferroni) nas análises de

associação individuais. A ideia da computação desse escore foi verificar a contribuição apenas daquelas variáveis que apresentam maior efeito no desfecho analisado. Para tanto, o escore parcial entrou como desfecho e as seguintes variáveis como preditores iniciais: gênero, idade, idade de início da doença, tipos de rinite, UCHL tecidual (densidade), UCHL perivascular (densidade), NGF (densidade), eosinófilos por campo e mastócitos por campo. Para a escolha dos preditores do modelo, foi aplicado o método de seleção stepwise, segundo o Critério de Informação de Akaike (AIC). A avaliação dos resíduos foi realizada através da análise de dispersão dos valores preditos versus os resíduos do modelo de regressão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da amostra

Os grupos de pacientes com Rinite Idiopática e Rinite Alérgica não apresentaram diferença estatística quanto ao gênero, à idade e à idade de início dos sintomas, conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1- Caracterização das amostras de pacientes com Rinite Idiopática e Rinite Alérgica

Variáveis	RI (n=15)	RA (n=15)	p-valor
Gênero <sup>a</sup>			
Mulheres	7	6	1,000
Homens	8	9	
Idade <sup>b</sup>	30,73 ± 8,61	26,13 ± 7,51	0,114
Idade de início <sup>b</sup>	16,60 ± 12,25	9,27 ± 9,59	0,088
UCLH tecidual (densidade) <sup>c</sup>	0,004±0,002	0,005±0,002	0,143
UCLH perivascular (densidade) <sup>b</sup>	0,016±0,007	0,024±0,012	0,074
<b>BNGF (densidade)<sup>b</sup></b>	<b>1,6e-03±1,4e-03</b>	<b>2,0e-03±6,4e-04</b>	<b>0,026*</b>
Eosinófilos por campo <sup>b</sup>	6,0e-06±4,8e-06	8,1e-06±6,1e-06	0,285
<b>Mastócitos por campo<sup>b</sup></b>	<b>3,0e-05±1,8e-05</b>	<b>1,8e-05±1,1e-05</b>	<b>0,026*</b>

RI, Rinite Idiopática; RA, Rinite Alérgica; UCLH, *Ubiquitin C-terminal hydrolase*; NGF, *Nerve Grown Factor*

Variáveis quantitativas estão descritas como média±desvio padrão

<sup>a</sup> Qui-quadrado de Pearson

<sup>b</sup> Teste de Wilcoxon

<sup>c</sup> Teste t de Student

\* p-valor estatisticamente significante

As médias do NGF (densidade) diferiram estatisticamente entre os dois grupos ( $W = 59$ , p-valor = 0,026), bem como as médias dos mastócitos por campo ( $W = 166,5$ , p-valor = 0,026). As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas entre as amostras comparadas.

A variável eosinófilo por campo foi retirada das análises de regressão linear múltipla e logística, pois sua inclusão previamente à aplicação do método de seleção stepwise gerou uma não convergência do algoritmo, levando todas as probabilidades das covariáveis para 1. Analisando a variável eosinófilo por campo em modelos de regressão univariados, ela não apresentou p-valores significativos, nem na regressão linear múltipla ( $B=3,89e+05$ , p-valor= 0,350), nem na regressão logística

( $B=1,86e+04$ ,  $p$ -valor= 0,307). Portanto, optou-se pela não inclusão dessa variável nos modelos completos para a seleção dos preditores.

#### 4.2 Comparação entre os grupos

As médias das pontuações dos grupos, para cada sinal e sintoma avaliado estão na Tabela 2. Na comparação entre os grupos quanto ao escore de sinais e de sintomas, demonstrada na Tabela 3, a pontuação de espirros/prurido foi maior no grupo dos indivíduos com RA. Essa diferença permaneceu após a correção de Bonferroni ( $p$ -valor = 0,015). Em relação à coriza, também maior no grupo dos indivíduos com RA, essa diferença estatisticamente significativa não sobreviveu à correção para múltiplos testes.

Tabela 2 - Média ( $\pm$ Desvio Padrão) da pontuação dos sinais e dos sintomas por tipos de rinite (idiopática e alérgica)

Variáveis	RI	RA
<b>Sintomas</b>		
Espirro/Prurido	1,067(1,033)	2,333(0,900)
Coriza	0,667(0,724)	1,667(0,724)
Obstrução nasal	2,933(0,258)	3,000(0,000)
Secreção retro-nasal	0,600(0,910)	0,867(0,743)
<b>Total de sintomas</b>	<b>5,333(1,952)</b>	<b>7,000(1,699)</b>
<b>Sinais</b>		
Coloração	1,200(0,414)	2,067(0,884)
Secreção	0,133(0,352)	1,333(0,900)
Edema	0,667(0,617)	1,333(0,448)
Orofaringe	0,267(0,458)	0,667(0,617)
<b>Total de Sinais</b>	<b>2,267(1,335)</b>	<b>5,400(2,354)</b>

RI = rinite idiopática; RA = rinite alérgica.

Tabela 3 - Associação entre os sintomas e sinais e os tipos de rinite (idiopática e alérgica)

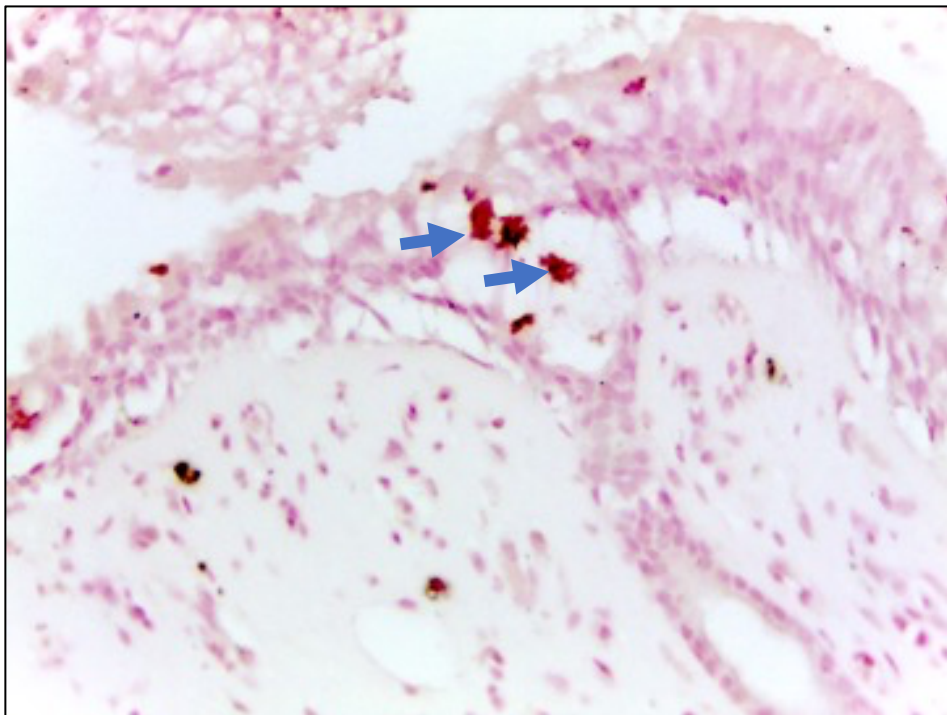
Variáveis	Teste Exato de Fisher	P-valor	p-valor (pós correção de Bonferroni)
<b>Sintomas</b>			
<b>Espirro/Prurido</b>	<b>13,975</b>	<b>0,002</b>	<b>0,015*</b>
Coriza	10,118	0,010	0,079
Obstrução nasal	-	1,000	1,000
Secreção retro-nasal	3,768	0,260	1,000
<b>Sinais</b>			
<b>Coloração</b>	<b>14,618</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005*</b>
<b>Secreção</b>	<b>14,511</b>	<b>0,001</b>	<b>0,004*</b>
Edema	8,785	0,011	0,090
Orofaringe	3,643	0,139	1,000

\*  $p$ -valor estatisticamente significativo pós correção de Bonferroni

Em relação aos sinais, as pontuações da coloração das conchas e de secreção se mostraram associadas aos tipos de rinite, sendo maiores no grupo dos indivíduos com RA. Ambas as associações se mantiveram significantes após a correção de Bonferroni (p-valor = 0,005 e p-valor = 0,004, respectivamente). Já a associação entre edema e os tipos de rinite não sobreviveu à correção para comparações múltiplas.

O NGF foi observado no citoplasma das células inflamatórias distribuídos principalmente pela submucosa, mas com algumas na camada epitelial, conforme mostram as Figuras 13 a 17. Os pacientes com RA apresentaram maior concentração de NGF, conforme demonstrado na Tabela 1.

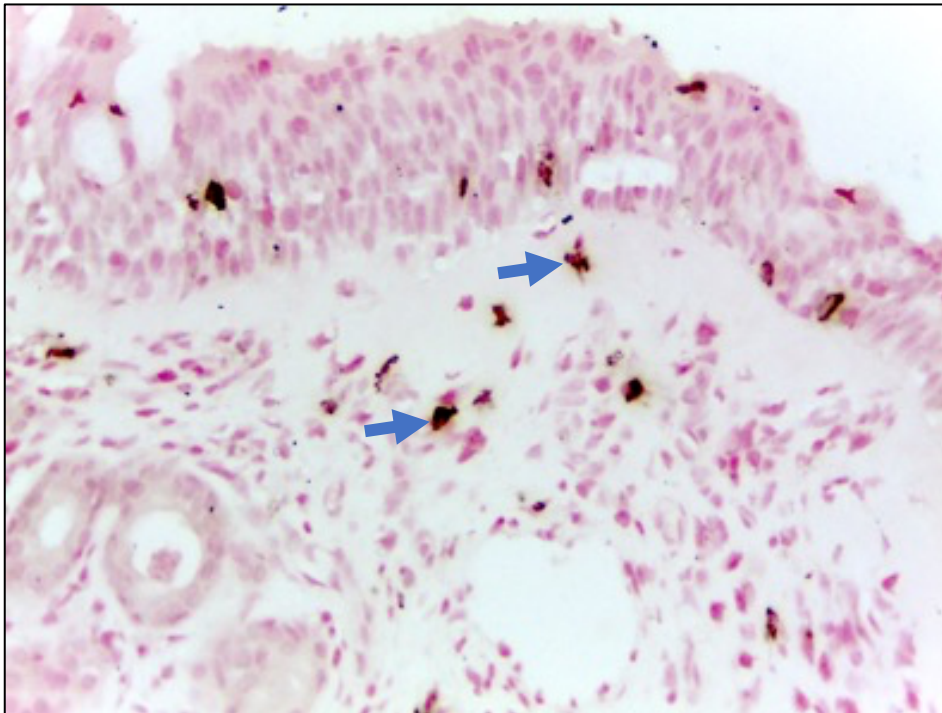
Figura 13 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (objetiva 40x)



Fonte: Acervo do autor

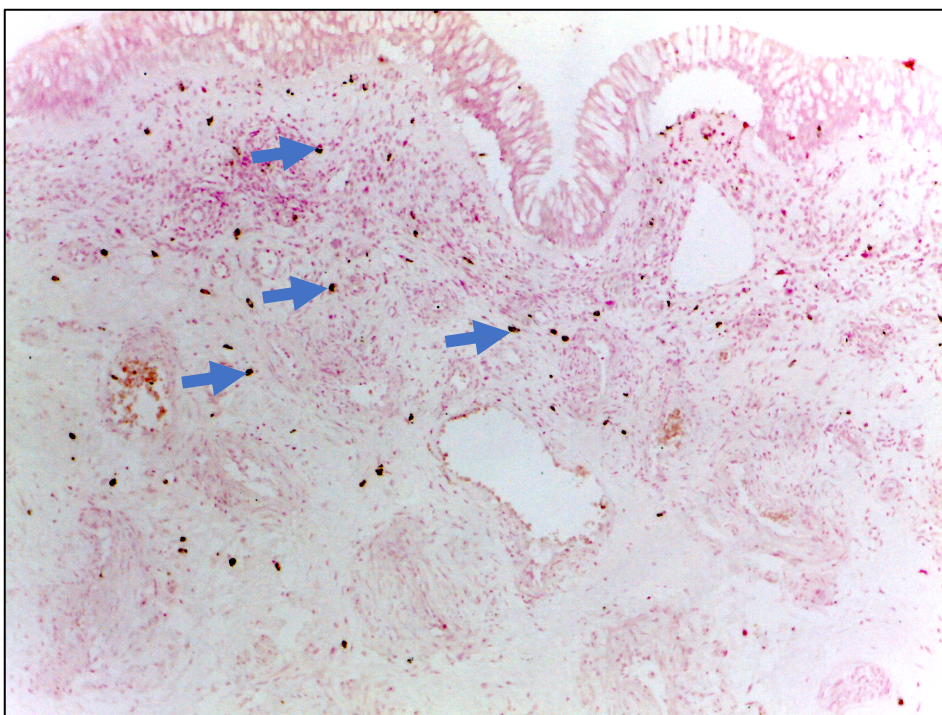
Células inflamatórias com marcação imuno-histoquímica para NGF sinalizadas com setas em azul.

Figura 14 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de em um paciente com Rinite Alérgica (objetiva 40x)



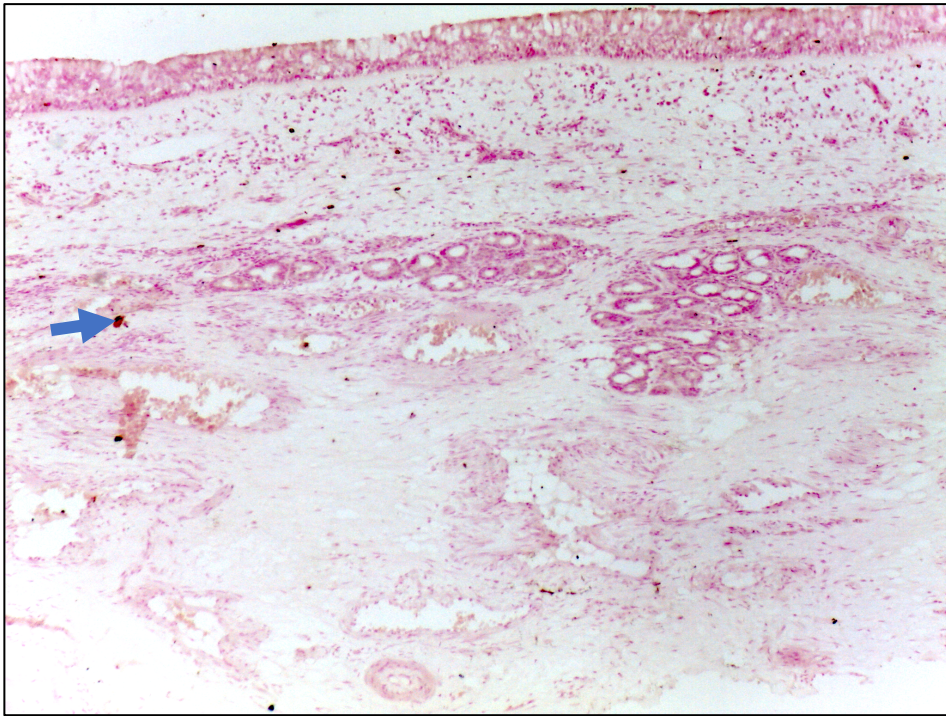
Fonte: Acervo do autor  
Células inflamatórias com marcação para NGF, algumas sinalizadas com setas em azul.

Figura 15 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (objetiva 10x)



Fonte: Acervo do autor  
Células inflamatórias com marcação para NGF, algumas sinalizadas com setas em azul.

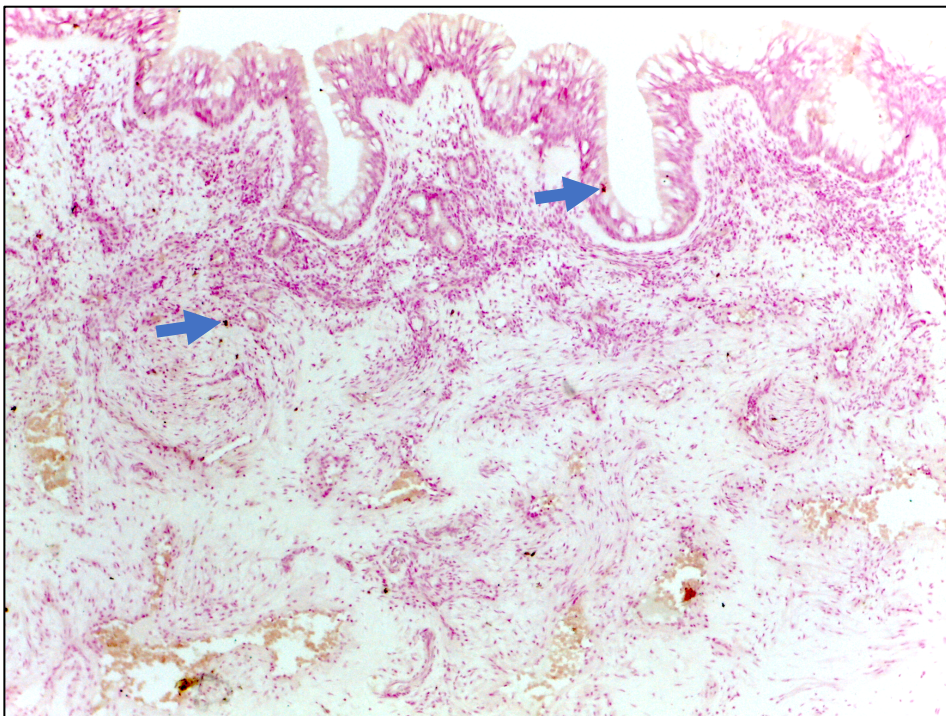
Figura 16 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (objetiva 10X)



Fonte: Acervo do autor

Células inflamatórias com marcação imuno-histoquímica para NGF sinalizada com seta azul.

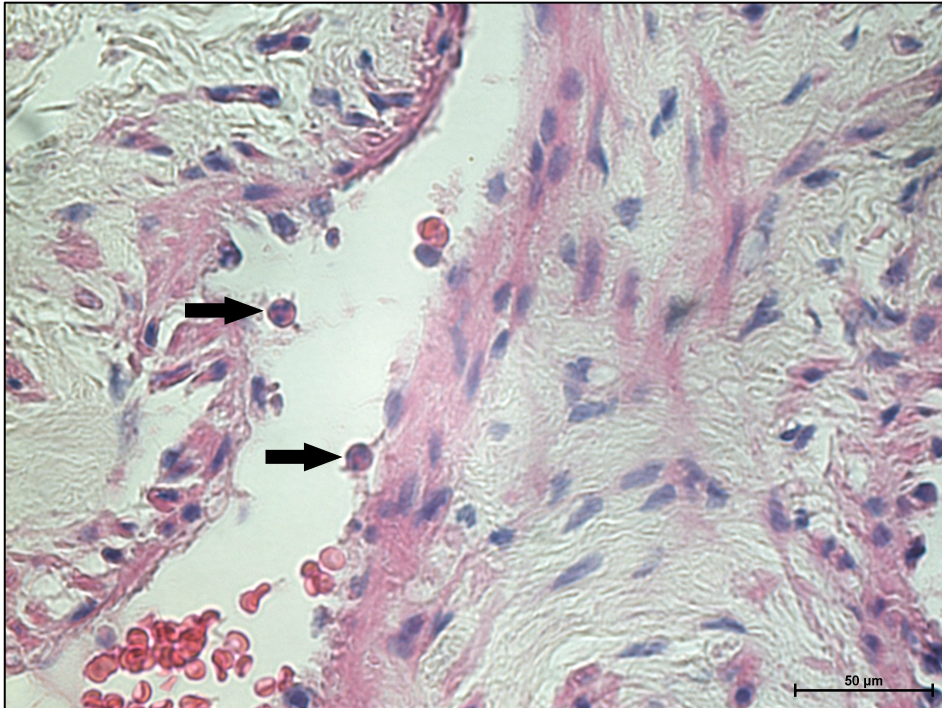
Figura 17 - Fotomicroscopia mostrando a marcação imuno-histoquímica para NGF na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (objetiva 10x)



Fonte: Acervo do autor

Células inflamatórias com marcação imuno-histoquímica para NGF sinalizadas com setas em azul.

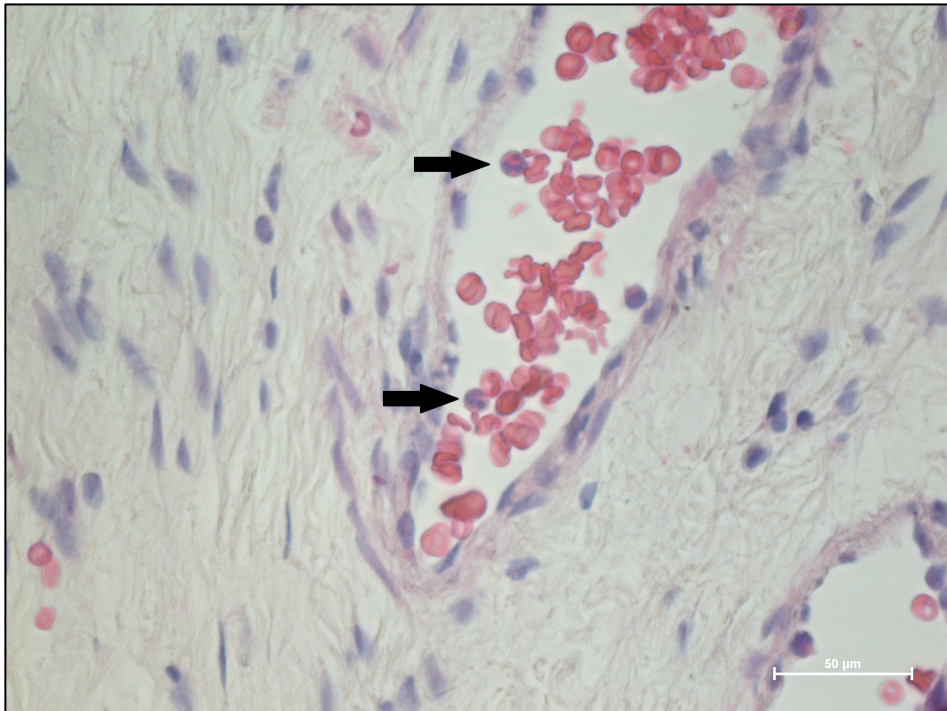
Figura 18 - Fotomicroscopia mostrando eosinófilo na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (coloração HE, objetiva 40x)



Fonte: Acervo do autor  
Eosinófilo na luz vascular, indicado pela seta preta.

Não houve diferença estatística na contagem de eosinófilos por campo entre os grupos. Nas Figuras 18 e 19 notamos a distribuição dos eosinófilos principalmente na luz dos vasos e perivascular.

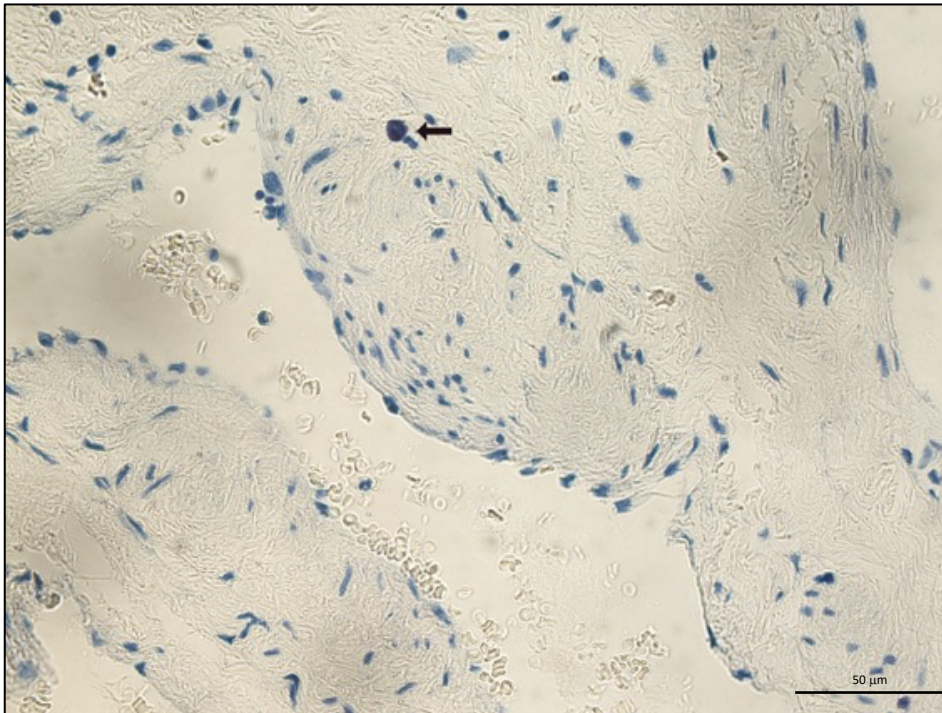
Figura 19 - Fotomicroscopia mostrando eosinófilo na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (coloração HE, objetiva 40x)



Fonte: Acervo do autor  
Eosinófilos na luz vascular, indicados pelas setas pretas.

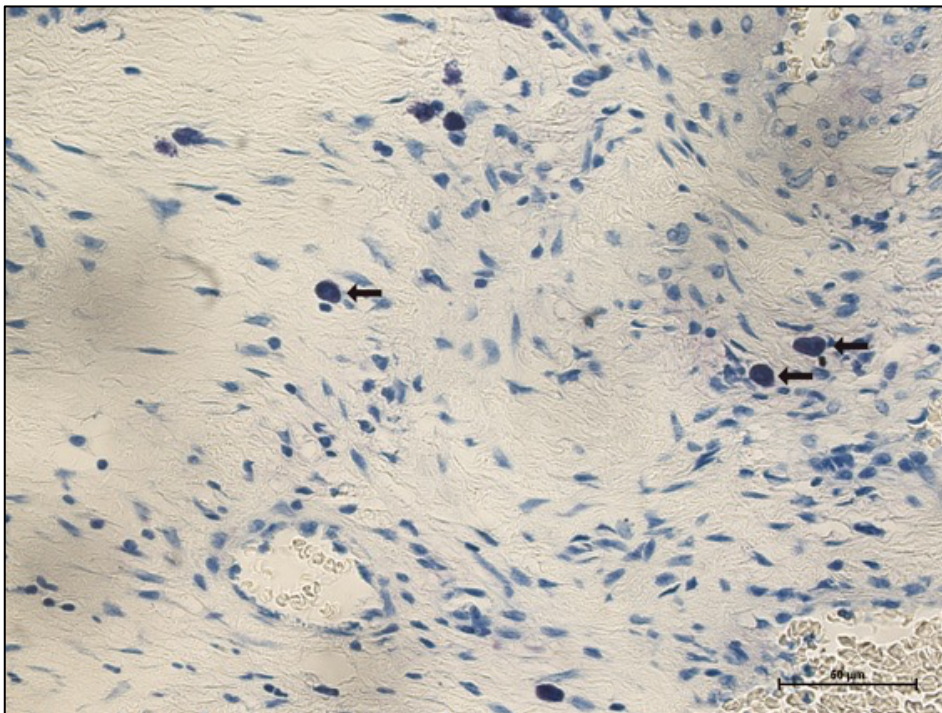
Os mastócitos foram encontrados distribuídos pela submucosa, em maior quantidade nas conchas nasais dos pacientes com RI, conforme ilustram as Figuras 20 e 21.

Figura 20 - Fotomicroscopia mostrando mastócitos na concha nasal de um paciente com Rinite Alérgica (coloração azul de toluidina, objetiva 40x)



Fonte: Acervo do autor  
Mastócito na submucosa, indicado pela seta preta.

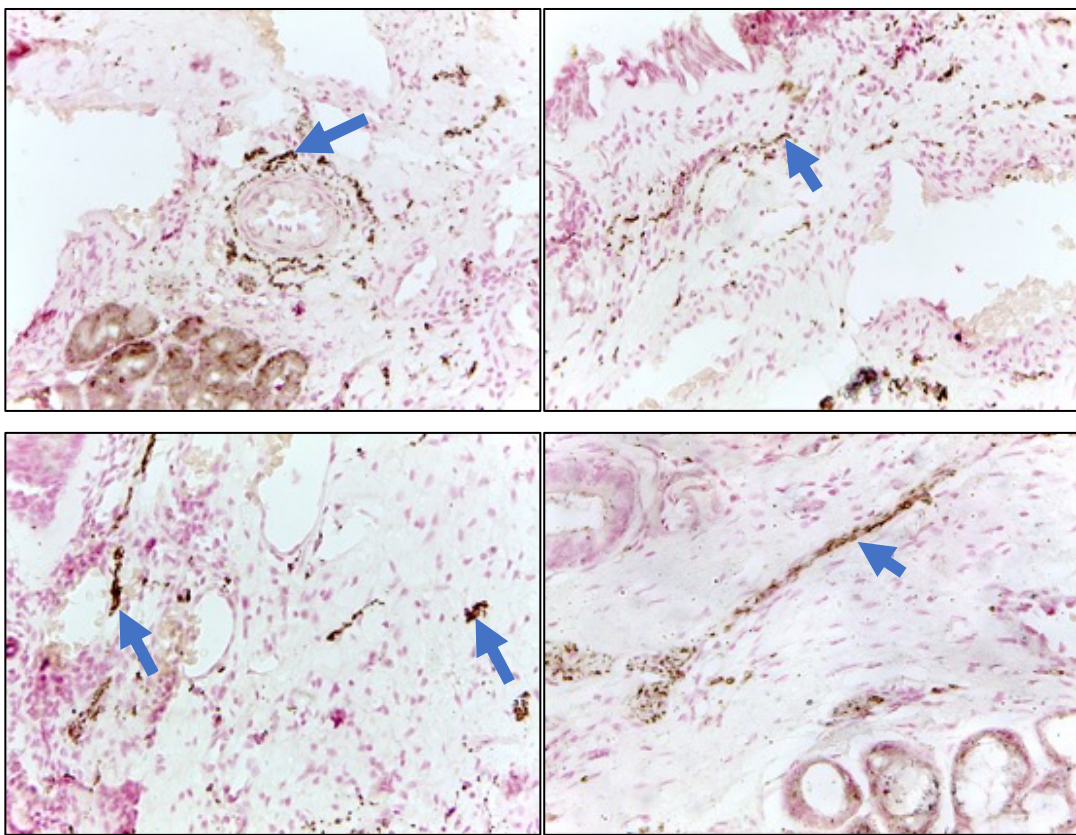
Figura 21 - Fotomicroscopia mostrando mastócitos na concha nasal de um paciente com Rinite Idiopática (coloração azul de toluidina, objetiva 40x)



Fonte: Acervo do autor  
Mastócitos na submucosa, indicados pelas setas pretas.

Não houve diferença estatística entre as médias da densidade de inervação tecidual e perivascular (representados pelo UCHL tecidual e perivascular), conforme demonstrado na Tabela 1. A quantidade de fibras nervosas positivas para UCHL foi maior na região subepitelial, próximo às glândulas mucosas e regiões perivasculares, principalmente artérias e anastomoses arteriovenosas, demonstrado nas Figuras 22 e 23.

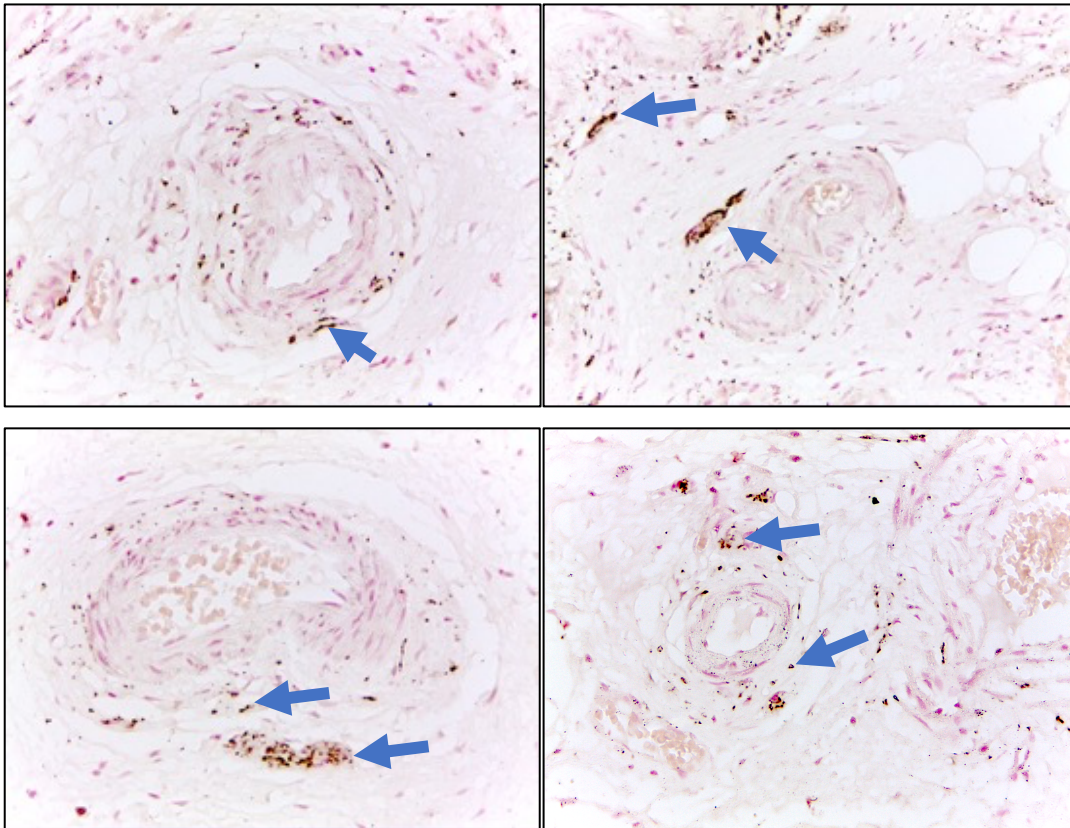
Figura 22 - Fotomicroscopias mostrando a marcação imuno-histoquímica para UCHL nas conchas nasais de indivíduos com Rinite Alérgica (objetiva 40x)



Fonte: Acervo do autor

A marcação imuno-histoquímica para UCHL são as áreas escuras, algumas indicadas pelas setas azuis.

Figura 23 - Fotomicroscopias da marcação muno-histoquímica para UCHL nas conchas nasais de indivíduos com Rinite Idiopática (objetiva de 40x)



Fonte: Acervo do autor

A marcação imuno-histoquímica para UCHL são as áreas escuras, algumas indicadas pelas setas azuis.

#### 4.3 Variáveis associadas à gravidade da doença.

No modelo de regressão linear múltipla para a verificação de quais variáveis estariam associadas à gravidade da doença, os preditores que se mantiveram no modelo de regressão (AIC = 56,88) foram **gênero, tipos de rinite e UCHL perivascular (densidade)**. A variável escore parcial contou com o somatório dos sintomas espirro/prurido e coriza e, dos sinais coloração, secreção e edema. Os betas e os respectivos p-valores estão demonstrados na Tabela 3. Os efeitos dos preditores UCHL perivascular, gênero e tipo de rinite sobre o escore parcial são demonstrados na Figura 24.

Ainda, a regressão apresentou um  $R^2 = 0,62$  e, na verificação da dispersão dos resíduos, não foram encontrados problemas de heterocedasticidade, bem como não foram detectados *outliers* pela análise de resíduos RStudent.

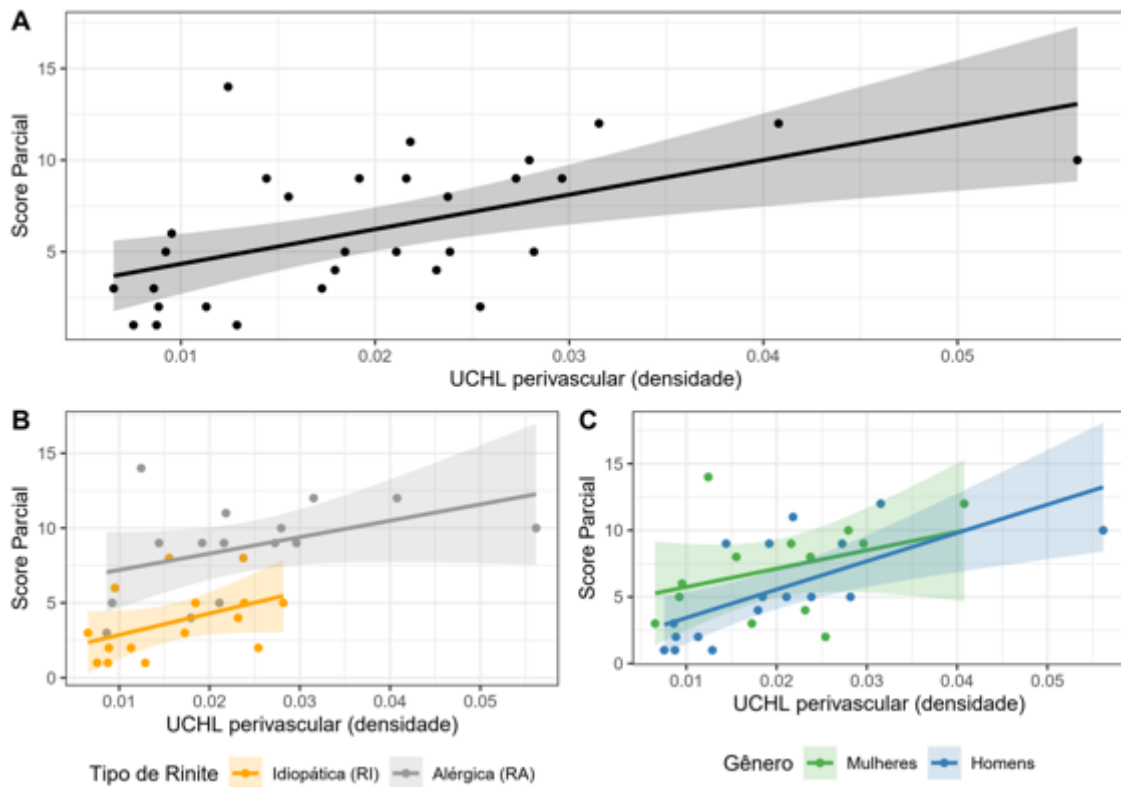
Tabela 4 - Regressão Linear Múltipla da gravidade da doença (escore parcial) com gênero, tipos de rinite e UCHL perivascolar (densidade)

Variáveis	Betas	IC(95%)	p-valor
Gênero	- 1,872	-3,71 – -0,03	0,047*
Tipo de rinite	4,222	2,25 – 6,19	0,0001*
UCHL perivascolar (densidade)	114,147	22,22 – 206,07	0,017*

IC, Intervalo De Confiança; UCHL, *Ubiquitin C-Terminal Hydrolase*.

\* p-valor estatisticamente significativo

Figura 24 - Regressão Linear Múltipla para escore parcial



UCHL, *Ubiquitin C-Terminal Hydrolase*

Regressão Linear Múltipla para escore parcial. **A** Efeito marginal de UCHL perivascolar (densidade) sobre o escore parcial; **B** Efeito de UCHL perivascolar (densidade) sobre o escore parcial por tipo de rinite; **C** Efeito de UCHL perivascolar (densidade) sobre o escore parcial por gênero. É possível observarmos que valores de UCHL perivascolar estão associados a escores parciais mais baixos (Figura 24A), assim como os efeitos dessa variável sobre a gravidade da doença é menor em pacientes com RI (Figura 24B) e em indivíduos do sexo masculino (Figura 24C).

## 5 DISCUSSÃO

Demonstramos neste estudo que o aumento da inervação perivascular na submucosa das conchas nasais está relacionado com maior gravidade da rinite, tanto na RI quanto na RA. Tal achado é corroborado pela presença de maior concentração de NGF (fator de crescimento neural) nas conchas inferiores dos pacientes com RA, justamente o grupo com maior pontuação do escore de sinais e sintomas. Além disso, o NGF foi encontrado em células inflamatórias distribuídos por toda submucosa.

### 5.1 Descritiva da amostra

A ausência de diferença estatística entre os grupos quanto ao gênero, idade e idade de início dos sintomas permitiu uma comparação mais adequada entre eles. Greiwe e Bernstein (2016)<sup>20</sup>, em uma revisão da literatura, descreveu o início dos sintomas das rinites alérgicas durante a infância, enquanto nas não alérgicas o início foi mais tardio, geralmente após os 20 anos. As médias encontradas no presente estudo foi de 9,27 anos para o grupo RA e de 16,6 anos para o grupo RI, porém não houve diferença estatística entre elas.

A avaliação clínica pela pontuação de sinais e sintomas permitiu aferir de forma individualizada cada achado clínico para comparar os grupos. De acordo com os critérios de inclusão, os pacientes possuíam pontuação elevada de obstrução nasal (indicação cirúrgica), portanto foi optado em fazer um ajuste com o escore parcial para aumentar a sensibilidade dos testes estatísticos. Assim como na revisão de Yum et al. (2020)<sup>58</sup> e de Greiwe e Bernstein (2016)<sup>20</sup>, os alérgicos apresentaram sintomas mais intensos.

A alta pontuação de obstrução nasal (indicação de cirurgia/critério de inclusão) reflete na alta pontuação no edema das conchas nos dois grupos. Tal fato pode explicar porque a associação entre edema e os tipos de rinite não sobreviveu à correção para comparações múltiplas.

### 5.2 Metodologia

Geralmente a análise imuno-histoquímica é realizada a partir de material fresco, submetido à congelação. No entanto, utilizamos o material coletado previamente em

outra pesquisa, que estava embocado em parafina. Segundo Lauria et al. (2010)<sup>53</sup>, a fixação de formalina deve ser evitada, pois pode gerar possíveis artefatos que causam uma aparência mais fragmentada das fibras nervosas, embora não afete a medição da densidade de inervação. A padronização descrita por Lauria et al. (2010)<sup>53</sup> é utilizada para contagem de fibras nervosas em neuropatias periféricas e possui um padrão de normalidade pré-estabelecido. Como o objetivo do presente estudo era verificar a densidade de inervação, a comparação entre os grupos e correlacionar com os achados clínicos, não vimos problemas em adotar esta metodologia. Sendo assim foi possível a marcação adequada, tanto das fibras nervosas, quanto do NGF.

### **5.3 Inervação**

Figuroa et al. (1998)<sup>57</sup> identificaram o aumento da inervação vascular no estudo de conchas nasais de crianças com sintomas de rinite, quando comparado com crianças sem rinite, submetidas à amigdalectomia. O grupo de pacientes com rinite não foi avaliado quanto à presença de alergia, nem detalhes da sintomatologia (sintomas predominantes ou intensidade). As artérias e anastomoses arteriovenosas dos indivíduos com rinite apresentaram uma inervação maior do que os vasos sanguíneos daqueles sem rinite.<sup>57</sup>

O'Hanlon et al. (2007)<sup>56</sup> estudaram indivíduos com rinite alérgica e controles sem rinite encontrando fibras nervosas por toda região subepitelial, principalmente em região de glândulas e vascular, com algumas fibras penetrando a região epitelial. A inervação estava muito aumentada nos sujeitos com rinite alérgica, quando comparados aos indivíduos saudáveis.<sup>56</sup>

Keh et al. (2008)<sup>14</sup>, compararam 3 grupos (controle, rinite alérgica e não alérgica) e encontraram fibras nervosas imunorreativas para PGP9.5 distribuídas por todo tecido, principalmente nas regiões subepitelial, glandular e vascular. Os pacientes com rinite, tanto os alérgicos quanto os não alérgicos, apresentaram maior inervação. No presente estudo também encontramos inervação seguindo a mesma distribuição tecidual e perivascular, porém não encontramos diferença entre os grupos.

#### 5.4 NGF

O. Noga et al. (2003)<sup>59</sup> demonstraram que os eosinófilos humanos são capazes de produzir, armazenar e liberar NGF. A literatura apresenta algumas divergências quanto a localização e quanto ao predomínio nos alérgicos ou não alérgicos. No presente estudo o NGF foi encontrado no citoplasma de células inflamatórias na submucosa das conchas e em maior quantidade nos alérgicos, assim como Bresciani et al. (2009)<sup>50</sup>. Poucas células marcadas foram encontradas na camada epitelial. No entanto, Keh et al. (2008)<sup>14</sup> encontraram NGF apenas na camada epitelial de alérgicos e não alérgicos, sendo maior nos não alérgicos.

No estudo de Bresciani et al. (2009)<sup>50</sup>, o NGF foi fortemente expresso na mucosa nasal de indivíduos com rinite alérgica, em células mononucleares da submucosa, preferencialmente em eosinófilos, mastócitos e no citoplasma de células secretoras em estruturas glandulares. A camada de células epiteliais mostrou positividade para NGF no citoplasma das células mucosas e em casos limitados nas células da camada basal.<sup>50</sup>

Gelincik et al. (2012)<sup>60</sup> compararam pacientes com rinite alérgica, rinite idiopática e um grupo controle, sem rinite. Encontraram NGF nos mastócitos da membrana basal do epitélio, na submucosa e região periglandular. A quantidade encontrada de NGF foi maior nos grupos com RA e RI quando comparados ao controle, mas não diferiram entre si. O'Hanlon et al. (2007)<sup>56</sup> comparou rinite alérgica com controles sem rinite e encontrou imunorreatividade para NGF nas células epiteliais, maior nos sujeitos com rinite alérgica.

O presente estudo, assim como a literatura demonstram a presença de NGF nas células inflamatórias da mucosa nasal dos pacientes com rinite. A liberação local desta neurotrofina poderia justificar o aumento da inervação local. Além disso, corrobora o NGF como um importante mediador entre os sistemas nervoso e o imunológico.

#### 5.5 Inervação x sintomas

Quanto a relação entre a inervação e achados clínicos, O'Hanlon et al (2007)<sup>56</sup> demonstraram que quanto maior a inervação nasal, maior a sensibilidade nasal (mucosa nasal/concha inferior). Eles compararam a quantidade de inervação com um

teste de sensibilidade desenvolvido pelos autores. Figueroa et al. (1998)<sup>57</sup> encontraram maior inervação vascular em crianças com sintomas de rinite, quando comparado com crianças sem rinite. Os indivíduos com rinite apresentaram uma inervação maior em artérias e anastomoses arteriovenosas.<sup>57</sup>

Por encontrar maior sensibilidade e fibras nervosas penetrando o epitélio, o estudo de O'Hanlon et al (2007)<sup>56</sup> sugere maior inervação aferente (sensitiva) na rinite alérgica. A presença de maior inervação perivascular nos pacientes com rinite na pesquisa de Figueroa et al. (1998)<sup>57</sup> sugere maior inervação eferente. No presente estudo a quantidade de inervação perivascular foi relacionada com maior gravidade da doença. Esses achados fornecem evidências de que uma inervação maior da mucosa nasal, incluindo os nervos eferentes e aferentes, pode contribuir para os sintomas das rinites.

## 5.6 Eosinófilos

No presente estudo não houve diferença em relação aos eosinófilos teciduais. O eosinófilo é a principal célula inflamatória envolvida no quadro de rinite alérgica, porém ela pode estar presente na rinite eosinofílica não alérgica. Gelardi et al. (2008)<sup>22</sup> descreveram os subtipos de rinites não alérgicas inflamatórias baseado nas células predominantes encontradas no exame citológico nasal. Foram definidos três tipos principais de rinite não alérgica inflamatória (*NAR*): *NAR* infiltrada por eosinófilos (*NARES*), por mastócitos (*NARMA*) e por neutrófilos (*NARNE*). Um tipo particular foi caracterizado com infiltração por eosinófilos e mastócitos (*NARESMA*). Portanto, o grande número de eosinófilos no grupo com RI poderia ser explicado pela possível presença de tais subtipos de rinites não alérgicas, não detectados no exame citológico realizado.

O que também pode ter contribuído para isso é o fato de não ter sido feito a pesquisa para rinite alérgica local com teste de provocação nasal com alérgenos específicos. Em uma revisão, Vardouniotis et al. (2020)<sup>30</sup> encontraram a probabilidade de rinite alérgica local em 10,2% a 24,7% dos pacientes com pesquisa para IgE específica sérica ou teste cutâneo negativos.

Gelardi et al. (2008)<sup>22</sup>, também verificaram que os subtipos de rinites não alérgicas onde os eosinófilos estavam presentes (*NARES E NARESMA*) a queixa de obstrução nasal era mais intensa, inclusive resultando em pior qualidade de vida. Tais

achados foram confirmados por Corso et al. (2014)<sup>61</sup>, encontrando também um maior risco para comorbidades como asma e intolerância ao ácido acetilsalicílico. Sendo assim, o eosinófilo é um mediador importante nas rinites não alérgicas também e é um fator de mau prognóstico. Considerando estes achados podemos inferir que os pacientes do presente estudo, por apresentarem obstrução nasal importante com indicação cirúrgica, poderiam apresentar maior quantidade de células inflamatórias na mucosa das conchas. Talvez uma pesquisa com um número maior de indivíduos possa demonstrar alguma diferença entre os alérgicos e os não alérgicos.

### **5.7 Mastócitos**

A literatura também mostrou algumas divergências quanto ao predomínio dos mastócitos nas rinites. Como o mastócito geralmente está envolvido nos quadros alérgicos, esperava-se que a quantidade encontrada fosse maior no grupo RA. Keh et al. (2008)<sup>14</sup> encontraram mastócitos distribuídos, principalmente pela região subepitelial, em maior quantidade nos alérgicos quando comparados aos não alérgicos e ao grupo controle. Gelincik et al. (2012)<sup>60</sup> encontraram a contagem de mastócitos maior nos grupos com RA e RI quando comparados ao controle, mas não diferiram entre si. No presente estudo encontramos um número maior de mastócitos no grupo RI. Tais achados sugerem que os mastócitos têm um papel importante na fisiopatologia da rinite idiopática também.

Gelardi et al. (2008) também verificaram que os pacientes com predomínio de eosinófilos e mastócitos (NARESMA) tiveram piores índices de qualidade de vida e estava relacionado com maior obstrução nasal. Devido aos critérios de inclusão adotados (obstrução nasal persistente), no presente estudo não encontramos relação entre a quantidade de células inflamatórias e a gravidade da doença.

A limitação do estudo, por motivos éticos, foi a necessidade de incluir apenas pacientes com indicação cirúrgica das conchas nasais. Portanto, apresentavam obstrução nasal intensa, o que dificulta a correlação deste sintoma com os achados histológicos. Pesquisas que consigam avaliar a histologia das conchas nasais de pacientes com diferentes graduações de obstrução nasal poderão contribuir para o melhor entendimento desta relação.

## 6 CONCLUSÕES

Concluimos que os pacientes com RA apresentaram maior quantidade de NGF na mucosa nasal quando comparados a pacientes com RI. Os mastócitos foram encontrados em maior quantidade nas conchas nasais dos pacientes com RI. Não encontramos diferença entre os grupos quanto as fibras nervosas e os eosinófilos.

O NGF é encontrado em células inflamatórias distribuídos por toda submucosa. As fibras nervosas estão distribuídas pela região subepitelial, próximo às glândulas mucosas e regiões perivasculares.

A inervação perivascular na submucosa das conchas nasais tem relação direta com a gravidade da rinite, tanto na RI quanto na RA.

## REFERÊNCIAS\*

1. Wise SK, Lin SY, Toskala E, et al. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Allergic Rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2018;8(2):108-352. doi:10.1002/alr.22073
2. Papadopoulos NG, Bernstein JA, Demoly P, et al. Phenotypes and endotypes of rhinitis and their impact on management: A PRACTALL report. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2015;70(5):474-494. doi:10.1111/all.12573
3. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008\*. *Allergy.* 2008;63:8-160. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x
4. Sakano E, Solé D, Cruz AA, et al. IV Consenso Brasileiro sobre Rinites 2017. *Doc conjunto da Assoc Bras Alerg e Imunol Assoc Bras Otorrinolaringol e Cir Cérvico-Facial e Soc Bras Pediatr.* 2017:1-43.  
<http://www.aborlccf.org.br/secao.asp?s=3>.
5. Mello Jr JF, Mion O. Rinite Alérgica. In: Campos CAH, Costa HO de O, eds. *Tratado de Otorrinolaringologia. Sociedade Brasileira de Otorrinolaringologia.* Vol 3. 1st ed. São Paulo: Roca; 2002:68-87.
6. Hellings PW, Klimek L, Cingi C, et al. Non-allergic rhinitis: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy.* 2017;72(11):1657-1665. doi:10.1111/all.13200
7. Eifan AO, Durham SR. Pathogenesis of rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2016;46(9):1139-1151. doi:10.1111/cea.12780
8. Papadopoulos NG, Guibas G V. Rhinitis Subtypes, Endotypes, and Definitions. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2016;36(2):215-233.  
doi:10.1016/j.iac.2015.12.001
9. Muraro A, Lemanske RF, Hellings PW, et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis - PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1347-1358. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.010
10. Bernstein JA, Hastings L, Boespflug EL, Allendorfer JB, Lamy M, Eliassen JC.

---

\* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- Alteration of brain activation patterns in nonallergic rhinitis patients using functional magnetic resonance imaging before and after treatment with intranasal azelastine. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011;106(6):527-532. doi:10.1016/j.anai.2011.02.014
11. Van Gerven L, Steelant B, Hellings PW. Nasal hyperreactivity in rhinitis: A diagnostic and therapeutic challenge. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2018;73(9). doi:10.1111/all.13453
  12. Raap U, Braunstahl G-JJ. *The Role of Neurotrophins in the Pathophysiology of Allergic Rhinitis.* Vol 10. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; 2010:8-13. doi:10.1097/ACI.0b013e328334f5de
  13. Pfaar O, Raap U, Holz M, Hörmann K, Klimek L. Pathophysiology of itching and sneezing in allergic rhinitis. *Swiss Med Wkly.* 2009;139(3-4):35-40. doi:smw-12468
  14. Keh SM, Facer P, Simpson KD, Sandhu G, Saleh HA, Anand P. Increased Nerve Fiber Expression of Sensory Sodium Channels Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9 in Rhinitis. *Laryngoscope.* 2008;118(4):573-579. doi:10.1097/MLG.0b013e3181625d5a
  15. Bernstein JA, Singh U. Neural abnormalities in nonallergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15(4):18. doi:10.1007/s11882-015-0511-7
  16. Brożek JL, Bousquet J, Agache I, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):950-958. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.050
  17. Kaliner MA. Classification of Nonallergic Rhinitis Syndromes With a Focus on Vasomotor Rhinitis, Proposed to be known henceforth as Nonallergic Rhinopathy. *World Allergy Organ J.* 2009;2(6):98-101. doi:10.1097/WOX.0b013e3181a9d55b
  18. Hellings PW, Fokkens WJ, Bachert C, et al. Positioning the principles of precision medicine in care pathways for allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis – A EUFOREA-ARIA-EPOS-AIRWAYS ICP statement. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2017;72(9):1297-1305. doi:10.1111/all.13162
  19. Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2013;41(2):73-85. doi:10.1016/j.aller.2012.03.001

20. Greiwe J, Bernstein JA. Nonallergic Rhinitis: Diagnosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016;36(2):289-303. doi:10.1016/j.iac.2015.12.006
21. Sin B, Togias A. Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. In: *Proceedings of the American Thoracic Society*. Vol 8. Proc Am Thorac Soc; 2011:106-114. doi:10.1513/pats.201008-057RN
22. Gelardi M, Maselli Del Giudice A, Fiorella ML, et al. Non-allergic rhinitis with eosinophils and mast cells constitutes a new severe nasal disorder. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(2):325-331. doi:10.1177/039463200802100209
23. Varricchi G, Marone G. Mast cells: Fascinating but still elusive after 140 years from their discovery. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2). doi:10.3390/ijms21020464
24. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*. 2020;58:1-464. doi:10.4193/Rhin20.600
25. Theoharides TC, Valent P, Akin C. Mast cells, mastocytosis, and related disorders. Ingelfinger JR, ed. *N Engl J Med*. 2015;373(2):163-172. doi:10.1056/NEJMra1409760
26. Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev*. 2018;282(1):168-187. doi:10.1111/imr.12622
27. Minnone G, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L. NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):1028. doi:10.3390/ijms18051028
28. Jordakieva G, Jensen-Jarolim E. The impact of allergen exposure and specific immunotherapy on circulating blood cells in allergic rhinitis. *World Allergy Organ J*. 2018;11(1). doi:10.1186/s40413-018-0197-0
29. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/9095275
30. Vardouniotis A, Doulaptsi M, Aoi N, Karatzanis A, Kawauchi H, Prokopakis E. Local Allergic Rhinitis Revisited. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020;20(7). doi:10.1007/s11882-020-00925-5
31. Altintoprak N, Kar M, Bayar Muluk N, et al. Update on local allergic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016;87:105-109. doi:10.1016/j.ijporl.2016.06.008
32. Kaliner MA. Nonallergic Rhinopathy (Formerly Known as Vasomotor Rhinitis).

- Immunol Allergy Clin North Am.* 2011;31(3):441-455.  
doi:10.1016/j.iac.2011.05.007
33. Baroody FM. Nonallergic Rhinitis: Mechanism of Action. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2016;36(2):279-287. doi:10.1016/j.iac.2015.12.005
  34. Segboer CL, Holland CT, Reinartz SM, et al. Nasal hyper-reactivity is a common feature in both allergic and nonallergic rhinitis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2013;68(11):1427-1434. doi:10.1111/all.12255
  35. Gray H. *Gray's Anatomy*. 20th ed. (Lewis W, ed.). Philadelphia: Lea and Febiger; 1918.
  36. Zhang EZ, Tan S, Loh I. Botulinum toxin in rhinitis: Literature review and posterior nasal injection in allergic rhinitis. *Laryngoscope.* 2017;127(11):2447-2454. doi:10.1002/lary.26616
  37. Sapci T, Yazici S, Evcimik MF, et al. Investigation of the effects of intranasal botulinum toxin type a and ipratropium bromide nasal spray on nasal hypersecretion in idiopathic rhinitis without eosinophilia. *Rhinology.* 2008;46(1):45-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444492>. Accessed December 7, 2017.
  38. Hippolyte Cloquet. *Osphrésiologie; ou, Traité des odeurs, du sens et des organes de l'olfaction: avec l'histoire détaillée des maladies du nez et des fosses nasales et des opérations qui leur conviennent.* 1821.  
<https://books.google.cd/books?id=E9REAAAcAAJ>. Accessed October 4, 2020.
  39. Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic Inflammation in Human and Rodent Skin. *Physiology.* 2001;16(1):33-37. doi:10.1152/physiologyonline.2001.16.1.33
  40. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol.* 2013;170(1):38-45. doi:10.1111/bph.12266
  41. Nassenstein C, Krasteva-Christ G, Renz H. New aspects of neuroinflammation and neuroimmune crosstalk in the airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(5):1415-1422. doi:10.1016/j.jaci.2018.09.011
  42. Breiteneder H, Diamant Z, Eiwegger T, et al. Future research trends in understanding the mechanisms underlying allergic diseases for improved patient care. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2019;74(12):2293-2311. doi:10.1111/all.13851
  43. Van Gerven L, Boeckxstaens G, Jorissen M, Fokkens W, Hellings PW. Short-

time cold dry air exposure: A useful diagnostic tool for nasal hyperresponsiveness. *Laryngoscope*. 2012;122(12):2615-2620. doi:10.1002/lary.23495

44. Saunders CJ, Christensen M, Finger TE, Tizzano M. Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(16):6075-6080. doi:10.1073/pnas.1402251111
45. Corrigan F, Mander KA, Leonard A V., Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):1-12. doi:10.1186/s12974-016-0738-9
46. Shim WS, Oh U. Histamine-induced itch and its relationship with pain. *Mol Pain*. 2008;4:29. doi:10.1186/1744-8069-4-29
47. Raap U, Ständer S, Metz M. Pathophysiology of itch and new treatments. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011;11(5):420-427. doi:10.1097/ACI.0b013e32834a41c2
48. Holland C, van Drunen C, Denyer J, et al. Inhibition of capsaicin-driven nasal hyper-reactivity by SB-705498, a TRPV1 antagonist. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;77(5):777-788. doi:10.1111/bcp.12219
49. Van Gerven L, Alpizar YA, Wouters MM, et al. Capsaicin treatment reduces nasal hyperreactivity and transient receptor potential cation channel subfamily V, receptor 1 (TRPV1) overexpression in patients with idiopathic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1332-1339, 1339.e1-3. doi:10.1016/j.jaci.2013.08.026
50. Bresciani M, Lalibertè F, Lalibertè MF, Gramiccioni C, Bonini S. Nerve growth factor localization in the nasal mucosa of patients with persistent allergic rhinitis. *Allergy*. 2009;64(1):112-117. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01831.x
51. Wang KKW, Kobeissy FH, Shakkour Z, Tyndall JA. Thorough overview of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 and glial fibrillary acidic protein as tandem biomarkers recently cleared by US Food and Drug Administration for the evaluation of intracranial injuries among patients with traumatic brain injury. *Acute Med Surg*. 2021;8(1). doi:10.1002/ams2.622
52. Dalsgaard CJ, Rydh M, Hægerstrand A. Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. *Histochemistry*. 1989;92(5):385-390. doi:10.1007/BF00492495
53. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, et al. European Federation of Neurological

- Societies/Peripheral Nerve Society guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Ner. *J Peripher Nerv Syst.* 2010;15(2):79-92. doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00269.x
54. Van Acker N, Ragé M, Sluydts E, et al. Automated PGP9.5 immunofluorescence staining: A valuable tool in the assessment of small fiber neuropathy? *BMC Res Notes.* 2016;9(1):280. doi:10.1186/s13104-016-2085-4
  55. Kupczyk P, Reich A, Gajda M, et al. UCHL1 /PGP 9.5 Dynamic in Neuro-Immune-Cutaneous Milieu: Focusing on Axonal Nerve Terminals and Epidermal Keratinocytes in Psoriatic Itch. *Biomed Res Int.* 2018;2018:13. doi:10.1155/2018/7489316
  56. O'Hanlon S, Facer P, Simpson KD, Sandhu G, Saleh HA, Anand P. Neuronal markers in allergic rhinitis: Expression and correlation with sensory testing. *Laryngoscope.* 2007;117(9):1519-1527. doi:10.1097/MLG.0b013e3180ca7846
  57. Figueroa JM, Mansilla E, Suburo AM. Innervation of Nasal Turbinate Blood Vessels in Rhinitic and Nonrhinitic Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(6):1959-1966. doi:10.1164/ajrccm.157.6.9709019
  58. Yum HY, Ha EK, Shin YH, Han MY. Prevalence, comorbidities, diagnosis, and treatment of non-allergic rhinitis: real-world comparison with allergic rhinitis. *Clin Exp Pediatr.* August 2020. doi:10.3345/cep.2020.00822
  59. Noga O, Englmann C, Hanf G, Grutzkau A, Seybold J, Kunkel G. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(5):649-654. doi:10.1046/j.1365-2222.2003.01586.x
  60. Gelincik A, Aydın F, Özerman B, et al. Enhanced nerve growth factor expression by mast cells does not differ significantly between idiopathic and allergic rhinitis. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2012;108(6):396-401. doi:10.1016/j.anai.2012.04.006
  61. de Corso E, Battista M, Pandolfini M, et al. Role of inflammation in non-allergic rhinitis. *Rhinology.* 2014;52(2):142-149. doi:10.4193/Rhin

## APÊNDICE – Metodologia Técnica

Após a cirurgia os fragmentos das conchas nasais inferiores foram imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0, por 24 horas, e transferidos para álcool 70° para posterior processamento para estudos morfológicos. Os materiais já fixados, foram desidratados em gradiente alcoólico (95° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Dos blocos contendo os fragmentos foram obtidos cortes de 5µm em micrótomo Leica RM2245, esticados em banho maria a 37°C e colhidos em lâminas silanizadas.

Para a coloração pelo método da Hematoxilina-eosina os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (100° a 70°) e água e corados durante 1 minuto pela Hematoxilina de Harris. Os cortes foram então lavados em água corrente e contracorados com eosina durante dez minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95° e 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e *entellan* para análise microscópica.

### Imuno-histoquímica

Para obter a melhor marcação, realizou-se a titulação dos anticorpos pela técnica da imuno-histoquímica obtendo-se os valores das concentrações dos respectivos anticorpos descritos no quadro 8. O conhecimento das titulações permite a análise de lâminas com tecido com marcações ideais e uma leitura mais precisa e detalhada.

Cortes de conchas nasais de pacientes com rinite foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 5 minutos e depois em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4 (PBS).

A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada por alta temperatura em citrato pH 6 para Beta NGF e UCHL. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 10v (3%), em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e deixadas em tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS). O bloqueio

das proteínas inespecíficas foi feito com Ultra V Block (THERMO Scientific) por 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos foram diluídos nas seguintes concentrações: UCHL 1:1000 e Beta NGF 1:20.

As lâminas foram incubadas overnight à 4°C em câmara úmida. Posteriormente foi feita a incubação com o anticorpo secundário Polímero ImPRESS HRP Polymer (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos em estufa 37 graus. Foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Adrich Steinheim, Alemanha). Posteriormente ocorreu a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

## ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

##### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Composição Neural Da Mucosa Nasal Dos Cornetos Inferiores De Pacientes Com Rinite Alérgica E Não Alérgica
- .....
- PESQUISADOR: Prof. Dr. Richard Louis Voegels.....
- CARGO/FUNÇÃO: ..Livre Docente... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº . 69967.....
- UNIDADE DO HCFMUSP: ..Disciplina de Otorrinolaringologia.....
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: ... 01 ano.....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável.....

Rubrica do pesquisador.....

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:**

Estudar um funcionamento neural em uma parte do nariz (concha inferior), que sempre é retirada na cirurgia para rinite e obstrução nasal (turbinectomia).

**2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:**

Todos os pacientes vão ser operados com anestesia geral, ou seja, vão dormir durante toda a cirurgia. Não vai ser feito nenhum corte na área externa do nariz, operando-se somente por dentro, através das narinas. O septo nasal desviado (torto) vai ser corrigido e as conchas nasais, que são muito grandes nos pacientes com rinite, vão ter o seu tamanho diminuído, assim melhorando a passagem do ar pelo nariz. O material que é retirado na cirurgia (conchas nasais), de rotina, vai para análise com microscópio. Neste estudo, além desta análise normal, vai ser feita uma avaliação mais detalhada do material.

**3. Desconfortos e riscos esperados:**

A pesquisa não oferece desconforto ou risco adicional, porque a cirurgia vai ser feita da mesma maneira que já estava indicada para cada paciente, ou seja, todos os pacientes já tinham indicação para esta cirurgia e nada vai ser feito de diferente na cirurgia por causa do estudo. A única diferença vai ser a análise mais detalhada da parte do nariz que é retirada com a cirurgia (conchas nasais). Os exames pré-operatórios são os mesmos que todos os casos de rinite do Hospital das Clínicas fazem.

**4. Benefícios que poderão ser obtidos:**

Entender melhor como funcionam as alterações do nariz causadas pela rinite.

**5- Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:**

Todos os pacientes que vão fazer a cirurgia não tiveram melhora após vários tratamentos com remédios e a cirurgia é a melhor opção neste momento, não havendo procedimentos alternativos vantajosos. A cirurgia vai ser realizada com técnicas bem estabelecidas e com o uso dos equipamentos mais modernos que existem para este tipo de cirurgia como endoscópios e câmeras.

**6- Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Richard Louis Voegels que pode ser encontrado no endereço Av. Dr Enéas Carvalho Aguiar 255, Prédio dos Ambulatórios 6º andar, bloco 6, Ambulatório de Otorrinolaringologia. Telefone: 3069-6286.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável\_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador\_\_\_\_\_

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br)

7 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

8 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

9 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

***Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?***

***(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.***

***(....) NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.***

O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável\_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador\_\_\_\_\_

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Composição Neural Da Mucosa Nasal Dos Cornetos Inferiores De Pacientes Com Rinite Alérgica E Não Alérgica"

Eu discuti com o Dr. Richard Louis Voegels sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----

Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----

Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

## ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq



**Hospital das Clínicas da FMUSP**  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** ESTUDO TRANSVERSAL: COMPOSIÇÃO NEURAL DA MUCOSA NASAL DOS CORNETOS INFERIORES DE PACIENTES COM RINITE ALÉRGICA E NÃO ALÉRGICA.

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Richard Louis Voegels **Versão:** 1  
**Pesquisador Executante:** Thiago Carvalho **CAAE:** 08887712.0.0000.0068  
**Co-autores:** Prof. Dr. João Ferreira de Mello Junior, Prof. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini  
**Finalidade Acadêmica:** Doutorado  
**Instituição:** HCFMUSP  
**Departamento:** OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Registro on-line:** 9215

**Número do Parecer:** 190.339

**Data da Relatoria:** 30/01/2013 *ad-referendum*

**Apresentação do Projeto:** Mudanças na estrutura e função dos nervos (plasticidade neuronal) podem contribuir para a fisiopatologia da rinite alérgica, bem como a resposta a irritantes exógenos e mediadores endógenos. Alguns autores sugerem o envolvimento das neurotrofinas na ativação dos nervos sensoriais e das células-alvo principais da resposta inflamatória das vias aéreas superiores. Elas exercem uma variedade de efeitos imunomoduladores sobre as células não neuronais, incluindo eosinófilos e mastócitos, que também produzem neurotrofinas. As principais neurotrofinas envolvidas neste processo são: NGF (nerve growth factor) e BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Keh et al mostrou que o aumento dos níveis dos canais sensoriais de sódio nas rinites alérgica e não alérgica pode contribuir para o estado de hipersensibilidade, independentemente do grau de inflamação ativa. Os canais de sódio dependentes de voltagem estão na base da geração e propagação do potencial de ação. Neurônios nociceptivos expressam vários subtipos do canal NaV1 que podem contribuir para a hiperexcitabilidade, característica dos estados de dor crônica. O fator de crescimento neural (NGF-nerve growth factor) foi a primeira neurotrofina descoberta, seguida do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofinas 3, 4 e 5. O mecanismo de ação NGF depende do receptor pan-neurotrofina p75 (NTR), de baixa afinidade e especificidade, desempenha um duplo papel, promovendo a hiperreatividade dos nervos sensoriais e inflamação das vias aéreas. A expressão destes receptores está aumentada nos eosinófilos do sangue periférico dos indivíduos alérgicos, quando comparado aos não alérgicos. Produto proteico do gene 9.5

(PGP 9.5) é um marcador pan-neuronal conhecido pela imunohistologia e tem sido utilizado para demonstrar a presença de neurônios nos tecidos. Na rinite alérgica, o número de fibras nervosas positivas para PGP 9.5 estava aumentado no epitélio, subepitélio, e nas glândulas mucosas mais profundas e regiões dos vasos sanguíneos. A literatura recente tem mostrado o aumento da função neural na mucosa nasal dos indivíduos com rinite alérgica através de neurotrofinas, fibras nervosas e canais de sódio, relacionando com a hipersensibilidade inespecífica. No entanto, faltam pesquisas que relacionem a quantidade destes marcadores com a intensidade dos sintomas e poucos estudos avaliaram indivíduos com rinite não alérgica.

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar  
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 1b, 17, 18 | [marcia.carvalho@hc.fm.usp.br](mailto:marcia.carvalho@hc.fm.usp.br)