

**Daniel Cauduro Salgado**

**Distribuição de colágeno na concha nasal inferior de pacientes com  
rinite alérgica ou 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

São Paulo

2014

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Salgado, Daniel Cauduro

Distribuição de colágeno na concha nasal inferior de pacientes com rinite  
alérgica ou idiopática / Daniel Cauduro Salgado. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Richard Louis Voegels.

Descritores: 1.Colágeno 2.Membrana basal 3.Remodelação das vias aéreas  
4.Rinite 5.Mucosa nasal

USP/FM/DBD-266/14

## Dedicatória

Aos meus pais, **Fabio e Cristina**, por todo amor, carinho, suporte e compreensão.

Aos meus irmãos, **Felipe e Fabio**, por todo apoio e amizade.

Aos meus avós, **Ésio e Maria do Carmo, Antônio e Dione**, por todos os ensinamentos e carinho.

A minha namorada, **Hevelin**, pela paciência e por me fazer tão feliz.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Richard Louis Voegels**, pela oportunidade de concluir essa etapa em minha carreira. Minha gratidão pela confiança e incentivo.

Ao **Dr. João Ferreira de Mello Júnior**, pela oportunidade de participar do Grupo de Rinite do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, além de todos os ensinamentos, apoio e amizade.

À **Prof. Dra. Élia Garcia Caldini**, pela oportunidade de realizar esse estudo no Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Minha eterna gratidão pela orientação, suporte e amizade.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de ingressar nessa 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 concluir essa etapa da minha carreira.

Ao **Dr. Olavo de Godoy Mion**, por todo auxílio oferecido no Grupo de Rinite e por todos os ensinamentos.

Ao **Dr. Marcelo Alves Ferreira**, pela grande ajuda na análise estatística e na redação deste trabalho.

À **Dra. Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues**, pelo auxílio com as lâminas e análise microscópica.



Ao **Thiago Carvalho**, pela amizade e companheirismo que se iniciou durante a pós-graduação.

A todos do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59), **Valéria, Gisele, Gildásio, Íris, Cláudia, Elnara, Adão, Miriam, Cecília, Margarida e Ângela**, que tanto contribuíram e me auxiliaram nesse trabalho.

À **Marilede, Marcia, Luci e Adílson**, pelo apoio de extrema importância.

A **todos assistentes e ex-residentes** da Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A todos **assistentes e ex-residentes** do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo que me incentivaram a seguir meus estudos.

A toda **minha família e meus amigos** que compreenderam minha ausência em decorrência do trabalho. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

A todos os **pacientes** que participaram de forma voluntária desse estudo.

## Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

## Sumário

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Normalização Adotada .....	vi
Lista de Símbolos .....	ix
Resumo .....	x
Summary .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Mucosa nasal.....	6
2.1.1 Colágenos.....	7
2.1.2 Glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas .....	11
2.1.3 Matriz extracelular laminar e intersticial.....	12
2.2 Alterações da mucosa nasal na rinite.....	14
2.3 Alterações da membrana basal da mucosa nasal na rinite.....	15
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Aspectos éticos e local de realização do estudo .....	20
4.2 Casuística .....	20
4.3 Investigação de sintomas e sinais .....	21
4.4 Teste cutâneo de hipersensibilidade imediata.....	22
4.5 Técnica cirúrgica.....	23
4.6 Preparação do material para análise histológica e morfométrica....	24
4.6.1 Processamento do material para microscopia de luz.....	24
4.6.1.1 Coloração pela Hematoxilina-eosina e identificação histopatológica .....	24
4.6.1.2 Coloração pelo Picrossírius-hematoxilina e identificação das fibras colagênicas.....	24
4.6.2 Processamento do material para microscopia eletrônica .....	25
4.6.3 Processamento do material para imunoistoquímica.....	26
4.7 Estudo do colágeno da matriz extracelular intersticial.....	27
4.7.1 Análise quantitativa das fibras colagênicas .....	27

4.7.2	Análise qualitativa das fibras colagênicas .....	27
4.7.3	Análise ultraestrutural do colágeno .....	28
4.8	Análise morfométrica da espessura da membrana basal.....	29
4.9	Análise estatística.....	30
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
5.1	Caracterização da amostra .....	32
5.2	Sintomas e sinais.....	33
5.3	Análise das fibras colagênicas na lâmina própria.....	34
5.3.1	Análise qualitativa em microscopia de luz.....	34
5.3.2	Análise quantitativa em microscopia de luz.....	36
5.3.3	Avaliação da lâmina própria em microscopia eletrônica.....	36
5.3.4	Associação entre o tempo de doença e quantidade de colágeno na lâmina própria .....	37
5.4	Análise dos colágenos da membrana basal.....	38
5.4.1	Análise qualitativa em microscopia de luz.....	38
5.4.2	Análise quantitativa em microscopia de luz.....	38
5.4.3	Associação entre a espessura da membrana basal e a intensidade da doença .....	39
5.4.4	Associação entre a espessura da membrana basal e o tempo de doença.....	39
5.4.5	Avaliação qualitativa e quantitativa da membrana basal em microscopia eletrônica.....	40
5.4.6	Análise imunoistoquímica da lâmina basal.....	43
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## Lista de Símbolos

**nm** nanômetro

**μm** micrômetro

## Resumo

Salgado DC. Distribuição de colágeno na concha nasal inferior de pacientes com rinite alérgica ou idiopática [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

**INTRODUÇÃO:** Embora seja reconhecida a existência do espessamento da membrana basal e da fibrose da concha nasal na rinite alérgica, não há estudos descritivos do comportamento da mucosa nasal nos pacientes com rinite idiopática. O propósito desse estudo é descrever possíveis alterações na membrana basal e na lâmina própria da concha nasal inferior em pacientes com rinite alérgica ou idiopática, além do estudo quantitativo das fibras colágenas nesta localização. **MÉTODOS:** Analisou-se na concha nasal inferior obtida através de turbinectomia bilateral em 28 pacientes - 14 com rinite alérgica e 14 com rinite idiopática - a área ocupada pelo colágeno, a espessura da membrana basal e o diâmetro das fibrilas de colágeno através do uso de microscopia óptica (coloração Hematoxilina-eosina e Picrossírius-hematoxilina), microscopia eletrônica e imunistoquímica para laminina e colágeno IV. **RESULTADOS:** 1) pacientes com rinite alérgica apresentaram significativamente maior área da concha nasal ocupada por colágeno do que o grupo com rinite idiopática. 2) a membrana basal de pacientes com rinite alérgica foi significativamente mais espessa. 3) a lâmina reticular da membrana basal dos pacientes com rinite alérgica apresentaram fibrilas de colágeno com menor diâmetro que os pacientes com rinite idiopática. 4) não houve diferenças significativas entre os grupos na distribuição de laminina e de colágeno IV. **CONCLUSÕES:** Alterações na mucosa nasal ocorrem na rinite alérgica, sendo caracterizadas pelo aumento da espessura da membrana basal e por fibrose. Na rinite idiopática, observou-se uma mucosa com aspecto estrutural semelhante aos pacientes normais.

**Descritores:** Colágeno; Membrana basal; Remodelação das vias aéreas; Rinite; Mucosa nasal.

## Summary

Salgado DC. Collagen distribution in the inferior nasal concha in patients with allergic or idiopathic rhinitis [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

**INTRODUCTION:** Despite our knowledge about nasal conchae fibrosis and basement membrane thickening in allergic rhinitis, there are no descriptive studies on nasal mucosa behavior in patients with idiopathic rhinitis. The aim of our study was to describe possible changes in the basement membrane and lamina propria of the inferior concha in patients with idiopathic or allergic rhinitis, in addition to a quantitative study of collagen fibers in this site. **METHODS:** The inferior nasal concha obtained from 28 patients submitted to bilateral turbinectomy was examined - 14 with allergic rhinitis and 14 with idiopathic rhinitis; analyzing the collagen area, the basement membrane thickness and the collagen fibrils diameter using optical microscopy (Hematoxylin-eosin and Picrosirius-hematoxylin staining), electron microscopy and immunohistochemistry for laminin and collagen IV. **RESULTS:** 1) patients with allergic rhinitis had a significantly larger area of the nasal concha occupied by collagen than the group with idiopathic rhinitis. 2) the basement membrane of patients with allergic rhinitis was significantly thicker. 3) the reticular lamina of the basement membrane of patients with allergic rhinitis had collagen fibrils with diameters which were smaller than those from patients with idiopathic rhinitis. 4) there were no significant differences between the groups concerning the distribution of laminin and collagen IV. **CONCLUSIONS:** Alterations to the nasal mucosa that happen in allergic rhinitis are characterized by basement membrane thickening and fibrosis. In idiopathic rhinitis the patients' mucosae were structurally similar to those from normal patients.

**Descriptors:** Collagen; Basement membrane; Airway remodelling; Rhinitis; Nasal mucosa.

## **1. INTRODUÇÃO**



Clinicamente, a rinite é definida como a somatória dos seguintes sintomas: rinorréia, obstrução nasal, prurido e espirros, que ocorrem por mais de dois dias consecutivos e por mais de uma hora na maior parte dos dias (Bousquet et al., 2008).

Existem vários tipos de rinite que podem ser divididos em dois grandes grupos: infecciosas e não infecciosas. As rinites infecciosas virais são o grupo de maior prevalência. As rinites não infecciosas, por sua vez, classificam-se em alérgicas e não alérgicas. As alérgicas tem um alérgeno como agente causador, enquanto que as não alérgicas têm diferentes etiologias e se classificam em rinite idiopática, hormonal, medicamentosa e outras não alérgicas.

A obstrução nasal constitui o sintoma mais comum da rinite. Sabe-se que a obstrução nasal é ocasionada pela hipertrofia das conchas nasais (decorrente da inflamação crônica da mucosa que se torna edemaciada) associada à rinorréia e aumento na produção de muco (Ciprandi et al., 2008a, Kim et al., 2010).

A rinite alérgica (RA) é definida como uma inflamação eosinofílica da mucosa nasal e dos seios paranasais resultante de uma reação mediada por IgE provocada por um alérgeno (Bousquet et al., 2008). Os relatos de sua prevalência são muito variados, provavelmente pela utilização de diferentes métodos nos estudos epidemiológicos. Segundo uma pesquisa realizada em oito países da América Latina, a prevalência da rinite alérgica no Brasil é de 8,8% (Neffen et al., 2010).

A RA foi direta e significativamente associada com alterações hipertróficas crônicas da mucosa mesmo em crianças pequenas: um estudo comparativo, envolvendo 255 crianças de 6 anos de idade, mostrou que as crianças com RA eram irresponsivas ao teste com descongestionante (Chawes et al., 2009).

Já a rinite idiopática (RI), conhecida no passado como rinite vasomotora, faz parte do grupo das rinites não alérgicas e ainda não possui sua fisiopatologia completamente elucidada. O diagnóstico da RI é de exclusão baseado na indeterminação de agente inflamatório, alérgeno ou fator causal,

verificado por meio da história clínica, do teste alérgico e do exame citológico nasal (Van Rijswijk et al., 2005; Van Rijswijk et al., 2006).

Há evidências que na RI as células inflamatórias não desempenham um papel importante (Van Rijswijk et al., 2005), ao contrário do que ocorre na RA. No estudo já citado de Chawes et al. (2009), o grupo de crianças com RI respondeu prontamente ao teste de descongestão, de modo semelhante às crianças normais e diferentemente daquelas com RA, mostrando que os mecanismos envolvidos na RI são diferentes daqueles da RA. Os desbalanços autonômicos como a inibição da resposta do sistema nervoso simpático no nariz e a hiperatividade do sistema parassimpático têm sido apontados como os principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da RI (Malcomson, 1959; Numata et al., 1999; Garay, 2004).

Processos inflamatórios crônicos, como os que ocorrem na RA, estão associados à deposição e degradação de matriz extracelular em resposta ao trauma. Trata-se de um aspecto crítico do processo de reparo de lesões em todos os órgãos (Cotran et al., 1989; Vignola et al., 2003). Especificamente nas vias aéreas, o processo de reparo foi extensamente estudado em pacientes asmáticos e resulta em remodelamento no epitélio, lâmina própria, submucosa e camada muscular das vias aéreas inferiores (Fahy et al., 2000). O remodelamento tecidual ocorre de maneira semelhante nas vias aéreas superiores em pacientes com RA, porém em menor intensidade (Salib, Howarth, 2003; Bousquet et al., 2004).

Embora seja reconhecida a existência da fibrose presente na lâmina própria (Kim et al., 2010) na RA como resultado do processo inflamatório, há controvérsias sobre a ocorrência de fibrose na mucosa nasal nos pacientes com RI (Numata et al., 1999; Powe et al., 2001; Van Rijswijk et al., 2003). Assim sendo, é necessária a realização de um estudo quantitativo da fração tecidual ocupada por fibras colágenas nesta localização, uma vez que o colágeno é a principal proteína presente na fibrose intersticial (Montes, 1996).

Uma das características mais relevantes do processo inflamatório nas vias aéreas, de modo geral, é o espessamento da membrana basal, que corresponde a uma estreita faixa de matriz extracelular especializada, localizada na interface epitélio-conjuntivo e reconhecida ao microscópio de luz

pela sua coloração rósea intensa nos cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina. Nesta localização, as macromoléculas da matriz extracelular, como os colágenos do tipo III, IV e VII, laminina e proteoglicanos, se associam entre si e com as integrinas das células epiteliais de modo a manter a coesão tecidual e ao mesmo tempo trocar informações biomecânicas entre a matriz e as células (Hashmi, Marinkovich, 2011). Embora haja uma evidência na literatura apontando para o possível espessamento da membrana basal da concha nasal em pacientes alérgicos (Sanai et al., 1999; Mora et al., 2003), não há estudos descritivos do comportamento da membrana basal em pacientes com RI. Assim sendo, é necessário realizar estudos que descrevam as possíveis alterações na espessura e na constituição da membrana basal da concha nasal em pacientes com RA ou RI.

Outro aspecto a ser levado em consideração é a hipótese que os sintomas e sinais do paciente com rinite estejam relacionados ao espessamento da membrana basal da mucosa nasal. Em indivíduos asmáticos, há evidências controversas, como pode ser observado quando se compara o estudo de Jeffery et al. (1989) indicando que espessamento da membrana basal da via aérea não se relaciona com a gravidade, duração ou etiologia da asma e o estudo de Chetta et al. (1997) demonstrando que a maior espessura da membrana basal se associa a quadros mais graves de asma. No caso da rinite, não foi possível encontrar na literatura estudos sobre a associação entre espessura da membrana basal nasal e sinais ou sintomas de rinite.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 Mucosa nasal

Na parede lateral de cada cavidade nasal, encontram-se três saliências ósseas recobertas por mucosa especializada chamadas de conchas nasais superior, média e inferior.

A concha superior é revestida principalmente por mucosa do tipo olfatório. A concha inferior, a maior delas, é um órgão erétil revestido por mucosa do tipo respiratório (com epitélio pseudoestratificado ciliado) que se projeta para o interior da cavidade nasal. A concha média geralmente tem pequeno tamanho e é pouco visível na rinoscopia.

A concha nasal inferior tem um importante papel na regulação da temperatura e umidificação do ar inspirado, funcionando ainda como filtro de partículas externas através do sistema mucociliar. Diversas situações, incluindo a RA, podem resultar na hipertrofia das conchas nasais, determinando aumento da resistência nasal e obstrução. Quando a terapia medicamentosa falha, os pacientes tem como opção o tratamento cirúrgico da causa da obstrução (Berger et al., 2003).

O tecido conjuntivo da concha nasal é rico em glândulas seromucosas distribuídas em dois estratos: um localizado na porção mais superficial e outro profundo subjacente à camada vascular (Watelet et al., 2006). O tecido conjuntivo apresenta ainda uma grande densidade de células de natureza imunológica como linfócitos e plasmócitos.

Embora a inflamação seja similar na asma e na RA, estudos demonstraram que a extensão das alterações na mucosa nasal parece ser menor do que nos brônquios. Existem algumas hipóteses que tentam explicar esse fato: produção de citocinas pelas células musculares lisas nos brônquios e origem embrionária diferente das vias aéreas superiores e inferiores (Bousquet et al., 2004). Além disso, postula-se que a mucosa nasal desenvolva mecanismos protetores que atuam minimizando os danos e aumentando a regeneração epitelial (McCusker, 2004).

O processo inflamatório tem lugar no tecido conjuntivo e provoca modificações qualitativas e quantitativas na matriz extracelular, inclusive na mucosa nasal, como demonstrado em estudos em humanos e animais que

estão relatados nesta Revisão da Literatura no item 2.2. No entanto, para compreender adequadamente estes estudos é necessário conhecer os elementos da matriz envolvidos neste processo de remodelamento tecidual.

### 2.1.1 Colágenos

A superfamília dos colágenos contém pelo menos 28 tipos diferentes de colágeno (nominados numericamente seguindo a seqüência cronológica de caracterização) que, em conjunto, constituem as mais abundantes proteínas encontradas no corpo (Gordon, Hahn, 2010).

Todas as moléculas de colágeno são compostas de três cadeias alfa espiraladas entre si formando uma tripla hélice. Variações entre os colágenos incluem diferenças na associação das cadeias de polipeptídeos, diferentes comprimentos de tripla hélice, interrupções na hélice e diferenças nas terminações dos domínios helicoidais.

A superfamília colagênica é subdividida em oito subfamílias, tendo como base suas associações supramoleculares (Nanci, 2008):

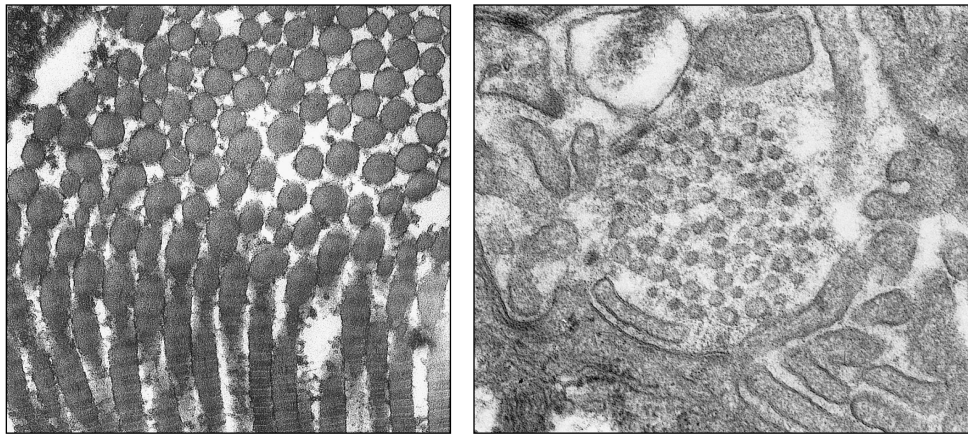
#### A) Colágenos fibrilares

Compreendem os tipos I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII. Nestes colágenos as moléculas de polimerizam de uma maneira altamente organizada para formar fibrilas. As fibrilas geralmente são compostas por mais de um tipo de colágeno. Os mais conhecidos são os colágenos tipo I, II e III.

As fibrilas de colágeno tipo I têm 50 a 100 nm de diâmetro, possuem estriação transversal bem evidente ao microscópio eletrônico e alcançam altos níveis de organização, se polimerizando para formar fibras grossas e feixes de fibras. As fibras de colágeno tipo I são conhecidas como "fibras colágenas" presentes em grande quantidade na maioria dos tecidos conjuntivos, como derme, ossos, cápsulas, fâscias, ligamentos, sendo também o principal constituinte das fibroses (Montes, 1996). Acredita-se que o colágeno tipo V regule o diâmetro das fibrilas.

Em contraste, o colágeno tipo III está presente nos órgãos que requerem uma estrutura flexível. Este colágeno forma fibrilas de 30 a 50 nm de diâmetro que se associam formando fibras finas, conhecidas como "fibras reticulares" constituindo o arcabouço dos órgãos parenquimatosos; geralmente durante os processos de fibrose é o primeiro colágeno a ser depositado, sendo mais tarde substituído pelo tipo I (Martinez-Hernandez, 1988).

A Figura 1 corresponde as imagens ultraestruturais das fibras de colágeno tipo I e tipo III.



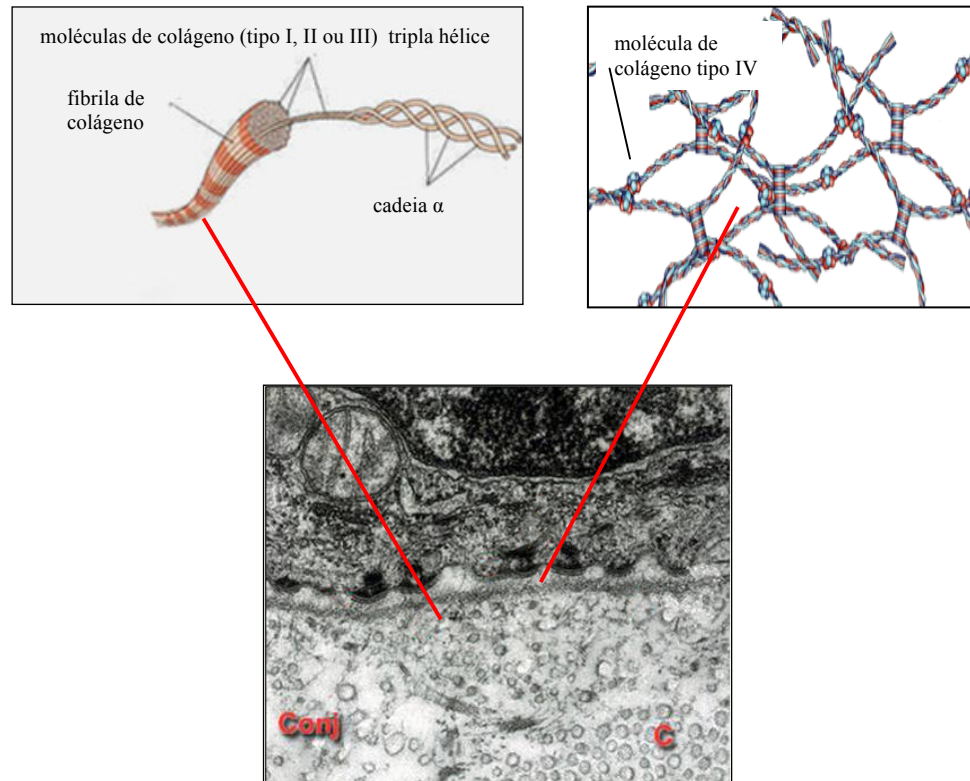
**Figura 1 - Levando-se em consideração que as duas imagens tem o mesmo aumento, nota-se que o colágeno do tipo I, à esquerda, forma fibrilas grossas que se associam formando fibras grossas com capacidade de resistir às forças de tração, como na pele, ossos e tendões; por sua vez, o colágeno tipo III, à direita, forma fibrilas finas que se associam em fibras finas presentes no arcabouço flexível dos órgãos parenquimatosos**

As moléculas de colágeno tipo II apresentam fibrilas de 20 a 25 nm de diâmetro que aparecem tipicamente na matriz extracelular das cartilagens. Cada fibrila está envolvida e interage com grande quantidade de proteoglicanos de modo que não se formam fibras, permanecendo sob a forma de fibrilas mesmo no tecido maduro.

#### B) Colágeno da lâmina basal

Corresponde ao colágeno tipo IV, cujas moléculas não se associam formando fibrilas, mas se agregam formando uma rede que faz parte da constituição da lâmina basal.

A Figura 2 mostra a diferença entre a organização molecular dos colágenos fibrilares (tipos I, II e III) e do colágeno da lâmina basal (colágeno IV).



**Figura 2 - As moléculas de colágeno dos tipos I, II e III se polimerizam formando as fibrilas (e fibras) da matriz intersticial enquanto que as moléculas de colágeno tipo IV se polimerizam formando uma estrutura em rede que é a base molecular da lâmina basal. A micrografia eletrônica mostra a aparência ultraestrutural da lâmina basal, como uma estrutura subepitelial contínua e das fibrilas de colágeno cortadas transversal e obliquamente (C)**

C) Colágenos com hélices triplas interrompidas que se associam a colágenos fibrilares (FACIT)

Estes compreendem os colágenos tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXVI e XXII. Não formam fibrilas, exibem interrupções diversas na tripla hélice e se associam a colágenos fibrilares e a outros componentes da matriz, sendo importantes na interação entre os componentes da matriz extracelular.

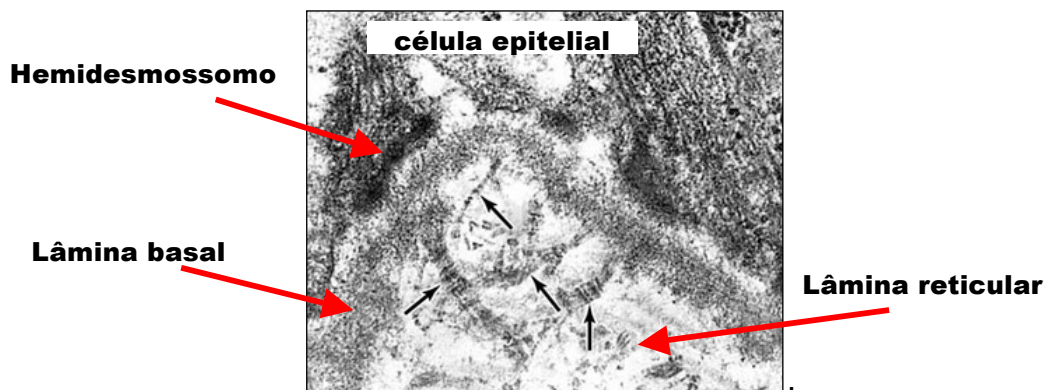


#### D) Colágenos formadores de redes

São os colágenos tipo VIII e X. Estão presentes nas cartilagens e se organizam como uma rede, aberta e porosa com grande capacidade de amortecer forças compressivas.

#### E) Colágeno formador de fibrila de ancoragem

Esta família contém apenas o colágeno tipo VII, cujas moléculas possuem terminais não helicoidais incomumente grandes que se associam entre si formando as fibrilas de ancoragem presentes na interface entre a lâmina basal e a lâmina reticular subjacente. Assim sendo, as fibrilas de colágeno VII têm importante papel na coesão entre a matriz laminar e a matriz intersticial (Figura 3).



**Figura 3 - Micrografia eletrônica mostrando fibrilas de ancoragem, (setas pretas), constituídas por colágeno tipo VII; se dispõem de modo a unir elementos da lâmina basal e da lâmina reticular, principalmente nas regiões onde se localizam os hemidesmosomos da célula epitelial, sendo, assim, um dos elementos que promovem a ancoragem célula-matriz extracelular**

#### F) Colágeno formador de microfibrilas

Corresponde ao colágeno tipo VI. Suas moléculas agregam-se formando microfibrilas que participam dos processos de interação entre as células, os proteoglicanos e o colágeno tipo I.

#### G) Colágenos transmembrana

Esta família compreende os colágenos tipo XIII, XVII, XXIII e XXV São moléculas de colágeno constituintes da membrana celular, que

interagem tanto com os elementos da matriz extracelular como com proteínas intracelulares, de modo a servir como transdutores de sinais mecânicos e regular o comportamento da célula frente às demandas do meio extracelular.

#### H) Colágenos multiplexina (formadores de endostatina)

São os colágenos tipo XVIII e XV. Possuem um grande domínio único não helicoidal que quando rompido por proteases extracelulares forma endostatina, um potente inibidor da migração de células endoteliais e da angiogênese.

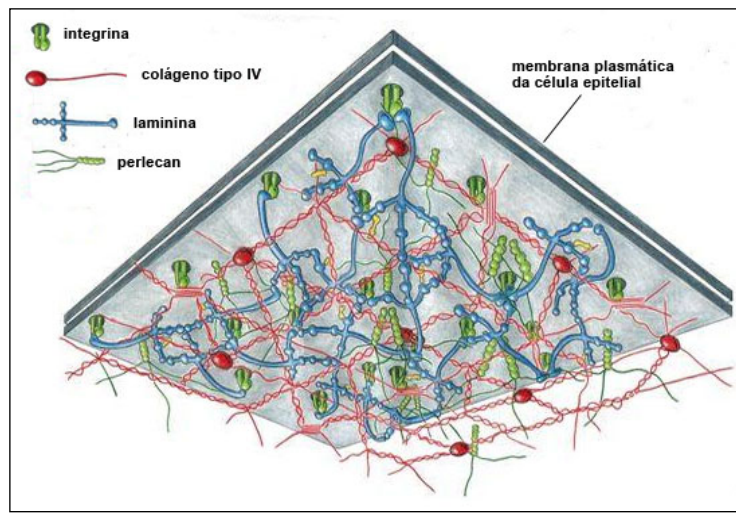
### **2.1.2 Glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas**

Os glicosaminoglicanos são moléculas glicídicas de alto peso molecular e com grande capacidade de reter moléculas de água. Assim sendo, são responsáveis pela manutenção do turgor tecidual e pela capacidade dos tecidos de resistirem às forças compressivas. Além disso, a água adsorvida aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular funciona como meio de difusão para os nutrientes e catabólitos (Kim et al., 2010). Diversos tipos de glicosaminoglicanos são reconhecidos, como o ácido hialurônico, condroitim sulfato, dermatansulfato, heparansulfato e queratansulfato, assim denominados pela localização na qual foram descritos. No entanto, sabe-se que todos estes glicosaminoglicanos têm distribuição ampla na matriz extracelular dos diferentes órgãos. Com exceção do ácido hialurônico, os outros glicosaminoglicanos se ligam a um eixo proteico formando macromoléculas conhecidas como proteoglicanos. Há vários tipos de proteoglicanos, como decorin, fibromodulin, biglican, versican, agregan e perlecan, classificados segundo o eixo proteico e glicosaminoglicanos que os constituem.

Além dos proteoglicanos, há diversas glicoproteínas na matriz extracelular com função de conectar elementos da matriz e das células entre si. A fibronectina é uma importante glicoproteína presente na matriz extracelular intersticial, que interage com glicosaminoglicanos (como o dermatansulfato), com o colágeno tipo I (ou tipo III) e com as integrinas na membrana celular do

fibroblasto. A condronectina e osteonectina têm a mesma função na cartilagem e no osso, conectando os condrócitos e os osteócitos à matriz intersticial.

Por sua vez, na lâmina basal, a glicoproteína adesiva é a laminina, com domínios de ligação para o colágeno tipo IV, para o proteoglicano perlecan e para as integrinas de membrana da célula epitelial de forma a garantir a coesão entre as moléculas da lâmina basal entre si e com a célula (Figura 4).



**Figura 4 – Desenho esquemático mostrando a organização molecular da lâmina basal sob a membrana plasmática do polo basal da célula epitelial. As moléculas de colágeno, o proteoglicano perlecan e a glicoproteína adesiva laminina se relacionam entre si formando um todo coeso que se liga à célula através de proteínas de membrana do tipo integrina. Esta organização possibilita a transdução das forças mecânicas da matriz para a célula, uma vez que, em termos moleculares, não há solução de continuidade entre a célula e a matriz**

### 2.1.3 Matriz extracelular laminar e intersticial

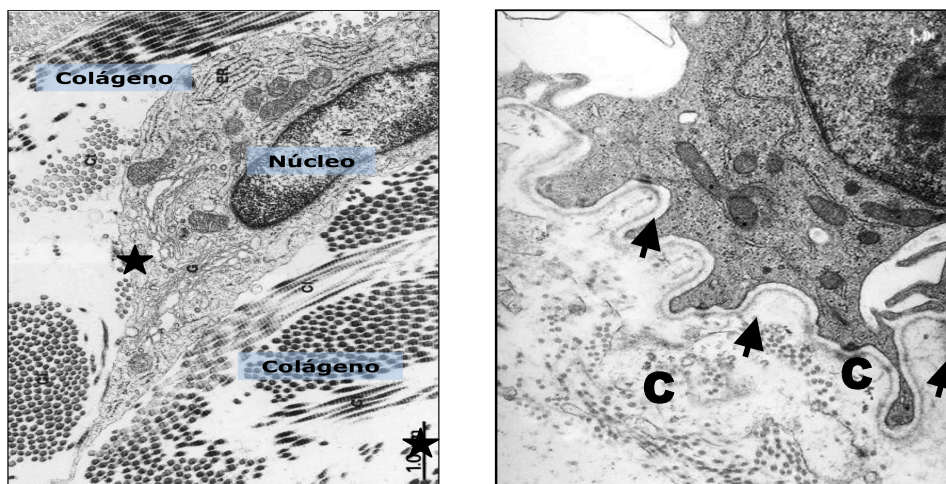
Em termos gerais, pode-se dizer que a matriz extracelular apresenta duas principais formas de organização: a matriz intersticial e a matriz laminar.

A matriz intersticial corresponde à matriz extracelular presente nos tecidos conjuntivos, sintetizada por células especializadas como o fibroblasto, o miofibroblasto, o condroblasto e o osteoblasto. A matriz intersticial é constituída por elementos fibrosos, como as fibras colágenas (colágeno tipo I), fibras reticulares (colágeno tipo III) e as fibras do sistema elástico, e por elementos não fibrosos, como glicoproteínas (principalmente a fibronectina) e diversos tipos de proteoglicanos (à exceção do perlecan).

Durante o processo de reparo do tecido conjuntivo após uma injúria, os miofibroblastos e fibroblastos secretam uma variedade de moléculas extracelulares, incluindo os componentes fibrosos da matriz extracelular, os componentes da substância fundamental amorfa e outras moléculas biologicamente ativas, como as metaloproteinases e seus inibidores.

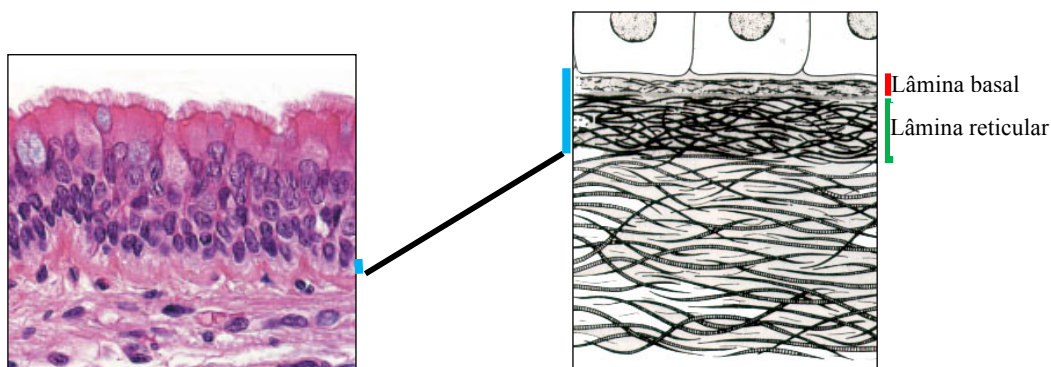
Por sua vez, a matriz extracelular do tipo laminar é conhecida como lâmina basal e corresponde ao estrato de matriz contínua separando o tecido epitelial do tecido conjuntivo e também envolvendo todos os tipos de células musculares e as células de Schwann no sistema nervoso periférico de modo também separá-las do conjuntivo adjacente. A lâmina basal somente pode ser reconhecida ao microscópio eletrônico e é sintetizada pelas células epiteliais em contato com o conjuntivo, pelas células musculares e pelas células de Schwann do sistema nervoso periférico.

A matriz laminar é constituída por moléculas de colágeno do tipo IV organizadas em rede, proteoglicanos (perlecan) e glicoproteínas adesivas (laminina). A Figura 5 mostra as principais características morfológicas da matriz intersticial e laminar.



**Figura 5 - Na micrografia eletrônica da esquerda nota-se um fibroblasto rodeado pela matriz extracelular intersticial por ele secretada, na qual se observam fibrilas de colágeno formando fibras e espaços preenchidos por substância fundamental amorfa (★). À direita observa-se parte de uma célula epitelial apoiada sobre a matriz extracelular laminar, denominada lâmina basal (seta) e uma região de matriz intersticial, com delgadas fibrilas de colágeno (C)**

Em alguns órgãos, como na pele, no útero e, de maneira muito proeminente, na árvore respiratória, a região superficial da matriz intersticial é composta por uma camada de fibrilas de colágeno tipo III, conhecida como lâmina reticular. Esta denominação deriva do fato que o colágeno tipo III é o principal constituinte das "fibras reticulares" da matriz intersticial. A associação da lâmina basal com a lâmina reticular forma uma camada acidófila na região subepitelial denominada membrana basal, visível ao microscópio de luz e especialmente desenvolvida nas vias aéreas (Figura 6).



**Figura 6 - Na imagem à esquerda observa-se um corte histológico de mucosa nasal, corado por Hematoxilina-eosina, no qual se distingue a proeminente membrana basal (barra azul) imediatamente abaixo do epitélio. O desenho, à direita, corresponde ao observado pela microscopia eletrônica mostrando que a membrana basal é constituída pela lâmina basal (barra vermelha) e lâmina reticular (barra verde)**

## 2.2 Alterações da mucosa nasal na rinite

As alterações da mucosa nasal na rinite têm sido estudadas por diversos autores, porém ainda restam algumas controvérsias, como por exemplo, se a descamação epitelial está sempre presente ou não nos pacientes com rinite (Braunstahl et al., 2003; Watanabe, Kiuna, 1998). Há indicações que a descamação epitelial seja uma característica típica da mucosa nasal de pacientes alérgicos (Amin et al., 2001).

Já em relação às glândulas nasais na RA, foram descritas alterações estruturais tais como distensão dos ácinos, degeneração e obstrução dos ácinos e dos ductos, dilatações císticas e infiltrado eosinofílico nas glândulas mais superficiais (Tos, Morgensen, 1977).

As alterações de matriz extracelular da mucosa nasal também foram estudadas em pacientes com rinite. Há dois estudos que investigaram as alterações do colágeno na lâmina própria da mucosa nasal de pacientes com RA e os resultados apresentados são contraditórios entre si. Enquanto que Sanai et al. (1999) não detectaram diferenças na quantidade de colágeno da lâmina própria da mucosa da concha nasal inferior de pacientes com RA comparado aos controles não alérgicos, Kim et al. (2010) evidenciaram um aumento de colágeno significativo na mucosa nasal de pacientes com RA. Mais ainda, quando levaram em consideração a gravidade da rinite, observaram que os pacientes com RA leve ou severa possuíam quantidades semelhantes de colágeno na mucosa nasal, sugerindo que o agravamento dos sintomas nos casos de RA severa não depende da presença de quantidades cada vez maiores de colágeno.

Merece destaque, o estudo de Mora et al. (2003), que embora não tenha dados específicos para a quantificação do colágeno, há descrição de fibrose na lâmina própria em 92,4% dos pacientes com RA.

### **2.3. Alterações da membrana basal da mucosa nasal na rinite**

Em indivíduos normais, a mucosa das vias aéreas apresenta uma membrana basal tipicamente mais espessa que outros locais do organismo. Como já mencionado anteriormente, esta membrana basal é constituída por: 1) a lâmina basal, onde a presença de colágeno tipo IV, laminina, nidogênio e proteoglicano heparansulfato (perlecan) indicam que esta estrutura é tipicamente idêntica àquela subjacente a todos os epitélios do organismo, e 2) a lâmina reticular, que corresponde um estrato com uma grande concentração de finas fibrilas de colágeno dispostas irregularmente, porém, sem formar fibras, como normalmente ocorre na matriz extracelular de outros locais do organismo (Agha-Mir-Salim et al., 1993).

Diferentes autores mediram a espessura da membrana basal para explicar sintomas de afecções da mucosa nasal a partir de alterações estruturais. Os dados obtidos são contraditórios, como mostrado no Quadro 1.



**Quadro 1- Espessura da membrana basal da concha nasal inferior (em  $\mu\text{m}$ )**

Estudo	Características da casuística	Espessura da membrana basal ( $\mu\text{m}$ )
AghaMirSalim et al. (1993)	2 saudáveis, 17 hipertrofia da concha nasal inferior 1 síndrome de imobilidade ciliar	10 a 15
Chanez et al. (1999)	6 saudáveis	4 a 6
Sanai et al. (1999)	Sem RA: 8 autópsias, 4 rinossinusite crônica e 1 tumor parassinusal  Com RA: 13 pacientes	Sem RA - Média: 8,9; Variação: 1,8 a 15  Com RA - Média: 17,2; Variação: 5,9 a 23,0
Berger et al. (2003)	8 autópsias e 8 septoplastias	14,5 a 18,5
Braunstahl et al. (2003)	16 saudáveis  19 com RA e asma  18 com RA e sem asma	Saudável - Média: 8,6; Variação: 5,7-10,5  RA e asma - Média: 8,4; Variação: 6,1 - 16,4  RA e sem asma - Média: 8,6; Variação: 5,7 -12,9
Saitoh et al. (2009)	6 saudáveis	4,7 $\pm$ 5,2

A análise deste quadro mostra que em apenas três destes estudos (marcados em azul) existiram grupos de indivíduos "saudáveis", para os quais foram afastadas doenças nasais, inclusive a RA. Quando se leva este parâmetro em consideração, pode-se observar que a espessura da membrana basal da concha nasal inferior em indivíduos normais varia de 4 a 10,5  $\mu\text{m}$ .

Além disso, a análise do Quadro 1 mostra que outras afecções, além, da RA, provocam o espessamento da membrana basal e que, mais importante do que o valor médio é a amplitude da variação da espessura da membrana basal, que mostra-se muito elevada nos pacientes com RA (marcados em vermelho).

Embora os dados da espessura (em micrômetros) da membrana basal não apareçam no trabalho de Mora et al. (2003), os autores fazem referência a seu espessamento na concha nasal inferior em 92,3% dos pacientes com RA.

### **3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**



Considerando-se que:

a) mesmo sem a utilização de métodos específicos para identificação de colágeno, há evidências que sugerem um acúmulo de colágeno na mucosa da concha nasal na RA, porém inexistem estudos sobre a deposição de colágeno na RI;

b) há evidências de espessamento da membrana basal em pacientes alérgicos, porém inexistem estudos sobre o tema em pacientes RI;

c) a RA e RI compartilham sinais e sintomas relacionados à rinite, embora com intensidades variadas,...

... o objetivo geral deste trabalho é investigar, através de análise comparativa, a distribuição do colágeno na concha nasal de pacientes com RA e RI.

... os objetivos específicos são:

- avaliar qualitativamente e quantitativamente as fibras colagênicas da lâmina própria;
- avaliar qualitativamente e quantitativamente a membrana basal;
- avaliar a existência de correlação entre o remodelamento histopatológico da mucosa da concha nasal com o tempo e a intensidade da doença.

Para tanto serão associados métodos de identificação (Picrossírius-polarização e métodos imunoistoquímicos) específicos para os colágenos tipo I, tipo III e tipo IV associados a métodos de quantificação de elementos teciduais em microscopia de luz e eletrônica.

## **4. MÉTODOS**

#### 4.1. Aspectos éticos e local de realização do estudo

Esta pesquisa teve início após apreciação e aprovação dos procedimentos pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob número 0670/07.

Durante todo o período da pesquisa foram seguidas as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

O estudo foi sediado na Divisão de Clínica Otorrinolaringológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O processamento do material para microscopia de luz e eletrônica foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 59 (LIM 59) - Laboratório de Biologia Celular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### 4.2 Casuística

Foram estudados 28 pacientes com diagnóstico de rinite persistente e com indicação de turbinectomia inferior parcial bilateral, associada ou não à septoplastia, 14 com RA e 14 com RI.

##### Critérios de inclusão:

A) Pacientes de ambos os sexos, sem distinção de raça, com diagnóstico de rinite persistente há mais de três anos, comprovado por história clínica e exame físico, sem melhora satisfatória após tratamento clínico, mantendo obstrução nasal grau 2 ou 3, segundo escore de sintomas e sinais de Mello Jr e Mion (2002).

B) Pacientes com indicação para realização de turbinectomia inferior parcial bilateral, associada à septoplastia ou não.

C) Pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de exclusão:

A) Pacientes com rinite de outras etiologias, como rinite eosinofílica não alérgica (RENA), gustativa, medicamentosa, hormonal, gravídica, por drogas ou ocupacional diagnosticadas através da história clínica, exame físico, exame citológico nasal e teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes.

B) Pacientes com doenças sistêmicas ou com outras comorbidades das vias respiratórias, como asma, rinossinusopatia crônica ou polipose nasossinusal, à exceção de desvio de septo nasal.

C) Pacientes tabagistas ou usuários de drogas ilícitas.

D) Pacientes que receberam medicações para rinite, pelo menos, duas semanas antes da operação.

### **4.3 Investigação de sintomas e sinais**

Em todos os pacientes foi realizado o exame físico completo (Anexo A). Investigou-se a presença e a data de início dos seguintes sintomas: espirro/prurido, coriza, obstrução nasal e secreção retro-nasal.

Através do exame otorrinolaringológico completo, seguido de endoscopia nasal, foram analisados os seguintes sinais: coloração, edema, secreção, além de coloração e presença de muco na parede posterior da orofaringe.

Os sintomas e sinais foram quantificados através do Escore de Sinais e Sintomas Nasais (Quadro 2) (Mello Jr, Mion, 2002).

**Quadro 2- Escore de sinais e sintomas nasais (Mello Jr, Mion, 2002)**

<b>Sintomas</b>	<b>Sinais</b>
<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

#### 4.4 Teste cutâneo de hipersensibilidade imediata

Em todos os pacientes foi realizado o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata (*prick test*) com antígenos inalatórios para ácaros, fungos, baratas, gato e cachorro (Quadro 3).

**Quadro 3- Antígenos inalatórios testados**

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

De acordo com o resultado do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes, os pacientes foram alocados em dois grupos com 14 indivíduos cada:

- Grupo Rinite Alérgica (RA): pacientes para os quais o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes foi positivo (pápula maior ou igual a 3 mm).

- Grupo Rinite Idiopática (RI): pacientes para os quais o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes foi negativo (pápula menor que 3 mm).

#### **4.5 Técnica cirúrgica**

Todas as cirurgias foram realizadas sob anestesia geral, com intubação orotraqueal. Sob visualização com endoscópio nasal de 0 grau, 4 milímetros, foi feita a vasoconstrição das conchas nasais inferiores por meio de algodões com solução de adrenalina 1:1000, topicamente, 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.

## **4.6 Preparação do material para análise histológica e morfométrica**

Os fragmentos das conchas nasais inferiores direita e esquerda dos pacientes coletados durante a cirurgia foram imediatamente recortados para obtenção de fragmentos a serem processados para análise histológica e morfométrica em microscopia de luz e eletrônica.

### **4.6.1 Processamento do material para microscopia de luz**

Após a coleta, os fragmentos das conchas nasais inferiores foram imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0, por 24 horas. A seguir, foram desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. A partir dos blocos contendo os fragmentos foram obtidos cortes de 5 µm em micrótomo Leica RM2245 para a realização de estudos morfológicos e morfométricos.

#### **4.6.1.1 Coloração pela Hematoxilina-eosina e identificação histopatológica**

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Os cortes foram então lavados em água corrente e corados 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.

#### **4.6.1.2 Coloração pelo Picrossírius-hematoxilina e identificação das fibras colagênicas**

Os preparados histológicos foram corados com Picrossírius-hematoxilina e o estudo foi realizado com auxílio do programa de análises de imagens digitais Image Pro-Plus (Media Cybernetics, EUA) acoplado a um microscópio de luz Nikon Opitphot.

O corante Sirius Red é uma molécula alongada, com seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazóicos. Demonstrou-se que os grupamentos sulfônicos do corante interagem fortemente com os aminoácidos básicos das moléculas dos diferentes tipos de colágeno, conferindo-lhe intensa cor vermelha, sendo assim muito apropriado para sua identificação em cortes histológicos de rotina (Junqueira et al., 1979).

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Os cortes foram então lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris fresca durante dois minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e *entellan* para análise microscópica.

#### **4.6.2 Processamento do material para microscopia eletrônica**

O material utilizado na obtenção de preparações para microscopia eletrônica foi constituído por pequenos fragmentos das conchas nasais inferiores processados segundo a rotina do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Pequenos fragmentos das conchas nasais inferiores foram fixados em solução de ácido tânico 1% dissolvido em glutaraldeído 2,0% em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2, por 2 horas. A seguir, foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em salina e contrastados em solução de acetato de uranila 0,5% em salina, por 12 horas e incluídos em resina araldite. Os cortes ultrafinos (de 70 nanômetros), obtidos em ultramicrotomo Reichert, foram submetidos à contrastação dupla por acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,5% e estudados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010.

A adição de ácido tânico ao fixador aumenta o contraste de vários componentes do tecido conjuntivo, inclusive das fibras do sistema elástico. A concentração 1% de ácido tânico foi suficiente para obtenção de um contraste regular das fibras do sistema elástico, sem prejudicar a preservação dos



demais componentes celulares, conferindo uma forte eletrodensidade ao colágeno fibrilar, à elastina e às microfibrilas do sistema elástico.

#### 4.6.3 Processamento do material para imunoistoquímica

Os cortes das conchas nasais de 4µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co; St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado.

Os anticorpos contra colágeno IV e laminina utilizados para o presente estudo estão descritos no Quadro 4.

**Quadro 4 - Anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico**

Anticorpo	Diluição	Origem
Colágeno IV	1/8000	Abcam
Laminina	1/500	Sigma-Aldrich Chemie

O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, a 60–65° C, durante 10 minutos e passagem rápida em 3 banhos de xilol frio. Os cortes foram colocados em dois banhos de álcool 100°, um banho de álcool 95° e outro de álcool 70°. A seguir, foram lavados em água corrente, água deionizada e em tampão fosfato pH 7,4. Para o colágeno IV, a recuperação antigênica foi feita por digestão com pepsina por 30 minutos, a 37°C; para a laminina este processo foi realizado utilizando a proteinase K por 20 minutos a 37°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada 10 volumes (3%) seguida por água corrente, água destilada e tampão fosfato salino (PBS). O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito por caseína diluída em tampão fosfato pH 7,4 (Synth, São Paulo, Brasil) por 5 minutos em temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em 1% de albumina de soro bovino (BSA), por 24 horas, a 4°C e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário Novolink (Novocastra-Leica). O cromógeno utilizado foi diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Posteriormente realizou-se a contra-coloração

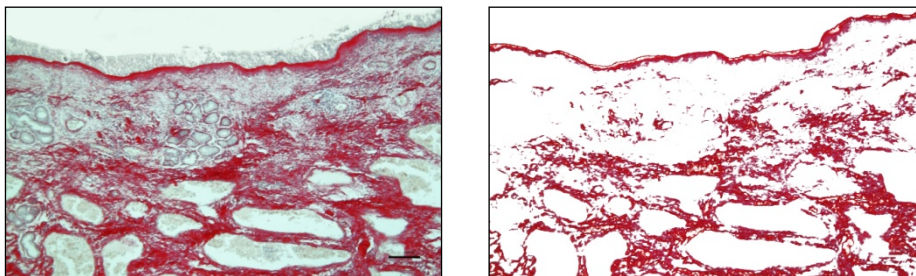
com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) para todos os casos.

## 4.7 Estudo do colágeno da matriz extracelular intersticial

### 4.7.1 Análise quantitativa das fibras colagênicas

A quantidade de colágeno foi medida na área total da lâmina própria, incluindo a lâmina reticular. Através do programa de Análise de Imagens Digitais Image Pro-Plus foram obtidas, ao microscópio de luz, com a objetiva de 10x, dez imagens digitais aleatórias de cortes histológicos, corados pelo Picrossírius-hematoxilina, da concha nasal inferior de cada paciente.

Utilizando uma ferramenta do mesmo programa foi possível selecionar e calcular a área ocupada pelo colágeno e a área total do tecido estudado (Figura 7); os resultados foram expressos em porcentagem (área do colágeno/área total x100).



**Figura 7 – Micrografia mostrando, à esquerda, corte histológico, corado com Picrossírius-hematoxilina, de concha nasal inferior de paciente com RA. À direita, pode-se observar a mesma imagem após o procedimento para seleção da área ocupada por colágeno. Barra = 100µm**

### 4.7.2 Análise qualitativa das fibras colagênicas

Utilizou-se a microscopia com luz polarizada pela sua capacidade de distinção entre fibras grossas e finas de colágeno, segundo Junqueira e Montes, 1983.

A coloração pelo método do Picrossírius-hematoxilina faz com que uma grande quantidade de moléculas do Sirius Red disponha-se paralelamente

às moléculas do colágeno, o que acarreta em um aumento considerável da birrefringência das fibras de colágeno quando observadas na microscopia com luz polarizada. O fenômeno do aumento da birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno. Assim, o método da coloração com o Picrossírius-hematoxilina associado à microscopia com luz polarizada é um método para detecção de estruturas compostas de moléculas de colágeno orientadas. Além de se mostrarem fortemente birrefringentes, as fibras que contêm colágeno assumem cores e intensidades de birrefringência variadas, resultantes dos diferentes graus de agregação física dos diferentes tipos de colágeno.

O colágeno tipo I é composto por fibrilas grossas densamente agrupadas e conseqüentemente apresentam uma intensa birrefringência com coloração amarelada ou avermelhada. Já o colágeno tipo III é composto por fibrilas finas frouxamente dispostas, apresentando uma fraca birrefringência e coloração esverdeada. Entretanto, durante a fase inicial de fibrose, as fibrilas imaturas de colágeno tipo I podem apresentar a mesma birrefringência verde semelhante à do colágeno tipo III, assumindo com a progressão da fibrose a intensa birrefringência característica do colágeno tipo I (Junqueira, Montes, 1983; Pickering, Boughner, 1991).

Desta forma, fibras finas, como aquelas presentes no tecido de granulação jovem, são reveladas como estruturas de cor esverdeada fracamente birrefringentes, enquanto as fibras grossas, características de lesões fibróticas maduras, são caracterizadas por sua forte birrefringência e pelas cores amarela ou vermelha (Clore et al., 1979).

#### **4.7.3 Análise ultraestrutural do colágeno**

Através da microscopia eletrônica foi possível analisar a ultraestrutura das fibrilas de colágeno, bem como identificar os tipos de colágeno existentes na membrana basal das conchas nasais, por suas características morfológicas distintas.

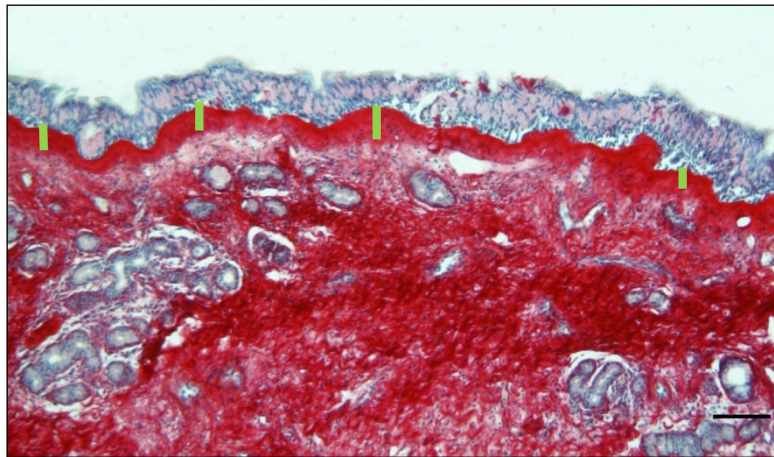
A partir das micrografias eletrônicas, com a utilização do programa para análise de imagens Image J (disponibilizado na página eletrônica do

National Institutes of Health, EUA) foi medido o diâmetro das fibrilas de colágeno presentes tanto na região subepitelial quanto na região profunda da membrana basal.

Foi investigada a presença de fibrilas de ancoragem (formadas por colágeno tipo VII) na interface da lâmina basal e lâmina reticular.

#### 4.8 Análise morfométrica da espessura da membrana basal

A espessura da membrana basal foi avaliada quantitativamente em cada corte histológico corado pelo método Picrossírius-hematoxilina. Foram obtidas, ao microscópio de luz, com objetiva de 10x, imagens digitais de 10 campos aleatórios percorrendo toda a extensão do tecido representado, através do programa Image Pro-Plus. Em cada um dos 10 campos estudados, a espessura da membrana basal foi medida em quatro pontos de maneira aleatória. O resultado para cada paciente foi calculado como a média das medidas (Figura 8).



**Figura 8 – Micrografia de luz de corte histológico de concha nasal inferior de paciente com RA. O corte foi corado com Picrossírius-hematoxilina; pode se observar a grande quantidade de colágeno na matriz intersticial. A membrana basal aparece como uma faixa contínua vermelha na região sub-epitelial. As barras verdes exemplificam quatro pontos aleatórios nos quais foi medida a espessura da membrana basal. Barra preta = 100 µm**

#### 4.9 Análise estatística

Por ser um estudo exploratório, não foi realizado previamente o cálculo de tamanho mínimo de amostra. A comparação dos sinais e sintomas, do colágeno fibrilar, da espessura da membrana basal e do diâmetro das fibrilas entre os pacientes com RA e RI foi realizada por seus valores mínimo e máximo, sua média (+ ou – desvio-padrão) e sua mediana. A distribuição das variáveis numéricas foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a comparação das variâncias pelo teste de Levene. Para comparação de médias foram aplicados os teste t de Student ou Mann-Whitney, conforme aplicável.

O teste exato de Fischer foi usado para avaliar a possível associação entre o sexo dos indivíduos e o tipo de rinite.

As associações entre tempo e intensidade da doença com a espessura da membrana basal também foram estatisticamente avaliadas. As associações entre variáveis categóricas foram avaliada pelo teste do qui-quadrado. Para variáveis numéricas, as associações foram avaliadas pelos coeficientes de Pearson e por modelos de regressão.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas SPSS 17.0 e GraphPad Prism 5.01.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 Caracterização da amostra

De acordo com os critérios de inclusão, os pacientes que apresentaram teste cutâneo de hipersensibilidade imediata positivo foram classificados no grupo RA. Todos eles resultaram positivos exclusivamente para ácaros.

A Tabela 1 resume as características da amostra em relação a gênero, idade na época do estudo, idade de início da doença e tempo de evolução da doença.

**Tabela 1 – Caracterização da amostra em relação ao gênero, idade na época do estudo, idade de início da doença e tempo de evolução da doença**

	Grupo RA	Grupo RI	p
<b>Sexo</b>			
Masculino	9	7	
Feminino	5	7	
<b>Idade</b> (média±desvio padrão)	26,07±7,79	31,29±8,65	0,106*
<b>Idade de início</b> (média±desvio padrão)	8,71±7,39	16,79±12,69	0,049*
<b>Tempo de evolução</b> (média±desvio padrão)	17,36±5,77	14,50±12,40	0,194**

\* teste t de Student

\*\* teste Mann-Whitney

Dos 14 pacientes do grupo RA, nove eram do sexo masculino e cinco do sexo feminino, enquanto que no grupo RI a distribuição por gênero foi mais equilibrada (sete homens e sete mulheres).

A idade do grupo RA variou de 19 a 40 anos, com média de idade de 26,07 anos. Já no grupo RI, a idade variou de 20 a 45 anos, com idade média de 31,29 anos. A análise estatística, pelo teste t de Student, mostrou que não existe diferença entre os grupos em relação à idade ( $p=0,106$ ).

Em média, os sintomas no grupo RA tiveram início por volta dos 9 anos de idade, enquanto que, no grupo RI, os sintomas apareceram significativamente mais tarde ( $p=0,049$ ), em média aos 17 anos, pelo teste t de Student.

Em relação ao tempo de evolução da doença os grupos eram homogêneos entre si, uma vez que não foi possível encontrar diferença

significativa pela comparação estatística pelo teste de Mann-Whitney ( $p=0,194$ ).

## 5.2 Sintomas e sinais

A Tabela 2 apresenta o resultado da investigação da presença de sintomas e sinais para os pacientes dos grupos RA e RI.

**Tabela 2 – Média e desvio padrão de sintomas e sinais nos grupos e resultado da análise estatística por teste t de Student**

	Grupo RA	Grupo RI	P
<b>Sintomas</b>			
Espirro/Prurido	2,29±0,91	1,00±1,04	0,002
Coriza	1,64±0,75	0,71±0,73	0,003
Obstrução nasal	3,00±0,00	3,00±0,00	*
Secreção retro-nasal	0,93±0,73	0,50±0,86	0,166
<b>Sinais</b>			
Coloração	2,07±0,92	1,14±0,36	0,003
Edema	1,36±0,93	0,64±0,63	0,003
Secreção	1,36±0,93	0,14±0,36	<0,001
Orofaringe	0,64±0,63	0,21±0,43	0,047

\* teste não válido por variância nula

A análise estatística pelo teste t de Student mostrou que os sintomas de espirro/prurido e coriza foram significativamente maiores no grupo RA, assim como os sinais de coloração, edema, secreção e aspecto da parede posterior da orofaringe.



A Tabela 3 mostra os resultados do escore de sintomas, escore de sinais e no escore total nos Grupos RA e RI. Pode-se observar que os escores de sintomas, de sinais e o escore total mostraram-se significativamente maiores no grupo RA, pelo teste t de Student.

**Tabela 3 – Média e desvio padrão de escore de sintomas, escore de sinais e escore total nos grupos e resultado da análise estatística por teste t de Student**

	<b>Grupo RA</b>	<b>Grupo RI</b>	<b>P</b>
<b>Escore de sintomas</b>	7,86±1,75	5,21±1,97	<0,001
<b>Escore de sinais</b>	5,43±2,44	2,14±1,29	<0,001
<b>Escore total</b>	13,29±3,71	7,36±3,10	<0,001

### **5.3 Análise das fibras colagênicas na lâmina própria**

#### **5.3.1 Análise qualitativa em microscopia de luz**

As lâminas coradas com Hematoxilina-eosina foram avaliadas do ponto de vista histopatológico. As lâminas coradas pelo Picrossírius-hematoxilina foram examinadas sob luz convencional ou polarizada para estudo das fibras colagênicas (Figura 9).

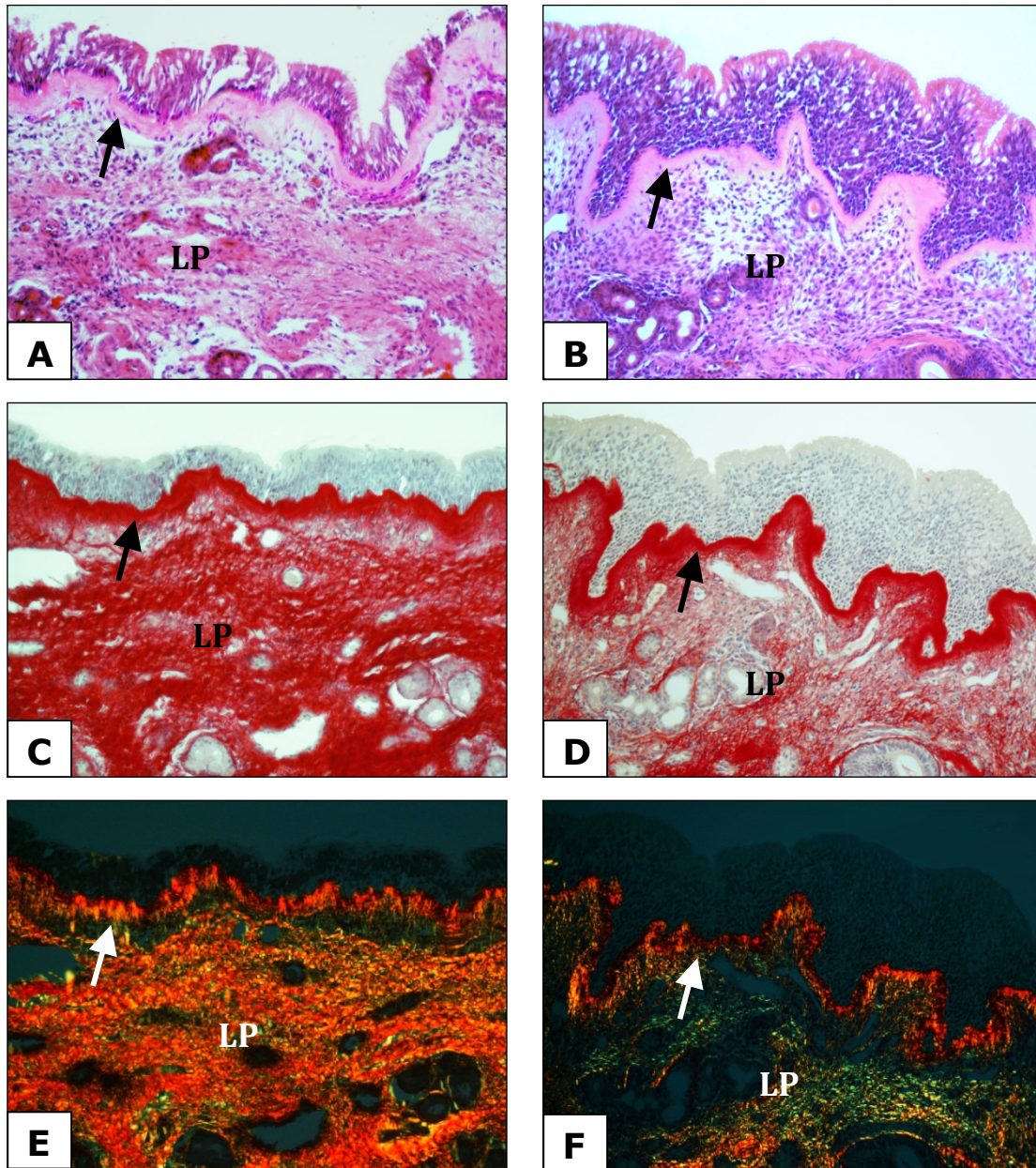


Figura 9 – Micrografias obtidas com objetiva 20X de cortes histológicos seriados, de concha nasal de pacientes com RA (A, C e E) ou RI (B, D e F) corados com Hematoxilina-eosina (A e B), Picrossírius-hematoxilina observados sob luz convencional (C e D) e sob luz polarizada (E e F). Com a coloração com Hematoxilina-eosina, a lâmina própria (LP) dos pacientes RA (A) apresenta-se mais rica em fibras colágenas coradas em rosa que nos pacientes RI nos quais mostra-se mais celularizada (B). O Picrossírius mostra que na LP dos pacientes RA (C), a quantidade de fibras que contém colágeno, coradas por vermelho intenso, é maior do que na RI (D). Já o método da Picrossírius-polarização permite observar que nos pacientes RA, as fibras colagênicas apresentam maior densidade e birrefringência amarelo-avermelhada, típica das fibras grossas de colágeno tipo I (E) enquanto que nos pacientes RI, estas fibras são finas e de birrefringência esverdeada (F). As setas apontam para a região da membrana basal. Observar a membrana basal, corada em rosa pela eosina (A e B). Nos cortes corados com Picrossírius pode-se comprovar a natureza colagênica da membrana basal corada em vermelho intenso quando observada na luz convencional (seta C e D) e birrefringente quando observada sob luz polarizada (seta em E e F). Observar que a membrana basal dos pacientes RI possui menor espessura média e menor birrefringência quando comparada com a membrana basal dos pacientes RA

Conclui-se desta que a lâmina própria dos pacientes com RA, apresentou fibras colagênicas grossas (que aparecem tipicamente nas lesões fibróticas) que tomavam grande parte do tecido, enquanto que os pacientes com RI apresentaram fibras colagênicas mais delgadas, formando uma delicada trama tridimensional na lâmina própria.

### 5.3.2 Análise quantitativa em microscopia de luz

A fração de tecido ocupada por colágeno fibrilar foi calculada para todos os pacientes. O teste t de Student mostrou que o grupo de pacientes alérgicos apresentou maior densidade de colágeno na lâmina própria. Os resultados estão mostrados na Tabela 4.

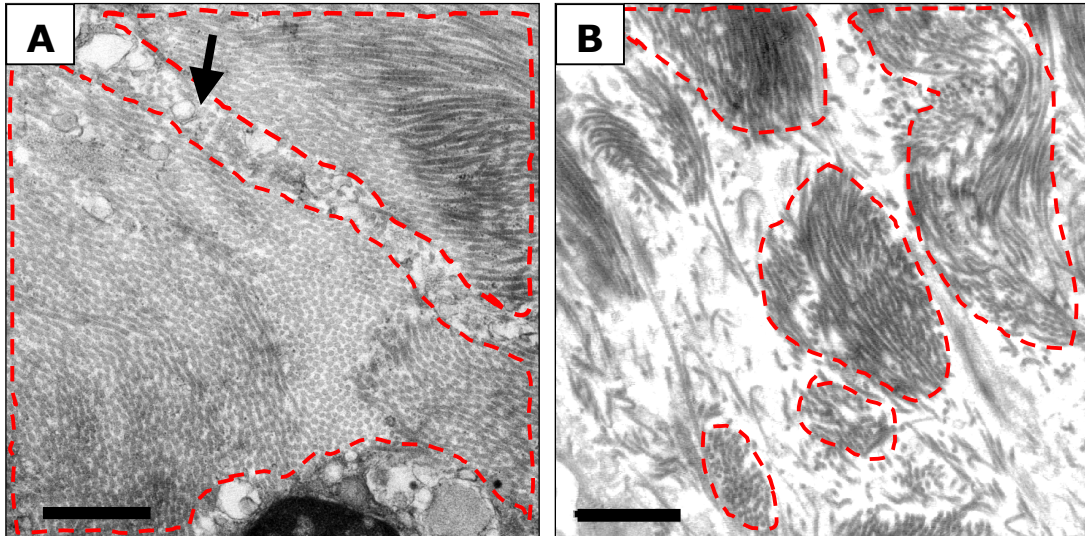
**Tabela 4 – Média e desvio padrão da fração de tecido ocupada por colágeno fibrilar nos grupos RA e RI**

	<b>Grupo RA</b>	<b>Grupo RI</b>	<b>p*</b>
<b>Colágeno fibrilar (%)</b>	58,89 ±11,83	46,24 ±10,29	0,005

\*teste t de Student

### 5.3.3 Avaliação da lâmina própria em microscopia eletrônica

Os resultados da análise do colágeno na lâmina própria, ao microscópio eletrônico, estão resumidos na Figura 10. Nos pacientes com RA havia grande quantidade de fibrilas de colágeno formando fibras grossas enquanto que nos pacientes com RI, o colágeno da lâmina própria era constituído por fibrilas frouxamente empacotadas formando fibras finas.



**Figura 10 – Micrografias eletrônicas de fragmentos da concha nasal inferior de paciente com RA e RI. As imagens representam as fibras colagênicas (contornadas em vermelho) da lâmina própria. Na imagem representativa dos pacientes com RA (A), as fibrilas de colágeno (que aparecem cortadas transversal e obliquamente) estão densamente empacotadas ocupando a maior parte da figura, formando duas fibras colágenas grossas separadas por um prolongamento celular (seta). Já na imagem representativa dos pacientes com RI (B), as fibrilas colagênicas se apresentam frouxamente empacotadas formando fibras mais finas. Barra = 1 $\mu$ m**

É possível estabelecer uma correspondência entre os achados da microscopia eletrônica e os achados do método da Picrossírius-polarização, de modo que as fibras colágenas formadas por grande quantidade de fibrilas densamente empacotadas dos pacientes com RA correspondem às fibras de birrefringência avermelhada mostradas na Figura 9E. Já as fibras finas formadas por poucas fibrilas frouxamente empacotadas dos pacientes com RI correspondem às fibras de pouca birrefringência, esverdeadas, da Figura 9F.

#### **5.3.4. Associação entre o tempo de doença e quantidade de colágeno na lâmina própria.**

Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre o tempo de evolução da doença e a área ocupada por colágeno na lâmina própria nem entre os pacientes RA ( $p=0,454$ ) e nem entre os pacientes RI ( $p=0,805$ ).



## 5.4 Análise dos colágenos da membrana basal

### 5.4.1 Análise qualitativa em microscopia de luz

Usando-se os preparados histológicos corados com o Picrossírius-hematoxilina, foi realizada a medida da espessura da membrana basal, uma vez que estas estruturas podiam ser perfeitamente distinguidas pela intensa coloração vermelha ao microscópio de luz convencional (Figura 11).

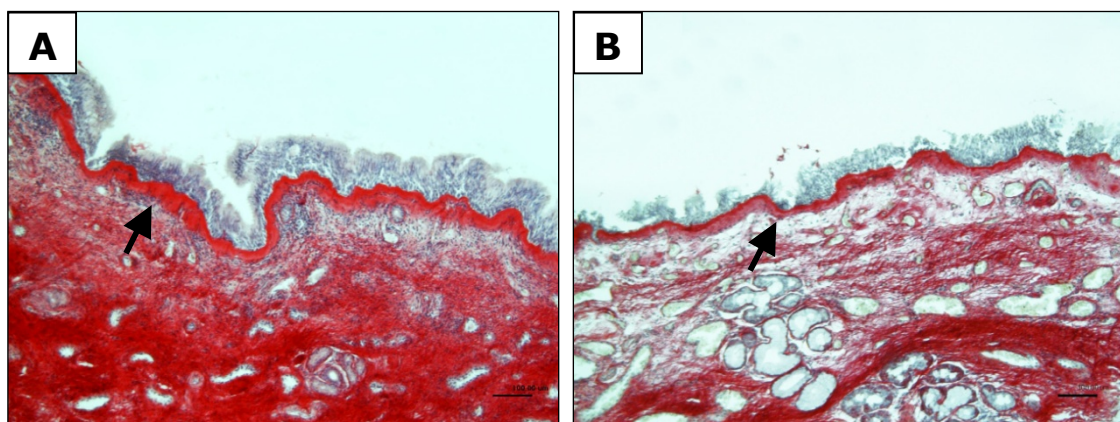


Figura 11 – Micrografias de mesmo aumento mostrando cortes histológicos, de concha nasal corados com Picrossírius-hematoxilina, de pacientes com RA (A) e com RI (B). Pode-se observar que a membrana basal (seta) apresenta-se mais espessa nos pacientes com RA. Barra = 100 $\mu$ m

### 5.4.2 Análise quantitativa em microscopia de luz

Com os dados coletados para a avaliação quantitativa da espessura da membrana basal, o teste estatístico t de Student mostrou que a membrana basal da concha nasal inferior de pacientes RA é significativamente mais espessa que de pacientes RI (Tabela 5).

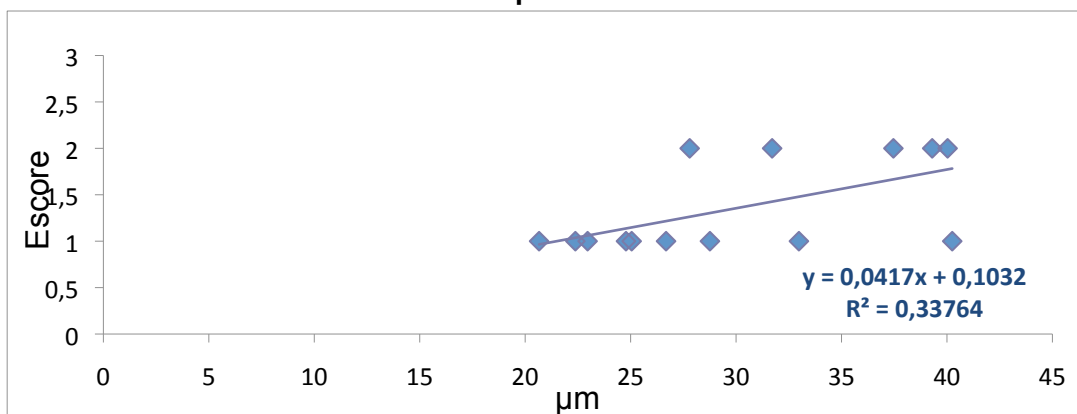
Tabela 5 – Espessura da membrana basal de pacientes com RA ou RI, em  $\mu$ m.

	Grupo RA	Grupo RI	p*
Média $\pm$ desvio padrão	30,06 $\pm$ 6,93	20,15 $\pm$ 7,91	0,002
Valor máximo	40,25	36,73	
Valor mínimo	20,66	10,28	

### 5.4.3 Associação entre a espessura da membrana basal e a intensidade da doença

As variações de espessura na membrana basal não se correlacionaram com a intensidade dos sintomas (espirros/prurido, coriza, obstrução nasal, secreção retro-nasal) ou dos sinais (coloração, secreção e com alterações da parede posterior da faringe). No entanto, o modelo de regressão linear mostrou que, nos pacientes com RA, há uma correlação positiva ( $p=0,029$ ) entre a espessura da membrana basal e “edema”, um dos sinais analisados ao exame físico (Gráfico 1). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,337, o que caracteriza uma correlação positiva moderada.

**Gráfico 1 – Regressão linear entre espessura da membrana basal e escore para sinal de “edema” no exame físico dos pacientes com RA**



### 5.4.4 Associação entre a espessura da membrana basal e o tempo de doença

Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre o tempo de evolução da doença e a espessura da membrana basal nos pacientes RA ( $p = 0,727$ ) ou RI ( $P = 0,781$ ).

#### 5.4.5 Avaliação qualitativa e quantitativa da membrana basal em microscopia eletrônica

Através do uso da microscopia eletrônica, foi claramente identificada a região da membrana basal, com seus componentes (lâmina basal e lâmina reticular) (Figura 12).

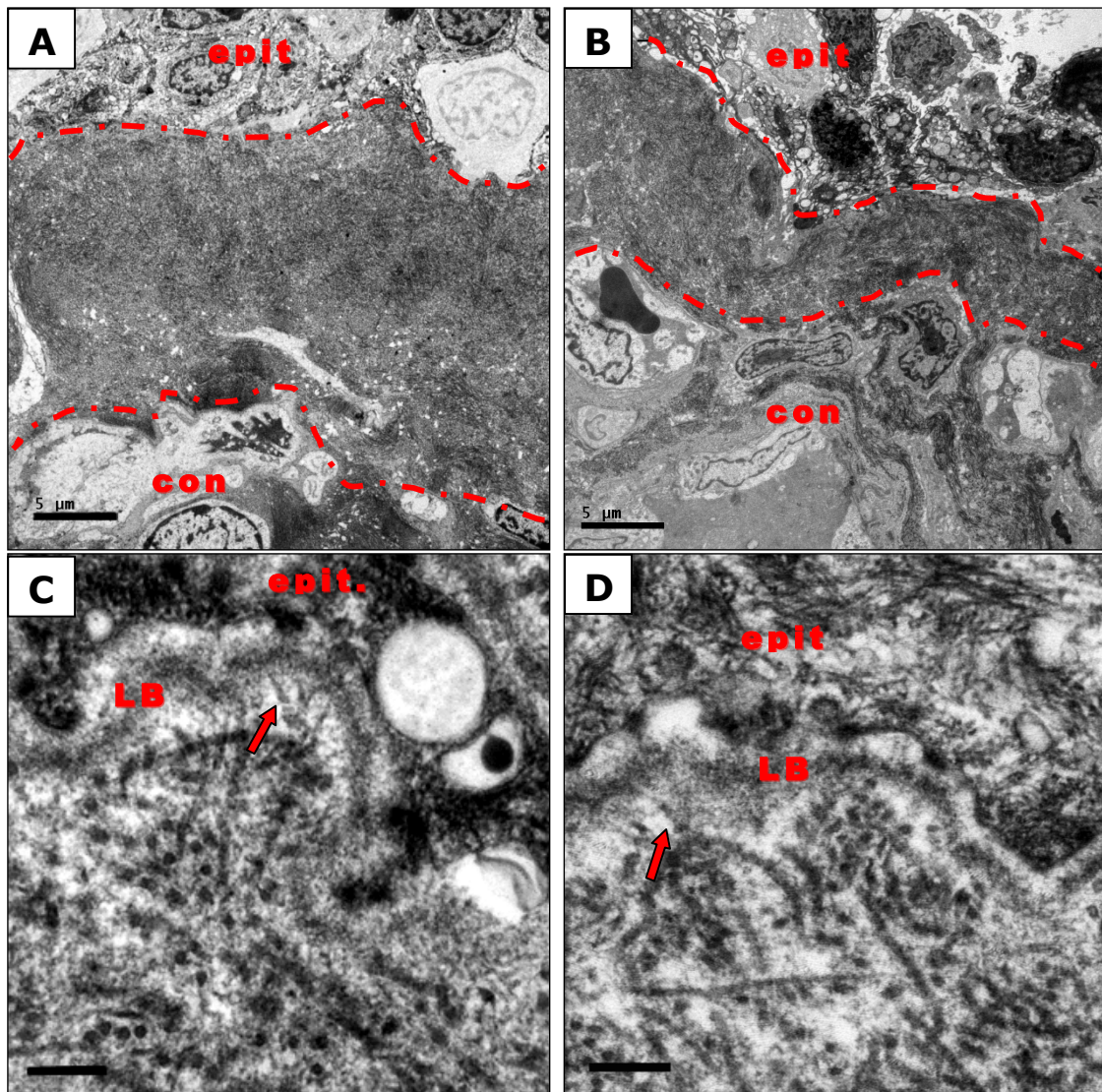
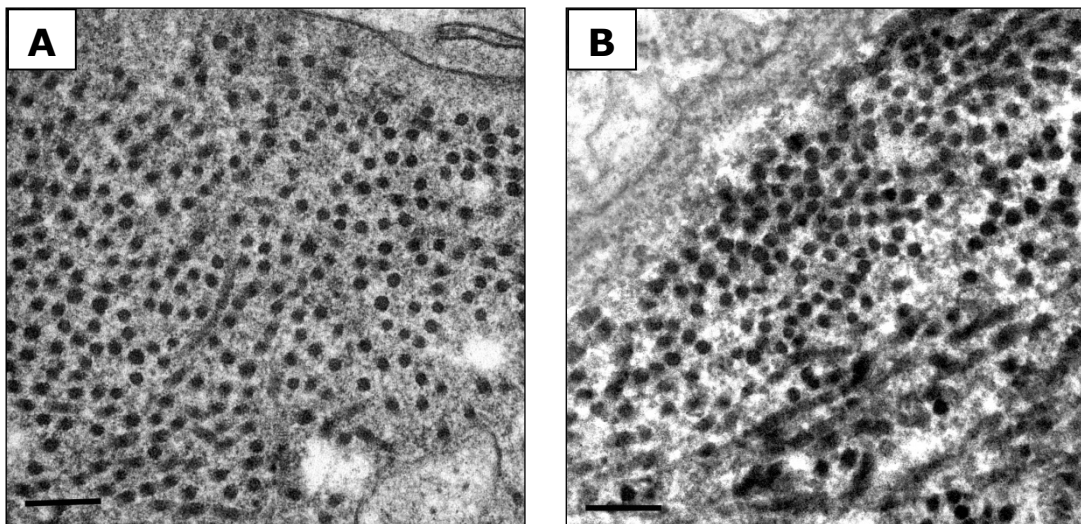


Figura 12 – Micrografias eletrônicas da concha nasal de pacientes com RA (A e C) ou RI (B e D). Nas micrografias de menor aumento (A e B) é possível observar, na parte superior, células do epitélio de revestimento da concha nasal (epit). A região da membrana basal está delimitada entre as linhas tracejadas nas duas micrografias. Abaixo da região da membrana basal, encontra-se o tecido conjuntivo propriamente dito (conj.). Nas micrografias de maior aumento (C e D) notam-se as porções basais de células epiteliais apoiadas na lâmina basal (LB) e toda região à ela corresponde à lâmina reticularis rica em fibrilas de colágeno associadas ao material amorfo. As setas apontam para fibrilas de colágeno tipo VII que fazem a ligação entre as fibras de colágeno da lâmina reticularis e a lâmina basal. Barra em A e B = 5µm; Barra em C e D = 0,2 µm

Tanto nos pacientes com RA como naqueles com RI, a lâmina reticular era o constituinte mais espesso com a típica concentração de fibrilas de colágeno, região subjacente à lâmina basal.

A análise das micrografias eletrônicas de maiores aumentos revelou que as fibrilas de colágeno da lâmina reticular dos pacientes com RA estavam distribuídas mais frouxamente na substância fundamental amorfa, deixando maior espaço entre as fibrilas, enquanto que nos pacientes com RI, estas fibrilas eram mais próximas entre si, deixando menor espaço interfibrilar. Além disso, as micrografias sugeriam que o diâmetro médio das fibrilas de colágeno nos pacientes com RI fosse maior (Figura 13).



**Figura 13 - Micrografia eletrônica, de mesmo aumento, da lâmina reticular da concha nasal de paciente com RA (A) e RI (B). Observar que, aparentemente, o diâmetro das fibrilas de colágeno é maior em RI. No grupo RA, as fibrilas parecem mais finas e mais frouxamente empacotadas, enquanto que no grupo RI, as fibrilas parecem mais grossas e densamente empacotadas, Barra = 200nm**



Os resultados das medidas dos diâmetros, em perfil transversal, das fibrilas de colágeno na lâmina reticular dos dois grupos de pacientes está mostrado na Tabela 6.

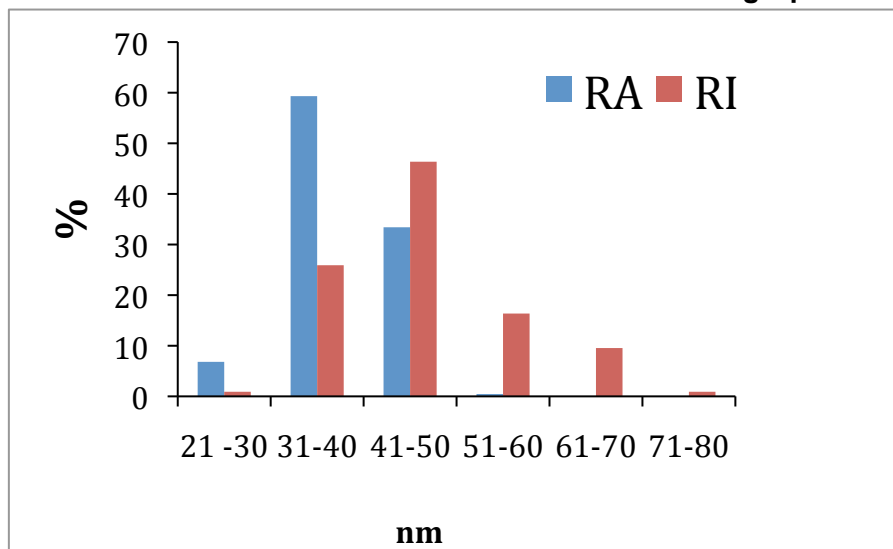
**Tabela 6 – Dados descritivos do diâmetro das fibrilas de colágeno da membrana reticular nos pacientes com RA ou RI, em nm**

	Grupo RA	Grupo RI	p*
Mediana (amplitude interquartil)	38 (8)	45 (12)	< 0,001
Valor máximo	54	75	
Valor mínimo	25	28	

\*teste de Mann-Whitney

A análise da distribuição dos diâmetros das fibrilas de colágeno mostra que os pacientes com RI apresentam uma população de fibrilas mais grossas ( $46,73 \pm 9,25$ , média e desvio padrão, em nm) com uma distribuição mais ampla e heterogênea com variação principalmente entre 31 a 70 nm. Em contraste, nos pacientes com RA, as fibrilas eram mais finas ( $38,17 \pm 5,2$ ) com diâmetros mais uniformes, concentrados entre 31 e 50 nm. (Gráfico 2).

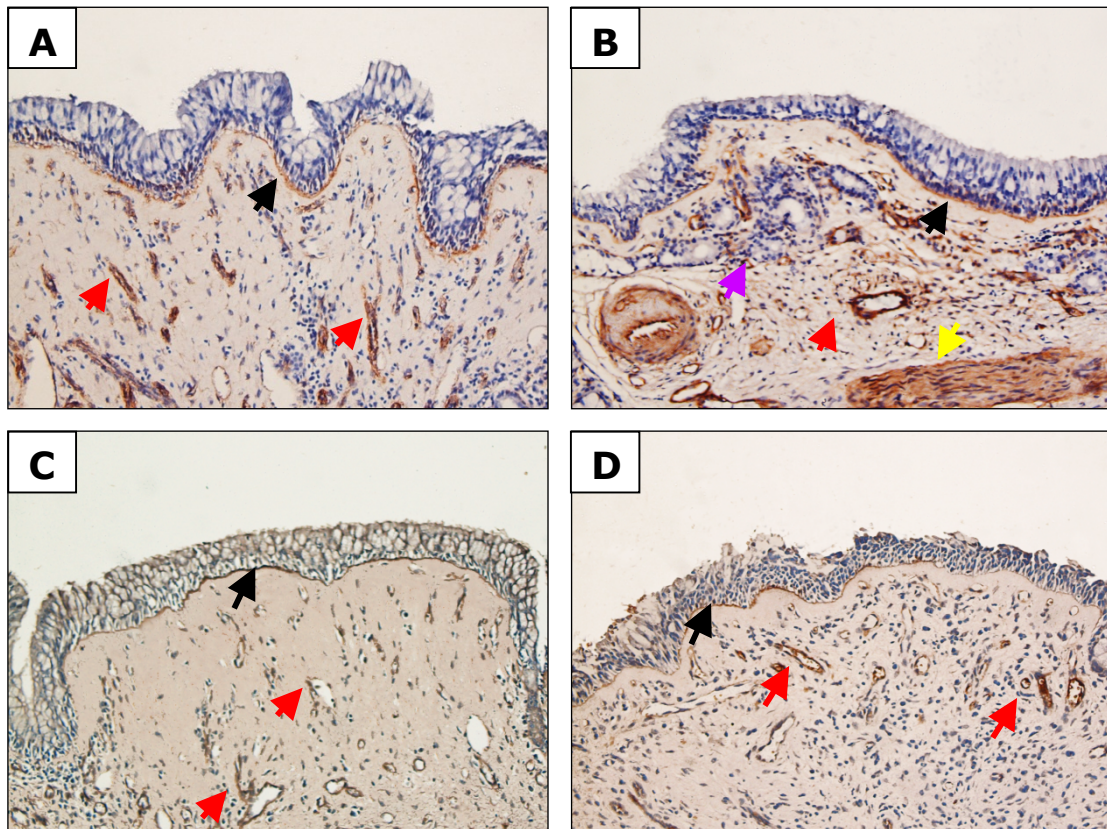
**Gráfico 2 – Histograma ilustrando a freqüência dos diâmetros das fibrilas colágenas medidos na lâmina reticular da mucosa nasal nos grupos RA e RI**



#### 5.4.6 Análise imunoistoquímica da lâmina basal

Os resultados obtidos no estudo imunoistoquímico da laminina e do colágeno tipo IV, principais constituintes da lâmina basal, revelam que não há diferenças significativas entre os grupos RA e RI na distribuição de laminina e de colágeno IV.

Estes resultados estão ilustrados na Figura 14.



**Figura 14 - Fotomicrografias de cortes histológicos de concha nasal inferior submetidos à reação imunoistoquímica para identificação de laminina (A e B), colágeno tipo IV (C e D). As imagens A e C correspondem à pacientes com RA, enquanto que B e D correspondem à pacientes com RI. Ambas proteínas limitam-se à lâmina basal seja do epitélio de revestimento (seta preta), do epitélio glandular (seta rosa), das células endoteliais (seta vermelha) ou das células musculares lisas (seta amarela). Observar que não há diferenças entre os grupos**

## **6. DISCUSSÃO**

Uma vez que a septoplastia associada à turbinectomia é um procedimento freqüente na cirurgia otorrinolaringológica foi possível reunir no tempo destinado ao Doutorado a casuística estudada, apesar das limitações impostas pelos critérios de inclusão e exclusão. A proposta para realização do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata foi aceita sem maiores problemas por todos os pacientes convidados a participar do estudo. Não houve problema algum para o entendimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado. Não houve complicações intra ou pós-operatórias, sendo que todos os pacientes foram acompanhados durante dois meses após a cirurgia.

O grupo de pacientes RA não se distinguiu do grupo de pacientes RI em relação à idade. Esta observação é importante, pois desta forma, não se pode atribuir à idade as diferenças encontradas neste estudo na organização do colágeno na mucosa nasal nos dois grupos.

A casuística estudada reproduz as características descritas na literatura científica para esses grupos de pacientes inclusive no que diz respeito à idade de início dos sintomas (Settipane, Charnock, 2007), que se mostrou mais avançada no grupo RI (por volta dos 17 anos) do que no grupo RA (com início por volta dos 9 anos). Já ao analisar o tempo de evolução da doença, observa-se que os dois grupos eram homogêneos entre si.

A aplicação do Questionário de Sinais e Sintomas, proposto por Mello Jr e Mion (2002) para estabelecimento de um escore que avalia a intensidade da doença foi fundamental para a caracterização da amostra. É um questionário de fácil aplicação, obtendo um resultado em pouco tempo. Na amostra deste estudo, os sintomas de espirro/prurido e coriza foram mais intensos no grupo RA. Os estudos de Sanico e Togias (1998) e Kalpaklioglu e Kayut (2009) obtiveram os mesmos resultados, comparando-se também pacientes com RA com pacientes com RI. Da mesma forma que nos estudos de Kalpaklioglu e Kayut (2009) e Bernstein (2009), os sintomas de obstrução nasal e de secreção retro-nasal se mostram iguais entre os dois grupos, ressaltando-se que ambos apresentaram escore máximo para obstrução nasal (valor 3), o que reforça a indicação de tratamento cirúrgico para esses pacientes.

Os sinais detectados ao exame físico, como a palidez aparente e o edema da concha nasal, além do aspecto da parede posterior da orofaringe e presença de secreção foram mais prevalentes no grupo RA do que no grupo RI. Estes sinais provavelmente derivam do quadro inflamatório que se instala na mucosa nasal dos indivíduos alérgicos. O aumento de permeabilidade dos capilares promovido pela histamina leva ao acúmulo anormal de líquido na matriz extracelular, provocando inchaço e palidez superficial da mucosa; mais ainda, a histamina acelera a produção e a secreção glandular, com rinorréia e irritação da parede posterior da orofaringe.

Como decorrência do processo inflamatório que se estabelece nos indivíduos alérgicos ocorre destruição tecidual com morte celular e fibrose, uma vez que no local da lesão ocorre a deposição de um tecido rico em fibras colágenas que caracteriza o processo de cicatrização.

A fibrose é um processo característico comum presente em diversas entidades patológicas. Em algumas doenças, o processo de reparação é um estado progressivo, levando um acúmulo significativo de colágeno que pode ocasionar alterações do parênquima do tecido envolvido. Quando depositado, o colágeno passa por um processo de maturação altamente regulado que aumenta sua força mecânica e sua resistência à degradação, sendo que neste processo estão envolvidas ligações intermoleculares cruzadas aumentadas e perda progressiva de substância fundamental amorfa e da água nela adsorvida (Nimni, 1980).

O padrão de distribuição e organização espacial do colágeno na lâmina própria da concha nasal inferior de indivíduos normais (teste cutâneo negativo e sem sintomas clínicos) foi descrito por Van Bruaene et al. (2009) em um estudo usando o método da Picrossírius-polarização como utilizado neste trabalho. A lâmina própria da concha nasal normal mostrou a presença de fibras finas, fracamente birrefringentes, esverdeadas, que ocupavam cerca de 35% da área tecidual. As fibras grossas, fortemente birrefringentes foram observadas apenas ocasionalmente.

Nos pacientes do grupo RA a fibrose resultante da inflamação continuada levou ao acúmulo de colágeno fibrilar, que aparece ocupando cerca de 60% da lâmina própria no presente estudo. Isso significa que a fração de

tecido ocupada por colágeno praticamente dobrou nos pacientes com RA. Além disso, a microscopia eletrônica mostra que a maior parte deste colágeno apresenta-se sob a forma de fibras grossas formadas por fibrilas grossas e densamente empacotadas, de modo a restar pouco espaço tecidual para as células e para a substância fundamental amorfa; por conseqüência, pode-se supor que há menor trânsito de nutrientes devido à menor quantidade de água tecidual adsorvida, o que, em última análise, dificultaria mais ainda a recuperação tecidual.

O aumento na quantidade de colágeno na mucosa nasal de pacientes alérgicos já havia sido descrito por Kim et al. (2010), com a comparação com controles saudáveis. Embora estes últimos autores tivessem utilizado um método (Van Gieson) não específico para colágeno, os nossos resultados coincidem, mostrando que 60% da área da lâmina própria da concha nasal está ocupada por colágeno nos pacientes com RA.

No entanto, estes resultados contrastam com aqueles de Sanai et al. (1999) que afirmam não ter encontrado diferenças na quantidade de colágeno na lâmina própria da concha nasal de indivíduos normais comparados a indivíduos com RA. Vale comentar que dos 13 indivíduos do grupo controle nenhum deles realizou teste cutâneo de hipersensibilidade imediata, sendo que 8 eram casos de autópsia, 4 eram casos de rinosinusite crônica (que em última análise é uma inflamação da mucosa nasal) e um deles tinha um tumor parassinusal (que também promove alteração do tecido adjacente). Desta forma, não é de se espantar que Sanai et al. (1999) não tenha encontrado diferença na quantidade de colágeno nos indivíduos com RA quando comparados aos pacientes deste grupo, que foi inadequadamente considerado por eles como controle.

O tecido fibrótico se modifica ao longo dos dois primeiros anos após a lesão e as avaliações histológicas da maturidade de um processo de cicatrização são de considerável valor para análise. No entanto, no caso das amostras deste estudo, todos os indivíduos com RA tinham mais que 9 anos de tempo de doença, o que caracteriza uma lesão já madura, rica em fibras grossas de colágeno, que se mostram com forte birrefringência amarelo-avermelhada quando analisadas pelo método da Picrossírius-polarização. Uma

vez que a fibrose estava consolidada pelo avançado tempo de doença em todos pacientes com RA, não foi possível encontrar correlação entre a quantidade de colágeno e o tempo de doença. É possível aventar a hipótese que a inclusão no grupo de estudo de pacientes com pouco tempo de RA (menos que dois anos) levaria à identificação da correlação entre quantidade de colágeno na lâmina própria e tempo de doença. Esta possível deposição de colágeno gradativa nos primeiros dois anos, pode explicar os achados de Ciprandi et al. (2008b) que mostrou uma piora da função nasal após dois anos de doença.

Esta quantidade maior de colágeno estabelecida diminui a complacência e a resiliência teciduais, como acontece em outros órgãos, como no pulmão na doença pulmonar obstrutiva crônica (Hogg et al., 2009) ou no coração como na cardiomiopatia hipertrófica (Ellims et al., 2014). Assim sendo, a fibrose da concha nasal nos pacientes com RA pode explicar a irreversibilidade da obstrução nasal no teste de descongestão em doentes crônicos (Ciprandi et al. 2008a), mesmo que sejam crianças (Chawes et al., 2009).

Já no grupo RI, a lâmina própria da concha nasal mostra menor quantidade de colágeno total que o grupo RA, sendo que os valores encontrados neste estudo são semelhantes àqueles descritos por Van Bruaene et al. (2009) para a concha nasal normal. Mais ainda, o aspecto estrutural das fibras colagênicas da concha nasal dos pacientes RI é semelhante àquele descrito para indivíduos normais, com presença predominante de colágeno sob a forma de fibras finas, esverdeadas fracamente birrefringentes típicas dessa localização, indicando que os sintomas da RI não derivam de fibrose tecidual.

Os achados ultraestruturais confirmam os resultados obtidos pelo método da Picrossírius-polarização, mostrando, na lâmina própria dos pacientes com RA a presença em grande quantidade de fibrilas grossas de colágeno densamente empacotadas formando fibras grossas, correspondentes às fibras fortemente birrefringentes avermelhadas observadas pelo método da Picrossírius-polarização. Por sua vez, na lâmina própria dos pacientes com RI, a análise ultraestrutural foram identificadas fibrilas finas de colágeno

frouxamente empacotadas formando fibras finas, que correspondem às fibras de pouca birrefringência, esverdeadas.

Mais uma vez, como já preconizado por Montes (1996), confirma-se que a análise das fibras de colágeno através do método da Picrossírius-polarização, associada ao estudo ultraestrutural é uma eficiente ferramenta para caracterização de processos cicatriciais fibróticos, nos quais há a substituição do colágeno tipo III (tipicamente sob a forma de fibras finas fracamente birrefringentes) por colágeno tipo I (tipicamente sob a forma de fibras grossas fortemente birrefringentes), dispensando o uso de imunistoquímica para caracterização deste padrão de alteração tecidual.

Em todos os preparados foi possível identificar de modo inequívoco a presença da membrana basal subepitelial espessa, típica das vias aéreas. Levando-se em consideração que a espessura da membrana basal de indivíduos sem rinite está na faixa dentre 4,0 a 10,5  $\mu\text{m}$  (Chanez, et al., 1999; Braunstahl et al., 2003; Shaitoh et al., 2009), os nossos dados mostram que a espessura da membrana basal triplicou nos pacientes com RA e duplicou nos pacientes com RI, com diferença significativa entre eles. Outros estudos, realizados em seres humanos, já haviam detectado o aumento da espessura da membrana basal da concha nasal de pacientes com RA (Sanai et al., 1999; Braunstahl et al., 2003). Além disso, estudos em modelos animais, confirmaram a presença de fibrose na região subepitelial correspondente à membrana basal após repetida exposição à alérgenos (Lim et al., 2007).

É interessante observar que este aumento de espessura não se fez às custas da lâmina basal, uma vez que a laminina e o colágeno tipo IV (que são os principais componentes da lâmina basal) não apresentaram alteração de quantidade ou distribuição tanto nos pacientes com RA como naqueles com RI; além disso, ao microscópio eletrônico a lâmina basal mostrou aspecto normal, quanto à espessura, integridade, eletrondensidade e à organização estrutural; não foram observadas delaminações ou reduplicação de lâmina basal como acontece em alguns tecidos em processo de reparo (Vracko, 1974). Também em indivíduos asmáticos, a lâmina basal do epitélio brônquico não apresenta alterações (Roche et al., 1989; Vignola et al., 2003).



Assim sendo, o grande aumento da espessura da membrana basal da concha nasal observado especialmente nos pacientes com RA deve-se a um aumento da lâmina reticular (constituída por fibrilas de colágeno tipo III e substância fundamental), exatamente do mesmo modo que já havia sido observado na parede brônquica de indivíduos asmáticos (Saglani et al., 2006).

A fibrose subepitelial brônquica em pacientes asmáticos ocorre em decorrência da deposição de imunoglobulinas, colágeno I e III, tenascina e fibronectina, que são produzidas por miofibroblastos (Roche et al., 1989; Brewster et al. 1990). O TGF- $\beta$  tem um papel importante no desenvolvimento e na manutenção da resposta fibrótica, assim como as interleucinas 4, 5, 9, 11 e 13 (Romagnani, 2000; McMillan, Lloyd, 2004).

A idéia de que existe uma relação positiva entre a espessura da membrana basal brônquica e a gravidade dos sintomas da asma (Chetta et al., 1997), nos levou a investigar se nos pacientes com rinite haveria também essa correlação. O tratamento estatístico, realizado com os dados obtidos através do escore de sinais e sintomas, mostrou que esta correlação está presente apenas nos pacientes com RA para o sinal "edema". Importante notar que, na prática clínica, este sinal reflete o volume da concha nasal inferior visualizada na rinoscopia.

Sabe-se que o edema, em termos patológicos, é definido como acúmulo de líquido intersticial. As causas que podem levar ao excesso de líquido tecidual se classificam em quatro grandes grupos: bloqueio do retorno linfático, aumento da pressão capilar, diminuição das proteínas plasmáticas e aumento da permeabilidade capilar (Hall, 2011). No caso da RA, o edema da concha nasal deve-se ao aumento da permeabilidade capilar provocado por reações imunes que causam a liberação de histamina e outros produtos imunologicamente ativos. Sabe-se também que os proteoglicanos desempenham um papel essencial na regulação do metabolismo da água adsorvendo ou liberando fluidos. À luz destes conhecimentos é possível interpretar o nosso achado da existência de maior espaço entre as fibrilas de colágeno tipo III da membrana basal como sendo a imagem ultraestrutural do edema subepitelial nos pacientes com RA, uma vez que o líquido intersticial em excesso se acomoda como água de solvatação adsorvida aos proteoglicanos

da substância fundamental amorfa contribuindo para o maior turgor tecidual, que clinicamente interpreta-se como edema.

Sabe-se que a polimerização das moléculas de colágeno para a formação das fibrilas e fibras depende grandemente dos outros componentes da matriz extracelular, como os proteoglicanos, as glicoproteínas adesivas e as metaloproteinases, portanto, é de se esperar que estes apresentem também alterações quantitativas e qualitativas na lâmina reticular, devendo ser o foco de futuros estudos.

## **7. CONCLUSÕES**

Alterações da mucosa nasal ocorrem na RA, sendo caracterizadas pelo aumento da espessura da membrana basal e por uma fibrose na lâmina própria. Na RI, apesar do espessamento da membrana basal, observou-se uma lâmina própria com aspecto estrutural semelhante aos pacientes normais, indicando que a fisiopatologia envolvida não deriva de fibrose tecidual como verificado nos pacientes alérgicos. Observou-se ainda a correlação entre a espessura da membrana basal e o edema das conchas nasais inferiores presente nos pacientes alérgicos.



**Anexo A****Identificação:**

Nome:.....

Data:...../...../.....

Sexo: M ( ) F ( )

Natural:..... Cor:.....

Profissão:.....

Data da cirurgia:...../...../.....

Cirurgia:.....

**Quadro Clínico:**

Idade de início:.....

Relaciona com algum fator:.....

Tendência: Piorando ( ) Melhorando ( ) Inalterado ( )

Sintoma: Perene ( ) Sazonal ( ) Perene com piora Sazonal ( )

Piora: diurna ( ) noturna ( ) variação geográfica ( )

Sintoma ocular:.....Sintoma auricular:.....

Sintoma Cutâneo:.....Sintoma sinusal:.....

Epistaxe:..... Broncoespasmo:.....

Espirros/Prurido	Coriza	Obstrução Nasal	Secreção Retro-nasal

**Fatores Agravantes:**

Alérgenos:

Poeira:..... Fungos:..... Pólen:..... Piretro:..... Lã:..... Penas:.....

Pelos:..... Outros:.....

Inespecíficos:

Irritantes:..... Alterações meteorológicas:..... Exercícios:.....

Stress:..... Ciclo menstrual:..... Gravidez:.....

Drogas:

AAS:..... ACO:..... Anti-hipertensivos:..... Outros:.....

Alimentos:.....

**Aspectos Ambientais:**

Adequado ( ) Inadequado ( )

Urbano ( ) Rural ( ) Poluente perto?:.....

Tipo de construção:..... Ventilação:.....

Tapete/carpete:..... Cortina:..... Colchão:.....

Animais:.....

**Aspectos Ocupacionais:**

Melhora ( ) Piora ( ) Inalterado ( )

Exposição: Poeira ( ) Fumaça ( ) Vapores ( ) Gases ( )

Tempo de exposição:.....

Medidas de proteção:.....

**Antecedentes Pessoais:**.....

**Antecedentes Familiares:**.....

**Hábitos:**.....

**Exame Físico:**

Coloração	Edema	Secreção	Faringe

Septo:.....

Boca:.....

Ouvidos:.....

Olhos:.....

**Terapêutica anterior:**.....

Melhora ( ) Sem resposta ( )



## **9. REFERÊNCIAS**

Agha-Mir-Salim P, Rauhut O, Merker HJ. Electron and fluorescence microscopic investigations on composition and structure of the epithelial basement membrane of the human inferior nasal concha. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993;250(7):401-7.

Amin K, Rinne J, Haahtela T, Simola M, Peterson CG, Roomans GM, et al. Inflammatory cell and epithelial characteristics of perennial allergic and nonallergic rhinitis with a symptom history of 1 to 3 years' duration. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107:249-57.

Berger G, Balum-Azim M, Ophir D. The normal inferior turbinate: histomorphometric analysis and clinical implications. *Laryngoscope.* 2003;113(7):1192-8.

Bernstein JA. Characteristics of Nonallergic Vasomotor Rhinitis. *World Allergy Organ J.* 2009;2(6):102-5.

Bousquet J, Jacot W, Vignola AM, Bachert C, Van Cauwenberge P. Allergic rhinitis: a disease remodeling the upper airways? *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:43-9.

Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008;63 Suppl 86:8-160.

Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, KleinJan A, Hoogsteden HC, Prins JB. Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways. *Clin Exp Allergy.* 2003;33(5):579-87.

Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;3:507-11.

Chanez P, Vignola AM, Vic P, Guddo F, Bonsignore G, Godard P, et al. Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:588-95.

Chawes BL, Kreiner-Møller E, Bisgaard H. Objective assessments of allergic and nonallergic rhinitis in young children. *Allergy*. 2009;64(10):1547-53.

Chetta A, Foresi A, Del-Donno M. Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest*. 1997;111:852-7.

Ciprandi G, Pistorio A, Tosca M, Cirillo I. Relationship between rhinitis duration and response to nasal decongestion test. *Laryngoscope*. 2008a;118:1139-41.

Ciprandi G, Cirillo I, Pistorio A, La Grutta S. Relationship between rhinitis duration and worsening of nasal function. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008b;138(6):725-9.

Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF. Quantification of collagen Types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1979;161:337-40.

Cotran R, Kumar V, Robin S. *Robbins pathologic basis of disease*. Philadelphia: WB Saunders; 1989. Cap. 2, p.39-87: Inflammation and repair.

Ellims AH, Taylor AJ, Mariani JA, Ling LH, Iles LM, Maeder MT, et al. Evaluating the utility of circulating biomarkers of collagen synthesis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2014 1;7(2):271-8.

Fahy JV, Corry DB, Boushey HA. Airway inflammation and remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2000; 6(1):15-20.

Garay R. Mechanisms of vasomotor rhinitis. *Allergy*. 2004;59:4-9.

Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):247-57.

Hall JE. *Guyton & Hall Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011. Cap. 25, p. 285-300: The Body Fluid Compartments: Extracellular and Intracellular Fluids; Edema.

Hashmi S, Marinkovich MP. Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Dermatol*. 2011;29(4):398-411.

Hogg JC, McDonough JE, Gosselink JV, Hayashi S. What drives the peripheral lung-remodeling process in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2009 6(8):668-72.

Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:1745-53.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy – a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-55.

Junqueira LCU, Montes GS. Biology of collagen-proteoglycan interaction. *Arch Histol Jpn*. 1983;46:589-629.

Kalpaklioglu AF, Kavut AB. Allergic and nonallergic rhinitis: can we find the differences/similarities between the two pictures? *J Asthma*. 2009;46(5):481-5.

Kim TH, Lee JY, Lee HM, Lee SH, Cho WS, Ju YH, et al. Remodeling of nasal mucosa in mild and severe persistent allergic rhinitis with special

reference to the distribution of collagen, proteoglycans and lymphatic vessels. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:1742–54.

Lim YS, Won TB, Shim WS, Kim YM, Kim JW, Lee CH, et al. Induction of airway remodeling of nasal mucosa by repetitive allergen challenge in a murine model of allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2007;98:22–31.

Malcomson KG. The vasomotor activities of the nasal mucous membrane. *J Laryngol*. 1959;73:73-5.

Martinez-Hernandez A. Repair, regeneration and fibrosis. In Rubin E, Faber JL. *Pathology*. Lippincott, 1988. pp. 66-95

McCusker CT. Use of mouse models of allergic rhinitis to study the upper and lower airway link. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4:11–6.

McMillan SJ, Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:497-507.

Mello Jr JF, Mion O. Rinite alérgica. In: Campos CAH, Costa HOO. *Tratado de Otorrinolaringologia*. São Paulo: Roca; 2002. v3, p. 68-87.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996;20:15-27.

Mora PM, Blanco E, Campos JJM, Espinosa AG, Fogelbach GG, Tinajeros OAC. Nasal remodeling in patient with perennial allergic rhinitis. *Rev Alerg Mex*. 2003;50(3):79-89.

Nanci A. *Ten Cate, histologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. Cap. 4, p. 48-70: Citoesqueleto, Junções Celulares, Fibroblastos e Matriz Extracelular.

Neffen H, Mello Jr JF, Sole D, Naspitz CK, Dodero AE, Garza HL, et al. Nasal allergies in the Latin American population: results from the Allergies in Latin America Survey. *Allergy Asthma Proc.* 2010;31 Suppl 1:9-27.

Nimni ME. The molecular organization of collagen and its role in determining biophysical properties of the connective tissues. *Biorheology.* 1980;17:51-82.

Numata T, Konno A, Hasegawa S, Hanazawa T, Nagata H, Terada N. Pathophysiological features of the nasal mucosa in patients with idiopathic rhinitis compared to allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;119(4):304-13.

Pickering JG, Boughner DR. Quantitative assessment of age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. *Am J Pathol.* 1991;138:1225-31.

Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. Evidence for an inflammatory pathophysiology in idiopathic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(6):864-72.

Roche WR, Beasley R, Williams JH. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1989;1 520-4.

Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:399-408.

Saglani S, Molyneux C, Gong H, Rogers A, Malmström K, Pelkonen A, et al. Ultrastructure of the reticular basement membrane in asthmatic adults, children and infants. *Eur Respir J.* 2006;28(3):505-12.

Saitoh T, Kusunoki T, Yao T, Kawano K, Kojima Y, Miyahara K, et al. Relationship between epithelial damage or basement membrane thickness

and eosinophilic infiltration in nasal polyps with chronic rhinosinusitis. *Rhinology*. 2009;47(3):275-9.

Salib RJ, Howarth PH. Remodeling of the upper airway in allergic rhinitis: is it a feature of the disease? *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1629-33.

Sanai A, Nagata H, Konno A. Extensive interstitial collagen deposition on the basement membrane zone in allergic nasal mucosa. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1999;119:473-8.

Sanico A, Togias A. Noninfectious, nonallergic rhinitis (NINAR): considerations on possible mechanisms. *Am J Rhinol*. 1998;12(1):65-72.

Settipane RA, Charnock DR. Epidemiology of rhinitis: allergic and nonallergic. *Clin Allergy Immunol*. 2007;19:23-34.

Tos M, Morgensen C. Nasal glands in nasal allergy. *Acta Otolaryngol*. 1977;83:498-504.

Van Bruaene N, Van Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):253-9.

Van Rijswijk JB, Blom HM, KleinJan A, Mulder PG, Rinjntjes E, Fokkens WJ. Inflammatory cells seem not to be involved in idiopathic rhinitis. *Rhinology*. 2003;41(1):25-30.

Van Rijswijk JB, Blom HM, Fokkens WJ. Idiopathic rhinitis, the ongoing quest. *Allergy*. 2005;60:1471-81.

Van Rijswijk JB, Gerth van Wijk R. Capsaicin treatment of idiopathic rhinitis: the new panacea? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2006;6(2):132-7.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, et al. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003;123(3):417S-22S.

Vracko R. Basal lamina scaffold-Anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure: a review. *Am J Pathol*. 1974; 77(2): 313–46.

Watanabe K, Kiuna C. Epithelial damage of nasal mucosa in nasal allergy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998;107:564-70.

Watelet JB, Van Zele T, Gjomarkaj M, Canonica GW, Dahlen SE, Fokkens W, et al. Tissue remodelling in upper airways: where is the link with lower airway remodelling? *Allergy*. 2006;61(11):1249-58.