

BRUNA SCHARLACK VIAN

**EFEITO DA APLICAÇÃO NASAL DE DIFERENTES SOLUÇÕES SALINAS
SOBRE OS SINTOMAS, SENSIBILIDADE OLFATIVA E EXPRESSÃO DE
FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL (NGF) EM PACIENTES COM
RINOPATIA ALÉRGICA PERSISTENTE.**

ORIENTADOR: PROF DR RICARDO DE LIMA ZOLLNER

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**EFEITO DA APLICAÇÃO NASAL DE DIFERENTES SOLUÇÕES SALINAS
SOBRE OS SINTOMAS, SENSIBILIDADE OLFATIVA E EXPRESSÃO DE
FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL (NGF) EM PACIENTES COM
RINOPATIA ALÉRGICA PERSISTENTE.**

BRUNA SCHARLACK VIAN

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner.

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

V654e Vian, Bruna Scharlack, 1979 -
Efeito da aplicação nasal de diferentes soluções
salinas sobre os sintomas, sensibilidade olfativa e
expressão de fator de crescimento neural (NGF) em
pacientes com rinite alérgica persistente / Bruna
Scharlack Vian. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Prevenção. 2. Farmacologia. 3. Doenças
respiratórias. I. Zollner, Ricardo de Lima. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of different concentration of nasal saline solutions on the symptoms, olfactory sensitivity and neural growth factor expression of patients with persistent allergic rhinitis.

Palavras-chave em inglês:

Prevention

Pharmacology

Respiratory Tract Diseases

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Reinaldo Jordão Gusmão

Pérsio Roxo Junior

Data da defesa: 11-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Bruna Scharlack Vian

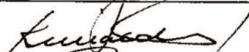
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Membros:

1. Prof. Dr. Pérsio Roxo Júnior



2. Prof. Dr. Reinaldo Jordão Gusmão



3. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/01/2012

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Pedro Antonio (*in memorian*) e Ana Maria.
A educação e o amor que me concederam foram imprescindíveis para me tornar
uma pessoa em busca de sabedoria, mesmo com todas as dificuldades que surgiram em
nossas vidas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, pela oportunidade e paciência e principalmente pelos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental: Dr Ricardo, Conceição, Karla, Meg, Priscila, Luis Guilherme, Giovana e, especialmente à Natalia. Obrigada pelos ensinamentos, companhia, colaboração e paciência.

Ao CEPAGRI - Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. Obrigada por fornecer os dados climáticos que muito favoreceram na coleta de dados.

A professora Dra Nicola Conran. Obrigada pela ajuda na revisão da língua inglesa.

À secretária Adriana, da Comissão de Pós Graduação em Clínica Médica. Obrigada pelas instruções e colaboração.

Aos estatísticos Rodolfo Arruda, Helymar Machado e Cleide Moreira da Silva.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Anatomia e fisiologia nasal.....	14
1.2. Rinite Alérgica.....	16
1.2.1. Diagnóstico da RA	18
1.2.2. Citologia Nasal.....	19
1.2.3. Neurotrofinas.....	19
1.2.4. Tratamento	20
1.2.5. Soluções Salinas.....	21
2. HIPÓTESE:	23
3. OBJETIVOS:.....	24
4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS:.....	25
4.1: Modelo de estudo clínico.....	25
4.2. Comitê de ética em pesquisa.....	27
4.3. Critérios de Inclusão.....	27
4.4. Condições Climáticas.....	29
4.5. Critérios clínicos de avaliação e seguimento quanto à aplicação das soluções na mucosa.....	29
4.6. Escores olfativos.....	30
4.7. Coleta de material da mucosa nasal.....	32
4.8. Extração de RNA Total (RNAT).....	32

4.9. Análise do RNA Total Extraído.....	33
4.10. Transcrição Reversa do RNA total Extraído cDNA).....	33
4.11. Expressão gênica de NGF por meio de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	34
4.12. Análise Estatística.....	36
5. RESULTADOS:.....	37
5.1. Seguimento do estudo.....	37
5.2. Condições climáticas (umidade e temperatura) durante o estudo.....	37
5.3. Total dos escores dos sintomas nasais (TESN).....	43
5.4. Total do escore do olfato.....	49
5.5. Expressão gênica da neurotrofina NGF.....	53
5.6. Análises comparativas e Evolutiva entre Grupos e tempos.....	57
6. DISCUSSÃO:.....	62
7. CONCLUSÃO:	66
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS:	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	68
ANEXOS:	77

LISTA DE ABREVIATURAS:

ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
cDNA	DNA complementar
CEPAGRI	Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DEPC	Dietil Pirocarbamato
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditioteitrol
FDA	Food and Drug Administration
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
HC	Hospital de Clínicas
HIPER	Solução hipertônica – cloreto de sódio 3%
HPO	Solução hipotônica – água destilada
IgE	Imunoglobulina E
IL-4	Interleucina 4
ISO	Solução isotônica – cloreto de sódio 0,9%
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
mRNA	RNA mensageiro
NGF	Fator de crescimento neural
P1	Período 1
P2	Período 2
P3	Período 3
pb	Pares de base
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico /Potência de Hidrogênio
RA	Rinite Alérgica
RAP	Rinite Alérgica Persistente

RNA	Ácido ribonucleico
RNAT	RNA Total
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
T	Temperatura
TESN	Total dos Escores dos Sintomas Nasal
Th-2	linfócitos T <i>helper 2</i>
U	Umidade
UA	Unidades Arbitrárias
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

RESUMO

A rinite alérgica (RA) é definida como uma inflamação da mucosa nasal, resultando em sintomas nasais que incluem rinorréia, obstrução, prurido e espirros. O fator de crescimento neural (NGF) está envolvido na fisiopatologia de inflamação alérgica. Soluções salinas nasais em diversas concentrações têm sido usadas para prevenir ou reduzir sintomas alérgicos, porém as concentrações ideais das soluções de cloreto de sódio nasal ainda não estão bem estabelecidas na literatura disponível. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito das soluções salinas: isotônica (ISO), hipertônica 3% (HIPER) e água destilada (HIPO) em pacientes com RA persistente, comparando os escores clínicos dos sintomas nasais, avaliação do escore olfativo e a expressão gênica de NGF como marcador inflamatório do conteúdo celular nasal e considerando temperatura e umidade nos diferentes períodos em que utilizaram as soluções. Trinta (30) pacientes com diagnóstico de RA persistente iniciaram o estudo, porém apenas 13 terminaram. Os pacientes foram divididos em 3 grupos aleatorizados que utilizaram as 3 soluções: ISO, HIPER e HIPO em 3 períodos diferentes (P1, P2 e P3). Os critérios clínicos de avaliação dos sintomas eram avaliados por meio de “Questionário Validado”, onde somava-se o total do escore dos sintomas nasais (TESN). Para a avaliação do sintoma olfato era aplicado um escore olfativo de 0 a 8 com diluições de essência de eucalipto. Foi realizada coleta de material da mucosa nasal para o estudo da expressão gênica de NGF por meio de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Os resultados observados neste estudo foram que no P1, os pacientes apresentaram melhora do TESH (p=0.004), quando comparada com a HIPER. Tanto o grupo que iniciou o tratamento com a solução ISO (p= 0,056), quanto o grupo que iniciou com HIPO (p= 0,063) tiveram uma tendência de melhora quando comparada com a HIPER. Todos os grupos no P1 apresentaram melhora do escore olfativo. O grupo que iniciou com a solução HIPER mostrou valores de expressão de NGF significativamente maiores (p=0,023). Conclui-se então, que as soluções salinas podem ser utilizadas como tratamento adjuvante na RA, pois melhorou os sintomas e melhorou o escore olfativo, porém a solução HIPER aumentou expressão de NGF na mucosa nasal.

ABSTRACT

Allergic rhinitis (AR) is defined as inflammation of the nasal mucosa, resulting in nasal symptoms including rhinorrhea, obstruction, itching and sneezing. Neural growth factor (NGF) is involved in the pathophysiology of allergic inflammation. Nasal saline solutions, at various concentrations, have been used to prevent or reduce allergic symptoms, but the ideal concentration of nasal sodium chloride solutions are not well established in the literature. The objective were to evaluate the effect of salt solutions such as isotonic (ISO), hypertonic (3% NaCl – HYPER) and hypotonic (sterile distilled water - HYPO) in patients with persistent allergic rhinitis, comparing clinical scores of nasal symptoms and olfactory score, as well as NGF expression as an inflammatory marker of nasal cell content. Thirteen (13) patients of thirty (30) with diagnosed persistent AR were divided into three randomized groups that used three solutions: ISO, HYPO and HYPER, during three periods (P1, P2 and P3). Clinical evaluation criteria of symptoms were determined by a validated questionnaire that evaluated the total nasal symptom score (TNSS). Nasal mucosa material was collected to analyze NGF expression assessed by the Polymerase Chain Reaction (PCR). The results were: patients showed an improvement in TNSS ($p = 0.004$) during the first period. The group that began treatment using the ISO solution ($p = 0.056$), as well the group that started using the HYPO ($p = 0.063$) showed a trend of improvement in TNSS, when compared with the HYPER group. All groups showed improvement in olfactory score during de first period. With regard to NGF gene expression, the group treated with the HYPER solution showed significantly higher levels ($p=0.023$) of expression compared with patients treated with the other nasal solutions. The conclusion was that the salt solutions may be used as adjuvant therapy in AR, due to the

fact that they improve symptoms and olfactory score. Hyper saline solution can increase the expression of NGF in nasal mucosa.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia e Fisiologia Nasal

O nariz se projeta anteriormente na linha mediana da face (1). O aspecto externo do nariz pode ser comparado com uma pirâmide de três lados, coberto por músculos e pele. O osso nasal compõe a maior parte da pirâmide e forma o terço superior do nariz, o terço médio é composto de cartilagens laterais superiores e o terço inferior da pirâmide pela cartilagem alar. O topo desta pirâmide é implantado na testa e denominado glabella. A base da pirâmide contém as duas narinas e entre elas existe um septo membranoso denominado columela. Sua estrutura forte protege as estruturas internas da cavidade nasal e sua mucosa sensível (2)

A cavidade nasal estende-se ântero-posteriormente das narinas às coanas (2).

O septo nasal, o qual é formado por cartilagens e ossos corresponde à parede medial da cavidade nasal e a divide em duas metades. A parte cartilaginosa é formada pela lâmina quadrangular com junção das cartilagens alares no ápice do nariz. A parte óssea consiste na lâmina perpendicular do etmóide e do vômer (3).

Os cornetos aumentam a superfície da mucosa da cavidade nasal, facilitam a umidificação, regulam a temperatura e filtram o ar inspirado (1). Do ponto de vista embriológicos, os corneto médio e superior correspondem a extensão do ossos etmóide, enquanto o corneto inferior é uma estrutura separada, anexada por sua borda superior da parede nasal. A porção anterior do corneto inferior interfere diretamente na entrada do fluxo aéreo e sua cauda, em caso de hipertrofia, pode reduzir significativamente o tamanho coanal. Qualquer alteração anatômica ou fisiológica pode influenciar significativamente a resistência nasal. O contato entre a concha inferior e o desvio do septo pode ser responsável pela obstrução nasal unilateral. A hipertrofia da porção anterior do corneto é classicamente visto na rinite alérgica. O complexo osteomeatal. Localizado abaixo do meato médio, contém os orifícios de drenagem do seio frontal, células etmoidais e seios maxilares. Os seios paranasais são quatro pares de cavidades aéreas localizados nos ossos da face,

denominados: frontais, maxilares, etmoidais e esfenóides de acordo com a localização de suas estruturas (2).

No interior da cavidade nasal, podem ser observadas três diferentes áreas, conhecidas como vestíbulo, área respiratória e área olfatória, com diferentes tipos de epitélio, conforme região considerada (2).

O vestíbulo nasal é uma pequena dilatação no nariz, corresponde ao primeiro terço da cavidade nasal, é composto pelo epitélio plano estratificado colunar ciliado e por uma lâmina própria de tecido conjuntivo denso. Nesse local existem pêlos e glândulas cutâneas, que constituem uma primeira barreira à entrada de partículas grandes nas vias aéreas (3).

Nos dois terços posteriores, a cavidade nasal é revestida pelo epitélio pseudo-estratificado colunar ciliado ou tipo respiratório, qual é composto por quatro tipos celulares: células colunares ciliadas responsáveis pela produção de trifosfato de adenosina (ATP) e batimento ciliar, células caliciformes ou células produtoras de muco e células basais. Este epitélio repousa sobre uma lâmina basal e uma lâmina própria fibrosa rica em glândulas do tipo misto, cuja secreção ajuda a manter úmidas as paredes das cavidades nasais.

A área olfatória, responsável pela sensibilidade olfativa, está localizada na parte superior da cavidade nasal, composto pelo epitélio pseudo-estratificado, que contém células olfativas, células basais e as glândulas de Bowman (2, 3).

Os odores atingem o epitélio olfativo através do nariz ou orofaringe, onde a função é essencial para a apreciação do sabor dos alimentos. São detectados quando se ligam a proteínas receptoras presentes nos receptores dos neurônios olfativos. Essas informações sensoriais são enviadas para o Sistema Nervoso Central, e os receptores dos neurônios expressam o receptor de proteínas e convergem para o bulbo olfativo. Este processo garante a transferência de um sinal de odor dado a um conjunto específico de células no bulbo olfativo (4).

O nariz tem um papel importante na respiração e olfato. Nos indivíduos saudáveis, o ar inspirado é filtrado, aquecido e umidificado pela mucosa nasal garantindo a proteção das vias aéreas inferiores. Uma parte da cavidade nasal também tem um papel na ressonância. A mucosa nasal tem um papel específico no sistema de defesa primário contra alérgenos, microorganismos, e outras substâncias irritantes. Esta defesa é realizada pela resposta

imune inata referente a barreira pelo transporte mucociliar e imune específicas celular e humoral (2).

O fluído nasal é uma substância heterogênea produzida pela mucosa nasal derivada dos olhos ou seios paranasais. O muco também é produzido por pequenas glândulas produtoras de muco ou células caliciformes. O muco adere microorganismos e partículas inertes deslocando-as pela superfície epitelial até atingir a faringe pelo batimento ciliar sincrônico (1). Tal mecanismo representa o principal componente da limpeza mucociliar e exerce importante função na defesa do trato respiratório (1, 5).

A mucosa nasal é innervada por dois caminhos sensoriais aferentes distintos: o nervo olfatório, o qual envia informação para sensações do olfato; e o nervo trigêmeo o qual envia ampla variedade de informações sobre temperatura, tato, fluxo aéreo, obstrução e quimiosensibilidade. Os nervos sensoriais nasais são os principais responsáveis pela ativação dos sintomas associados à inflamação nasal (6).

A microvasculatura do nariz consiste em uma densa rede de capilares subepiteliais com comunicações entre as células endoteliais. Os vasos, quando distendidos bloqueiam o lúmen nasal e quando não, facilitam a passagem do ar. A mucosa nasal pode contrair ou expandir rapidamente por alterações do volume sanguíneo em resposta a estímulos neurais, mecânicos, térmicos e químicos (7). Mudanças de volume sanguíneo regulam a resistência ao fluxo aéreo nasal. Na maioria dos indivíduos sob condições normais, essa alteração do volume sanguíneo resulta em alternância rítmica entre congestão e descongestão da mucosa, definida como ciclo nasal (8-10).

1.2.Rinite Alérgica

Segundo a Organização Mundial da Saúde e o grupo ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma), a rinite alérgica (RA) acomete entre 10 e 40% da população mundial (1). Há uma maior prevalência em países tropicais. No Brasil, a prevalência varia entre 7% e 25% (11).

Embora, não seja classificada como doença grave ou de risco de vida, é considerada problema de saúde pública, que pode resultar em custos médicos elevados e morbidade

elevada que interferem na qualidade de vida e a produtividade no trabalho (12-14). Os custos diretos do tratamento da rinite alérgica e os custos indiretos relacionados à perda de produtividade laboral resultantes da doença são significativos e substanciais (15).

A rinopatia alérgica está associada a uma variedade de condições de comorbidade, incluindo asma, sinusite, otite média, polipose nasal, conjuntivite alérgica e infecções do trato respiratório inferior. (15, 16).

Vários fatores de risco têm sido descritos em diferentes estudos, sendo a maioria deles associado a mudanças no estilo de vida, como tendência a climatização de ambiente fechados com animais domésticos e tabagismo passivo; exposição ambiental a certos agentes alérgenos, contribuição de agentes infecciosos, além de fatores sócio-econômicos. A contribuição de fatores ambientais, fatores imunológicos e genéticos no desenvolvimento da rinite alérgica está bem estabelecido (17).

A rinite pode ser observada como grupo heterogêneo de desordens nasais caracterizada por um ou mais dos seguintes sintomas: espirros, prurido nasal, rinorréia, obstrução nasal e drenagem pós-nasal (1, 18, 19) que são desencadeados não só por alérgenos, mas por fatores ambientais irritantes (20). Estes ocorrem devido à interação entre mediadores inflamatórios e estruturas neural, vascular e glandular no nariz (21).

Pode ser classificada em infecciosa, alérgica, ocupacional, induzida por drogas, hormonal, idiopática e outras causas (1), sendo a RA o tipo mais comum de rinite crônica (22).

Recentemente, a rinite foi classificada clinicamente de acordo com o tempo e circunstâncias da exposição aos alérgenos. Essa nova classificação utiliza sintomas e parâmetros de qualidade de vida, está baseada na duração das manifestações clínicas (intermitente ou persistente), quanto a gravidade (leve ou moderada-grave dependendo da intensidade dos sintomas) considerando seu impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes (1, 23, 24).

Após minutos de exposição ao alérgeno, mastócitos sensibilizados por IgE liberam mediadores inflamatórios como a histamina, proteases, leucotrienos, prostaglandinas e citocinas. Alguns desses mediadores produzem os sintomas da fase precoce da RA. Outros estimulam a infiltração de células inflamatórias como basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos recém sintetizados e células mononucleares. Este infiltrado de células

inflamatórias e a liberação subsequente de seus mediadores sustentam a reação inflamatória com o contínuo recrutamento de células inflamatórias e produzem a fase tardia da RA (16).

1.2.1. Diagnóstico da RA

O diagnóstico de RA é baseado na relação entre a história típica de sintomas alérgicos e testes diagnósticos, que se baseiam na demonstração da sensibilização ao alérgeno específico IgE na pele (teste cutâneo) ou no sangue (IgE específico) (11).

A avaliação diagnóstica do paciente com rinite deve incluir a observação dos sintomas específicos, o padrão dos sintomas (intermitente, sazonal ou perene), identificação dos fatores desencadeantes, resposta a medicações, condições co-existent, e a história detalhada das condições ambientais, incluindo exposições domésticas, ocupacionais (18) e história familiar.

A rinoscopia anterior permite visualizar o terço anterior da via aérea nasal, incluindo a porção anterior do corneto inferior (e ocasionalmente a porção anterior do corneto médio), e porções do septo nasal. Em indivíduos com RA observa-se frequentemente edema de cornetos, mucosa pálida ou hiperemiada além de drenagem pós-nasal. Em associação com a RA outros achados devem ser considerados como conjuntivite bilateral, escurecimento infra-orbital, e algumas vezes o aparecimento de uma persistente prega horizontal sobre o nariz. Em alguns casos, técnicas especiais como endoscopia nasal, medidas de pico de fluxo inspiratório, rinometria acústica ou rinomanometria para avaliar a função da via aérea pode ser útil na avaliação de pacientes com sintomas de rinite(18).

A citologia nasal fornece informação valiosa sobre as células da mucosa nasal (25), entretanto, não existe consenso sobre a utilização rotineira da citologia no diagnóstico da rinite (18).

1.2.2. Citologia Nasal

A citologia nasal ajuda no melhor entendimento dos mecanismos dos sintomas, da fisiopatologia e de doenças específicas. Auxilia no diagnóstico das rinopatias e sua classificação, acompanha a evolução da doença e a resposta a diferentes intervenções terapêuticas e pode nos ajudar na informação de partes menos acessíveis do sistema respiratório como as vias aéreas inferiores. Este procedimento é bem tolerado, de fácil execução e de fácil acesso podendo ocorrer sensações desagradáveis, mas transitórias (25).

As informações da citologia nasal são decorrentes de células colhidas do epitélio de revestimento da mucosa nasal (26). Parte dessas informações é determinada por eventos celulares que ocorrem no tecido celular (25, 27).

As células que infiltram a mucosa respiratória nasal podem ser quantificadas e identificadas. São elas: eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos, basófilos e células caliciformes. Em indivíduos saudáveis podemos encontrar células epiteliais numerosas, incluindo colunares ciliadas e não-ciliadas, caliciformes e basais. Poucas bactérias podem ser vistos em amostra da porção anterior do corneto inferior(25).

O sucesso deste procedimento depende da coleta nasal obtida adequadamente, da preparação e coloração apropriadas da amostra, e da interpretação do material por um profissional experiente (25, 28).

Existem vários métodos de coleta e a escolha depende do objetivo do estudo, da idade do paciente, do número de coletas a serem realizadas e do local a ser coletado (25, 26).

1.2.3. Neurotrofinas

As neurotrofinas são um grupo de polipeptídios com fator de crescimento que são essenciais para o desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso vertebral (29, 30). Levi-Montalcini (1952) descobriu uma neurotrofina que induz o crescimento neuronal e a nomeou de fator de crescimento neural (NGF) (29).

O NGF está bem caracterizado como fator neurotrófico essencial para a sobrevivência, manutenção e desenvolvimento dos neurônios no sistema nervoso central. Ações biológicas do NGF são mediados por receptores de alta e baixa afinidade, que após ligados esses receptores ativam uma cascata de eventos morfológicos e bioquímicos em suas células alvos (31). É uma neurotrofina liberada nos tecidos inflamatórios, entretanto, condições inflamatórias podem levar ao aumento da produção da expressão de NGF na mucosa nasal (20, 32-36).

Nas vias aéreas, a inflamação leva a uma hiperresponsividade e esta pode estar atribuída ao aumento da reação neural. A neurotrofina NGF é expressa e liberada por diversos tipos de células que participam ativamente do processo inflamatório alérgico e produz alterações biológicas que pode aumentar a responsividade neural nas vias aéreas (14) e são responsáveis por sintomas em pacientes com alergia (34).

O NGF é encontrado em várias células como mastócitos (20, 34), eosinófilos (20, 36-38). Essas células obtidas da mucosa nasal expressam mRNA para NGF. A proteína NGF também é encontrada no fluido nasal e apresenta-se aumentada em indivíduos com RA (39).

1.2.4. Tratamento

O controle ambiental, reduz a exposição ao alérgeno, é considerada estratégia básica de extrema relevância no tratamento da RA com repercussão sobre a progressão da manifestação clínica da RA (40). Contudo, nos casos de rinite persistente apenas a profilaxia pode não ser suficiente necessitando de outras medidas terapêuticas.

O tratamento da RA pode incluir combinação de anti-histamínicos, corticóides tópicos nasais e soluções salinas para lavagem da mucosa nasal (41), mais comumente utilizados são medicamentos de uso tópico intranasal e via oral. A resposta à droga ocorre durante um tratamento em longo prazo (1).

Agentes adrenérgicos (como pseudoefedrina) reduzem a obstrução nasal e aumentam o tônus venoso e arterial nos vasos da mucosa, entretanto quando administrados via oral são limitados pelos efeitos adversos e contra indicações. Descongestionantes nasais

como a oximetazolina agem rapidamente, mas apresentam efeito de congestão rebote com uso prolongado. Corticosteróides nasais e anti-histamínicos são alternativos de tratamento que aliviam a maioria dos sintomas da rinite alérgica, porém os corticóides nasais também aliviam a obstrução nasal, e anti-histamínicos são considerados menos eficazes na obstrução nasal que em outros sintomas da rinite alérgica (42).

Diversos estudos demonstraram que os corticosteróides podem atenuar a expressão e a liberação de citocinas pro inflamatórias das células epiteliais das vias aéreas e são eficazes na redução do número de células de *Langerhans*, mastócitos, eosinófilos, interleucina 4 (IL-4), e linfócitos T *helper* 2 (Th-2). Clinicamente, podem reduzir a congestão nasal e melhorar o sono, além disso, reduzem a sonolência, fadiga e distúrbios do sono. A administração tópica do medicamento proporciona baixa biodisponibilidade sistêmica, por isso, corticosteróides são considerados seguros e tem mínima influência na supressão adrenal (43, 44). Atualmente, é considerado medicamento de primeira escolha no tratamento de rinite alérgica em adultos (44-47). Quando administrados sistemicamente, os corticosteróides estão associados a numerosos efeitos adversos, entretanto, a utilização intranasal tem sido designada tanto para otimização do efeito tópico, quanto para minimizar efeitos colaterais (48).

Soluções salinas isotônicas e hipertônicas têm sido usadas em vários estudos como tratamento coadjuvante para minimizar os sintomas da rinite alérgica e rinosinusite (49).

1.2.5. Soluções Salinas

Soluções salinas nasais em diversas concentrações têm sido usadas para prevenir ou reduzir sintomas alérgicos. Embora os resultados sejam controversos, a irrigação nasal melhora sintomas e, muitas vezes diminui a quantidade de medicamentos prescritos (49).

A solução salina tópica em diferentes concentrações de cloreto de sódio tem sido utilizada amplamente no tratamento das rinopatias, melhorando a depuração mucociliar da mucosa nasal (50, 51), qualidade de vida e sintomas clínicos da rinite alérgica, provavelmente exercendo um efeito antiinflamatório na mucosa nasal (52, 53).

O método de aplicação e a concentração ideal das soluções de cloreto de sódio nasal ainda não estão bem estabelecidos na literatura disponível.

2. HIPÓTESE:

O uso de soluções salinas no tratamento da Rinopatia Alérgica Persistente podem ser benéficos.

3. OBJETIVOS:

Geral:

Avaliar o efeito da aplicação nasal de diferentes soluções salinas: isotônica cloreto de sódio 0,9% (ISO), e hipertônica cloreto de sódio 3% (HIPER) e da água estéril (HIPO) em pacientes com rinite alérgica persistente (RAP).

Específicos:

1. Comparar os escores clínicos dos sintomas da rinite
2. Estudar a expressão gênica da neurotrofina NGF como marcador inflamatório, do conteúdo celular nasal
3. Comparar os escores olfativos.

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1: Modelo de estudo clínico

O estudo foi estruturado como aleatorizado, cego e de três braços com intervenção cruzada onde eram testadas três soluções de aplicação nasal: solução isotônica de cloreto de sódio 0,9% (ISO), solução hipertônica de cloreto de sódio 3% (HIPER) e água estéril (HIPO), gentilmente cedidas pelo Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. A condutividade dessas soluções foi medida por meio do condutivímetro CD-21 Tecnal Digimed, sua calibração foi realizada com cloreto de sódio 0,0001 mol/L - 111,8 μ m/cm, a uma temperatura de 20°C. Os valores da condutividade das soluções estão descritos na tabela 1, página 26.

Tabela 1. Condutividade das soluções nasais.

Solução ISO	11,01 mS/cm
Solução HIPER	32,98 mS/cm
Solução HIPO	3,65 μ S/cm

4.2. Comitê de ética em pesquisa

O projeto de pesquisa, com o protocolo 125695 e o termo de consentimento, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP de Campinas, credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) - Conselho Nacional de Saúde/MS.

4.3. Critérios de Inclusão:

Pacientes adultos, totalizando 30, com idade entre 15 e 38 anos, de ambos os sexos, acompanhados no Ambulatório de Imunologia Clínica, Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP) com diagnóstico de Rinopatia Alérgica Persistente (RAP) segundo os critérios estabelecidos pelo grupo ARIA (1).

Todos eram submetidos ao teste epicutâneo de leitura imediata com resultado positivo (diâmetro da pápula >3mm com extratos padronizados) e dosagem sérica da IgE total. Os pacientes que estavam em tratamento com corticóide tópico nasal foram orientados a interromper o tratamento duas semanas antes de iniciar o estudo proposto.

Os pacientes eram divididos em 3 grupos: grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3). Cada indivíduo utilizou as 3 soluções, cada uma em um período de 8 semanas, denominadas: período 1 (P1), período 2 (P2) e período 3 (P3), entre os períodos foi feito um intervalo de 1 semana sem medicamento. O G1 utilizou primeiro a solução ISO no P1, depois as soluções HIPER no P2 e HIPO no P3, respectivamente. O G2 iniciou com a solução HIPO no P1, depois ISO no P2 e HIPER no P3 e o G3 iniciou com a solução HIPER no P1, depois HIPO no P2 e ISO no P3. Tabela 2 (página 28):

Tabela 2. Divisão dos grupos

	P1 8 semanas	<i>Intervalo</i> <i>1 semana</i>	P2 8 semanas	<i>Intervalo</i> <i>1 semana</i>	P3 8 semanas
G1	ISO		HIPER		HIPO
G2	HIPO		ISO		HIPER
G3	HIPER		HIPO		ISO

Os pacientes eram orientados a utilizar a solução indicada aspergindo 2 vezes em cada narina, equivalente a 100µL/aplicação, nos períodos da manhã, tarde e noite e se houvesse qualquer tipo de intercorrência os mesmos eram orientados a procurar o ambulatório de Imunologia Clínica do HC-Unicamp e/ou os pesquisadores do estudo.

Os pacientes tiveram esclarecidas todas as dúvidas e assinaram espontaneamente o termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo.

4.4. Condições Climáticas

Durante o estudo eram obtidos valores da Temperatura (T) e Umidade (U) do Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura (CEPAGRI), localizado no campus da Universidade Estadual de Campinas.

4.5. Critérios clínicos de avaliação e seguimento quanto à aplicação das soluções na mucosa

Os sinais e sintomas eram avaliados por meio de “Questionário Validado” considerando: coriza nasal; espirros; obstrução nasal e prurido nasal, segundo O grupo ARIA ordenados em gravidade pelos pesquisadores e, denominado:

“Escore Clínico de Acompanhamento” onde:

0 = ausência de sintomas (não apresenta sinais ou sintomas evidentes)

1 = sintomas leves (sinais/sintomas claramente presentes, mas tolerados facilmente)

2 = sintomas moderados (sinais/sintomas presentes, que incomodam, porém toleráveis)

3 = sintomas graves (sinais/sintomas difíceis de tolerar causando interferência nas atividades de vida diária e/ou sono)

O questionário era aplicado antes e após o uso de cada solução. O total dos escores dos sintomas nasais (TESN) era somado, conforme recomendado pelo FDA (54) em escala de variação de 0 a 12, para posterior análise.

4.6. Escore Olfativo:

Para a avaliação do sintoma olfato era aplicado um escore olfativo de 0 a 8. Para pontuar os escores eram utilizados vários frascos preparados com essência de eucalipto diluída em diversas proporções, onde o frasco com o conteúdo mais diluído, correspondia ao escore 8 e o mais concentrado ao escore 1, conforme tabela 3, na página 30. Dessa maneira o paciente era orientado a identificar a essência. Era fornecido a ele primeiramente o frasco mais diluído, se ele não conseguisse identificar o aroma, era fornecido outro frasco mais concentrado, seguindo a ordem da tabela 3, página 31. Caso o paciente não conseguisse identificar a essência ele recebia a pontuação zero. Com objetivo de minimizar erros durante a avaliação olfativa e os pacientes não serem induzidos a identificarem a essência de eucalipto utilizada na primeira avaliação. Nas reavaliações, além dos frascos diluídos com essência de eucalipto, eram fornecidos ao paciente alguns frascos com água e essência de canela também diluída nas mesmas concentrações que a essência de eucalipto para que o paciente identificasse e reconhecesse o aroma, porém a essência de eucalipto era a que consideramos para a avaliação olfativa.

Tabela 3. Escores olfativo:

0	1	2	3	4	5	6	7	8
anosmia	1:500	1:1000	1:2500	1:5000	1:10000	1:50000	1:100000	1:250000

Diluições de essência de eucalipto e escores olfativos.

4.7.Coleta de material da mucosa nasal

Os pacientes eram orientados a realizar a higiene nasal com aproximadamente 10 mL de soro fisiológico em cada narina para remover a secreção. Após as células da mucosa nasal eram coletadas por meio de escova delicada (similar à utilizada em coleta de material uterino) com um movimento rotacional cuidadoso para não provocar danos à mucosa. A escova era introduzida na narina junto ao meato médio.

A escova com o material coletado era transferida para um tubo livre de RNase contendo solução de preservação (Guanidina Tiocianato - Fenol – Clorofórmio) para extração de RNA total, agitando cuidadosamente e “escovando” a parede do tubo. Após o material era congelado a -80° para posterior análise.

4.8.Extração de RNA Total (RNAT)

As amostras de RNA total eram extraídas das células nasais, através do método de Guanidina Tiocianato - Fenol - Clorofórmio (55) conforme descrição a seguir:

As células nasais eram respectivamente agrupadas e homogeneizadas em solução de extração de RNA, 4M guanidina tiocianato contendo 2-mercaptoetanol (Sigma) e 0,5% sarcosil pH 7,0. Para a separação das proteínas dos ácidos nucleicos adicionava-se volume igual de solução Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1). A seguir, esta mistura era agitada vigorosamente formando emulsão e centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente, a 10.000 x g, recuperando-se a fase aquosa (superior). Repetia-se a extração com Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico até que não houvesse proteínas na interfase. A retirada do excesso de fenol era realizada pela extração com Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1). O RNA na fase aquosa era precipitado pela adição de 3 volumes de etanol absoluto e acetato de sódio pH 5,2, na concentração final de 0,3M. Esta preparação era mantida à -80°C por 48 horas.

Para a precipitação do RNAT a preparação era centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. Ao precipitado celular, era adicionada 40µl de água ultrapura estéril

preparada com Dietil Pirocarbamato (DEPC, Sigma Co, St Louis, EUA) e armazenando à -80°C.

4.9. Análise do RNA Total Extraído

A qualidade do RNA total extraído era analisada através da relação entre suas leituras em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, EUA) nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Eram consideradas adequadas as amostras com relação entre 1.6 e 1.8.

A quantificação do RNA total era feita através da fórmula:

(densidade óptica a 260nm/0,025) x diluição de leitura/1000= RNA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.10. Transcrição Reversa do RNA total Extraído (cDNA)

A síntese do cDNA era realizada a partir de 5 μg de RNA total. Para a realização PCR de transcrição reversa (RT-PCR), adicionava-se à amostra 0,5 μl de Oligo d(pt) e água ultra pura em quantidade suficiente para 28 μl . Aquecia-se os tubos com as respectivas amostras em termocicladora (GeneAmp® 9700, Perkin Ellmer, EUA) por 10 minutos a 65°C e resfriava-se para 4°C por 5 minutos.

Para permitir a ligação complementar dos *primers* ao RNA, adicionava-se 21 μL de solução de reação (10 μL de tampão Super RT, 5 μL de dNTP mix 0,5mM, 5 μL de DTT 0,1M e 1 μL de RNAsin) seguidos da incubação por 2 minutos a 42°C. Após adição de 1 μL de enzima Super Transcriptase reversa (500U), a reação processava-se em termocicladora nas condições: 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos, resfriamento da amostra até 4°C (adaptado de LIAE) (56).

Após a última etapa, as amostras com volume de 50 μL eram armazenadas a -20°C como DNA complementar (cDNA).

4.11. Expressão gênica de NGF por meio de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

O procedimento padrão de PCR era realizado adicionando-se ao tubo de reação, 2µL de amostra de cDNA, 100ng de primer 5' sense, 100ng de primer 3' anti-sense, 45µL de solução de reação (5µL de tampão Taq polimerase - *Thermus aquaticus* DNA polimerase gene (Invitrogen, EUA); 5µL de dNTP mix 5mM, 1,5µL de MgCl₂ 50mM e 33.5µL de água ultra pura) e 1µL de óleo mineral. Em seguida os tubos contendo as misturas de cDNA eram transferidas para termocicladora programada para as seguintes condições: Desnaturação a 94°C por 2 minutos, 80°C por 5 minutos para aplicação de 1µL da enzima Taq polimerase, Pareamento 58°C por 45 segundos, Extensão dos *primers* a 72°C por 90 segundos, Desnaturação dos *primers* a 95°C por 45 segundos, 40 ciclos, extensão final 72°C por 10 minutos, temperatura de espera 4°C. Os produtos dos PCR eram armazenados a -20°C (57). Os *primers* utilizados com suas seqüências descritas na tabela 4, página 35, obedeciam à estratégia sense e anti-sense.

Beta-actina (*gene estrutural*) era empregada como controle interno do preparo de RNA total, transcrição reversa e PCR: As co-amplificações dos cDNA, utilizando-se os primers específicos, eram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2% e revelados com brometo de etídio, através de excitação em UV e documentado através da captação das imagens dos géis através de sistema de captação de imagem. Para a semi-quantificação, as áreas de pixel determinadas pela intensidade de cada banda serão comparadas com as da beta-actina. Os valores serão normalizados e transformados em Unidades arbitrárias (pixel index) através da seguinte fórmula: Unidades arbitrárias = pixel (amplicons amostras / amplicon gene estrutural do respectivo grupo) x 100.

Tabela 4: *Primers* utilizados com suas seqüências descritas abaixo obedeciam à estratégia sense e anti-sense: **pb**= pares de bases.

Primer	Sense (5' – 3')	Anti-sense (5' – 3')	Produto
NGF	TGAAGCCCACTGGACTAAA	ACCTCCTTGCCCTTGATG	372 pb
B actina	GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG	GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	237 pb

4.12. Análise Estatística

O programa computacional estatístico utilizado foi o SPSS versão 16 licenciado pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Para analisar a T e U entre os períodos era utilizado o teste estatístico de Friedman e Wilcoxon. Para analisar as variáveis TESN, escores do olfato e expressão de NGF com as soluções ISO, HIPER e HIPO e entre os períodos P1, P2 e P3 utilizou-se o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, Tukey e Bonferroni.

Para a comparação das variáveis numéricas entre os 3 grupos e entre as 3 avaliações foi utilizado modelo de efeitos mistos, análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas para experimento do tipo crossover, seguida de teste de comparação múltipla de Tukey para comparar os grupos em cada momento, e o teste de perfil por contrastes para analisar a evolução entre os tempos em cada grupo. Devido à ausência de distribuição Normal, as variáveis foram transformadas em postos (ranks).

Foi analisado o teste de efeito carryover, com os resultados do teste ANOVA.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Seguimento do estudo

30 pacientes seleccionados iniciaram o estudo, 16 continuaram até o segundo período, mas somente 13 completaram o estudo. Os motivos da desistência foram: pacientes que não suportaram ficar sem o uso do corticóide tópico ou apresentaram exacerbação dos sintomas, pacientes que fizeram uso inadequado das soluções ou que abandonaram o estudo por outros motivos. Após o término do estudo os pacientes foram reavaliados e reencaminhados ao tratamento ambulatorial.

5.2. Condições climáticas (umidade e temperatura) durante o estudo.

Valores obtidos da Umidade (U) média, mínima e máxima em porcentagem (%) e da temperatura (T) média, mínima e máxima em graus Celsius (°C) por período estão representados graficamente nas figuras 1 (página 39) e figura 2 (página 40) respectivamente. Cada período correspondeu a oito semanas de tratamento com um intervalo de uma semana sem tratamento. O P1 corresponde aos dias 1 a 57 compreendidos entre 7 de agosto e 2 de outubro de 2007, abrangendo as estações climáticas do ano final do inverno e início da primavera. Os dias 58 a 64 representam uma semana de intervalo. O P2 com 55 dias (dias 65 a 120), compreendidos entre 10 de outubro e 3 de dezembro de 2007, envolve a estação do ano primavera. Dias 121 a 127 representam o intervalo de uma semana. P3 tem 55 dias (dias 128 a 183) compreendidos entre 11 de dezembro de 2007 e 3 de fevereiro de 2008, incluindo a estação do ano final da primavera e verão. Os dias 184 a 190 foram destinados para reavaliar os pacientes que terminaram o estudo e dar continuidade ao seguimento ambulatorial.

A análise estatística realizada para avaliar a U, revelou que no P1 tanto a U mínima quanto a média e a máxima foram menores que no P2 e P3 com $p= 0,0001$. Entre P2 e P3 não houve diferença significativa (figura 3, página 41).

Para as variáveis T mínima, média e máxima, somente na T mínima houve diferença significativa com $p= 0,0001$, revelando valores de temperaturas mais baixas no P1 (figura 4, página 42). Entre P2 e P3 não revelou diferença significativa.

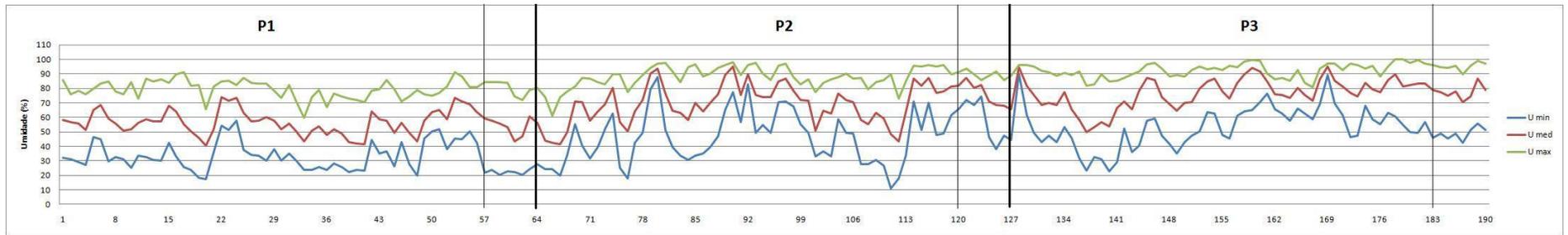


Figura 1. Representação gráfica da umidade (U) em porcentagem (%), mínima (min), média (med) e máxima (max) nos períodos 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3). P1 = dias 1 – 57 (tratamento), dias 58 – 64 (intervalo); P2= dias 65 – 120 (tratamento) e 121 – 127 (intervalo) e P3= dias 128 – 183 (tratamento) e 183 – 190 (reavaliação). Fonte: CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicadas à Agricultura- Unicamp.

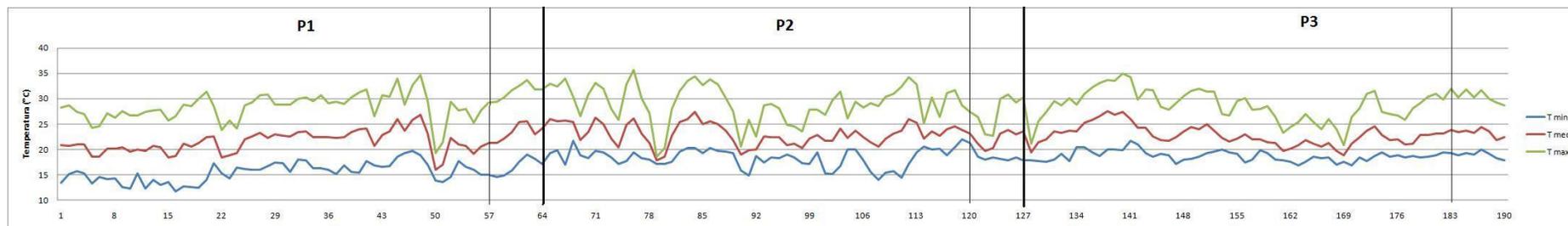


Figura 2. Representação gráfica da temperatura (T) em graus Celsius (°C), mínima (min), média (med) e máxima (max) nos períodos 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3), onde P1 = dias 1 – 57 (tratamento) e 58 – 64 (intervalo); P2= dias 65 – 120 (tratamento) e 121 – 127 (intervalo) e P3= dias 128 – 183 (tratamento) e 183 – 190 (reavaliação). Fonte: CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicadas à Agricultura- Unicamp

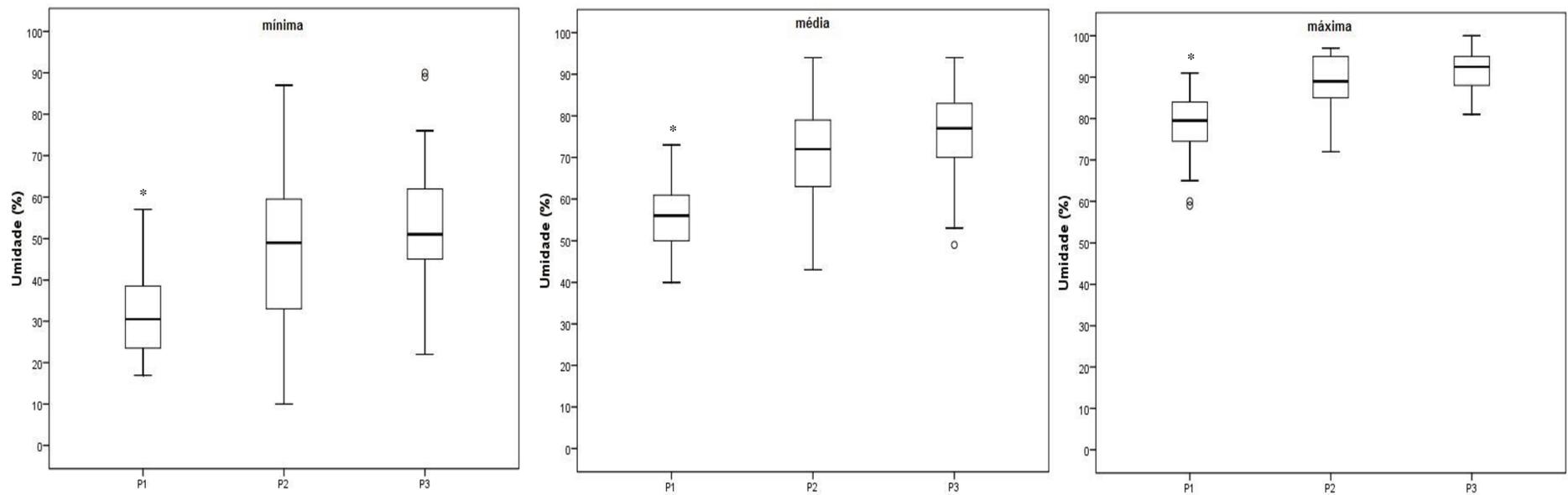


Figura 3. Representação gráfica por meio de Box-plot da umidade mínima, média e máxima em porcentagem (%), entre P1, P2 e P3. Análise estatística baseada no teste de Friedman e Wilcoxon, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$. (* $p=0.0001$). Os pontos no P3 da umidade mínima e média e o ponto no P1 da umidade máxima representam os valores que tiveram um desvio extremo em relação à média.

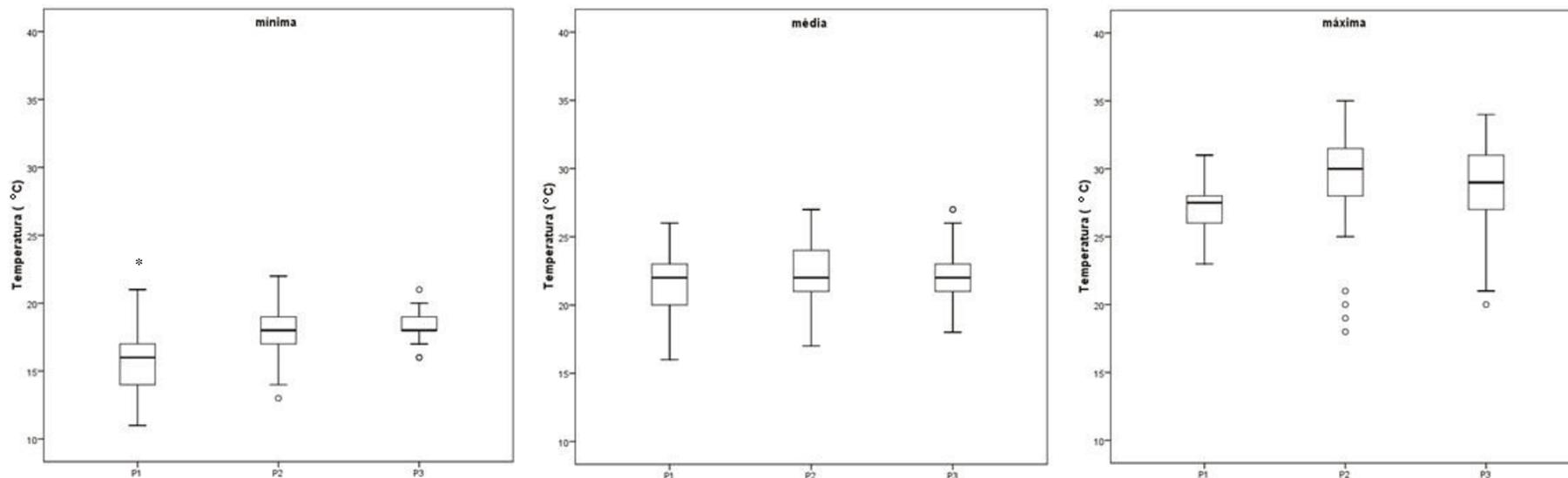


Figura 4. Representação gráfica por meio de box-plot da temperatura mínima, média e máxima em em graus Celsius (°C), entre P1, P2 e P3. Análise estatística baseada no teste de Friedman e Wilcoxon, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$. (* $p = 0.0001$). Os pontos no P2 e P3 da T mínima representam os valores que tiveram um desvio extremo em relação à média, assim como o ponto no P3, da T média e os pontos no P2 e P3, da T máxima.

5.3. Total dos escores dos sintomas nasais (TESN).

O TESH pré e pós tratamento de cada paciente com as soluções ISO, HIPER e HIPO estão representados graficamente (figura 5, página 44) por período (P1, P2 e P3) e por grupo (G1, G2 e G3). A mediana encontra-se em destaque e pontilhada.

Cada grupo: G1, G2 e G3 foram analisados individualmente entre P1, P2 e P3 (tabela 5, página 45). O G1 que utilizou a solução ISO (P1), solução HIPER (P2) e solução HIPO (P3), revelou tendência ($p= 0,056$) de melhora do TESH com a solução ISO, quando comparada com a HIPER. O G2 que iniciou o estudo com HIPO (P1), ISO (P2) e HIPER (P3), revela que também há uma tendência ($p= 0,063$) de melhora do TESH com a solução HIPO quando comparada com a HIPER. O G3 que iniciou o tratamento com HIPER (P1), HIPO (P2) e ISO (P3) mostra que não há diferença significativa entre as soluções utilizadas.

Quando analisamos cada período (P1, P2 e P3), os resultados obtidos da análise estatística que estão representados na tabela 6, página 46 mostram que não há diferença significativa entre os grupos G1, G2 e G3.

O TESH também foi analisado entre as soluções ISO, HIPO e HIPER, independente do período e grupo (figura 6, página 47). Não há diferença significativa ($p=0,160$) entre as soluções.

Ao avaliar o TESH por período independente da solução utilizada (figura 7, página 48) observou-se que no P1 houve melhora do TESH com $p=0.004$. Entre P2 e P3 não houve diferença estatisticamente significativa.

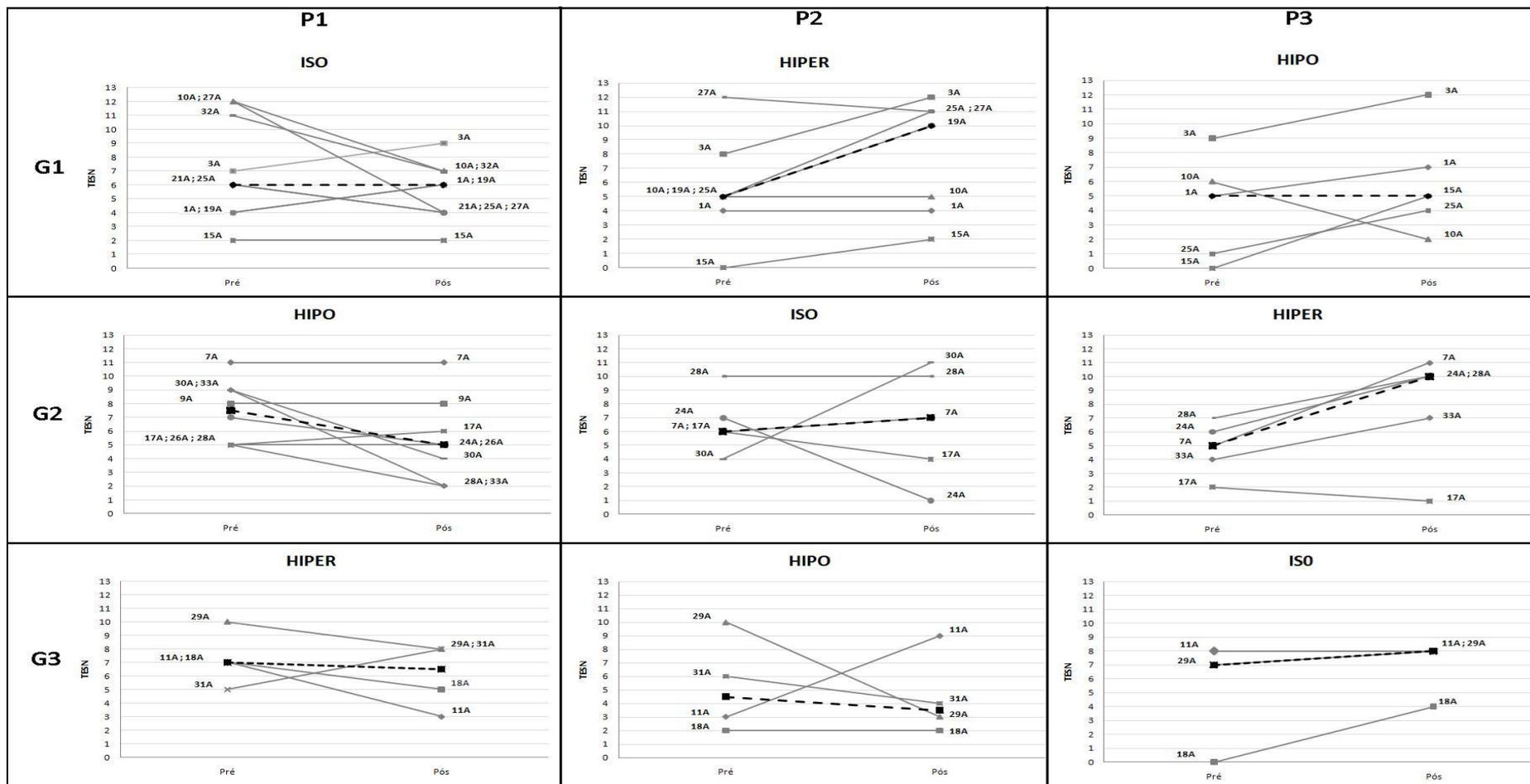


Figura 5. Representação gráfica do total dos escores dos sintomas nasais (TESN) de cada paciente pré e pós tratamento com as soluções isotônica (ISO), hipertônica 3% (HIPER) e água estéril (HIPO) por grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3) e períodos 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3). A linha pontilhada em destaque representa a mediana.

Tabela 5. TESN pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO. Análise de cada grupo entre os períodos.

	P1		P2		P3	p valor
G1	ISO (n=9)	X	HIPER (n=7)	X	HIPO (n=5)	0,056
G2	HIPO (n=8)	X	ISO (n=5)	X	HIPER (n= 5)	0,063
G3	HIPER (n=4)	X	HIPO (n=4)	X	ISO (n=3)	0,415

Análise estatística considerando os grupos (G1, G2 e G3) entre os períodos (P1, P2 e P3). Cada período teve duração de 8 semanas de tratamento e entre um período e outro há um intervalo de uma semana. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

Tabela 6. TESN pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO. Análise de cada período entre os grupos

	P1	P2	P3
G1	ISO (n=9)	HIPER (n=7)	HIPO (n=5)
	X	X	X
G2	HIPO (n=8)	ISO (n=5)	HIPER (n= 5)
	X	X	X
G3	HIPER (n=4)	HIPO (n=4)	ISO (n=3)
p valor=	0,936	0,493	0,710

Análise estatística dos períodos (P1, P2 e P3), entre os grupos (G1, G2 e G3). Os grupos utilizaram diferentes soluções em cada período. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

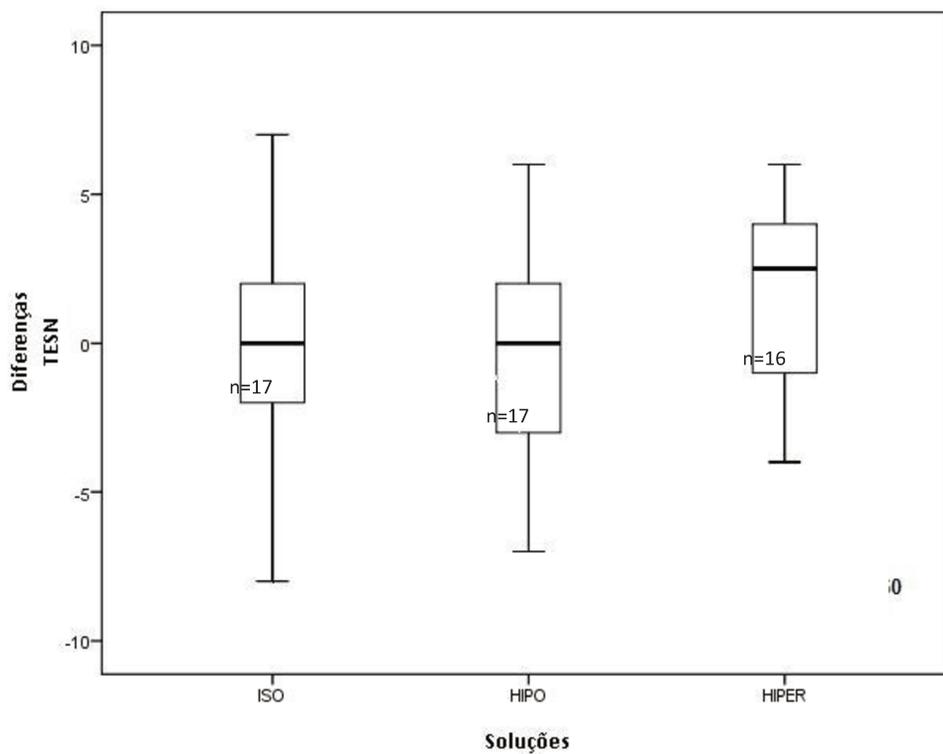


Figura 6. Representação gráfica formato Box-plot entre as soluções ISO, HIPO e HIPER. Os valores negativos do eixo (diferenças TESN) revelam melhora do TESN. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

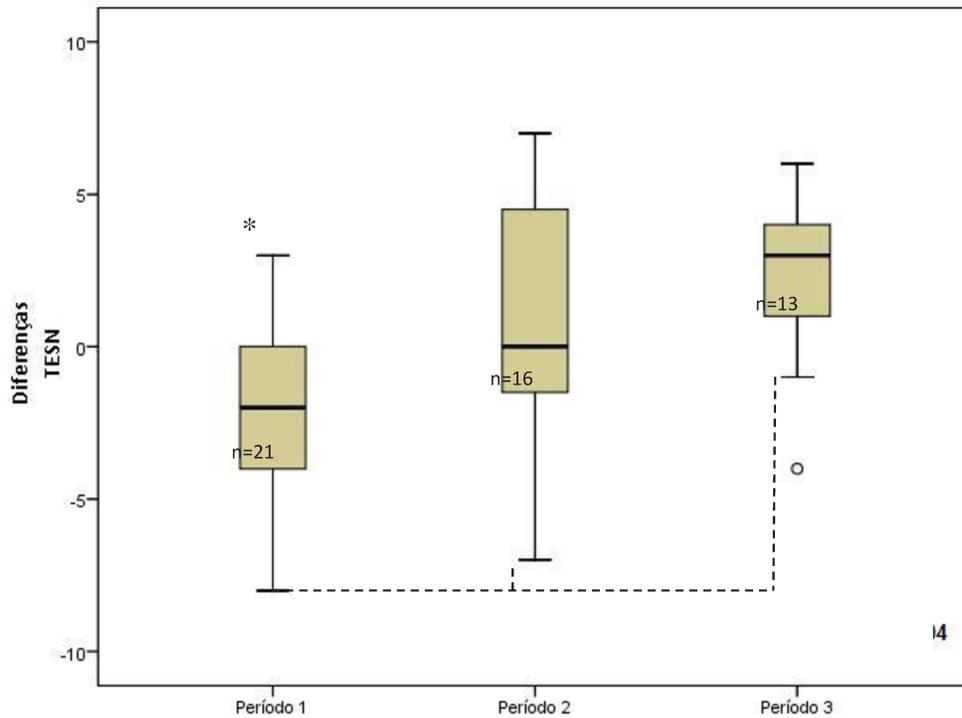


Figura 7. Representação gráfica por meio de Box-plot entre os períodos 1, 2 e 3, independente da solução utilizada. Os valores negativos do eixo (diferenças TESN) significam melhora do TESN. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$. (* $p=0,004$). O ponto no P3 representa valor com desvio extremo em relação à média.

5.4. Total do escore do olfato.

O escore do olfato pré e pós-tratamento de cada paciente estão representados graficamente (figura 8, página 50) por período (P1, P2 e P3) e por grupo (G1, G2 e G3). A mediana encontra-se em destaque e pontilhada.

A tabela 7, página 51, mostra a análise do escore do olfato dos grupos G1, G2 e G3 entre os períodos P1, P2 e P3. Todos os grupos apresentaram melhora do olfato no P1, o G1 ($p= 0,034$), G2 ($p=0,031$) e G3 ($p=0,021$).

A tabela 8, página 52, mostra a análise realizada de cada período (P1, P2 e P3) entre os grupos G1, G2 e G3 não há diferença significativa

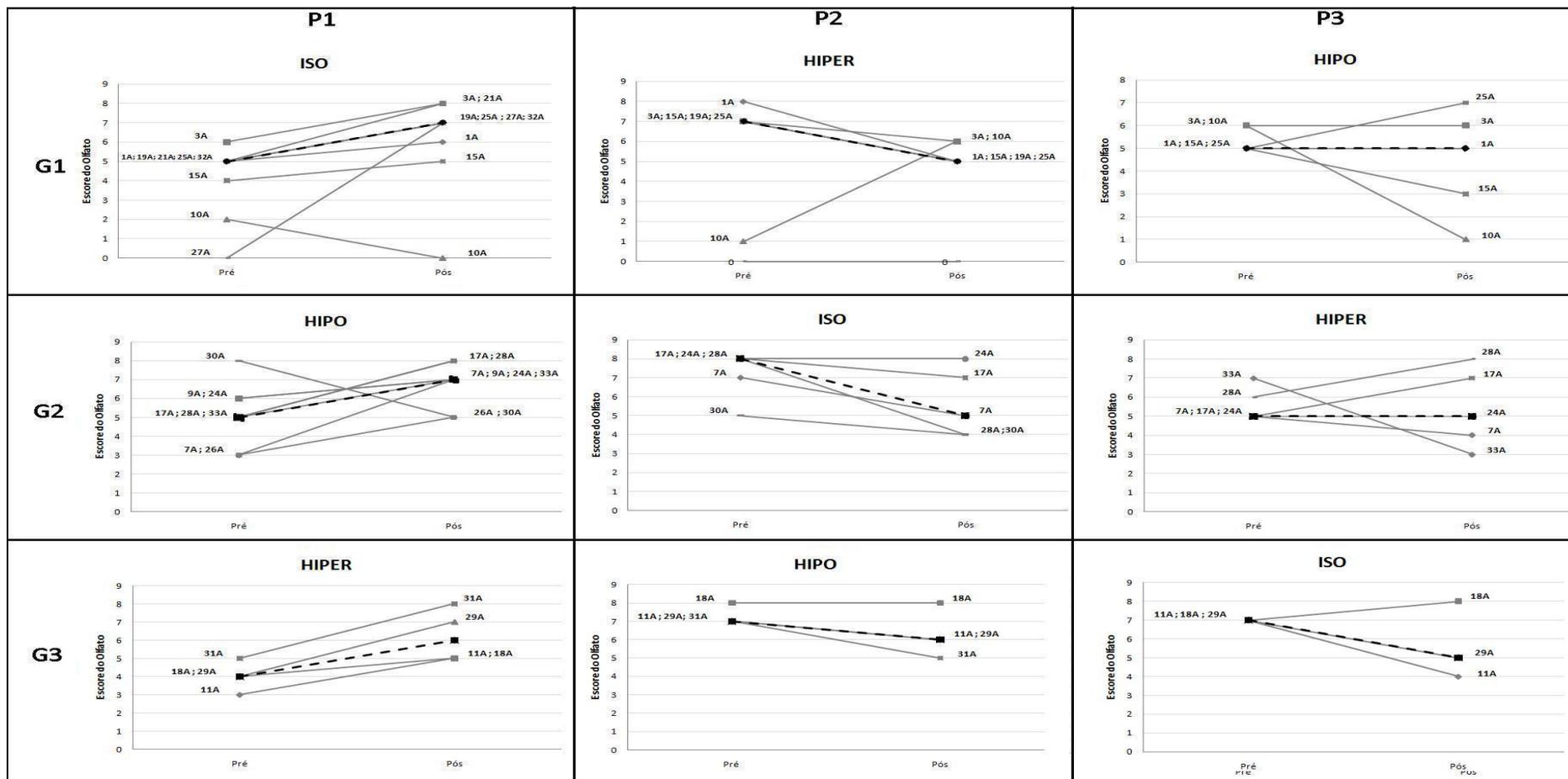


Figura 8. Representação gráfica do total do escore do olfato de cada paciente pré e pós tratamento com as soluções isotônica (ISO), hipertônica 3% (HIPER) e água estéril (HIPO) por grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3) e períodos 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3). A linha pontilhada em destaque representa a mediana.

Tabela 7. Escore do olfato pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO. Análise de cada grupo entre os períodos.

	P1		P2		P3	p
G1	ISO (n=9)	X	HIPER (n=7)	X	HIPO (n=5)	*0,034
G2	HIPO (n=8)	X	ISO (n=5)	X	HIPER (n= 5)	*0,031
G3	HIPER (n=4)	X	HIPO (n=4)	X	ISO (n=3)	*0,021

Análise estatística dos grupos (G1, G2 e G3) entre os períodos (P1, P2 e P3). Cada período teve duração de 8 semanas de tratamento e entre um período e outro há um intervalo de uma semana. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

Tabela 8. Escore do olfato pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO.
Análise de cada período entre os grupos

	P1		P2		P3
G1	ISO (n=9)		HIPER (n=7)		HIPO (n=5)
	X		X		X
G2	HIPO (n=8)		ISO (n=5)		HIPER (n= 5)
	X		X		X
G3	HIPER (n=4)		HIPO (n=4)		ISO (n=3)
p valor=	0,654		0,844		0,754

Análise estatística dos períodos (P1, P2 e P3), entre os grupos (G1, G2 e G3). Os grupos utilizaram soluções diferentes em cada período. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

5.5. Expressão gênica da neurotrofina NGF.

A expressão gênica da neurotrofina NGF pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO estão representados graficamente (figura 9, página 54) com valores expressos em unidades arbitrárias (UA) de cada paciente que participou do estudo por grupos G1, G2 e G3 e por períodos P1, P2 e P3. A mediana encontra-se em destaque e pontilhada.

Os resultados obtidos da análise estatística da expressão de NGF pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO, representados na tabela 9, página 55, demonstra que não houve diferença significativa para os grupos G1, G2 e G3, quando avaliados entre os períodos.

Em cada período foi analisado a expressão de NGF entre os grupos G1, G2 e G3 (tabela 10, página 56) e revelou que há diferença significativa ($p=0,023$) somente no P1 e que o G3 que utilizou a solução HIPER tem valores de expressão de NGF significativamente maiores.

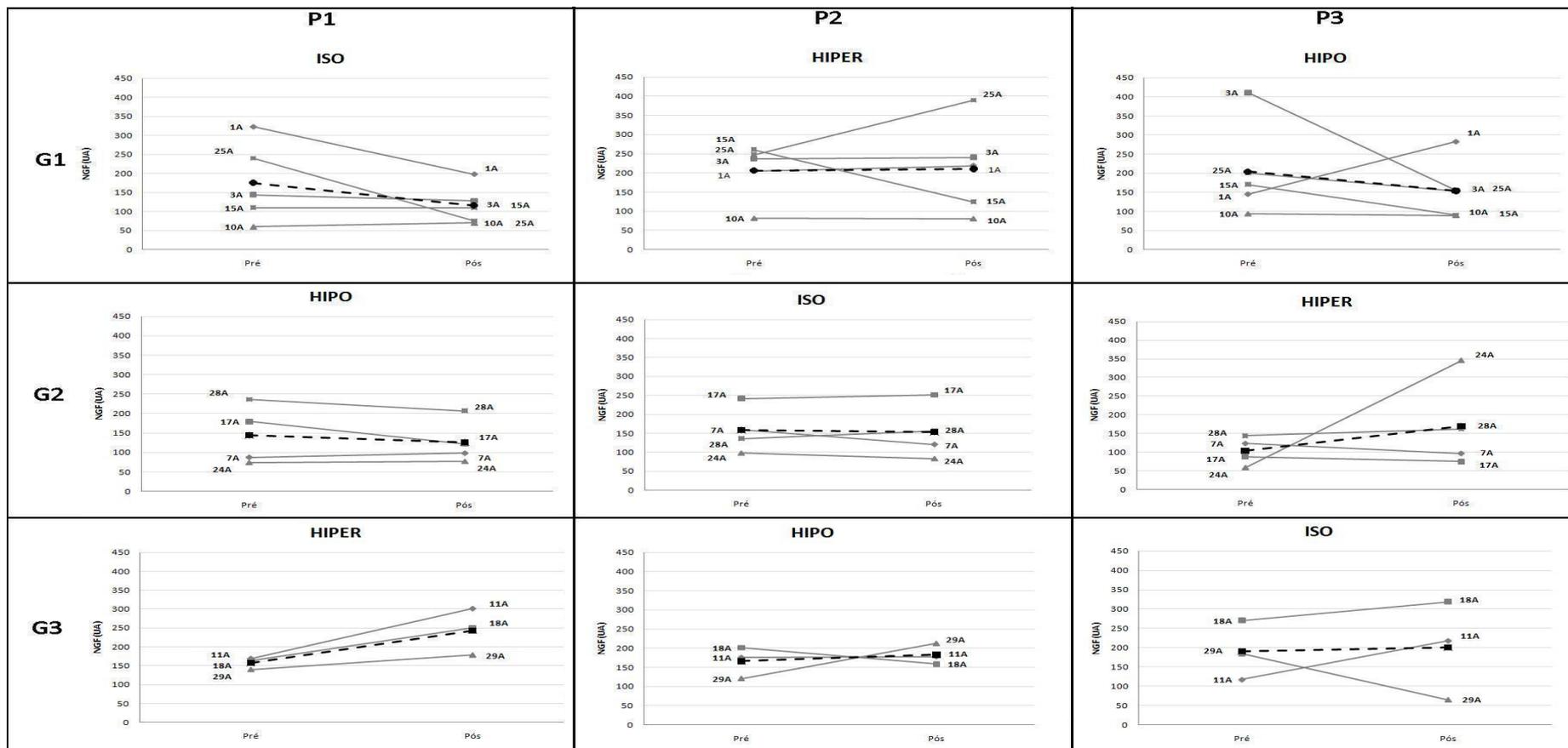


Figura 9. Representação gráfica da expressão gênica da neurotrofina NGF de cada paciente pré e pós tratamento com as soluções isotônica (ISO), hipertônica 3% (HIPER) e água estéril (HIPO) por grupos 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3) e períodos 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3). Os valores da expressão de NGF de cada paciente está demonstrado no gráfico em unidades arbitrárias (UA). A linha pontilhada em destaque representa o valor da mediana.

Tabela 9. Expressão de NGF pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO. Análise de cada grupo entre os períodos.

	P1		P2		P3	p valor
G1	ISO (n=9)	X	HIPER (n=7)	X	HIPO (n=5)	0,444
G2	HIPO (n=8)	X	ISO (n=5)	X	HIPER (n= 5)	0,557
G3	HIPER (n=4)	X	HIPO (n=4)	X	ISO (n=3)	0,629

Tabela representativa dos grupos (G1, G2 e G3) entre os períodos (P1, P2 e P3). Cada período teve duração de 8 semanas de tratamento e entre um período e outro há um intervalo de uma semana. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

Tabela 10. Expressão de NGF pré e pós tratamento com as soluções ISO, HIPER e HIPO.
Análise de cada período entre os grupos

	P1	P2	P3
G1	ISO (n=9)	HIPER (n=7)	AGUA (n=5)
	X	X	X
G2	AGUA (n=8)	ISO (n=5)	HIPER (n= 5)
	X	X	X
G3	HIPER* (n=4)	AGUA (n=4)	ISO (n=3)
p valor	* 0,023	0,981	0,578

Análise estatística dos períodos (P1, P2 e P3), entre os grupos (G1, G2 e G3). Os grupos utilizaram soluções diferentes em cada período. Análise estatística baseada no teste de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

5.6. Análises Comparativa e Evolutiva entre grupos e tempos.

As tabelas 11 a 14, a seguir, nas páginas 58 a 61 respectivamente, apresentam as análises comparativas e evolutivas das variáveis principais entre os 3 grupos e entre as avaliações (pré e pós tratamento) em cada período num estudo tipo crossover, sem e com efeito de carryover.

As variáveis foram transformadas em postos (ranks) devido à ausência de distribuição normal.

Tabela 11. Comparação entre grupos e tempos no P1.

Variáveis (n=21)	Comparação entre os 3 grupos (ISO - HIPER - HIPO)	Comparação entre as avaliações (pré e pós tratamento)	Interação Grupos vs Tempos
TESN	p=0,873	p=0,059	p=0,842
OLFATO	p=0,381	p=0,001*¹	p=0,736
NGF	p=0,090	p=0,946	p=0,001*²

Resultados das ANOVAs para medidas repetidas e para estudo crossover.

(1) Diferença significativas entre tempos (teste de perfil de contraste): pré é diferente pós para G1 e G3

(2) Efeito significativo da interação grupo vs tempo: diferenças significativas (teste de Tukey): G1 diferente G3 no pós-tratamento; diferenças significativas entre tempos (teste por contraste): Pré-tratamento diferente de pós para G3

Diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

Tabela 12. Comparação entre grupos e tempos no P2.

Variáveis (n=16)	Comparação entre os 3 grupos (ISO - HIPER - HIPO)	Comparação entre as avaliações (pré e pós tratamento)	Interação Grupos vs Tempos
TESN	p=0,470	p=0,899	p=0,527
OLFATO	p=0,299	p=0,004* ¹	p=0,723
NGF	p=0,238	p=0,747	p=0,455

Resultados das ANOVAs para medidas repetidas e para estudo crossover.

(1) Diferença significativas entre tempos (teste de perfil de contraste): pré é diferente pós para G2.

Diferença significativa valores de $p < 0,05$ (*).

Tabela 13. Comparação entre grupos e tempos no P3.

Variáveis (n=13)	Comparação entre os 3 grupos (ISO - HIPER - HIPO)	Comparação entre as avaliações (pré e pós tratamento)	Interação Grupos vs Tempos
TESN	p=0,813	p=0,018* ¹	p=0,453
OLFATO	p=0,308	p=0,265	p=0,662
NGF	p=0,359	p=0,922	p=0,306

Resultados das ANOVAs para medidas repetidas e para estudo crossover.

(1) Diferença significativas entre tempos (teste de perfil de contraste): pré é diferente pós para G2

Tabela 14. Comparação entre grupos e tempos, com teste de efeito Carryover

Variáveis	Efeito dos períodos P1-P2-P3	Efeito dos grupos IS0-HIPO-HIPER	Efeito de Carryover	Efeito de Tempo Pré e pós-tratamento
TESN	p=0,851	p=0,690	p=0,359	p=0,945
OLFATO	p=0,191	p=0,271	p=0,484	p=0,288
NGF	p=0,038*¹	p=0,072	p=0,182	p=0,649

Resultados das ANOVAs para medidas repetidas e para estudo crossover.

(1) Diferença significativas entre períodos (teste de perfil de contraste): P1 é diferente de P2 e P2 é diferente de P3.

6. Discussão:

A RA é definida como uma inflamação da mucosa nasal, induzida pela exposição à alérgenos que, após sensibilização, desencadeiam uma resposta inflamatória mediada por imunoglobulina E (IgE), que pode resultar em sintomas crônicos ou recorrentes. Os principais sintomas incluem rinorréia aquosa, obstrução nasal, prurido nasal e espirros os quais se resolvem espontaneamente ou através de tratamento (1).

Para classificar esses sintomas nasais na RA quanto à gravidade, neste estudo, foi utilizado um escore clínico de 0-3, onde 0 denota ausência de sintomas, 1 representa sintomas leves, 2 representa sintomas moderados e 3 sintomas graves (que interferem nas atividades de vida diária e/ou sono) de acordo com o grupo ARIA (1), e após foi somado o total dos escores clínicos dos sintomas nasais, como recomendado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (54, 58, 59).

O controle ambiental, reduzindo a exposição ao alérgeno, é considerada estratégia básica de extrema relevância no tratamento da RA com repercussão sobre a progressão da manifestação clínica da RA (40). Contudo, nos casos de rinite persistente apenas a profilaxia pode não ser suficiente necessitando de outras medidas terapêuticas.

Além de evitar os alérgenos, a primeira escolha de tratamento para rinite alérgica moderada a grave com sintomas persistentes são os corticoides nasais tópicos (1). Os efeitos colaterais mais leves do corticóide tópico nasal são descamação, ressecamento da mucosa e epistaxe (45). As soluções salinas são utilizadas para o tratamento complementar da RA (52, 60-62) e rinossinusite crônica(62). Nas orientações do grupo BSACI (*British Society for Allergy and Clinical Immunology*) (63) recomenda-se para a RA o uso de solução salina para a diminuição dos sintomas em crianças e adultos com rinite, por ser um método seguro e barato. Embora as soluções salinas sejam mencionadas em diversos guias de orientações/diretrizes, a evidência científica sobre sua eficácia como tratamento único é pobre (45, 64). Cordray e colaboradores (2005) avaliaram os efeitos da solução salina como tratamento único para a RA (53). No presente estudo foi avaliado o efeito das soluções salinas nasais sem a utilização do corticoide tópico nasal. O uso de sprays nasais ou irrigação nasal com solução salina para controlar os sintomas da RA é um método seguro,

sem nenhum relato de efeitos adversos graves, os quais podem ser evitados com a modificação da técnica e ajuste de salinidade (62).

A solução salina isotônica mostrou ter efeito preventivo sobre os sintomas dos sintomas da rinite (49, 65), ajudou na redução de mediadores inflamatórios em secreções nasais (66) e mostrou eficácia clínica do tratamento da rinite crônica (66, 67), além de melhorar o aspecto da mucosa, em pacientes com rinosinusite crônica (68).

No presente estudo observou-se melhora do TESH, embora sem significância estatística com os grupos G1 e G2 que no P1 iniciaram o tratamento com as soluções ISO e HIPO respectivamente. O G2 piorou o TESH no P3 com significância estatística com a utilização da solução HIPER. O G3 que iniciou o tratamento no P1 com a solução HIPER também não obteve melhora do TESH, porém sem significância estatística. Estudos sugerem que o uso da solução salina hipertônica na RA contribuem para o controle dos sintomas nasais e melhora da qualidade de vida (69-72), redução de anti-histamínicos utilizados (60) e melhora da função mucociliar (51, 61, 73-76). Contudo, o uso da solução salina hipertônica na RA ainda é controverso. A solução salina hipertônica pode induzir a secreção nasal em indivíduos com rinite alérgica provocando sintomas como queimação, rinorréia e obstrução (39), podendo causar irritação nasal (77) e aumentar a quantidade de secreção na mucosa (78), embora tenha sido um tratamento complementar válido em sintomas da rinosinusite crônica (79), para lavagem da cavidade nasal removendo muco e crostas, mediadores inflamatórios (52) e promovendo melhora da função mucociliar (51, 61, 73, 76).

A mucosa nasal humana tem as mesmas características que as vias aéreas inferiores, mas com mecanismos de obstrução de fluxo aéreo diferentes considerando suas estruturas. Contudo os mecanismos de inflamação são similares, enquanto no trato respiratório inferior ocorre contração da musculatura lisa nos brônquios e traqueia, a vasodilatação dos cornetos causa um edema na mucosa (80). Em indivíduos asmáticos a solução hipertônica age como irritante podendo estimular a hiperreatividade brônquica, seu mecanismo ainda não está claro, mas envolve resposta neurogênica (81). A associação entre respostas imune e neural foi previamente designada inflamação neurogênica, onde os mediadores desta interação incluem as neurotrofinas (82, 83), como o NGF (84). As vias neurais desempenham papel importante na fisiopatologia da RA. (85). Os sintomas da RA como prurido e espirros,

também são caracterizados por hiperresponsividade a estímulos inespecíficos, os quais são parcialmente controlados via neural (38). Níveis elevados de NGF foram identificados em pacientes com asma (31) e em pacientes com RA (17, 84, 86, 87).

Os resultados sugerem que a solução HIPER no presente estudo pode ter agido como elemento irritante, uma vez que no P1, os pacientes do G3 não apresentaram melhora do TESN e apresentaram concentrações de expressão de NGF mais altas com a utilização da solução HIPER, porém houve melhora do escore olfato com a solução HIPER.

Na avaliação do total do escore olfato todos os grupos apresentaram melhora no P1.

Infecções das vias aéreas superiores são uma das causas mais comuns de distúrbios olfatórios (88). A hiposmia tem uma maior prevalência em pacientes com RA e a rinossinutite associada pode ser a sua principal causa (89-91), além da polipose, com obstrução do fluxo de ar sobre o epitélio olfativo (91). A fisiopatologia da disfunção olfatória na RA não é totalmente compreendida. Duas potenciais causas podem estar envolvidas: obstrução e inflamação, as quais podem causar bloqueios no transporte de partículas de odor ao epitélio olfativo em razão da congestão nasal, explicando a perda do olfato na RA, podendo assim definir a gravidade da RA persistente (92). Durante a estação de pólen, a hiposmia pode aumentar nesses pacientes. (93) e estão relacionados com mecanismos inflamatórios alérgicos (94).

No entanto, o aumento das concentrações de NGF no G3, no primeiro período parecem não ter influenciado no escore olfato. O escore do olfato melhorou enquanto houve aumento de NGF.

Neste estudo, pudemos observar que os pacientes apresentaram melhora do TESN e escore do olfato no P1. As condições climáticas do P1, que compreendeu entre o fim do inverno e início da primavera, mostraram que os valores de umidade do ar mínima, média e máxima e temperatura mínima foram significativamente mais baixos que os períodos P2 e P3.

A morbidade da rinite alérgica depende da região geográfica, estação do ano e clima local (45). O clima pode influenciar na prevalência da rinite e as condições de umidade são as que mais influenciam na manifestação respiratória (95). A polinização, vistas em áreas continentais mais frias, sendo limitada na estação primavera-verão, piora os sintomas da RA e climas mais úmidos e quentes, favorece o crescimento dos fungos (95). Ausência de

pólens ou sua baixa concentração em áreas tropicais, como no Brasil, são insuficientes para causar rinite alérgica (96). Mesmo assim, casos isolados foram identificados em algumas áreas específicas, como Caxias do Sul e Curitiba(97), e a maioria era associada à conjuntivite alérgica sazonal (98).

7. CONCLUSÕES

As soluções ISO e HIPO podem ser utilizadas como tratamento adjuvante na RA, pois aliviou os sintomas e melhorou a sensibilidade olfativa, mesmo sem o uso tópico de corticóide nasal.

A solução salina HIPER pode aumentar a expressão de NGF na mucosa nasal, contudo, melhorou o escore olfato.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As soluções salinas podem ser utilizadas como tratamento coadjuvante da RA, porém o uso de corticoide tópico nasal é de extrema importância.

As soluções hipertônicas podem ser benéficas no tratamento do escore do olfato, porém pode aumentar a expressão de NGF na mucosa nasal em pacientes com RA.

A dificuldade da continuação da coleta de dados, por ser um estudo longo com o mesmo paciente, foi outro fato que deve ser enfatizado neste estudo, por isso, este foi concluído com uma amostra pequena.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(5 Suppl):S147-334.
2. Van Cauwenberge P, Sys L, De Belder T, Watelet JB. Anatomy and physiology of the nose and the paranasal sinuses. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24(1):1-17.
3. Jones N. The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;51(1-3):5-19.
4. Rawson NE. Olfactory loss in aging. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2006;2006(5):pe6. Epub 2006/02/14.
5. Cole P. Physiology of the nose and paranasal sinuses. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1998;16(1-2):25-54.
6. Taylor-Clark TE, Kollarik M, MacGlashan DW, Jr., Undem BJ. Nasal sensory nerve populations responding to histamine and capsaicin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(6):1282-8. Epub 2005/12/13.
7. Widdicombe J. Microvascular anatomy of the nose. *Allergy*. 1997;52(40 Suppl):7-11. Epub 1997/01/01.
8. Eccles R, Eccles KS. Asymmetry in the autonomic nervous system with reference to the nasal cycle, migraine, anisocoria and Meniere's syndrome. *Rhinology*. 1981;19(3):121-5. Epub 1981/09/01.
9. Van Cauwenberge PB, Deleye L. Nasal cycle in children. *Arch Otolaryngol*. 1984;110(2):108-10. Epub 1984/02/01.
10. Soane RJ, Carney AS, Jones NS, Frier M, Perkins AC, Davis SS, et al. The effect of the nasal cycle on mucociliary clearance. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2001;26(1):9-15. Epub 2001/04/12.
11. 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. Epub 2008/03/26.

12. Meltzer EO. Allergic rhinitis: the impact of discordant perspectives of patient and physician on treatment decisions. *Clin Ther.* 2007;29(7):1428-40. Epub 2007/09/11.
13. Lamb CE, Ratner PH, Johnson CE, Ambegaonkar AJ, Joshi AV, Day D, et al. Economic impact of workplace productivity losses due to allergic rhinitis compared with select medical conditions in the United States from an employer perspective. *Curr Med Res Opin.* 2006;22(6):1203-10. Epub 2006/07/19.
14. Sanico AM, Stanisiz AM, Gleeson TD, Bora S, Proud D, Bienenstock J, et al. Nerve growth factor expression and release in allergic inflammatory disease of the upper airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1631-5. Epub 2000/05/12.
15. Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(1 Suppl):S2-8. Epub 2001/07/13.
16. Borish L. Allergic rhinitis: systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6):1021-31. Epub 2003/12/06.
17. Raap U, Fokkens W, Bruder M, Hoogsteden H, Kapp A, Braunstahl GJ. Modulation of neurotrophin and neurotrophin receptor expression in nasal mucosa after nasal allergen provocation in allergic rhinitis. *Allergy.* 2008;63(4):468-75. Epub 2008/02/13.
18. Dykewicz MS. 7. Rhinitis and sinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2 Suppl):S520-9. Epub 2003/02/20.
19. Ciprandi G, Cirillo I, Klersy C, Castellazzi AM, Barberi S, Marseglia GL. Nasal decongestion test in allergic rhinitis: definition of responder. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(3):372-4. Epub 2007/02/06.
20. Sanico AM, Koliatsos VE, Stanisiz AM, Bienenstock J, Togias A. Neural hyperresponsiveness and nerve growth factor in allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;118(2-4):154-8. Epub 1999/05/04.
21. Howarth PH, Salagean M, Dokic D. Allergic rhinitis: not purely a histamine-related disease. *Allergy.* 2000;55 Suppl 64:7-16. Epub 2001/04/09.
22. Settupane RA, Lieberman P. Update on nonallergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001;86(5):494-507; quiz -8. Epub 2001/05/31.
23. Demoly P, Allaert FA, Lecasble M, Bousquet J. Validation of the classification of ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma). *Allergy.* 2003;58(7):672-5. Epub 2003/06/26.

24. Bauchau V, Durham SR. Epidemiological characterization of the intermittent and persistent types of allergic rhinitis. *Allergy*. 2005;60(3):350-3. Epub 2005/02/01.
25. Howarth PH, Persson CG, Meltzer EO, Jacobson MR, Durham SR, Silkoff PE. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(3 Suppl 1):S414-41.
26. Pipkorn U, Karlsson G. Methods for obtaining specimens from the nasal mucosa for morphological and biochemical analysis. *Eur Respir J*. 1988;1(9):856-62.
27. Maru YK, Munjal S, Gupta Y. Brush cytology and its comparison with histopathological examination in cases of diseases of the nose. *J Laryngol Otol*. 1999;113(11):983-7.
28. Bickmore JT, Marshall ML. Cytology of nasal secretions: further diagnostic help. *Laryngoscope*. 1976;86(4):516-23. Epub 1976/04/01.
29. Vega JA, Garcia-Suarez O, Hannestad J, Perez-Perez M, Germana A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat*. 2003;203(1):1-19.
30. Millqvist E, Ternesten-Hasseus E, Stahl A, Bende M. Changes in levels of nerve growth factor in nasal secretions after capsaicin inhalation in patients with airway symptoms from scents and chemicals. *Environ Health Perspect*. 2005;113(7):849-52.
31. Bonini S, Lambiase A, Angelucci F, Magrini L, Manni L, Aloe L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):10955-60. Epub 1996/10/01.
32. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987;237(4819):1154-62.
33. Fox AJ, Patel HJ, Barnes PJ, Belvisi MG. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*. 2001;424(2):159-62.
34. Bonini S, Aloe L, Bonini S, Rama P, Lamagna A, Lambiase A. Nerve growth factor (NGF): an important molecule for trophism and healing of the ocular surface. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506(Pt A):531-7.
35. Bonini S, Lambiase A, Lapucci G, Properzi F, Bresciani M, Bracci Laudiero ML, et al. Nerve growth factor and asthma. *Allergy*. 2002;57 Suppl 72:13-5.

36. Wilfong ER, Dey RD. The release of nerve growth factor from the nasal mucosa following toluene diisocyanate. *J Toxicol Environ Health A*. 2005;68(15):1337-48.
37. Kobayashi H, Gleich GJ, Butterfield JH, Kita H. Human eosinophils produce neurotrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood*. 2002;99(6):2214-20.
38. Pfaar O, Raap U, Holz M, Hormann K, Klimek L. Pathophysiology of itching and sneezing in allergic rhinitis. *Swiss Med Wkly*. 2009;139(3-4):35-40.
39. Sanico AM, Philip G, Lai GK, Togias A. Hyperosmolar saline induces reflex nasal secretions, evincing neural hyperresponsiveness in allergic rhinitis. *J Appl Physiol*. 1999;86(4):1202-10.
40. Naclerio RR, L; Ohkubo, K. Allergic Rhinitis: current and future treatments. *Clin Exp All Rev*. 2002;2:137-47.
41. Bousquet J, van Cauwenberge P, Ait Khaled N, Bachert C, Baena-Cagnani CE, Bouchard J, et al. Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis ARIA update (in collaboration with GA2LEN). *Allergy*. 2006;61(9):1086-96. Epub 2006/08/22.
42. Horak F. Impact and modulation of nasal obstruction. *Allergy*. 2002;57 Suppl 75:25-8. Epub 2002/12/21.
43. Quraishi SA, Davies MJ, Craig TJ. Inflammatory responses in allergic rhinitis: traditional approaches and novel treatment strategies. *J Am Osteopath Assoc*. 2004;104(5 Suppl 5):S7-15. Epub 2004/06/05.
44. Price D, Bond C, Bouchard J, Costa R, Keenan J, Levy ML, et al. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: management of allergic rhinitis. *Prim Care Respir J*. 2006;15(1):58-70. Epub 2006/05/17.
45. van Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, et al. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. *Allergy*. 2000;55(2):116-34. Epub 2000/03/22.
46. Mygind N, Nielsen LP, Hoffmann HJ, Shukla A, Blumberga G, Dahl R, et al. Mode of action of intranasal corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(1 Suppl):S16-25. Epub 2001/07/13.

47. Kaiser HB, Naclerio RM, Given J, Toler TN, Ellsworth A, Philpot EE. Fluticasone furoate nasal spray: a single treatment option for the symptoms of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1430-7. Epub 2007/04/10.
48. Boner AL. Effects of intranasal corticosteroids on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(1 Suppl):S32-9. Epub 2001/07/13.
49. Slapak I, Skoupa J, Strnad P, Hornik P. Efficacy of isotonic nasal wash (seawater) in the treatment and prevention of rhinitis in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(1):67-74. Epub 2008/01/23.
50. Inanli S, Ozturk O, Korkmaz M, Tutkun A, Batman C. The effects of topical agents of fluticasone propionate, oxymetazoline, and 3% and 0.9% sodium chloride solutions on mucociliary clearance in the therapy of acute bacterial rhinosinusitis in vivo. *Laryngoscope*. 2002;112(2):320-5.
51. Talbot AR, Herr TM, Parsons DS. Mucociliary clearance and buffered hypertonic saline solution. *Laryngoscope*. 1997;107(4):500-3.
52. Tomooka LT, Murphy C, Davidson TM. Clinical study and literature review of nasal irrigation. *Laryngoscope*. 2000;110(7):1189-93.
53. Cordray S, Harjo JB, Miner L. Comparison of intranasal hypertonic dead sea saline spray and intranasal aqueous triamcinolone spray in seasonal allergic rhinitis. *Ear Nose Throat J*. 2005;84(7):426-30.
54. US Food and Drug Administration - Center for Drug Evaluation and Research. Allergic rhinitis: Clinical development programs for drug products (Draft guidance). [cited 2009 June]; Available from: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071293.pdf
55. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9. Epub 1987/04/01.
56. Boechat LH, Vilella CA, Zollner RL. Effect of iodide on Fas, Fas-ligand and Bcl-w mRNA expression in thyroid of NOD mice pretreated with methimazole. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(3):289-95. Epub 2002/03/12.

57. Vieira KP, de Almeida e Silva Lima Zollner AR, Malaguti C, Vilella CA, de Lima Zollner R. Ganglioside GM1 effects on the expression of nerve growth factor (NGF), Trk-A receptor, proinflammatory cytokines and on autoimmune diabetes onset in non-obese diabetic (NOD) mice. *Cytokine*. 2008;42(1):92-104. Epub 2008/03/11.
58. Kirtsreesakul V, Somjareonwattana P, Ruttanaphol S. The correlation between nasal symptom and mucociliary clearance in allergic rhinitis. *Laryngoscope*. 2009;119(8):1458-62. Epub 2009/06/10.
59. Hohlfeld JM, Holland-Letz T, Larbig M, Lavae-Mokhtari M, Wierenga E, Kapsenberg M, et al. Diagnostic value of outcome measures following allergen exposure in an environmental challenge chamber compared with natural conditions. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(7):998-1006. Epub 2010/04/24.
60. Garavello W, Romagnoli M, Sordo L, Gaini RM, Di Berardino C, Angrisano A. Hypersaline nasal irrigation in children with symptomatic seasonal allergic rhinitis: a randomized study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003;14(2):140-3. Epub 2003/04/05.
61. Kim CH, Hyun Song M, Eun Ahn Y, Lee JG, Yoon JH. Effect of hypo-, iso- and hypertonic saline irrigation on secretory mucins and morphology of cultured human nasal epithelial cells. *Acta Otolaryngol*. 2005;125(12):1296-300.
62. Rabago D, Zgierska A. Saline nasal irrigation for upper respiratory conditions. *Am Fam Physician*. 2009;80(10):1117-9. Epub 2009/11/13.
63. Scadding GK, Durham SR, Mirakian R, Jones NS, Leech SC, Farooque S, et al. BSACI guidelines for the management of allergic and non-allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(1):19-42. Epub 2007/12/18.
64. Fokkens W, Lund V, Bachert C, Clement P, Hellings P, Holmstrom M, et al. EAACI position paper on rhinosinusitis and nasal polyps executive summary. *Allergy*. 2005;60(5):583-601. Epub 2005/04/09.
65. Tano L, Tano K. A daily nasal spray with saline prevents symptoms of rhinitis. *Acta Otolaryngol*. 2004;124(9):1059-62. Epub 2004/10/30.
66. Georgitis JW. Nasal hyperthermia and simple irrigation for perennial rhinitis. Changes in inflammatory mediators. *Chest*. 1994;106(5):1487-92. Epub 1994/11/01.

67. Nuutinen J, Holopainen E, Haahtela T, Ruoppi P, Silvasti M. Balanced physiological saline in the treatment of chronic rhinitis. *Rhinology*. 1986;24(4):265-9. Epub 1986/12/01.
68. Bachmann G, Hommel G, Michel O. Effect of irrigation of the nose with isotonic salt solution on adult patients with chronic paranasal sinus disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2000;257(10):537-41. Epub 2001/02/24.
69. Shoseyov D, Bibi H, Shai P, Shoseyov N, Shazberg G, Hurvitz H. Treatment with hypertonic saline versus normal saline nasal wash of pediatric chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(5):602-5. Epub 1998/05/26.
70. Rabago D, Pasic T, Zgierska A, Mundt M, Barrett B, Maberry R. The efficacy of hypertonic saline nasal irrigation for chronic sinonasal symptoms. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;133(1):3-8.
71. Rabago D, Barrett B, Marchand L, Maberry R, Mundt M. Qualitative aspects of nasal irrigation use by patients with chronic sinus disease in a multimethod study. *Ann Fam Med*. 2006;4(4):295-301.
72. Rabago D, Guerard E, Bukstein D. Nasal irrigation for chronic sinus symptoms in patients with allergic rhinitis, asthma, and nasal polyposis: a hypothesis generating study. *WMJ*. 2008;107(2):69-75. Epub 2008/07/03.
73. Homer JJ, England RJ, Wilde AD, Harwood GR, Stafford ND. The effect of pH of douching solutions on mucociliary clearance. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1999;24(4):312-5. Epub 1999/09/03.
74. Papsin B, McTavish A. Saline nasal irrigation: Its role as an adjunct treatment. *Can Fam Physician*. 2003;49:168-73. Epub 2003/03/07.
75. Suslu N, Bajin MD, Suslu AE, Ogretmenoglu O. Effects of buffered 2.3%, buffered 0.9%, and non-buffered 0.9% irrigation solutions on nasal mucosa after septoplasty. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266(5):685-9. Epub 2008/09/20.
76. Wabnitz DA, Wormald PJ. A blinded, randomized, controlled study on the effect of buffered 0.9% and 3% sodium chloride intranasal sprays on ciliary beat frequency. *Laryngoscope*. 2005;115(5):803-5. Epub 2005/05/04.

77. Adam P, Stiffman M, Blake RL, Jr. A clinical trial of hypertonic saline nasal spray in subjects with the common cold or rhinosinusitis. *Arch Fam Med*. 1998;7(1):39-43. Epub 1998/01/27.
78. Baraniuk JN, Ali M, Yuta A, Fang SY, Naranch K. Hypertonic saline nasal provocation stimulates nociceptive nerves, substance P release, and glandular mucous exocytosis in normal humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):655-62. Epub 1999/08/03.
79. Harvey R, Hannan SA, Badia L, Scadding G. Nasal saline irrigations for the symptoms of chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(3):CD006394. Epub 2007/07/20.
80. Raphael GD, Baraniuk JN, Kaliner MA. How and why the nose runs. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87(2):457-67. Epub 1991/02/01.
81. Anderson SD. Challenge tests to assess airway hyperresponsiveness and efficacy of drugs used in the treatment of asthma. *J Aerosol Med*. 1996;9(1):95-109. Epub 1997/01/02.
82. Barnes PJ. Neurogenic inflammation and asthma. *J Asthma*. 1992;29(3):165-80. Epub 1992/01/01.
83. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(1):67-71. Epub 2006/01/03.
84. Raap U, Braunstahl GJ. The role of neurotrophins in the pathophysiology of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(1):8-13. Epub 2009/11/26.
85. Sarin S, Undem B, Sanico A, Togias A. The role of the nervous system in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(5):999-1016. Epub 2006/11/08.
86. Wu X, Myers AC, Goldstone AC, Togias A, Sanico AM. Localization of nerve growth factor and its receptors in the human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):428-33.
87. Bresciani M, Laliberte F, Laliberte MF, Gramiccioni C, Bonini S. Nerve growth factor localization in the nasal mucosa of patients with persistent allergic rhinitis. *Allergy*. 2009;64(1):112-7. Epub 2008/12/17.
88. Seiden AM, Duncan HJ. The diagnosis of a conductive olfactory loss. *Laryngoscope*. 2001;111(1):9-14. Epub 2001/02/24.

89. Apter AJ, Gent JF, Frank ME. Fluctuating olfactory sensitivity and distorted odor perception in allergic rhinitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;125(9):1005-10. Epub 1999/09/17.
90. Cowart BJ, Flynn-Rodden K, McGeady SJ, Lowry LD. Hyposmia in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;91(3):747-51. Epub 1993/03/01.
91. Guss J, Doghramji L, Reger C, Chiu AG. Olfactory dysfunction in allergic rhinitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2009;71(5):268-72. Epub 2009/10/03.
92. Guilemany JM, Garcia-Pinero A, Alobid I, Cardelus S, Centellas S, Bartra J, et al. Persistent allergic rhinitis has a moderate impact on the sense of smell, depending on both nasal congestion and inflammation. *Laryngoscope.* 2009;119(2):233-8. Epub 2009/01/23.
93. Moll B, Klimek L, Eggers G, Mann W. Comparison of olfactory function in patients with seasonal and perennial allergic rhinitis. *Allergy.* 1998;53(3):297-301. Epub 1998/05/23.
94. Klimek L, Eggers G. Olfactory dysfunction in allergic rhinitis is related to nasal eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(2):158-64. Epub 1997/08/01.
95. Zanolin ME, Pattaro C, Corsico A, Bugiani M, Carrozzi L, Casali L, et al. The role of climate on the geographic variability of asthma, allergic rhinitis and respiratory symptoms: results from the Italian study of asthma in young adults. *Allergy.* 2004;59(3):306-14. Epub 2004/02/26.
96. Oliveira Lima A, Dias Da Costa P, et al. Pollinosis in Brazil. *Ann Allergy.* 1946;4:13-22. Epub 1946/01/01.
97. Viera FAMN, E.B. Epidemiologia da polinose na população de algumas cidades do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Alergia Imunopatol.* 1989;12(3):73-8.
98. Rosario Filho NA. Reflexões sobre polinose: 20 anos de experiência. *Rev Bras Alergia Imunopatol.* 1997;20(6):210-3.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

A) Nome do Projeto: **“EFEITO DA APLICAÇÃO NASAL DE DIFERENTES SOLUÇÕES (ÁGUA ESTÉRIL, ISOTÔNICA E HIPERTÔNICA 3%) SOBRE OS SINTOMAS E EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL (NGF) EM PACIENTES COM RINOPATIA ALÉRGICA PERSISTENTE”**

B) Nome dos Responsáveis:

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner: Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental e Ambulatório de Alergia Respiratória, Departamento de Clínica Médica, Clínica, Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Ramal: Fone Direto: 19-3289.3709

Bruna Scharlack Vian – Crefito 3/65917-F

Natalia E. Z. Fabbri – Crefito 3/63372 - F

C) Nome Completo do Paciente:.....

Idade: / RG nº

Endereço :.....

HC nº

D) Nome do responsável legal pelo paciente:.....

Idade:...../ RG nº:.....

Endereço Completo:.....

Grau de Parentesco:.....

Prova Documental comprobatória da Responsabilidade. (Nos casos de autorização fornecida por responsável):.....

E) Objetivos: Esse projeto tem como objetivo oferecer tratamento coadjuvante a pacientes com rinite alérgica

F) Procedimentos submetidos aos pacientes: sob supervisão médica.

1. Rinoscopia anterior
2. Coleta de material nasal
3. Lavagem.

G) Durante o tratamento será coletado material nasal para dosagens e estudos específicos no sentido de avaliação do efeito das soluções e armazenamento segundo autorização expressa do paciente, conforme as diretrizes da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp

H) Benefícios esperados: Melhora de sintomas clínicos da rinopatia com consequente melhora da qualidade de vida presente estudo trará subsídios adicionais ao tratamento de suporte a rinite alérgica

I) Efeitos Colaterais:

Contudo, é possível, embora não usual, a presença de reações sistêmicas. Assim, o monitoramento dos sinais vitais, pela equipe médica durante todo o transcorrer do tratamento deverá ser rigorosamente observado.

J) Exames Clínico-Laboratoriais:

Não haverá ônus ao paciente, todos os procedimentos estão previstos nos custos do projeto.

L) A equipe de pesquisadores estará à disposição do paciente para qualquer esclarecimento quanto ao estudo.

M) Se após qualquer esclarecimento o paciente desejar deixar o grupo de estudo ou tratamento imunoterápico, este direito está assegurado, sem prejuízo de seu acompanhamento clínico.

N) Todos os informes serão sigilosos, quanto a sua identidade ou divulgação nos resultados.

As medicações para controle de sintomas alérgicos se necessárias durante o estudo, serão fornecidas pela equipe de pesquisadores.

Todas as informações serão fornecidas e atualizadas independente de afetar ou não a permanência do paciente no estudo.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO:

SIM, eu autorizo o armazenamento do material biológico para o presente estudo e estudos futuros, desde que sejam assegurados sigilo e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp

NÃO, Eu não autorizo o armazenamento do material biológico

R) Nomes e telefones dos pesquisadores da equipe:

- Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner; Professor Associado, Livre Docente em Imunologia Clínica & Alergia e Dra Conceição Aparecida Vilella, Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental - Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas. Fone Direto: 19-32893709.
- Bruna Scharlack Vian –19-9758-1066
- Natalia E. Zanellato Fabbri – 19-9719-9898

S) Comitê de Ética em Pesquisa, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Fone: 19-3521-8936; cep@fcm.unicamp.br

Campinas, SP de de 2006

.....

Assinatura do Paciente

.....

Assinatura do Responsável pela Pesquisa

Prof. Dr. Ricardo L Zollner

CRM-SP: 42769

ANEXO II



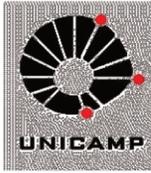
EFEITO DA APLICAÇÃO NASAL DE DIFERENTES SOLUÇÕES (ÁGUA ESTÉRIL, ISOTÔNICA E HIPERTÔNICA 3%) SOBRE OS SINTOMAS E EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL (NGF) EM PACIENTES COM RINOPATIA ALÉRGICA PERSISTENTE

ESCORE CLÍNICO DE ACOMPANHAMENTO

Nome: _____ HC: _____

SOLUÇÃO ISO																				
SINAIS/ SINTOMAS	AVALIAÇÃO INICIAL				2ª AVALIAÇÃO				3ª AVALIAÇÃO				4ª AVALIAÇÃO				AVALIAÇÃO FINAL			
	dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__			
Obstrução	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
prurido	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
coriza	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
espirros	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
SOLUÇÃO HIPER																				
SINAIS/ SINTOMAS	AVALIAÇÃO INICIAL				2ª AVALIAÇÃO				3ª AVALIAÇÃO				4ª AVALIAÇÃO				AVALIAÇÃO FINAL			
	dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__			
Obstrução	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
prurido	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
coriza	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
espirros	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
SOLUÇÃO HIPO																				
SINAIS/ SINTOMAS	AVALIAÇÃO INICIAL				2ª AVALIAÇÃO				3ª AVALIAÇÃO				4ª AVALIAÇÃO				AVALIAÇÃO FINAL			
	dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__				dia: __/__/__			
Obstrução	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
prurido	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
coriza	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
espirros	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3

ANEXO III



“EFEITO DA APLICAÇÃO NASAL DE DIFERENTES SOLUÇÕES (HIPOTÔNICA, ISOTÔNICA E HIPERTÔNICA 3%) SOBRE OS SINTOMAS E EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO NEURAL (NGF) EM PACIENTES COM RINOPATIA ALÉRGICA PERSISTENTE”

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO

Data: ____/____/____

Nome: _____

Idade: _____ HC: _____ Cor: _____ Sexo: () M () F

(a) Solução Isotônica (b) Solução Hipertônica (c) Água

Indivíduo apresenta:

1. Congestão Nasal?

() não () leve () moderada () intensa

2. Espirros?

() não () leve () moderada () intensa

3. Secreção nasal?

() não () leve () moderada () intensa

() aquosa () mucóide

4. Prurido nasa?

() não () leve () moderada () intensa

5. Diminuição olfato?

() anosmia () não () hiposmia

6. Outros:.....