





# **Modulação Colinérgica da Resposta Inflamatória na Rinossinusite Crónica**

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor,  
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

RUI ANTÓNIO SOARES CEREJEIRA

Programa Doutoral de Medicina e Oncologia Molecular  
Porto, 2016



**Orientadora:** Professora Doutora Carla Pinto Moura

**Co-Orientadora:** Professora Doutora Susana Fernandes



À Rafaela



Aos meus pais, avós e irmãos



Aos meus sogros, à Tó e ao Jorge



Aos meus Mestres



A todos quantos me ajudaram  
a percorrer este caminho



## **Constituição do Júri das Provas de Doutoramento em Medicina e Oncologia Molecular**

### **Presidente:**

- Reitor da Universidade do Porto.

### **Vogais:**

- Doutor António Carlos Eva Miguéis, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;

- Doutor Paulo Jorge da Silva Correia de Sá, Professor Catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto;

- Doutor Henrique Manuel Nunes de Almeida, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

- Doutor Jorge Eduardo de Freitas Spratley, Professor Associado Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

- Doutora Rosa Maria da Cruz Ventura Roque Farinha, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior;

- Doutora Carla Isabel Ferreira Pinto de Moura, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e orientadora da tese.



## **Corpo Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto**

### **Professores Efetivos**

Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões

Maria Amélia Duarte Ferreira

José Agostinho Marques Lopes

Patrício Manuel Vieira Araújo Soares Silva

Alberto Manuel Barros da Silva

José Manuel Lopes Teixeira Amarante

José Henrique Dias Pinto de Barros

Maria Fátima Machado Henriques Carneiro

Isabel Maria Amorim Pereira Ramos

Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira

Maria Dulce Cordeiro Madeira

Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira

Rui Manuel Almeida Mota Cardoso

José Carlos Neves da Cunha Areias

Manuel Jesus Falcão Pestana Vasconcelos

João Francisco Montenegro Andrade Lima Bernardes

Maria Leonor Martins Soares David

Rui Manuel Lopes Nunes

José Eduardo Torres Eckenroth Guimarães

Francisco Fernando Rocha Gonçalves

José Manuel Pereira Dias de Castro Lopes

António Albino Coelho Marques Abrantes Teixeira

Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira

Raquel Ângela Silva Soares Lino

**Professores Jubilados ou Aposentados**

Abel Vitorino Trigo Cabral

Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto

Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar

Amândio Gomes Sampaio Tavares

António Augusto Lopes Vaz

António Carlos de Freitas Ribeiro Saraiva

António Carvalho Almeida Coimbra

António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga

António José Pacheco Palha

António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira

Belmiro dos Santos Patrício

Cândido Alves Hipólito Reis

Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão

Cassiano Pena de Abreu e Lima

Daniel Filipe de Lima Moura

Daniel Santos Pinto Serrão

Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira

Fernando Tavela Veloso

Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Menezes

Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares

José Carvalho de Oliveira

José Fernando Barros Castro Correia

José Luis Medina Vieira

José Manuel Costa Mesquita Guimarães

Levi Eugénio Ribeiro Guerra

Luis Alberto Martins Gomes de Almeida

Manuel António Caldeira Pais Clemente

Manuel Augusto Cardoso de Oliveira

Manuel Machado Rodrigues Gomes

Manuel Maria Paula Barbosa

Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães

Maria Isabel Amorim de Azevedo

Mário José Cerqueira Gomes Braga

Serafim Correia Pinto Guimarães

Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso

Walter Friedrich Alfred Osswald



Os trabalhos de investigação desenvolvidos para a elaboração desta Tese permitiram realizar as seguintes publicações:

**Publicações por Extenso em Revistas Indexadas e *Peer Reviewed***

Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Prevalence of Nasal Polyps in Northern Portugal – a cadaver endoscopic study. *Rhinology* 2014; 52:386-9.

Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Portuguese Version of RhinoQOL: validation and clinical application. *Braz J Otorhinolaryngol* 2015; 81:630-635.

Cerejeira R, Fernandes S, Moura CP. Increased expression of  $\alpha 7nAChR$  in chronic rhinosinusitis: the intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* 2016; 43:176-81. doi: 10.1016/j.anl.2015.08.011. Epub 2015 Sep 26.

**Publicações sob a forma de Resumo em Revistas Indexadas e *Peer Reviewed***

Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Prevalence of Nasal Polyps in Northern Portugal – a cadaver endoscopic study. *Rhinology* 2014; 52(Suppl 25):310.



Os trabalhos de investigação desenvolvidos para a elaboração desta Tese permitiram realizar as seguintes comunicações:

### **Comunicações Orais em Congressos Internacionais**

Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Prevalence of Nasal Polyps in Northern Portugal – a cadaver endoscopic study. 25<sup>th</sup> Congress of The European Rhinologic Society, Amesterdão, Junho de 2014. [doc.1]

Cerejeira R, Fernandes S, Moura CP. Chronic rhinosinusitis is associated with increased protein expression of  $\alpha 7nAChR$ : the intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. 3<sup>rd</sup> Congress of European ORL-HNS, Praga, Junho de 2015. [doc.2]

### **Pósteres em Congressos Internacionais**

Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. The Portuguese Version of RhinoQOL questionnaire: an easy clinical outcome assessment test for endoscopic sinus surgery in chronic rhinosinusitis. 3<sup>rd</sup> Congress of European ORL-HNS, Praga, Junho de 2015. [doc.3]

### **Pósteres em Congressos Nacionais**

Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Prevalence of Nasal Polyps in Northern Portugal – a cadaver endoscopic study. 4<sup>o</sup> Encontro de Doutorandos da FMUP, Porto, Dezembro de 2014. [doc.4]



## Lista de Abreviaturas

Ach	acetilcolina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALI	<i>air-liquid interface</i>
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensageiro
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CREB	<i>AMPc response element-binding protein</i>
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crónica
EPOS	<i>eupean position paper on rhinosinusitis and nasal polyps</i>
ICD-9	<i>International Classification of Diseases – 9</i>
GPP	gânglio pterigopalatino
HMGB	<i>high mobility group box</i>
IκB	inibidor do NF-κB
IFN	interferão
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
LPS	lipopolissacarídeo
mAChR(s)	receptor(es) muscarínico(s) da acetilcolina
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MEC	matriz extra-celular
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
nAChR(s)	receptor(es) nicotínico(s) da acetilcolina
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ORL	otorrinolaringologia
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PLUNC	<i>palate, lung, nasal epithelium clone</i>
PN	pólipos nasais
RA	rinoscopia anterior
RSA	rinossinusite aguda

RSC	rinossinusite crónica
RSCcPN	rinossinusite crónica com pólipos nasais
RSCsPN	rinossinusite crónica sem pólipos nasais
SNC	sistema nervoso central
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TC	tomografia computadorizada
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper cells</i>
TJs	<i>tight junctions</i>
TLRs	<i>toll like receptors</i>
TNF	fator de necrose tumoral
t-PA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	células T reguladoras
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VIH	vírus da imunodeficiência humana
VII	sétimo par craniano (nervo facial)
VIP	peptídeo intestinal vasoativo

## ÍNDICE

<i>Lista de publicações.....</i>	<i>xxiii</i>
<i>Comunicações e pósteres em congressos nacionais e internacionais.....</i>	<i>xxv</i>
<i>Lista de abreviaturas utilizadas.....</i>	<i>xxvii</i>
<b>1. RESUMO / ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>3. RINOSSINUSITE CRÓNICA: DEFINIÇÃO CLÍNICA E DE INVESTIGAÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>4. EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. Estudo de Prevalência de Pólipos Nasais no Cadáver por Endoscopia.....</b>	<b>17</b>
<i>Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Prevalence of Nasal Polyps in Northern Portugal – a cadaver endoscopic study. Rhinology 2014; 52:386-9.</i>	
<b>5. FISIOPATOLOGIA DA RINOSSINUSITE CRÓNICA.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Papel dos Agentes Infeciosos.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2. Resposta Imunitária Inata.....</b>	<b>26</b>
<b>5.3. Função de Barreira Epitelial.....</b>	<b>27</b>
<b>5.4. Resposta Imunitária Adaptativa.....</b>	<b>28</b>
<b>5.5. Remodelação Tecidual.....</b>	<b>29</b>
<b>6. SISTEMA NERVOSO E RINOSSINUSITE CRÓNICA.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1. Inervação Sensitiva do Nariz e das Fossas Nasais.....</b>	<b>33</b>
<b>6.2. Inervação Autonómica do Nariz e das Fossas Nasais.....</b>	<b>34</b>
<b>6.3. Regulação Reflexa do Sistema Imunitário.....</b>	<b>37</b>
6.3.1. Via Colinérgica Anti-Inflamatória.....	37
6.3.2. Mecanismo Molecular de Função do Arco Eferente.....	37
6.3.3. Implicações Terapêuticas.....	39
<b>6.4. Hipótese Colinérgica Anti-Inflamatória Intranasal.....</b>	<b>40</b>
6.4.1. Introdução.....	40

6.4.2. Estudo Molecular..... 41

*Cerejeira R, Fernandes S, Moura CP. Increased expression of  $\alpha 7nAChR$  in chronic rhinosinusitis: the intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. Auris Nasus Larynx 2016; 43:176-81. doi: 10.1016/j.anl.2015.08.011. Epub 2015 Sep 26.*

**7. AVALIAÇÃO CLÍNICA DO DOENTE COM RINOSSINUSITE CRÓNICA..... 49**

**7.1. Introdução..... 51**

**7.2. Versão Portuguesa do RhinoQOL..... 52**

*Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Portuguese Version of RhinoQOL: validation and clinical application. Braz J Otorhinolaryngol 2015; 81:630-635.*

**8. DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÕES..... 59**

**9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 65**

**10. ANEXO..... 77**

**1.**

**RESUMO / ABSTRACT**



## **MODULAÇÃO COLINÉRGICA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA RINOSSINUSITE CRÓNICA**

### **RESUMO**

#### **Introdução**

A rinossinusite crónica, com e sem pólipos nasais, constitui um relevante problema de saúde pública com custos médicos elevados e impacto significativo na qualidade de vida. Está mal caracterizada do ponto de vista epidemiológico, devido à escassez de estudos credíveis, baseados na endoscopia nasal ou na tomografia computadorizada. Por outro lado, apesar de toda a investigação realizada na rinossinusite crónica, desde a etiologia ao tratamento, a verdade é que os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à doença permanecem mal compreendidos. Partindo do modelo da etiologia multifactorial, com interacção de factores tanto do hospedeiro como do ambiente, podemos admitir que mecanismos colinérgicos, até agora não estudados, em especial os resultantes da activação dos receptores  $\alpha 7nACh$ , podem ter um papel importante na modulação da resposta inflamatória na rinossinusite crónica.

Este trabalho tem como objetivos:

- 1) estabelecer a frequência de pólipos nasais em cadáveres de um hospital distrital, por endoscopia nasal, e estimar a sua prevalência na região Norte de Portugal;
- 2) investigar se o sistema colinérgico está implicado na rinossinusite crónica;
- 3) elaborar e validar a versão portuguesa do questionário de qualidade de vida para a rinossinusite “RhinoQOL”.

#### **Material e Métodos**

1) Foram avaliados por endoscopia nasal, nas manhãs dos dias de semana, todos os cadáveres depositados na morgue de um hospital distrital, desde Dezembro de 2012 a Agosto de 2013. Realizou-se um exame endoscópico sistemático de cada fossa nasal, tendo-se procedido também a uma revisão dos processos clínicos, com registo da causa da morte, comorbilidades e história pregressa ORL.

2) Biópsias nasais de 14 doentes com RSCcPN, 8 doentes com RSCsPN e 10 controlos, submetidos a cirurgia nasal, foram processadas para determinação dos níveis de ARNm e proteínas do recetor  $\alpha 7nACh$ .

3) A versão em português do RhinoQOL foi aplicada consecutivamente a 58 pacientes com rinossinusite crónica, com e sem pólipos nasais, previamente à cirurgia endoscópica nasal, tendo

sido reavaliados aos 3 meses de pós-operatório. Foi realizada a análise estatística para determinar as suas propriedades psicométricas.

### **Resultados**

1) Um grupo de 200 cadáveres caucasianos consecutivos foi analisado, 83 mulheres e 117 homens, com uma idade média de  $77,23 \pm 12,29$  anos (âmbito: 34-97). A prevalência de pólipos nasais foi de 5,5% (intervalo de confiança a 95%, 2,34-8,66). Não houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis clínicas estudadas (sexo, rinite alérgica, doenças respiratórias baixas e consumo de tabaco) e a presença de pólipos nasais.

2) Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os níveis de ARNm de  $\alpha 7nAChR$  nas biópsias nasais dos três grupos estudados; por outro lado, a expressão proteica do recetor  $\alpha 7nACh$  foi significativamente mais elevada no grupo RSCcPN relativamente ao grupo RSCsPN ( $p=0,041$ ), e estes grupos apresentaram, ambos, níveis proteicos significativamente mais elevados do que o grupo controlo (RSCcPN vs. Controlos –  $p = 0,001$ ; RSCsPN vs. Controlos –  $p = 0,041$ ).

3) A validade de conteúdo da versão portuguesa do RhinoQOL foi confirmada por uma consistência interna similar à do questionário original, para cada subescala, e por uma forte correlação entre cada item e o *score* total. A aplicação do questionário foi fácil e rápida (5,5 min). Aos 3 meses, verificou-se uma redução significativa dos *scores* de todas as subescalas, indicando melhoria clínica, com um tamanho de efeito considerado grande.

### **Conclusões**

Este estudo apresenta os primeiros dados epidemiológicos baseados na endoscopia sobre os pólipos nasais em Portugal, mostrando uma prevalência em idades avançadas que está em consonância com estudos anteriores realizados na Europa.

Os níveis proteicos elevados de  $\alpha 7nAChR$  na mucosa nasal de doentes com rinossinusite crónica sugerem que o sistema colinérgico está envolvido na resposta inflamatória da doença. Isto poderá levar à elucidação da sua fisiopatologia e ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Este trabalho fornece ainda um questionário de qualidade de vida que é equivalente à versão inglesa original, com boa sensibilidade à mudança, o que pode ser especialmente útil na medição do impacto da cirurgia.

**CHOLINERGIC MODULATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN CHRONIC RHINOSINUSITIS**

**ABSTRACT**

**Introduction**

*Chronic rhinosinusitis, with or without nasal polyps, constitutes an important health problem, with high medical costs and a significant impact in quality of life. Its epidemiology is badly characterized, because of the scarcity of reliable studies, based on nasal endoscopy or CT. Despite all the research carried out in chronic rhinosinusitis, from aetiology to treatment, the pathophysiological mechanisms underlying the disease remain poorly understood. Starting from the multifactorial aetiology model, with interaction of factors both of the host and the environment, it may be assumed that cholinergic mechanisms, so far not studied, in particular those resulting from the activation of  $\alpha 7nACh$  receptors, can play an important role in modulating the inflammatory response in chronic rhinosinusitis.*

*The objectives of this work are:*

- 1) to establish, by nasal endoscopy, the frequency of nasal polyps in cadavers from a district hospital, and to estimate its prevalence in Northern Portugal;*
- 2) to investigate whether the cholinergic system is implicated in chronic rhinosinusitis;*
- 3) to elaborate and validate the Portuguese version of the quality of life questionnaire for rhinosinusitis "RhinoQOL".*

**Material and Methods**

*1) The cadaver specimens deposited in the mortuary room of a district hospital, every early morning on weekdays, from December 2012 to August 2013, were submitted to a systematic endoscopic examination of both nasal cavities. A review of the medical record of the cadavers was done, to search for cause of death, co-morbidities and past ENT history.*

*2)  $\alpha 7nAChR$  mRNA and protein levels were measured in nasal biopsy specimens of 14 patients with CRSwNP, 8 with CRSsNP and 10 control subjects, undergoing surgery.*

*3) The Portuguese version of the RhinoQOL was administered consecutively to 58 patients with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps, assessed for endoscopic sinus surgery. A follow-up survey was completed three months after surgery. Statistical analysis was performed to determine its psychometric properties.*

## **Results**

1) A group of 200 consecutive Caucasian cadaver specimens was analysed, 83 women and 117 men, with a mean age of death of  $77.23 \pm 12.29$  years (range 34-97). The prevalence of nasal polyps was 5.5% (95% confidence interval, 2.34-8.66). No statistically significant association between the studied clinical variables (sex, allergic rhinitis, lower respiratory diseases and smoking) and the presence of nasal polyps was identified.

2) Gene expression levels of  $\alpha 7nAChR$  in nasal biopsies did not differ between groups; protein expression was significantly higher in CRSwNP than in CRSsNP ( $p = 0.041$ ), and both of these patient groups showed significant higher levels than controls (CRSwNP vs Controls –  $p = 0.001$ ; CRSsNP vs Controls –  $p = 0.041$ ).

3) Face and content validity of the Portuguese version of RhinoQOL were confirmed by similar internal consistency as the original questionnaire for each sub-scale, and strong correlation between individual items and total score. The questionnaire was easy and quick to administer (5.5 min). At three months, there was a significant decrease from baseline for all sub-scale scores, indicating clinical improvement, with an effect size considered as large.

## **Conclusions**

This study presents the first endoscopic based epidemiological data on nasal polyps in Portugal, showing a prevalence for old age group in accordance with previous studies in Europe.

Elevated  $\alpha 7nAChR$  protein levels in nasal mucosa suggest that the cholinergic system is involved in the inflammatory response of chronic rhinosinusitis. This can shed light on both, the disease pathophysiology and the development of future treatment options.

This work also provides a questionnaire that is equivalent to the original English version, with good responsiveness to change, which can be especially valuable to measure the outcome of surgery.

## **2. INTRODUÇÃO**



## **Rinossinusite Crónica – o âmbito do problema**

A rinossinusite crónica, com ou sem pólipos nasais, representa um problema de saúde significativo, afetando cerca de 10% da população europeia<sup>1</sup>. Caracteriza-se pela inflamação persistente da mucosa nasossinusal, com obstrução nasal, rinorreia anterior e/ou posterior e sintomas gerais associados. É uma doença com grande impacto na qualidade de vida<sup>1-4</sup> sendo causa de absentismo escolar e laboral, baixa produtividade e acarretando custos elevados.

Apesar de ser uma doença comum, a RSC constitui um grande desafio para o médico, tanto a nível diagnóstico como a nível terapêutico. Com efeito, existem numerosos subtipos da doença, etiologias distintas e uma grande variabilidade na apresentação clínica, havendo muitas vezes sobreposição com outras entidades nosológicas. Por outro lado, é uma doença muitas vezes recidivante, exigindo acompanhamento médico especializado a longo prazo.

Os últimos anos têm-se caracterizado pela tentativa de compilação de dados e uniformização de procedimentos, tendo surgido documentos de consenso, com dados epidemiológicos e *guidelines* focadas em critérios de diagnóstico e métodos de tratamento<sup>2,3,4</sup>. Estas recomendações resultam da evidência publicada na literatura e refletem também os pontos de vista de vários grupos de peritos nos campos da alergia, imunologia e otorrinolaringologia.

Estes documentos são unânimes na constatação da escassez de estudos epidemiológicos credíveis na RSC. Por outro lado, as *guidelines* publicadas mantêm divergências significativas na forma de abordar o doente com rinossinusite<sup>3</sup>. No que respeita ao tratamento da RSC, a inexistência de um consenso alargado ou de um algoritmo sucinto resulta, em larga medida, da falta de estudos controlados para esta indicação. O desenho e a interpretação de ensaios clínicos na RSC têm sido dificultados pela heterogeneidade intrínseca da doença, pela falta de definições uniformes, pelo conhecimento incompleto das patologias subjacentes e pela falta de objetivos clínicos e laboratoriais standardizados para medir a resposta ao tratamento<sup>5</sup>. O armamentário terapêutico disponível inclui o tratamento médico com corticóides tópicos e sistémicos, antibióticos, antifúngicos, lisados bacterianos, mucolíticos, soluções salinas, entre outros. A cirurgia (com especial preponderância para as técnicas endoscópicas) é outra opção terapêutica e deve ser sempre considerada nos doentes sem resposta ou com resposta insuficiente ao tratamento médico<sup>2</sup>.

Apesar de alguns avanços já verificados, desde a etiologia ao tratamento da RSC, a verdade é que a elucidação dos mecanismos subjacentes à doença permanece em níveis insatisfatórios, mantendo-se a perspetiva de que a RSC será uma síndrome clínica que corresponde à

manifestação final comum de múltiplas vias fisiopatológicas que atingem o nariz e as fossas nasais.

Partindo deste modelo da RSC baseado na inter-relação de múltiplos fatores, tanto a nível do hospedeiro como a nível ambiental, podemos admitir que mecanismos colinérgicos, até agora não estudados, em especial os resultantes da ativação dos recetores  $\alpha 7nACh$ , podem ter um papel importante na modulação da resposta inflamatória na RSC.

Assim, e de acordo com estes pressupostos, propusemo-nos realizar um estudo de prevalência de pólipos nasais na região Norte de Portugal. Esse estudo, feito em cadáveres, providencia os primeiros dados epidemiológicos sobre pólipos nasais em Portugal, baseados na endoscopia. Pretendeu-se também verificar se a expressão dos recetores  $\alpha 7nACh$  na mucosa nasal está alterada nos doentes com RSC e discutir as suas possíveis implicações fisiopatológicas e terapêuticas. Foi ainda elaborada e validada a versão portuguesa do questionário de qualidade de vida para a rinossinusite RhinoQOL - *Rhinosinusitis Quality of Life Survey Instrument*<sup>6,7</sup> - para ser usada nos doentes de língua portuguesa com RSC.

**3.**

**RINOSSINUSITE CRÓNICA:  
DEFINIÇÃO CLÍNICA E DE INVESTIGAÇÃO**



Neste trabalho utilizam-se as definições de RSC emanadas do painel de peritos EPOS 2012<sup>2</sup>, que se explicitam de seguida:

### **3.1. DEFINIÇÃO CLÍNICA**

A rinossinusite consiste na inflamação da mucosa nasal e dos seios perinasais; define-se clinicamente, no adulto, pela existência de 2 ou mais sintomas, um dos quais deverá ser a obstrução/congestão nasal ou a rinorreia anterior/posterior, sendo outros sintomas a dor/pressão na face e a redução ou desaparecimento do olfato. Para o diagnóstico clínico deverão existir ainda sinais endoscópicos de: pólipos nasais e/ou rinorreia mucopurulenta a drenar do meato médio e/ou edema/obstrução mucosa primariamente no meato médio; e/ou alterações na tomografia computadorizada que revelem alterações na mucosa do complexo ostiomeatal e/ou dos seios perinasais. Quando não há resolução completa dos sintomas em 12 ou mais semanas estamos perante uma rinossinusite crónica.

### **3.2. DEFINIÇÃO PARA USO EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E NO ÂMBITO DA MEDICINA GERAL**

A definição para os estudos epidemiológicos baseia-se apenas na sintomatologia, não sendo necessários os resultados de uma avaliação por Otorrinolaringologista ou dos exames radiológicos.

### **3.3. DEFINIÇÃO PARA INVESTIGAÇÃO**

Para efeitos de Investigação, mantém-se a definição clínica, sendo que a diferenciação entre rinossinusite crónica com pólipos nasais e sem pólipos nasais terá de ser baseada na endoscopia.



**4.**  
**EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA**



#### **4.1. INTRODUÇÃO**

A RSC, com ou sem pólipos nasais, constitui um relevante problema de saúde pública<sup>1</sup>, com custos médicos elevados e impacto significativo na qualidade de vida<sup>8</sup>. É identificada em várias especialidades médicas, como os Cuidados Primários, a Medicina Intensiva, a Pneumologia, a Imunoalergologia, a ORL, a Neurocirurgia, entre outras<sup>9</sup>. Um estudo multicêntrico, baseado num questionário postal, estimou a prevalência da RSC na Europa em 10.9%<sup>1</sup>.

No entanto, a escassez de dados epidemiológicos e a grande heterogeneidade metodológica dos estudos, que habitualmente se baseiam em questionários e não utilizam a endoscopia ou a Tomografia Computorizada, únicos meios de confirmação diagnóstica<sup>10,11</sup>, leva a que a determinação da prevalência desta patologia seja hoje largamente especulativa<sup>2</sup>.

Com efeito, os números da prevalência da RSC, quando diagnosticada por um médico, são muito inferiores aos obtidos pelos questionários<sup>2</sup>; um estudo realizado nos EUA em 2004 mostrou uma prevalência de 2%, utilizando os códigos ICD-9 como identificadores da doença<sup>12</sup>. A acrescentar ao problema, a maior parte dos médicos de medicina geral e familiar não têm o treino, conhecimento ou o equipamento necessários para fazer um diagnóstico de certeza da RSC, o que leva ao sobrediagnóstico<sup>13</sup>.

No que concerne apenas à RSCcPN, um estudo populacional<sup>14</sup>, baseado na endoscopia, confirmou que os dados obtidos através de questionários são pouco fiáveis, uma vez que nem todos os doentes que afirmavam ter pólipos os tinham de facto (discrepância de 2,2% para 1,4%). Por outro lado, doentes assintomáticos, com pólipos nasais, nunca seriam contabilizados através de questionários.

Os pólipos de maior dimensão podem ser facilmente identificados por RA, enquanto os mais pequenos exigem a avaliação por endoscopia nasal rígida ou flexível. Assim, de acordo com o painel de peritos EPOS 2012<sup>2</sup>, a endoscopia é um pré-requisito para uma estimativa precisa da prevalência dos PN.

A necessidade de obter dados objetivos sobre a epidemiologia dos PN em Portugal levou-nos a desenvolver um estudo que consistiu em determinar a frequência de PN numa região do Norte de Portugal, utilizando a endoscopia nasal em cadáveres.

#### **4.2. ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE PÓLIPOS NASAIS NO CADÁVER POR ENDOSCOPIA**

*Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Prevalence of Nasal Polyps in Northern Portugal – a cadaver endoscopic study. Rhinology 2014; 52:386-9.*



## Prevalence of nasal polyps in Northern Portugal: a cadaver endoscopic study\*

Rui Cerejeira<sup>1,2</sup>, Rafaela Veloso-Teles<sup>3</sup>, Nuno Lousan<sup>1</sup>, Carla Pinto Moura<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Otolaryngology, Tâmega e Sousa Hospital Center, Portugal

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal

<sup>3</sup> Department of Otolaryngology, Alto Ave Hospital Center, Portugal

**Rhinology** 52: 386-389, 2014

DOI:10.4193/Rhino14.016

**\*Received for publication:**

January 26, 2014

**Accepted:** February 28, 2014

### Abstract

**Background:** Epidemiological studies on chronic rhinosinusitis with nasal polyps are scarce and mostly based on questionnaires. Data obtained with such approaches can be unreliable, thus endoscopy is a prerequisite for an accurate estimate of the prevalence of nasal polyps. The objective of this study was to establish the frequency of nasal polyps in Northern Portugal, using nasal endoscopy in cadavers from a District Hospital.

**Methods:** The cadaver specimens deposited in the mortuary room of the hospital, every early morning on week days, from December 2012 to August 2013, were submitted to a systematic endoscopic examination of both nasal cavities, using a 25°, 2.7 mm rigid endoscope from R. Wolf®. A review of the medical record of the cadavers was done, to search for cause of death, co-morbidities and past ENT history.

**Results:** A group of 200 consecutive caucasian cadaver specimens were analyzed, 83 women and 117 men, with a mean age of death of  $77.23 \pm 12.29$  years (range 34-97). The prevalence of nasal polyps was 5.5% (95% confidence interval, 2.34-8.66). No statistically significant association between the studied clinical variables (sex, allergic rhinitis, lower respiratory diseases and smoking) and the presence of nasal polyps was identified.

**Conclusion:** This study provides the first endoscopic based epidemiological data on nasal polyps in Portugal, showing a prevalence for old age group in accordance with previous studies in Europe.

**Key words:** sinusitis, nasal cavity, respiratory tract diseases

### Introduction

Epidemiological studies on chronic rhinosinusitis (CRS) with nasal polyps (NP) are scarce and mostly based on questionnaires. The data obtained with such approach can be unreliable as not all patients that claim to have NP have polyps on nasal endoscopy<sup>(1)</sup> and asymptomatic polyps will be missing. According to the EPOS 2012 expert panel, endoscopy is, therefore, a prerequisite for an accurate estimate of the prevalence of NP<sup>(2)</sup>. Some population-based studies have estimated the prevalence

of NP using endoscopy, with values ranging from 0.5 (Korea) to 2.7% (Sweden)<sup>(1,3)</sup>.

A Danish team of investigators did some work in cadaver specimens, using anterior rhinoscopy, and found a prevalence of nasal polyps of 2%<sup>(4-6)</sup>. The frequency of nasal polyps in 100 autopsies was, however, much higher, reaching 35% of patients, a number considered by the authors as surprisingly high<sup>(7)</sup>. The objective of this study was to establish the frequency of

nasal polyps in Northern Portugal, using nasal endoscopy in cadavers.

**Materials and methods**

The present study was approved by the Ethical Committee of the “Tâmega e Sousa Hospital Center”. The target population of this Hospital comprises more than 500,000 inhabitants, situated in the “Vale do Sousa” and “Baixo Tâmega” regions, in Oporto district, Northern Portugal.

The material comprises a group of 200 cadaver specimens consecutively deposited in the mortuary room of the hospital, every early morning in week days, from December 2012 to August 2013. A systematic endoscopic examination of both nasal cavities was performed, using a 25°, 2.7 mm rigid endoscope from R. Wolf®; a suction system was used on an as-needed basis. A review of the medical record of the cadavers was done to search for cause of death, co-morbidities and past ENT history.

**Statistical analyses**

Data collected in the assessment was processed by statistical software IBM® SPSS® Statistics, version 21, 2012. Descriptive statistics of demographic and clinical data of the sample were calculated (sex, age at time of death, cause of death, morbidities, presence of nasal polyps). Fisher’s exact test was used to determine the two-tailed statistical significance of differences between proportions in 2x2 tables. A p-value of less than 0.05 was considered significant.

**Results**

The sample consisted of 200 caucasian cadaver specimens, 83 women and 117 men. Mean age of death was 77.23 years, as shown in Table 1. Cause of death is depicted in Table 2, with no cases related to naso-sinusal pathology.

Polyps were identified in 11 cadavers (prevalence = 5.5%; 95% confidence interval, 2.34-8.66), 6 men and 5 women, and were characterized as shown in Table 3. All cases were bilateral, with polyps emerging in the middle meatus. Mean age of death for this group was 75.36 ± 9.146 years (range 64-89 yr).

Just one patient with nasal polyps (9.1%) had history of allergic rhinitis, comparing with 32 cadavers (16.9%) with history of allergic rhinitis without nasal polyps. Chronic lower respiratory diseases (10 cases with asthma, 26 cases of chronic obstructive pulmonary disease, and one case of pulmonary fibrosis) affected 37 patients without polyps (19.6%), but no history of lower respiratory disease was found in the group of patients with nasal polyps. Only one patient (9.1%) with NP was a smoker, comparing with 38 (20.1%) without polyps. Moreover, none of the patients with nasal polyps had a previous record of ENT observation.

Table 1. Age of death.

	Mean	N	SD	Range
Female	81.27	83	9.116	36-97
Male	74.37	117	13.435	34-97
Total	77.23	200	12.291	34-97

N = number of specimens; SD = Standard Deviation

Table 2. Cause of death.

Cause of death	N (%)
Infectious	83 (41.5)
Cardiovascular	49 (24.5)
Neoplastic	23 (11.5)
Traumatic	5 (2.5)
Metabolic	15 (7.5)
Other	12 (6)
Unknown	13 (6.5)

N = number of specimens

Table 3. Characterization of nasal polyps identified in cadavers.

Grade	N	%
0 (no polyps)	189	94.5
1	1	0.5
2	7	3.5
3	3	1.5
Total	200	100

N = number of specimens; Grading according to Lund (8).

Table 4. Association between demographic and clinical variables and presence of Nasal Polyps: significance values (n=200).

	p value (Fisher’s Exact Test, 2-sided)
Sex	0.765
Allergic Rhinitis	0.696
Lower Respiratory Diseases	0.222
Tobacco	0.695

As depicted in Table 4, none of the demographic and clinical variables were significantly related with the presence of nasal polyps ( $p > 0.05$ ).

### Discussion

Chronic rhinosinusitis, with or without nasal polyps, constitutes an important health problem, with an estimated prevalence of 10.9% in Europe<sup>(9)</sup>. It has a significant impact in quality of life, interfering in personal, professional and social functioning. Despite all advances in the management of CRS, there is still little accurate information of its prevalence and incidence<sup>(2,10)</sup>. Epidemiological data on NP is difficult to obtain, as there are silent or non-symptomatic cases and, when symptomatic, they can be missed, as a result of bad medical judgment (misdiagnosis) or just because the patient doesn't search for health care advice. To surpass some of those issues, it was proposed to study the cadaver population present consecutively every early morning in the mortuary room (convenience sampling), during a relatively long period of time (to collect cases from almost an all year round). This approach has some limitations concerning the extrapolation of the results for the total population, as it is impossible to be sure that the studied sample is a good representative of the target population.

Given that, the results of the prevalence of the present study are higher than the two population-based studies from Sweden and Korea<sup>(1,3)</sup>. This is not surprising, as the present sample consisted mainly of old individuals, and it has been suggested that the prevalence of NP increases with age<sup>(1,11,12)</sup>. It was postulated that the longer inflammation in the respiratory tract persists, the greater is the risk of development of polyps; this thesis is supported by the fact that nasal polyposis is exceedingly rare in children (with the exception of cystic fibrosis) with a reported incidence of 0.1%<sup>(12)</sup>. The present results are, in fact, in reasonably agreement with the estimated prevalence for older ages of the Skovde (Sweden) population-based study, in which the preva-

lence of nasal polyps approached 5% at the ages of 60 years and up<sup>(1)</sup>. The lack of association between the clinical variables studied and the presence of NP adds to the need for more research in the field of pathophysiology of CRS with and without NP. Most worthy of notice is the absence of cases which have concomitant NP and Asthma. Although their inter-relationship is still poorly understood<sup>(13)</sup>, epidemiological studies<sup>(14)</sup> and clinical practice impression, especially in more severe cases, frequently associate these entities. This finding raises the question whether asthma is underdiagnosed in this population. Moreover, the SARA study<sup>(15)</sup> demonstrated that asthma in the elderly is frequently confused with chronic obstructive pulmonary disease or not diagnosed; it appears that older age and the greater degree of disability, together with a less typical clinical pattern, are the main causes of misdiagnosis. Also, the relative small number of cases with NP in the sample may contribute to these figures. Interesting is also the fact that none of the patients with NP had a record of previous ENT observation; this must be emphasized as one can presuppose that symptoms would have a low impact in quality of life. This also confirms the difficulties for an accurate estimate of the prevalence of NP based in questionnaires. This study provided the first epidemiological data on NP based in endoscopy in Portugal.

### Acknowledgement

Nothing to declare.

### Authorship contribution

RC: Study design, data collection, statistical analysis, discussion, revision; RVT: Statistical analysis, discussion, revision; NL: data collection, revision; CPM: Study design, revision

### Conflicts of Interest

The authors report no potential conflicts of interest relevant to this article.

### References

- Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melen I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skovde population based study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112: 625-629.
- Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. The European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinology* 2012; Suppl. 23: 1-299
- Min YG, Jung HW, Kim HS, Park SK, Yoo KY. Prevalence and risk factors of chronic sinusitis in Korea: results of a nationwide survey. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996; 253: 435-439.
- Larsen PL, Tos M. Origin of nasal polyps. *The Laryngoscope* 1991; 101: 305-312.
- Larsen PL, Tos M. Site of origin of nasal polyps. Transcranially removed nasoethmoidal blocks as a screening method for nasal polyps in autopsy material. *Rhinology* 1995; 33:185-188.
- Larsen P. Anatomic site of origin of nasal polyps: endoscopic nasal and paranasal sinus surgery as a screening method for nasal polyps in autopsy material. *Am J Rhinol* 1996; 10: 211-216.
- Larsen P, Tos M. Origin of Nasal Polyps: An Endoscopic Autopsy Study. *Laryngoscope* 2004; 114: 710-719.
- Lund VJ. Diagnosis and treatment of nasal polyps. *Br Med J* 1995; 311: 1411-1414.
- Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe – an underestimated disease. A GA2LEN study. *Allergy* 2011; 66: 1216-1223.
- Fokkens WJ, Lund V, Mullol J, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2012; 50: 1-12.
- Grigoreas C, Vourdas D, Petalas K, et al. Nasal polyps in patients with rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2002; 23: 169-174.
- Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc.* 1996; 17: 231-236.
- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, et al. Allergic rhinitis and its impact on Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108 (5 Suppl): S147-334.
- Chung SD, Chen PY, Lin HC, Hung SH. Comorbidity profile of Chronic rhinosinusitis: a population-based study. *Laryngoscope.* 2014; 124: 1536-1541.

*Prevalence of Nasal Polyps in Northern Portugal*

15. Bellia V, Battaglia S, Catalano F, et al. Aging and disability affect misdiagnosis of COPD in elderly asthmatics: the SARA study. *Chest* 2003; 123: 1066-1072.

Rui Cerejeira  
Department of Otolaryngology  
Tâmega e Sousa Hospital Center  
Penafiel  
Portugal

Tel: 00351- 965487059  
E-mail: r.cerejeira@netcabo.pt

**5.**  
**FISIOPATOLOGIA DA RINOSSINUSITE CRÓNICA**



A RSC é considerada uma doença complexa multifatorial, não sendo possível delinear uma única via molecular que consiga explicar o processo fisiopatológico que culmina na inflamação tecidual crónica da mucosa nasossinusal<sup>15</sup>. Pode ser considerada como o resultado de uma interação disfuncional entre o hospedeiro e o ambiente, no local da interface, que ocorre no nariz e nos seios perinasais<sup>2</sup>.

É consensual o reconhecimento de dois fenótipos clínicos, baseados na presença ou ausência de PN na avaliação endoscópica: RSCcPN e RSCsPN. No entanto, esta simples divisão em dois grandes grupos não consegue refletir os múltiplos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à RSC. Neste contexto, têm sido descritas várias variantes ou subtipos da doença, com vias fisiopatológicas distintas, muitas vezes ainda mal definidas; este conhecimento limitado parece ser o principal obstáculo à compreensão da etiologia da RSC e ao desenvolvimento de novos e melhores tratamentos<sup>16</sup>.

Neste capítulo é feita uma breve revisão da fisiopatologia da RSC, com especial enfoque nos fatores desencadeantes da resposta inflamatória e na resposta mucosa do hospedeiro.

### **5.1. PAPEL DOS AGENTES INFECIOSOS**

Os micro-organismos têm um papel bem estabelecido na etiologia da rinossinusite aguda e desde cedo se especulou que a RSC resultaria de uma RSA incompletamente tratada. Embora seja clara a relação entre os agentes infecciosos e a exacerbação de episódios agudos, o seu papel na etiologia da RSC permanece mal definido<sup>2,16</sup>. Várias hipóteses relativas à etiologia infecciosa da RSC têm-se focado no papel das bactérias, vírus e fungos. No entanto, os estudos que procuraram obter uma entidade unificadora causadora da doença obtiveram resultados decepcionantes<sup>16</sup>.

Os estudos sobre a bacteriologia das cavidades nasossinusais em pacientes com RSC mostraram resultados muito variáveis<sup>2,16</sup>, embora muitos deles tenham identificado um aumento da prevalência de algumas bactérias, como as dos géneros *Haemophilus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* e o *S. aureus*, especialmente em pacientes com exacerbações agudas de RSC<sup>17,18</sup>. O *S. aureus* é o agente bacteriano mais vezes identificado na RSC nos países ocidentais<sup>19</sup>; no ser humano, os superantígenos podem induzir a ativação de células T CD4 e CD8<sup>20</sup>, com libertação de citocinas que amplificam a resposta TH2 nos tecidos e impedem a função dos Linfócitos T reguladores<sup>21</sup>. No entanto, apesar do aparente papel dos superantígenos estafilocócicos na amplificação e modulação da inflamação na polipose nasal, não existe evidência que suporte um papel direto na etiologia da doença<sup>22</sup>.

Em consonância com o papel dúbio da infeção bacteriana na RSC está a possível ineficácia do tratamento antibiótico na RSC. Melhorias ligeiras a moderadas poderão ocorrer em pacientes com RSC tratados com antibióticos, em especial nos doentes com RSC neutrofílica sob tratamento com macrólidos, devido às suas propriedades imunomoduladoras complementares<sup>2,23</sup>.

Os biofilmes bacterianos também têm sido implicados na etiopatogenia da RSC. Estes são estruturas altamente organizadas compostas por comunidades de bactérias envoltas numa matriz extracelular protetora. Os biofilmes ocorrem frequentemente em pacientes com RSC mas também podem ser identificados em indivíduos saudáveis<sup>16</sup>. A presença de biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi considerada fator de mau prognóstico pós-operatório<sup>24,25</sup>. A contribuição patofisiológica dos biofilmes na RSC continua pouco clara, sendo necessário determinar se os biofilmes podem ou não definir endotipos específicos da doença.

Também a hipótese de uma etiologia viral tem sido colocada como possível fator etiopatogénico na RSC, embora não existam estudos que a suportem de forma convincente<sup>2,16</sup>.

O papel dos fungos na RSC tem também gerado enorme controvérsia. A utilização de técnicas sensíveis de deteção demonstrou que os fungos estão presentes de forma ubíqua na cavidade nasal, tendo sido identificados em quase 100% dos doentes com RSC e dos controlos<sup>26,27</sup>. Apesar do entusiasmo inicial para a hipótese fúngica, o estado atual da evidência científica, associado ao falhanço de ensaios clínicos com anfotericina, indica como pouco provável um papel central dos fungos na RSC<sup>2</sup>.

## **5.2. RESPOSTA IMUNITÁRIA INATA**

A colonização e infeção da mucosa nasossinusal por bactérias e fungos é muito variável, ocorrendo em doentes com RSC mas também em controlos saudáveis. Este facto sugere que fatores do hospedeiro poderão estar envolvidos, como por exemplo a redução da resposta imune. Alguns estudos apontaram para uma redução da presença de enzimas antimicrobianas na RSC, como a lisozima e a lactoferrina<sup>28,29</sup>. Estudos baseados na análise do ARNm e de proteínas demonstraram uma redução da libertação de moléculas de defesa, como a psoriasina/S100A7, e diminuição da expressão de membros da família PLUNC de peptídeos de ligação ao LPS<sup>30-32</sup>. A maior parte destas moléculas é produzida por células epiteliais; algumas delas, como a psoriasina e as defensinas, são produzidas por células epiteliais mucosas, em especial na região anterior da cavidade nasal (por ex. nas conchas inferiores), enquanto outras, como muitas da família PLUNC, a lisozima e a lactoferrina, têm origem no epitélio glandular e são secretadas nos seios perinasais ou no lúmen da via aérea juntamente com as secreções

serosas e mucosas<sup>16</sup>. A ação deste tipo de moléculas de defesa inata, constitutivas e induzíveis, é responsável por manter um “estado antimicrobiano” nas vias aéreas e a alteração da sua função protetora constitui a base da “hipótese da barreira imune” na RSC<sup>33</sup>. Os processos moleculares responsáveis pela redução da produção de moléculas de defesa pelo epitélio do hospedeiro são desconhecidos, mas um potencial mecanismo inclui defeitos locais na via do fator de transcrição STAT3<sup>34</sup>. O STAT3 tem sido fortemente ligado à imunidade porque doentes com defeitos na via deste fator de transcrição manifestam a Síndrome de hiper-IgE (doença de Job), que se caracteriza por infeções frequentes, bacterianas (especialmente por *S. aureus*) e fúngicas<sup>35</sup>.

### **5.3. FUNÇÃO DE BARREIRA EPITELIAL**

A função de barreira do epitélio respiratório é um componente essencial da defesa do hospedeiro. As células epiteliais encontram-se ligadas através de complexos de adesão que incluem as TJs apicais. As TJs são responsáveis pela regulação da permeabilidade epitelial através do controlo do fluxo paracelular, que é o movimento das substâncias que passam entre as células que constituem o epitélio. Para além disso, as TJs também previnem a entrada de partículas estranhas, como os alérgenos, nas camadas subepiteliais imunoativas. Por outro lado, a abertura das TJs pode limitar um processo imune através da saída de células inflamatórias para o lúmen, afastando-as do tecido inflamado. Assim, as TJs podem ter uma ação importante quer na iniciação e amplificação da resposta inflamatória, quer na sua limitação e resolução. Um estudo sobre a expressão proteica das TJs da mucosa sinusal em doentes com RSC mostrou uma redução relativamente aos controlos; foi também verificada, em culturas ALI de doentes com RSCcPN, RSCsPN e controlos, uma diminuição da resistência trans-epitelial na RSCcPN<sup>36</sup>. Esta resistência é reduzida *in vitro* em culturas celulares pelo IFN- $\gamma$  e IL-4, enquanto a IL-17 não produziu efeitos<sup>37</sup>.

A interação das células epiteliais com linfócitos T ativados na RSC pode ter uma natureza dual<sup>38</sup>. Numa fase inicial, as células T ativadas estimulam as funções pro-inflamatórias das células epiteliais, levando à libertação de citocinas e quimiocinas. Após esta fase, ocorre a apoptose destas células, através da ação do IFN- $\gamma$  e da interação do Fas com o seu ligando e do TRAIL com o recetor TRAIL-II, terminando assim a sua contribuição para a resposta inflamatória. A apoptose e a saída de células do epitélio comprometem a função de barreira epitelial e aumentam a suscetibilidade à colonização bacteriana e à formação de biofilmes. Contribuindo para o mesmo efeito, verificou-se que a expressão de vários genes envolvidos na manutenção da barreira epitelial se encontra reduzida na RSC<sup>39</sup>.

#### **5.4. RESPOSTA IMUNITÁRIA ADAPTATIVA**

Em consequência da inflamação crónica num microambiente colonizado por bactérias e fungos, com ou sem biofilmes, os tecidos afetados dos doentes com RSC apresentam um aumento de células envolvidas na resposta imunitária adaptativa, como os linfócitos T e B e os plasmócitos<sup>16</sup>. Os plasmócitos que produzem IgE e IgA são particularmente proeminentes nos PN e estas Igs podem estar envolvidas na ativação de mastócitos e eosinófilos, amplificando assim a inflamação nos tecidos<sup>40</sup>. Os níveis de IgE nos PN estão geralmente muito elevados, independentemente da existência de atopia ou do grau de eosinofilia<sup>16</sup>. As IgEs locais, apesar do seu carácter policlonal, dirigidas a uma grande variedade de alvos (por ex.: alérgenos, enterotoxinas e exotoxinas bacterianas), possuem a capacidade de desgranular os mastócitos<sup>41</sup>. O papel da IgA na fisiopatologia da RSC é ainda desconhecido, mas a presença de IgA em vários tipos de inflamação crónica mucosa, como por exemplo a periodontite, sugere que a IgA pode ter uma ação importante<sup>42</sup>.

Após a apresentação do antígeno, as células naivas CD4+ diferenciam-se em uma de várias linhagens possíveis, determinando a natureza da resposta imunitária adaptativa. Os subtipos incluem as células Th1, Th2, Th17 e Treg; cada um deles tem propriedades moleculares, celulares e funcionais próprias<sup>43</sup>. Estudos *in vitro* indicam que a resposta Th1 se caracteriza pela preponderância da citocina IFN- $\gamma$  e por um infiltrado celular rico em macrófagos; a resposta Th1 é particularmente eficaz contra vírus e bactérias intracelulares, incluindo as micobactérias. Já a resposta Th2 envolve as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e a ativação eosinofílica; as respostas Th2 são particularmente eficazes contra parasitas, especialmente quando estes são demasiado grandes para poderem ser fagocitados. A resposta Th17, a que se associa a IL-17A, caracteriza-se por um infiltrado neutrofílico; é ativada contra bactérias extracelulares como é o caso do *S. aureus*<sup>44</sup>. Os linfócitos Treg têm como função regular a ação das células na resposta imune, com isso limitando respostas excessivas.

Os pólipos nasais eosinofílicos são o fenótipo mais comum na Europa e nos Estados Unidos. Na Ásia cerca de metade dos doentes com RSCcPN tem PN não eosinofílicos, embora estudos recentes indiquem que a prevalência de PN eosinofílicos está a aumentar<sup>45</sup>.

Em contraste com a inflamação eosinofílica, os padrões inflamatórios nos PN não eosinofílicos são ainda mal compreendidos. Os PN não eosinofílicos podem ser divididos em vários fenótipos, sendo que destes, a neutrofilia é o fenótipo mais bem caracterizado. Os pólipos neutrofílicos são mais comuns na Ásia, sendo que a infiltração neutrofílica também se verifica na Europa e nos Estados Unidos, mas geralmente ocorre em simultâneo com a infiltração eosinofílica<sup>45</sup>.

Uma das causas possíveis apontadas para a existência de vários padrões de inflamação nos PN nas várias regiões do Globo prende-se com a diferente colonização bacteriana da mucosa nasal<sup>16</sup>.

### **5.5. REMODELAÇÃO TECIDUAL**

A remodelação na RSC inclui alterações da estrutura tecidual e a deposição de matriz extracelular. Vários fatores têm sido implicados no fenómeno da remodelação, incluindo as MMPs e o TGF- $\beta$ . As metaloproteinases são uma família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes que degradam vários componentes da MEC e medeiam a remodelação tanto nos processos fisiológicos como nos patológicos<sup>46</sup>. A investigação dos vários subtipos de MMPs na RSC revelou que a MMP-7 e a MMP-9 estão elevadas na RSCsPN e na RSCcPN<sup>2,16,45</sup>. O TGF- $\beta$  tem efeitos de mediação anti-inflamatória atuando em vários tipos celulares do sistema imunitário; tem efeitos na fibrose ao aumentar a deposição de colagénio, fibronectina e proteoglicano na MEC. Vários estudos procuraram detetar diferenças na concentração das várias isoformas do TGF- $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3) na RSC com e sem PN<sup>45</sup>. Apesar de alguma discrepância nos resultados apresentados, estes estudos sugerem que o TGF- $\beta$  se encontra reduzido na RSCcPN e elevado na RSCsPN<sup>2</sup>.

O padrão de remodelação da RSCcPN é diferente do verificado na RSCsPN. Com efeito, os níveis de colagénio apresentam-se aumentados na RSCsPN e diminuídos na RSCcPN. Em contraste com a RSCsPN, a deposição de fibrina é especialmente elevada nos PN, o que pode representar um fator chave no processo de remodelação na RSCcPN<sup>45</sup>. Um estudo recente mostrou que, nos PN, a fibrina entrecruzada se encontra elevada, enquanto o t-PA está reduzido<sup>47</sup>. O t-PA tem como função converter o plasminogénio em plasmina, o que promove a degradação da fibrina. Importante é também o facto de que as citocinas envolvidas na resposta Th2, como a IL4 e a IL-13 que estão elevadas na RSCcPN, reduzem a expressão de t-PA nas células epiteliais<sup>47</sup>.

Outra citocina que varia de acordo com o fenótipo de RSC é a IL-32, uma citocina moduladora envolvida em várias doenças inflamatórias crónicas. Tem ação inibidora direta na angiogénese e inibe também a secreção de fatores pro-angiogénicos como o VEGF e o PDGF *in vitro*<sup>48</sup>. Os níveis de ARNm da IL-32 aumentam pela ação do TNF- $\alpha$  e do IFN- $\gamma$  em células epiteliais primárias sinusais, enquanto a IL-1 $\beta$ , a IL-4, a IL-13 e a IL-17 não influenciam a expressão da IL-32<sup>48,49</sup>. Os níveis de IL-13 estão significativamente aumentados na RSCcPN, em comparação com os doentes com RSCsPN e com controlos saudáveis<sup>49,50</sup>. No entanto, a importância e o impacto destes resultados são ainda indefinidos.

Outros fatores inflamatórios e de remodelação potenciais que diferem entre os vários fenótipos de RSC incluem os eosinófilos, mastócitos e o sistema complemento<sup>16</sup>.

Em conclusão, existe um conjunto amplo de processos reguladores e imunomoduladores que diferem entre as variantes de RSC, e que, potencialmente, podem permitir a definição de endotipos patogénicos da doença.

**6.**  
**SISTEMA NERVOSO E RINOSSINUSITE CRÓNICA**



A influência de mecanismos neurais na mucosa e função nasais é conhecida e alvo de estudo desde há várias décadas<sup>51-54</sup>. Os trabalhos realizados têm-se focado na ação dos nervos sensoriais e dos reflexos simpáticos e parassimpáticos, que se associam aos sintomas de congestão e obstrução nasal, rinorreia e prurido nasal. Estes reflexos fisiológicos permitem a otimização da permeabilidade nasal pela alteração do fluxo sanguíneo local, e servem também para proteger a superfície mucosa, por exemplo, através da secreção de muco (via recetores muscarínicos M3) e dos estertutos, que podem ser despoletados por uma grande variedade de estímulos, incluindo alergénios, ar frio, e irritantes químicos. A ativação dos nervos aferentes da mucosa nasal pode também originar efeitos significativos na respiração, frequência cardíaca, e calibre da via aérea (reflexo de imersão)<sup>54</sup>.

A função parassimpática na mucosa nasal tem sido associada à secreção mucosa e/ou vasodilatação. Estes efeitos são mediados pelos recetores muscarínicos da acetilcolina. A função simpática, pelo contrário, não tem ação relevante na função secretora da mucosa, mas permite a vasoconstrição na mucosa do nariz e seios peri-nasais.

Faz agora duas décadas que ficou demonstrado que doentes com rinite alérgica sintomática apresentam hiper-responsividade neuronal associada à inflamação de causa alérgica<sup>55</sup>. Nestes doentes, o teste de provocação da mucosa nasal com bradicinina induz uma resposta secretora exagerada na mucosa da fossa nasal contralateral; esta reação de hipersecreção pode ser reduzida ou até abolida através de um pré-tratamento com atropina, o que confirma a natureza reflexiva das respostas<sup>55</sup>. Outro estudo, que analisou a inervação vascular da mucosa nasal, por imunohistoquímica, em crianças com e sem sintomas de rinite crónica, detetou que as artérias e anastomoses arteriovenosas da mucosa inflamada apresentavam uma inervação mais intensa do que os vasos da mucosa sem inflamação<sup>56</sup>.

Apesar destas observações, os mecanismos subjacentes a esta hiper-responsividade neuronal associada à inflamação de causa alérgica permanecem desconhecidos, sendo ainda pouco claro se existe ou não algum efeito da inflamação nos nervos autonómicos que inervam o nariz<sup>54</sup>.

### **6.1. INERVAÇÃO SENSITIVA DO NARIZ E DAS FOSSAS NASAIS**

Os nervos sensitivos do nariz têm origem na divisão oftálmica (através do nervo etmoidal) e na divisão maxilar do nervo trigémio. Eles consistem tanto em fibras mielinizadas como em fibras não mielinizadas. As primeiras são de maior diâmetro e permitem uma condução mais rápida do impulso nervoso, sendo que a sua função permanece ainda mal conhecida. Algumas destas fibras (as mais finas dentro das mielinizadas) pertencem à categoria Ad, que se pensa

poderem ter função nociceptiva<sup>57</sup>. Por outro lado, as fibras mielinizadas de maior diâmetro parecem ter função não nociceptiva<sup>58</sup>. No modelo animal (felino), as fibras tipo Ad do nariz foram caracterizadas como sendo sensíveis à estimulação táctil ligeira (neurónios mecanorreceptores de baixo limiar) ou como respondendo a estímulos químicos ou mecânicos (*wide dynamic range neurones*)<sup>59</sup>. As fibras não mielinizadas têm uma velocidade de condução lenta, e pertencem, na sua maioria, ao nociceptor com fibras do grupo C. O corpo celular destes neurónios localiza-se no gânglio trigeminal. Alguns trabalhos realizados em modelos animais tentaram identificar a localização destes neurónios no gânglio trigeminal e as suas projeções nervosas para os núcleos do tronco cerebral; foram identificadas, no rato, projeções para o *subnucleus caudalis* e *subnucleus interpolaris*, do núcleo espinhal do trigémio, que se sabe serem regiões envolvidas no processamento da informação nociceptiva<sup>60</sup>. Estudos semelhantes foram também realizados no gato<sup>61</sup>, não havendo ainda estudos relativos ao ser humano.

Uma característica importante das fibras C reside na possibilidade de serem estimuladas em sentido antidrómico, por potenciais de ação que têm origem nas várias terminações de um mesmo neurónio. Esta estimulação antidrómica é também designada por reflexo axonal<sup>62,63</sup>. Este reflexo resulta na libertação de neuropeptídeos inflamatórios pelas terminações nervosas sensitivas, tais como as taquicininas (substância P e neurocinina A) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina<sup>57</sup>. O peptídeo libertador da gastrina também já foi identificado na mucosa nasal humana<sup>64</sup>. Estes neuropeptídeos provocam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, fenómeno que foi primariamente descrito em roedores e que foi designado por inflamação neurogénica<sup>65-72</sup>. Outros efeitos destes neuropeptídeos são a ativação glandular<sup>73</sup>, o recrutamento de leucócitos<sup>74,75</sup> e a diferenciação e ativação de vários tipos celulares do sistema imunitário, como por exemplo, os linfócitos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos<sup>76,77</sup>. No entanto, a existência da inflamação neurogénica no ser humano é ainda controversa<sup>57</sup>.

## **6.2. INERVAÇÃO AUTÓNOMICA DO NARIZ E DAS FOSSAS NASAIS**

O sistema nervoso simpático distingue-se do parassimpático por características anatómicas únicas que se relacionam com a distribuição dos corpos celulares dos neurónios e pelo padrão de inervação dos órgãos alvo. Tal como acontece no sistema nervoso simpático, os impulsos nervosos parassimpáticos eferentes são enviados do sistema nervoso central para os órgãos alvo por um sistema de dois neurónios. O primeiro neurónio designa-se por neurónio pré-ganglionar ou pré-sináptico. O seu corpo celular localiza-se no SNC e o seu axónio estende-se até ao gânglio parassimpático periférico onde ocorre a sinapse com as dendrites do 2º neurónio. Este 2º

neurónio designa-se por neurónio pós-ganglionar ou pós-sináptico. Os axónios dos neurónios pré-sinápticos parassimpáticos são geralmente longos, enquanto o 2º neurónio tem fibras muito curtas. O inverso ocorre no sistema simpático: logo que o nervo espinhal (1º neurónio) deixa o canal espinhal, as fibras pré-ganglionares abandonam o nervo e passam para um dos gânglios da cadeia simpática, onde farão sinapse com um neurónio pós-ganglionar que percorre o percurso até terminar no órgão alvo.

Classicamente, a inervação autonómica da cavidade nasal tem sido descrita como estando a acompanhar a inervação sensitiva (através das ramificações do nervo trigémio)<sup>78</sup>. Ela inclui as fibras vasomotoras simpáticas pós-ganglionares para os vasos sanguíneos nasais (via recetores adrenérgicos), e as fibras parassimpáticas pós-ganglionares, provenientes do gânglio pterigopalatino, que providenciam a inervação secretomotora para as glândulas nasais (via recetores muscarínicos). O GPP é o maior dos gânglios parassimpáticos periféricos e localiza-se profundamente na fossa pterigopalatina, nas proximidades do *foramen* esfenopalatino e anteriormente ao canal pterigoideu e ao *foramen* redondo. É atravessado por fibras que não fazem sinapse: as sensitivas, que se juntam ao nervo maxilar através dos seus ramos ganglionares, e a raiz simpática do nervo do canal pterigoideu, que tem origem no nervo petroso profundo. Já a raiz motora ou parassimpática do nervo Vidiano (que provém do nervo grande petroso, ramo do par craniano VII) faz sinapse no gânglio.

No entanto, estudos recentes de microdissecção anatómica da fossa pterigopalatina redefiniram a via secretomotora. Com efeito, o paradigma existente, que considerava a individualidade dos nervos autonómicos pós-ganglionares, foi alterado a favor de uma multiplicidade de ramos eferentes que se projetam do GPP para inervar a órbita e a mucosa nasal, através de numerosos grupos de pequenos fascículos nervosos<sup>79-81</sup>.

#### *Inervação Parassimpática*

Os nervos parassimpáticos pré-ganglionares libertam acetilcolina e, possivelmente, outros neurotransmissores que atuam nos recetores nicotínicos dos neurónios pós-ganglionares. Estas fibras pós-ganglionares libertam, por sua vez, acetilcolina, que atua nos recetores muscarínicos e também nos recetores nicotínicos da acetilcolina.

Para além da acetilcolina, algumas fibras pós-ganglionares contêm neuropeptídeos, como o peptídeo intestinal vasoativo, e também o peptídeo histidina metionina e o peptídeo histidina valina (que são dois produtos que resultam de um *splicing* alternativo do ARNm do VIP). Contribuem na via aérea nasal para a secreção glandular, vasodilatação e engorgitamento sinusoidal<sup>82,83</sup>.

### *Recetores de Acetilcolina*

Os recetores de acetilcolina podem ser agrupados em dois grandes subtipos: os recetores muscarínicos metabotrópicos e os recetores nicotínicos ionotrópicos. Ambos partilham a característica de serem ativados pelo neurotransmissor endógeno acetilcolina e são expressos tanto em células nervosas como em células não nervosas ao longo do corpo<sup>84-87</sup>.

Os recetores metabotrópicos são formados por complexos proteicos transmembranares acoplados a proteínas G, sendo designados por *seven - transmembrane proteins*, porque atravessam a membrana celular sete vezes. Definem-se classicamente como sendo ativados pela muscarina, uma toxina do cogumelo *Amanita muscaria*, e inibidos pela atropina, uma toxina derivada da planta *Atropa belladonna*. Existem 5 tipos de recetores muscarínicos: M1, M2, M3, M4 e M5<sup>88,89</sup>.

Estudos na mucosa nasal humana<sup>90,91</sup> permitiram identificar recetores de tipo M1 e M2 nas glândulas, artérias, veias e no epitélio da mucosa; recetores de tipo M3 (que são os mais extensamente distribuídos) nas glândulas, artérias e veias; recetores de tipo M4 nas artérias; e recetores de tipo M5, nas glândulas e vasos arteriais. A ativação dos mAChRs é relativamente lenta (milissegundos a segundos) e, dependendo do subtipo presente, alteram diretamente a homeostase celular da fosfolipase C, inositol trifosfato, AMPc e cálcio livre<sup>92</sup>.

O outro subtipo dos recetores da acetilcolina é o recetor nicotínico de canal catiónico ionotrópico rápido (nAChR). Estes recetores são sensíveis à ativação pela nicotina e possuem canais iónicos cuja actividade é induzida numa ordem de grandeza de micro a sub-microsegundos. Têm a capacidade de, pela ligação de um agonista endógeno (como, por exemplo, a acetilcolina), provocar o fluxo de iões através dos seus canais e induzir uma resposta celular, não usando segundos mensageiros (ao contrário dos recetores metabotrópicos).

Existe uma grande diversidade de subunidades do nAChR, que se associam em pentâmeros, formando o recetor final. Os nAChRs musculares consistem em cinco subunidades denominadas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ , e  $\epsilon$ . Os recetores neuronais podem ser homopentaméricos ou heteropentaméricos. Até ao momento, foi possível clonar de tecido neuronal de mamíferos oito subunidades  $\alpha$ , designadas por  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  e  $\alpha 10$ , e três subunidades não- $\alpha$  ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ )<sup>54</sup>. Muitas destas subunidades são também expressas em vários tipos celulares não neuronais, sendo que algumas delas (como a  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ , e  $\alpha 10$ ) possuem funções especializadas, como a regulação de mecanismos de sinalização celular no epitélio sensorial e noutras células não neuronais.

Coletivamente, estas subunidades interagem de forma distinta, produzindo um espectro de nAChRs com propriedades funcionais únicas, permitindo a customização da sua função na regulação de processos fisiológicos, que vão desde a manutenção do tónus metabólico, ao

controlo de processos inflamatórios, e à transmissão de sinais inibitórios e excitatórios no sistema nervoso central e periférico.

### **6.3. REGULAÇÃO REFLEXA DO SISTEMA IMUNITÁRIO**

#### **6.3.1. Via Colinérgica Anti-Inflamatória**

A via colinérgica anti-inflamatória é um circuito neuronal parassimpático bem estabelecido que reduz ou elimina as respostas pró-inflamatórias excessivas, prevenindo, assim, o dano celular mediado imunologicamente<sup>93,94</sup>. O incremento da atividade deste circuito neuronal confere proteção através da inibição da libertação de citocinas durante episódios de infeção, autoimunidade, choque ou outras síndromes inflamatórias<sup>94</sup>.

O arco reflexo inflamatório consiste num arco aferente sensitivo, que deteta os produtos moleculares da lesão celular, da infeção e da inflamação, e num arco eferente motor, que transmite sinais para modular a resposta imune.

Os produtos moleculares libertados em locais de infeção ou lesão celular estimulam os recetores das células do sistema imune inato, incluindo TLRs e NLRs. As interações ligando-recetor induzem as respostas imunes inatas, levando à secreção de citocinas pró-inflamatórias. Estas moléculas ativam também os neurónios sensitivos aferentes, que consistem no arco sensitivo do reflexo inflamatório. Estes neurónios despolarizados transportam o potencial de ação até ao tronco cerebral, onde é ativado o arco eferente, também conhecido por via colinérgica anti-inflamatória<sup>94</sup>. A via eferente origina a libertação de acetilcolina e ativação dos recetores nicotínicos da acetilcolina  $\alpha 7$ <sup>94,95</sup>. A ativação direta do  $\alpha 7$ nAChR inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e HMGB-1), mas não inibe a produção de citocinas anti-inflamatórias (como por exemplo a IL-10 e o TGF- $\beta$ )<sup>94,96</sup>.

Os estudos experimentais já realizados, utilizando o modelo animal, têm-se focado no papel do nervo vago na modulação da inflamação periférica<sup>94,97,98</sup>. A estimulação elétrica do nervo vago proximal durante situações de endotoxémia e lesão celular com determinação dos níveis séricos de TNF, em animais com e sem ressecção de localizações distais do nervo vago, permitiu o mapeamento anatómico funcional da via colinérgica anti-inflamatória<sup>94,99,100</sup>.

#### **6.3.2. Mecanismo Molecular de Função do Arco Eferente**

O  $\alpha 7$ nAChR é amplamente expresso pelas células do sistema nervoso e também do sistema imunitário, tendo sido identificado em monócitos, macrófagos, células B, células T, células

dendríticas e células epiteliais<sup>94,101</sup>. É codificado pelo gene *CHRNA7* no cromossoma 15q14 e é o produto de dez exões que originam uma proteína madura com cerca de 50 kDa. Existe uma outra forma deste recetor nas células humanas, que resulta de *splicing* alternativo e consiste num híbrido com duplicação dos exões 5-10, combinados com outros quatro exões, sendo designada por DuPα7.

Os recetores nicotínicos apresentam uma estrutura pentamérica; enquanto nos neurónios o recetor α7 é essencialmente homomérico<sup>102</sup>, têm sido reportadas formas heteroméricas funcionantes em alguns sistemas, constituídas por subunidades α7 ligadas a subunidades α5, β2 ou β3<sup>103-105</sup>.

Embora os mecanismos moleculares da ativação e função do α7nAChR tenham sido já amplamente estudados nos neurónios, o conhecimento acerca das suas ações nas células do sistema imunitário é ainda limitado. Ao contrário do que acontece nos neurónios, a ativação deste recetor nas células do sistema imunitário não implica a despolarização da membrana celular ou a atividade como canal iónico<sup>94</sup>.

A ligação entre o recetor α7nACh e agonistas não seletivos (por ex.: nicotina) ou altamente seletivos (como a colina ou o fármaco experimental GTS-21) resulta na ativação de cascatas intracelulares de transdução de sinais, que reduzem a translocação nuclear do NF-κB e a expressão do TLR-4 e suprimem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias<sup>93,95,100,106,107-110</sup>. Em monócitos e macrófagos, a ativação do recetor leva à inibição da fosforilação do IκB, que é um passo essencial na regulação da ativação do NF-κB<sup>111</sup>. Ocorre também o recrutamento da JAK2 que forma complexos heterodiméricos que iniciam uma cascata de eventos mediados pela STAT3, que resultam na regulação negativa da ligação do NF-κB ao ADN e também no aumento da atividade do SOCS3<sup>112</sup>. Outro mecanismo descrito resulta da interação física entre o recetor α7 e a adenilato ciclase 6; essa interação aumenta os níveis de AMPc, provocando a fosforilação do CREB, o que por sua vez aumenta a expressão do *c-fos*, um membro da *early gene family* dos fatores de transcrição; a ativação do *c-fos* inibe a atividade do NF-κB, parando assim a transcrição das citocinas<sup>98</sup>.

Outro aspeto interessante foi a observação de que a ativação do α7nAChR origina uma redução seletiva da produção de citocinas, uma vez que as citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF-β não são suprimidas<sup>93,108,109</sup>.

Estudos em células T revelaram que a ativação do recetor α7 induz a libertação intracelular de Ca<sup>2+</sup> por um processo que requer a ativação de proteínas tirosina cinases<sup>113</sup>. Para além disso, ocorre também a formação de complexos proteicos heterodiméricos com a cadeia zeta do

complexo TCR<sup>113</sup>. Estes mecanismos têm sido implicados na diminuição da expressão de moléculas de adesão e na redução da produção de citocinas e da proliferação de linfócitos<sup>114</sup>.

Assim, em contraste com o que ocorre nos neurónios, não existe atualmente evidência de que o recetor  $\alpha 7$ nACh possa regular a resposta imune nas células do sistema imunitário através de canais iónicos na membrana plasmática<sup>94</sup>.

### **6.3.3. Implicações Terapêuticas**

A evolução significativa na área da biologia molecular, nomeadamente na capacidade de produção de anticorpos específicos e na identificação das citocinas específicas que medeiam a lesão celular, veio permitir importantes avanços no tratamento das doenças inflamatórias e autoimunes. Por exemplo, o tratamento da artrite reumatóide e da doença inflamatória intestinal inclui já o uso de agentes seletivos que modulam a atividade das citocinas TNF, IL1 e IL6. No entanto, estes agentes são ainda ineficazes numa elevada percentagem de casos e, em alguns casos, podem ter ação imunossupressora significativa, resultando em efeitos secundários potencialmente graves.

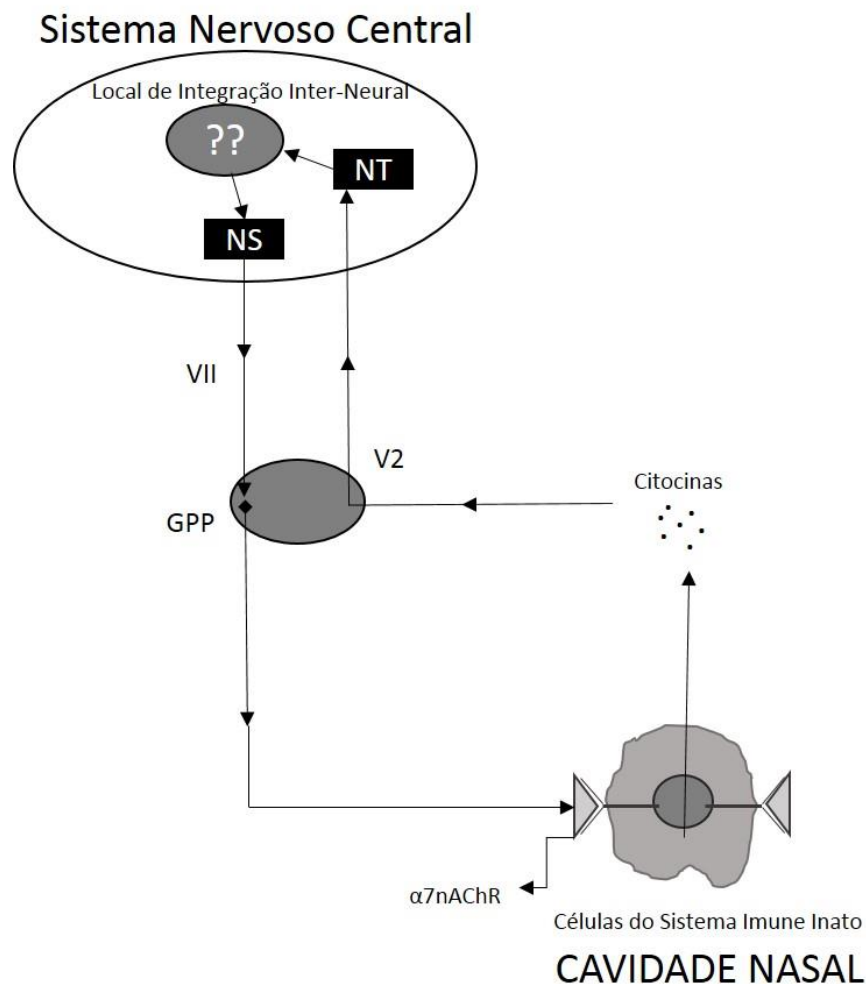
Isto demonstra, por um lado, a necessidade de serem desenvolvidas novas terapêuticas dirigidas, mais eficazes e com menos efeitos adversos. Por outro lado, levanta a questão sobre se a ativação, farmacológica ou elétrica, da via colinérgica anti-inflamatória poderá resultar em imunossupressão importante. Os dados obtidos nos estudos animais<sup>94,97</sup> parecem demonstrar que a terapêutica dirigida à ativação da via colinérgica anti-inflamatória resulta na atenuação da resposta imunitária inata, sem a abolir por completo, não causando imunossupressão. Com efeito, a estimulação elétrica do nervo vago, ou a administração de agonistas do  $\alpha 7$ nAChR, reduz a produção de citocinas pro-inflamatórias numa magnitude de 50 a 75%, mas não elimina a sua actividade<sup>93,99,108,109,115</sup>. Assim, a exploração terapêutica do reflexo inflamatório constitui uma nova alternativa, já em estudo, num leque alargado de modelos experimentais de doenças inflamatórias, incluindo a endotoxémia, sépsis, lesões de isquémia-reperusão, choque hemorrágico, artrite, colite e pancreatite<sup>97</sup>.

#### 6.4. HIPÓTESE COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA INTRANASAL

##### 6.4.1. Introdução

Apesar dos estudos já realizados se terem focado no papel do nervo vago na modulação da inflamação periférica<sup>94,97,98</sup>, é provável que o sistema parassimpático tenha também relevância na regulação da inflamação no nariz e nas fossas nasais.

O reflexo anti-inflamatório poderá atuar na cavidade nasal através de uma via análoga à descrita no abdómen, participando três componentes: as fibras aferentes trigeminais que constituem a parte sensitiva do reflexo; um sistema interneural de transmissão nervosa localizado centralmente; e as fibras eferentes parassimpáticas que têm origem no núcleo salivar superior do nervo intermédio (VII) e que atingem o GPP através do nervo Vidiano (Figura 1).



**Figura 1** – Hipótese de anatomia funcional do reflexo inflamatório no nariz

NT – *nucleus trigeminalis*; NS – *nucleus salivatorius superior*; V2 – divisão maxilar do nervo trigémico;

VII – nervo facial; GPP – gânglio pterigopalatino; α7nAChR – recetor nicotínico de acetilcolina α7.

Dada a inexistência de estudos científicos que tenham abordado esta hipótese, propusemos estudar se marcadores da função colinérgica na mucosa nasal estão alterados na RSC com e sem pólipos nasais.

#### **6.4.2. Estudo Molecular**

*Cerejeira R, Fernandes S, Moura CP. Increased expression of  $\alpha 7nAChR$  in chronic rhinosinusitis: the intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. Auris Nasus Larynx 2016; 43:176-81. doi: 10.1016/j.anl.2015.08.011. Epub 2015 Sep 26.*





Contents lists available at ScienceDirect

Auris Nasus Larynx

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anl](http://www.elsevier.com/locate/anl)

## Increased expression of $\alpha 7$ nAChR in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis

Rui Cerejeira<sup>a,b,\*</sup>, Susana Fernandes<sup>b,c</sup>, Carla Pinto Moura<sup>b,c,d</sup><sup>a</sup> Department of Otolaryngology, Tâmega e Sousa Hospital Center, Penafiel, Portugal<sup>b</sup> Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal<sup>c</sup> Institute for Research and Innovation in Health, University of Porto, Portugal<sup>d</sup> Department of Otolaryngology, São João Hospital Center, Porto, Portugal

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 March 2015

Accepted 26 August 2015

Available online xxx

## Keywords:

Inflammation

Nasal cavity

Parasympathetic system

Rhinitis

Sinusitis

## ABSTRACT

**Objective:** Chronic rhinosinusitis results from a dysfunctional host–environment interaction at the site of interface, in the nose and paranasal sinuses. A parasympathetic-mediated anti-inflammatory reflex is known to have a pivotal role in the control of damage induced by immune response to injury and infection; acetylcholine released by peripheral nerves interacts with nicotinic acetylcholine receptor subunit  $\alpha 7$  –  $\alpha 7$ nAChR – of innate immune cells, inhibiting pro-inflammatory signalling. This work aims to investigate whether cholinergic function is implicated in chronic rhinosinusitis.

**Methods:**  $\alpha 7$ nAChR mRNA and protein levels were measured in nasal biopsy specimens of 14 patients with CRSwNP, 8 with CRSsNP and 10 control subjects, undergoing surgery.

**Results:** Gene expression levels of  $\alpha 7$ nAChR did not differ between groups; protein expression was significantly higher in CRSwNP than in CRSsNP ( $p = 0.041$ ), and both of these patient groups showed significant higher levels than controls (CRSwNP vs Controls –  $p = 0.001$ ; CRSsNP vs Controls –  $p = 0.041$ ).

**Conclusion:** Elevated  $\alpha 7$ nAChR protein levels suggest that the cholinergic system is involved in the inflammatory response of chronic rhinosinusitis. This can shed light on both, the disease pathophysiology and the development of future treatment options.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chronic rhinosinusitis (CRS), with and without nasal polyps, constitutes a significant health problem with an estimated prevalence of 10.9% in Europe [1]. Despite the identification of many factors associated with CRS (like ciliary impairment, allergy, asthma, aspirin sensitivity, immunocompromised state, genetic, endocrine and environmental factors, biofilms, etc.), the knowledge about its aetiology and pathogenesis still remains at an unsatisfactory level. The current consensus considers that CRS can be typically described as a dysfunctional host–environment interaction at the site of interface, which occurs in the nose and paranasal sinuses [2].

The cholinergic anti-inflammatory pathway is a well-established parasympathetic neural circuit that terminates excessive

pro-inflammatory cytokine responses, thereby preventing immune-mediated cell damage [3,4].

This inflammatory reflex functions like a reflex arc, with both afferent and efferent pathways. The afferent sensory neural arc detects the molecular products of injury, infection and inflammation. The efferent motor neural arc transmits signals to modulate immune responses, through acetylcholine release and activation of the nicotinic acetylcholine receptor subunit  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ nAChR) [4]. Direct activation of  $\alpha 7$ nAChR inhibits the production of pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF, IL-1, IL-6, IL-8 and high mobility group box 1 (HMGB-1)), but does not inhibit anti-inflammatory cytokine production (e.g. IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta)), thereby attenuating the local inflammatory response [4,5].

While prior studies have focused on the role of the vagus nerve in the modulation of peripheral inflammation [4,6,7], it is likely that the parasympathetic system is also relevant in the regulation of nasal inflammation. However, little is known about how the cholinergic anti-inflammatory response is implicated in chronic rhinosinusitis. In order to address this, we aimed to determine if markers of cholinergic function in the nasal mucosa are altered in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps.

\* Corresponding author at: Department of Otolaryngology, Tâmega e Sousa Hospital Center, Penafiel, Portugal. Tel.: +351 965487059.

E-mail address: [r.cerejeira@netcabo.pt](mailto:r.cerejeira@netcabo.pt) (R. Cerejeira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2015.08.011>

0385-8146/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Cerejeira R, et al. Increased expression of  $\alpha 7$ nAChR in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2015.08.011>

## 2. Materials and methods

### 2.1. Human subjects

Fourteen patients with CRSwNP, eight with CRSsNP and ten control subjects (without evidence of disease and without peripheral eosinophilia) were consecutively enrolled in the study, using EPOS2012 expert panel definitions for CRS [2]. Excluding criteria were as follows: antibiotics or steroids or other immunosuppressing drugs usage in the month prior to surgery, diabetes, autoimmune diseases (e.g. lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, etc.) and tobacco consumption (as nAChR levels may vary with nicotine exposure [8,9]).

A pre-operative CT scan with Lund–Mackay score [10] determination was used as a marker of disease severity.

Patients with CRS in the study underwent endoscopic sinus surgery, and a tissue specimen was taken from the lateral wall of the nasal cavity, in the area of the uncinata process. Tissue samples were selected to avoid polyps or tissue that was grossly polypoid in appearance and stored in an Eppendorf tube in RNA later at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Control patients had no evidence of sinus pathology or history of allergy, and were undergoing surgery for septoplasty or rhinoplasty procedures. A pre-operative CT scan was equally performed in the control group. Tissue samples in the control group were also located in the lateral nasal wall, in the area where inferior turbinate connects with the maxilla, nearest possible to the uncinata process. The same storing protocol was used to these samples.

Also, for patients with CRS, routine histopathological evaluation was conducted with haematoxylin and eosin (H&E) staining. The number of eosinophils per  $400\times$  high powered field (hpf) was recorded by two independent observers, with a cut point of  $>10$  eosinophils/hpf used as a marker of tissue eosinophilia [11].

Likewise, serum eosinophil count was performed for all patient groups, with values greater than  $0.4 \times 10^3/\mu\text{L}$  meaning peripheral eosinophilia.

The research protocol was approved by the Ethical Committee of the “Tâmega e Sousa Hospital Center”, and all subjects gave signed informed consent.

### 2.2. RNA extraction/reverse transcription

After thawing in ice, small pieces of tissue from the intranasal samples were homogenized with Minilys benchtop homogeniser (peqlab) and total RNA was extracted, using the Tripure isolation protocol. RNA concentration was assessed by spectrophotometric analysis (Nanodrop Instrument). Isolated mRNA was reverse transcribed with oligo (dT) and random primers using the qScript™ cDNA SuperMix. The reaction mix consisted of  $4 \mu\text{L}$  of qScript cDNA SuperMix,  $1 \mu\text{g}$  of RNA template and RNase/DNase-free water to make up to a total volume of  $20 \mu\text{L}$ . Samples were incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 5 min,  $42^{\circ}\text{C}$  for 30 min, and  $85^{\circ}\text{C}$  for 5 min.

### 2.3. Real time polymerase chain reaction

Real time polymerase chain reaction (PCR) was performed in Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System. TaqMan probes (Applied Biosystems) for  $\alpha 7\text{nAChR}$  and the house-keeping gene RPLP0 (ribosomal protein large P0) labelled with carboxyfluorescein were purchased. The reaction mix consisted of  $10 \mu\text{L}$  of Fast TaqMan Universal PCR Master Mix,  $7 \mu\text{L}$  of RNase-free water,  $1 \mu\text{L}$  of  $20\times$  TaqMan Gene Expression Assay Mix, and  $2 \mu\text{L}$  of cDNA, for a total volume of  $20 \mu\text{L}$ . The cycle parameters used were  $95^{\circ}\text{C}$  for 20 s, followed by 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 1 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 20 s. For each sample, the relative amount of the target

messenger RNA was normalized to the amount of RPLP0 transcript and data were processed using  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method (standard curves were determined with an efficiency near 100% for both  $\alpha 7\text{nAChR}$  and RPLP0 genes).

### 2.4. Protein extraction and western blotting procedure

After submitting the samples to Tripure protocol and collecting the extracted RNA, the protein content of the tubes was isolated and used for western blot analysis. Total protein concentration was determined by the Lowry DC protein assay (Biorad, Hercules CA). For each sample, a total of  $15 \mu\text{g}$  of protein extract was heated at  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 min in sample buffer (containing 100 mM DTT) and run on an Any KD TGX Stain-Free pre-cast gel (BioRad, Hercules, CA), for 20 min at 300 volts. Stain-free gels were activated according to manufacturer instructions using the ChemiDoc XRS equipment (BioRad, Hercules, CA). Sample proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes (BioRad) using a TransBlot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA). Subsequently, membranes were imaged, blocked in 5% milk-TBS 0.1% Tween and incubated overnight, at  $4^{\circ}\text{C}$ , with the antibody against AChR $\alpha 7$  (1:1000) (Santa Cruz sc-5544). Membranes were then washed and incubated with an HRP-conjugated secondary antibody raised in rabbit (1:10,000; GE Healthcare; USA) for 1 h followed by signal detection with a sensitive chemiluminescence reagent (Western Bright Quantum; Advansta, Melo Park, CA), performed on the ChemiDoc equipment. Total protein staining obtained from the TGX Stain-Free gels was used for normalization of the AChR $\alpha 7$  band intensities, and the densitometric analyses were performed in the Image Lab Software (BioRad, Hercules, CA) [22–24]. Determination of the  $\gamma$ -actin protein levels was performed with the Sigma anti- $\gamma$ -actin antibody (1:2000 dilution in 5% milk-TBS 0.1% Tween) (Sigma, A8481). Membranes were incubated for 2 h in primary antibody, washed and incubated with an HRP-conjugated secondary antibody raised in mouse (1:10,000; GE Healthcare; USA) for 1 h. Signal detection with a sensitive chemiluminescence reagent (Western Bright Quantum; Advansta, Melo Park, CA) was performed on the ChemiDoc equipment. Data obtained using normalization with  $\gamma$ -actin were similar to those using total protein content (stain-free gels). Results are expressed as arbitrary units after normalization on  $\gamma$ -actin content.

### 2.5. Immunohistochemical analyses of sample slides

To determine which cell types express  $\alpha 7\text{nAChR}$  in sinonasal mucosa, histopathological slides from two patients with CRSwNP, two patients with CRSsNP and two control patients were processed for qualitative immunohistochemical analysis.

#### 2.5.1. Morphological studies

Pieces of tissue collected from the lateral nasal wall were fixed in formalin and processed for paraffin embedding according to standard procedures. Blocks were then sectioned at  $5 \mu\text{m}$  thickness, mounted on poly-L-lysine-coated slides and dried overnight at  $37^{\circ}\text{C}$ . Sections were deparaffinised in xylene and re-hydrated in decreasing ethanol concentrations. Some were stained with haematoxylin and eosin for general observation.

#### 2.5.2. Fluorescence microscopy

Sections intended for immunofluorescence were re-hydrated as above and submitted to antigen retrieval with 1 M HCl for 30 min at room temperature (RT), followed by a brief 0.1 M Borax neutralization and unspecific antigen blocking with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 hour at RT. They were then incubated with a polyclonal rabbit antibody anti-AChR $\alpha 7$ -H-302

Please cite this article in press as: Cerejeira R, et al. Increased expression of  $\alpha 7\text{nAChR}$  in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2015.08.011>

(Santa Cruz sc-5544), 1:250 diluted, overnight at 4 °C in moistened environment. Upon washing twice for 5 min with 0.1% Triton X-100 in PBS (PBST), slides were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated, anti-rabbit, IgG secondary antibody (Molecular Probes, 1:1000), 1 h at RT and washed again in PBST, before counterstaining with 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) and final mounting. Slides were examined in a fluorescence microscope (Carl Zeiss AxioImager Z1) equipped with a digital camera.

### 2.6. Statistical analyses

Raw data collected in the assessment were processed by statistical software IBM SPSS Statistics, version 21, 2012. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Kruskal–Wallis test was used for comparisons between groups. When significant differences were found, the Mann–Whitney test was used for comparison between each pair. All tests were evaluated at a 95% confidence level. Correlation between  $\alpha$ 7nAChR protein content and Lund–MacKay score, for patients with CRS, was tested with Pearson coefficient for quantitative variables. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

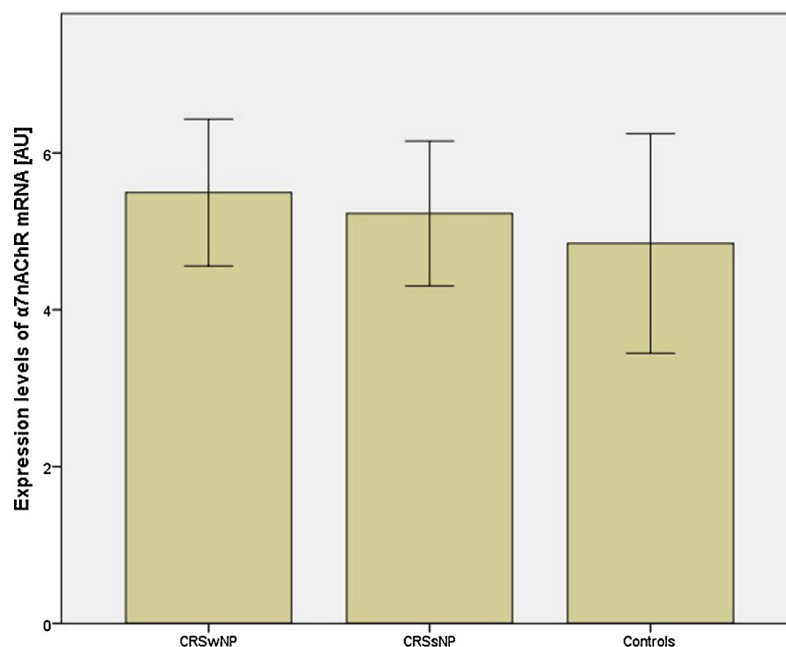
### 3. Results

The sample consisted of 32 patients, 15 men and 17 women. Demographic and clinical information is shown in Table 1.

**Table 1**  
Demographic and clinical characteristics of the sample.

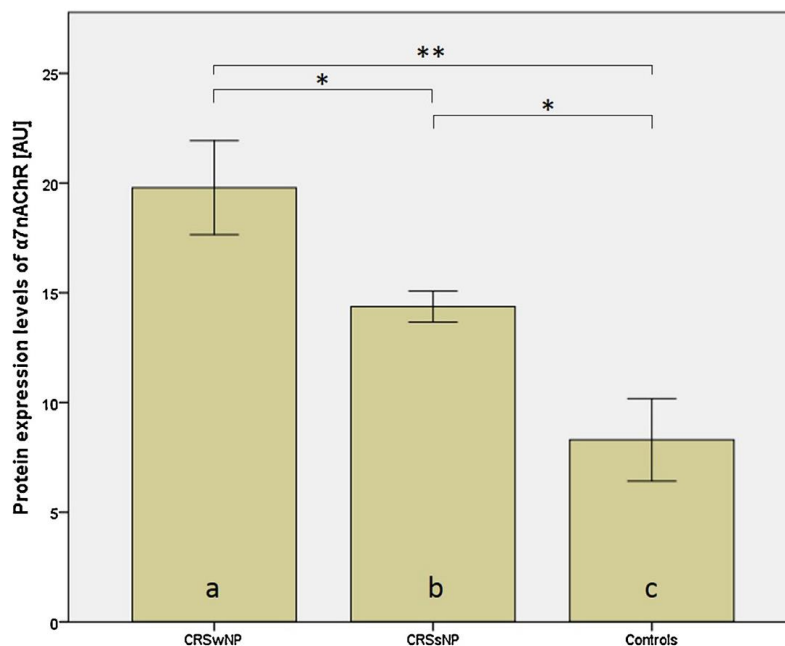
	N	♂/♀	Age (mean/range)	Lund–Mackay score: mean $\pm$ SD (unilateral/bilateral)
CRSwNP	14	7/7	50.07 y/37–69	8.14 $\pm$ 2.11/15.86 $\pm$ 4.33
CRSsNP	8	5/3	46.00 y/25–65	5.63 $\pm$ 1.85/8.50 $\pm$ 3.42
Controls	10	3/7	28.60 y/18–37	0.00 $\pm$ 0.00/0.00 $\pm$ 0.00

CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSsNP, chronic rhinosinusitis without nasal polyps; SD, standard deviation; y, years; ♂, males/♀, females.



**Fig. 1.** Expression levels of  $\alpha$ 7nAChR mRNA in chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSsNP) and control patients (arbitrary units – AU). Data do not reach statistical significance when compared between groups ( $p > 0.05$ ).

Please cite this article in press as: Cerejeira R, et al. Increased expression of  $\alpha$ 7nAChR in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2015.08.011>



**Fig. 2.** Protein expression levels of α7nAChR in chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSsNP) and control patients (arbitrary units – AU). The differences between groups were significant (\**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01). (a, b, c) Homogeneous groups according to the non-parametric Mann-Whitney test, at 95% confidence level.

**Table 2**  
Quantitative analysis of Western Blot data for the three groups (Arbitrary Units).

	N	Mean	SEM	Min.	Max.	Kruskal–Wallis test
CRSwNP	14	19.79	2.14	4.27	38.76	<i>p</i> = 0.001
CRSsNP	8	14.37	0.71	11.80	17.13	
Controls	10	8.30	1.88	0.76	15.90	

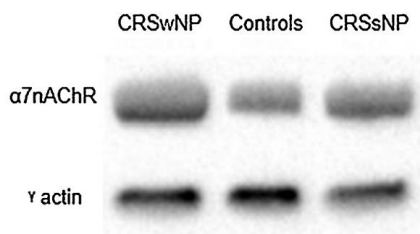
CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSsNP, chronic rhinosinusitis without nasal polyps; SEM, standard error of mean; Min, minimum value; Max, maximum value.

representative image of western blotting of α7nAChR and γ-actin protein detection is shown in Fig. 3.

**3.3. Comparison between markers of severity of CRS and α7nAChR protein levels**

A moderate positive correlation was obtained between α7nAChR protein content and Lund–MacKay score of patients with CRS (*r* = 0.480, *p* = 0.024 for unilateral score; *r* = 0.535, *p* = 0.010 for bilateral score).

Protein levels of α7nACh receptors did not show a statistically significant difference between patients with CRS with peripheral



**Fig. 3.** Representative image of western blotting. CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSsNP, chronic rhinosinusitis without nasal polyps.

eosinophilia (6 patients with CRSwNP and 1 patient with CRSsNP) and patients with CRS without peripheral eosinophilia (8 patients with CRSwNP and 7 patients with CRSsNP) – *p* = 0.378.

Also, α7nAChR protein level differences were not found between CRS patients with tissue eosinophilia (5 patients with CRSwNP and 1 patient with CRSsNP) and without tissue eosinophilia (9 patients with CRSwNP and 7 patients with CRSsNP) – *p* = 0.122. Even though not statistically significant, both groups with eosinophilia (peripheral and histologic) showed higher receptor protein levels than the groups without eosinophilia.

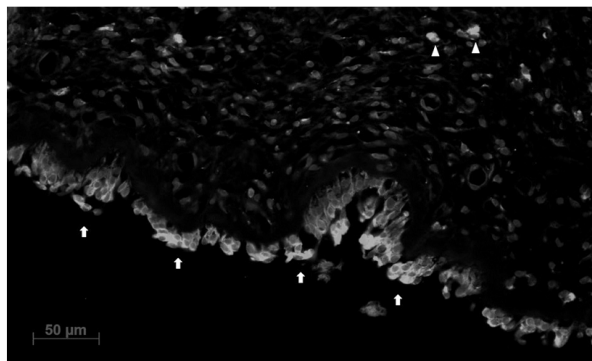
**3.4. α7nAChR is expressed mainly by epithelial cells in the nasal mucosa**

α7nAChR immunofluorescence was observed mainly in the pseudostratified columnar epithelium, and also in a few scattered mononuclear cells in the submucosa (Fig. 4). These results were consistently observed throughout the samples analyzed, independently of the group they belonged to.

**4. Discussion**

According to the current understanding of the aetiology and pathogenesis of chronic mucosal inflammatory disorders in general, CRS can be regarded as a dysfunctional host–environment

Please cite this article in press as: Cerejeira R, et al. Increased expression of α7nAChR in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2015.08.011>



**Fig. 4.**  $\alpha 7nAChR$  immunofluorescence: cells of pseudostratified columnar epithelium exhibit a strong cytoplasmic labelling (arrows), that is absent in the submucosa except in a few scattered mononuclear cells (arrowheads).

interaction involving various exogenous agents and changes in the sinonasal mucosa, with persistent inflammation [2].

The prior discovery that human bronchial epithelial and endothelial cells express  $\alpha 7nAChR$  [12], along with the concept of the unified airway “one airway, one disease” [13], pointed to the existence and activity of these receptors in the nasal cavity.

In this study, we demonstrated the expression of  $\alpha 7nAChR$  in human sinonasal mucosa of healthy individuals and in patients with CRS. This receptor is widely expressed by cells of the immune system and has been identified in monocytes, macrophages, B cells, T cells and dendritic cells [4]. It is also present in epithelial cells [12] which are important interacting cells in innate immune response. The immunohistochemical staining results point out to the preponderance of epithelial cells in the expression of this receptor in nasosinusal mucosa. This is important, because it is known that epithelial cells of the upper airway are capable of mimicking cell mechanisms that are found inside phagocytic cells and are responsive to the presence of pathogens providing an inducible inflammatory response [14,15]. A recent study [16] with epithelial cell cultures derived from patients with allergic rhinitis and CRSwNP showed up-regulation in the secretion of several cytokines/chemokines. Altogether, these data indicate both a relevant contribution of epithelial cells in the inflammatory responses in nasosinusal diseases, and a significant expression of  $\alpha 7nAChR$  in the same cell type. This association may not be random but rather represent an important mechanism in the pathophysiologic response in CRS.

The results suggest that protein expression of  $\alpha 7nAChR$  correlates with the level of inflammation in nasal mucosa. In fact, protein expression was higher in CRSwNP than in CRSsNP, and both of these patient groups showed much higher levels than controls (Fig. 3). Based on radiologic Lund–Mackay staging system, which has been shown to be a good marker of disease severity in CRS [17], one may infer that higher inflammatory burden is associated with higher levels of  $\alpha 7nAChR$ .

Regulation of  $\alpha 7nAChR$  protein expression may be accomplished through various mechanisms. This receptor has a pentameric structure and so subunit folding, assembly and trafficking pathways are all potential targets for increasing its expression. For example, in muscle cells, nAChR assembly is inefficient, with only 20–30% of synthesized subunits to assemble into mature receptors in the endoplasmic reticulum, while the remaining unassembled subunits are degraded [18]. The efficiency of subunit assembly can be regulated under certain conditions leading to higher nAChR expression. Studies in mouse fibroblasts showed that increased intracellular cAMP levels increase nAChR

assembly efficiency and surface expression [19,20]. Another mechanism emerging as an important modulator of nAChR expression involves association with chaperone proteins that transport receptors away from the endoplasmic reticulum [8]. Also, block of ubiquitin-proteasome degradation appears to enhance nAChR assembly and expression [18].

Given the preponderance of post-translational mechanisms in the expression of this receptor, it is not surprising that obtained data from  $\alpha 7nAChR$  mRNA were not significantly different among the three studied groups.

These results advocate that the cholinergic system can be implicated in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. Future studies should determine whether higher levels of  $\alpha 7nAChR$  are a consequence of exaggerated levels of immune mediators and represent an overactive cholinergic anti-inflammatory reflex. Increased protein expression of  $\alpha 7nAChR$  receptors may be the result of compensatory neural signs, via parasympathetic facial nerve (VII) innervation of the nasal cavity (rami of the pterygo-palatine ganglion), although protein expression of  $\alpha 7nAChR$  does not necessarily reflect the levels of acetylcholine.

Eosinophilia, which is a known predictor of refractoriness of CRS [2,21], was associated with higher levels of  $\alpha 7nAChR$ , although without statistical significant results. This may result from the small sample size and warrants further investigation with a better powered study.

The main limitation of this work concerns the lack of results on the functional activity of  $\alpha 7nAChR$  in sinonasal mucosa. In fact, one can only be certain of the preponderance of these receptors in CRS pathophysiology with studies that can address receptor activation, via neural signs and with local stimulation with agonists and antagonists. Also, new focus of future research can be the evaluation of potential synergistic effects of nAChR agonists with corticosteroids in the modulation of local inflammation in CRS.

Upcoming studies should evaluate whether these results can be replicated in more heterogeneous samples and in different clinical settings. Also, further research is needed to identify the factors that influence the baseline levels of  $\alpha 7nAChR$  in healthy subjects. Ultimately, these findings can have a major impact in the quality of health care offered to patients if translated into novel therapeutic strategies modulating the cholinergic system.

#### Conflict of interest

The authors report no potential conflicts of interest relevant to this article.

#### Acknowledgements

We thank Maria João Pinho, PhD for her comments in RT-PCR processing and results; António Carlos Ferreira, PhD for technical support in Western Blot analysis; Henrique Almeida, PhD and Elisa Nova for the technical support in Immunohistochemical analysis.

#### References

- [1] Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe – an underestimated disease. *A GA2LEN study*. *Allergy* 2011;66:1216–23.
- [2] Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. The European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinology* 2012;(Suppl. 23):1–299.
- [3] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458–62.
- [4] Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* 2009;9:418–28.
- [5] Marrero MB, Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R. Application of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists in inflammatory diseases: an overview. *Pharm Res* 2011;28:413–6.

Please cite this article in press as: Cerejeira R, et al. Increased expression of  $\alpha 7nAChR$  in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2015.08.011>

- [6] Andersson U, Tracey KJ. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012;30:313–35.
- [7] Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev* 2012;248:188–204.
- [8] Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009;89:73–120.
- [9] Perry DC, Davila-Garcia MI, Stockmeier CA, Kellar KJ. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:1545–52.
- [10] Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 1993;31:183–4.
- [11] Soler ZM, Sauer D, Mace J, Smithe TL. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;142:64–71.
- [12] Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 2001;60:1201–9.
- [13] Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, Aria Workshop Group, World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(5 Suppl.):S147–334.
- [14] Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 2000;173:27–38.
- [15] Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19:711–20.
- [16] Shiozawa A, Miwa M, Ono N, Homma H, Hirotsu M, Ikeda K. Comparative analysis of cytokine release from epithelial cell cultures of the upper airway. *Rhinology* 2015. <http://dx.doi.org/10.4193/Rhino14.078> [Epub ahead of print].
- [17] Hopkins C, Browne J, Slack R, Lund V, Brown P. The Lund–Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:555–61.
- [18] Wanamaker CP, Christianson JC, Green WN. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Ann NY Acad Sci* 2003;998:66–80.
- [19] Green WN, Ross AF, Claudio T. Acetylcholine receptor assembly is stimulated by phosphorylation of its gamma subunit. *Neuron* 1991;7:659–66.
- [20] Rothhut B, Romano SJ, Vijayaraghavan S, Berg DK. Post-translational regulation of neuronal acetylcholine receptors stably expressed in a mouse fibroblast cell line. *J Neurobiol* 1996;29:115–25.
- [21] Tokunaga T, Sakashita M, Haruna K, Asaka D, Takeno S, Ikeda H, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy* 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/all.12644> [Epub ahead of print].
- [22] Li R, Shen Y. An old method facing a new challenge: Re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci* 2013;92:747–51.
- [23] Colella AD, Chegenii N, Tea MN, Gibbins IL, Williams KA, Chataway TK. Comparison of stain-free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem* 2012;403:108–10.
- [24] Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 2008;172:250–4.

Please cite this article in press as: Cerejeira R, et al. Increased expression of  $\alpha 7$ nAChR in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis. *Auris Nasus Larynx* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2015.08.011>

**7.**  
**AVALIAÇÃO CLÍNICA DO DOENTE COM**  
**RINOSSINUSITE CRÓNICA**



## **7.1. INTRODUÇÃO**

A rinossinusite aguda ou crónica, com ou sem pólipos nasais, constitui um importante problema de saúde, com impacto significativo na qualidade de vida, interferindo na vida pessoal, profissional e social do paciente<sup>1,2</sup>.

A avaliação do doente com RSC baseia-se em critérios objetivos e em critérios subjetivos.

Para determinar a extensão da doença no nariz e seios perinasais, foram desenvolvidos sistemas de classificação baseados na endoscopia e imagens de TC. Um dos sistemas de avaliação objetiva mais usado é o sistema de estadiamento imagiológico de Lund-MacKay<sup>116</sup>; este sistema considera o estado de opacificação dos seios perinasais (“0 – sem opacificação”; “1 – opacificação parcial”; “2 – opacificação total”) e do complexo ostiomeatal (“0 – não opacificado” ou “2 - opacificado”), bilateralmente. Já o sistema de classificação endoscópica de Lund-Kennedy<sup>117</sup>, com scores totais que variam entre “0” e “20”, pretende quantificar o estado patológico do nariz e dos seios perinasais, focando-se na presença de pólipos, na rinorreia, no edema, em zonas de tecido cicatricial/adesões, e na existência de crostas.

Estes sistemas de estadiamento permitem uma avaliação pormenorizada de cada fossa nasal, que pode ser realizada tanto numa primeira avaliação, como em diferentes fases pós tratamento.

No entanto, apesar do seu uso frequente, os sistemas de avaliação objetiva muitas vezes não refletem de forma correta o que o doente sente relativamente à sua doença, demonstrando uma baixa correlação com métodos de avaliação subjetivos<sup>118-120</sup>.

Os métodos subjetivos permitem avaliar o impacto da doença em cada paciente e também monitorizar a resposta ao tratamento. Estes baseiam-se num conjunto de sintomas locais e gerais, e no seu efeito na qualidade de vida do doente.

Os sintomas locais consistem na congestão, obstrução ou bloqueio nasal; rinorreia anterior ou posterior, muitas vezes mucopurulenta; dor ou pressão facial, cefaleias; hipósmia ou anósmia.

Os sintomas gerais incluem as queixas faríngeas, laríngeas e traqueais, como por exemplo as parestesias, a odinofagia, a tosse e a disfonia; o mau estado geral; a sensação de febre; a astenia; entre outros. O conjunto dos sintomas gerais apresentados varia de forma muito significativa consoante o doente<sup>117,121-123</sup>.

Questionários que integram os sintomas auto-reportados pelo doente e o seu impacto na qualidade de vida constituem um instrumento valioso na abordagem clínica dos doentes com RSC, sendo cada vez mais utilizados como rotina nas consultas de Rinologia.

A necessidade de ter um questionário em língua portuguesa, breve e fácil de usar, específico para rinossinusite, e que simultaneamente apresentasse boas características psicométricas, levou-nos a traduzir a versão original e validar a versão portuguesa do RhinoQOL (*Rhinosinusitis Quality of Life Survey Instrument*<sup>6,7</sup>).

Outros testes diagnósticos poderão ser realizados, como, por exemplo, os testes funcionais respiratórios, a rinometria acústica, a rinomanometria, testes de função mucociliar e os testes de avaliação do olfato. O seu uso é, no entanto, pouco prático, sendo por vezes exames morosos, que levantam problemas de parametrização e interpretação de resultados, pelo que têm estado maioritariamente reservados para fins de investigação<sup>2</sup>.

## **7.2. VERSÃO PORTUGUESA DO RHINOQOL**

*Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Portuguese Version of RhinoQOL: validation and clinical application. Braz J Otorhinolaryngol 2015; 81:630-635.*



ORIGINAL ARTICLE

The Portuguese version of the RhinoQOL  
Questionnaire: validation and clinical application ☆,☆☆



Rui Cerejeira<sup>a,b,\*</sup>, Rafaela Veloso-Teles<sup>c</sup>, Nuno Lousan<sup>b</sup>, Carla Pinto Moura<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal

<sup>b</sup> Department of Otorhinolaryngology, Tâmega e Sousa Hospital Center, Penafiel, Portugal

<sup>c</sup> Department of Otorhinolaryngology, Alto Ave Hospital Center, Guimarães, Portugal

<sup>d</sup> Department of Otorhinolaryngology, São João Hospital Center, Porto, Portugal

Received 12 May 2014; accepted 8 October 2014

Available online 21 October 2015

**KEYWORDS**

Quality of life;  
Questionnaires;  
Sinusitis;  
Natural orifice  
endoscopic surgery

**Abstract**

**Introduction:** Rhinosinusitis constitutes an important health problem, with significant interference in personal, professional, and social functioning. This study presents the validation process of the Portuguese version of the RhinoQOL, to be used as a routine procedure in the assessment of patients with chronic rhinosinusitis.

**Objective:** To demonstrate that the Portuguese version of the RhinoQOL is as valid as the English version to measure symptoms and health-related quality of life in chronic rhinosinusitis.

**Methods:** The Portuguese version of the RhinoQOL was administered consecutively to 58 patients with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps, assessed for endoscopic sinus surgery. A follow-up survey was completed three months after surgery. Statistical analysis was performed to determine its psychometric properties.

**Results:** Face and content validity were confirmed by similar internal consistency as the original questionnaire for each sub-scale, and strong correlation between individual items and total score. The questionnaire was easy and quick to administer (5.5 min). At three months, there was a significant decrease from baseline for all sub-scale scores, indicating clinical improvement, with an effect size considered as large.

**Conclusion:** This study provides a questionnaire that is equivalent to the original English version, with good responsiveness to change, which can be especially valuable to measure the outcome of surgery.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

☆ Please cite this article as: Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Pinto Moura C. The Portuguese version of the RhinoQOL Questionnaire: validation and clinical application. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;81:630–5.

☆☆ Instituição: Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa, Penafiel, Portugal.

\* Corresponding author.

E-mail: r.cerejeira@netcabo.pt (R. Cerejeira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.08.015>

1808-8694/© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

**PALAVRAS-CHAVE**

Qualidade de vida;  
Questionários;  
Sinusite;  
Cirurgia endoscópica  
por orifício natural

**Versão portuguesa do Questionário RhinoQOL: validação e aplicação clínica**

**Resumo**

**Introdução:** A rinossinusite constitui um importante problema de saúde, com interferência significativa na vida pessoal, e sócio-profissional dos pacientes. Este estudo apresenta o processo de validação da versão do RhinoQOL na língua portuguesa para ser usado em pacientes portadores de rinossinusite crônica.

**Objetivo:** Demonstrar que a versão do RhinoQOL na língua portuguesa é tão válida quanto a versão inglesa na medição dos sintomas e qualidade de vida dos pacientes com rinossinusite crônica.

**Método:** A versão em português do RhinoQOL foi aplicada consecutivamente a 58 pacientes com rinossinusite crônica, com e sem pólipos nasais, previamente à cirurgia endoscópica nasal, tendo sido reavaliados aos 3 meses de pós-operatório. Análise estatística foi realizada para determinar as suas propriedades psicométricas.

**Resultado:** A validade de conteúdo foi confirmada por uma consistência interna similar à do questionário original, para cada sub-escala, e por uma forte correlação entre cada item e o score total. A aplicação do questionário foi fácil e rápida (5,5 min). Aos 3 meses, verificou-se uma redução significativa dos scores de todas as sub-escalas, indicando melhoria clínica, com um tamanho de efeito considerado grande.

**Conclusão:** Este estudo fornece um questionário que é equivalente à versão original, com boa sensibilidade à mudança, o que pode ser especialmente útil na medição do impacto da cirurgia.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

**Introduction**

Rhinosinusitis, acute or chronic, with or without nasal polyps, constitutes an important health problem with significant impact on quality of life, interfering in personal, professional, and social functioning.<sup>1</sup>

Disease-specific instruments that measure symptoms and health-related quality of life (HRQL) have been developed to assess the impact of rhinosinusitis in individual patients, and to monitor the response to treatment. There are several questionnaires (Table 1) that subjectively assess rhinosinusitis impact and associated incapacity.

One of the major problems precluding the administration of these instruments in daily clinical practice is the lack of available time. The need for a brief and easy-to-use rhinosinusitis-specific questionnaire with strong psychometric characteristics resulted in the development of the RhinoQOL Survey Instrument<sup>8</sup> (Fig. 1), that has been validated in acute<sup>8</sup> and chronic<sup>9</sup> rhinosinusitis patients treated both medically and surgically.

This assessment instrument, which has been already validated in French,<sup>10</sup> consists of 17 items, divided in three domains addressing symptom frequency (five items), symptom bothersomeness (with answers ranging from 0, meaning "not bothered at all," to 10, meaning "bothered a lot," for each of its three items), and symptom impact (nine items). For the symptom frequency and impact questions, the patient has five possible responses: "never," "a few times," "some of the time," "most of the time," and "always."

In a recent systematic review of the available HRQL questionnaires for Rhinosinusitis, the RhinoQOL was one of only

RhinoQOL – english version <sup>9</sup>
<i>Symptom frequency scale items<sup>a</sup></i>
1. Sinus headaches, facial pain, or facial pressure
2. Blocked or stuffy nose
3. Postnasal drip
4. Thick nasal discharge
5. Runny nose
<i>Symptom bothersomeness scale items<sup>b</sup></i>
1. Sinus headaches, facial pain, or facial pressure
2. Blocked or stuffy nose
3. Postnasal drip
<i>Symptom impact scale items<sup>c</sup></i>
1. Tired or fatigued
2. Trouble sleeping
3. Harder to concentrate
4. Harder to do the things you normally do
5. Embarrassed
6. Frustrated
7. Irritable
8. Sad or depressed
9. Think about

<sup>a</sup>Patients were asked, "in the last seven days, how much of the time did you have" the listed symptom. responses included, "never," "a few times," "some of the time," "most of the time," and "always."

<sup>b</sup>Patients were asked, "using a scale of 0 to 10, where 0 is not bothered at all and 10 is bother a lot, how much were you bothered by" the listed symptom. responses ranged from 0 "not bothered at all" to 10 "bothered a lot."

<sup>c</sup>Patients were asked, "in the last seven days, how much of the time did you" have the listed problem, "because of your nasal symptoms." responses included, "never," "a few times," "some of the time," "most of the time," and "always."

**Figure 1** RhinoQOL – English version.

**Table 1** Questionnaires for assessment of quality of life in rhinosinusitis.

	Instrument	Items	Domains	Authors
RSOM-31	Rhinosinusitis Outcome Measurement	31	7	Piccirillo <sup>2</sup>
SNOT-16	Sinonasal Outcome Test	16	1	Anderson et al. <sup>3</sup>
SNOT-20	Sinonasal Outcome Test	20	1	Piccirillo et al. <sup>4</sup>
SNOT-22	Sinonasal Outcome Test	22	1	Hopkins et al. <sup>5,6</sup>
RSDI	Rhinosinusitis Disability Index	30	3	Benninger, Senior <sup>7</sup>
RhinoQOL	Rhinosinusitis Quality of Life Survey Instrument	17	3	Atlas et al. <sup>8,9</sup>

two (the other being the RSOM-31) that met the authors' criteria for discriminant validity and responsiveness.<sup>11</sup>

This article presents the translation to Portuguese and validation procedure of the RhinoQOL to allow its use in assessment of chronic rhinosinusitis (CRS) in Portuguese-speaking patients.

**Methods**

The present study was approved by the Ethical Committee of a level 1 hospital (decision 12/2012) and was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki.

**Adaptation to Portuguese**

The RhinoQOL questionnaire was obtained from the original article by Atlas et al.<sup>9</sup> (Fig. 1). A double translation of the English questionnaire into Portuguese was made by two bilingual physicians, followed by a retrotranslation into English. The final form of the validated Portuguese version

of the RhinoQOL (RhinoQOL-pv) is attached to this article (Fig. 2).

**Sample and procedures**

The study was conducted in the Otolaryngology Department on patients submitted to surgery from December 1, 2012 to July 31, 2013. The RhinoQOL-pv was administered, during the consultation, consecutively to the first 58 patients with CRS with nasal polyps (CRSwNP) and without nasal polyps (CRSsNP) assessed pre-operatively for endoscopic sinus surgery (ESS), which was always performed by the same surgical team, using the principles of functional endoscopic surgery first described by Messerklinger.<sup>12</sup> The sample size (n = 58) was determined based on the sample size of the original study by Atlas et al.<sup>9</sup> (n = 50), in which it was possible to detect clinically significant differences. All persons provided informed consent prior to their inclusion in the study. Eligibility criteria included age 18 or older and ability to speak and read Portuguese. Administration time was measured (in minutes). Patients were asked about the clearness of

RhinoQOL (Rhinosinusitis quality of life survey) - versão portuguesa					
Responda às seguintes questões marcando uma cruz (x) na resposta mais adequada para cada pergunta.					
	Nunca	Pouco tempo	Algum tempo	Muito tempo	Sempre
1. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo senti dor de cabeça, dor na face ou pressão na face?					
1A. Usando uma escala de 0 a 10, em que 0 significa "nada incomodado" e 10 significa "muito incomodado", que valor atribuiria ao incômodo causado pelas dores de cabeça, dor na face ou pressão na face?	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
2. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo senti ter o nariz tapado ou congestionado?					
2A. Usando uma escala de 0 a 10, em que 0 significa "nada incomodado" e 10 significa "muito incomodado", que valor atribuiria ao incômodo causado por ter o nariz tapado ou congestionado?	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
3. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo senti escorrência por detrás do nariz?					
3A. Usando uma escala de 0 a 10, em que 0 significa "nada incomodado" e 10 significa "muito incomodado", que valor atribuiria ao incômodo causado pela escorrência por detrás do nariz?	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
4. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo teve saída de secreções nasais espessas?					
5. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo senti o nariz a pingar?					
Para responder às próximas perguntas, por favor considere todos os sintomas nasais que tem sentido recentemente.					
6. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo se sentiu cansado(a) por causa dos seus sintomas nasais?					
7. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo sentiu dificuldade em dormir por causa dos seus sintomas nasais?					
8. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo sentiu mais dificuldade em se concentrar por causa dos seus sintomas nasais?					
9. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo sentiu mais dificuldade em fazer as coisas que normalmente faz por causa dos seus sintomas nasais?					
10. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo se sentiu embaraçado(a) por causa dos seus sintomas nasais?					
11. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo se sentiu frustrado(a) por causa dos seus sintomas nasais?					
12. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo se sentiu irritável por causa dos seus sintomas nasais?					
13. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo se sentiu triste ou deprimido(a) por causa dos seus sintomas nasais?					
14. Nos últimos 7 dias, durante quanto tempo pensou acerca dos seus sintomas nasais?					

**Figure 2** RhinoQOL – Portuguese version.

questions ("Did you experience difficulties in interpreting any of the items of the questionnaire?") and the duration of the assessment ("Did you find the questionnaire too long to complete?") with a yes/no answer option. Patients completed a follow-up survey three months after surgery.

### Statistical procedure

Data collected in the assessment were introduced and processed by the statistical software IBM™ SPSS™ Statistics v. 21.

Descriptive statistics of demographic and clinical data of the sample were calculated (age, sex, presence of nasal polyps, and Lund–MacKay score<sup>13</sup> in pre-operative computed tomography scans).

As in the original study of the RhinoQOL,<sup>9</sup> the psychometric evaluation was performed separately for symptom frequency, bothersomeness, and impact scales. Scores for the symptom frequency and impact scales ranged from 1 ("never") to 5 ("always"). For the bothersomeness scale, scores ranged from 0 to 10, in accordance with the questions possible answers.

Internal consistency reliability was assessed using Cronbach's alpha. For comparison of means between two groups, Student's *t*-test was used. Correlation between Lund–MacKay score and RhinoQOL sub-scale scores was tested with Pearson's coefficient for quantitative variables; correlation between each individual item and total RhinoQOL-pv sub-scale scores was tested with Spearman's coefficient.

The change in scores between baseline and three month follow-up was assessed using Student's *t*-test for paired samples. Responsiveness was also assessed by measuring the magnitude of the effect, which is the mean value of variation of the scores divided by the standard deviation of the initial values. By convention, an effect magnitude between 0.2 and 0.5 is considered a "mild" improvement; between

**Table 2** Distribution of patients according to sex and type of CRS.

	CRSwNP	CRSsNP	Total
Male	20	10	30
Female	18	10	28

CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSsNP, chronic rhinosinusitis without nasal polyps.

0.5 and 0.8, "moderate" improvement; and greater than 0.8, a "large" improvement in quality of life.<sup>6</sup>

### Results

The sample consisted of 58 patients, 30 men and 28 women. Mean age was  $48.48 \pm 11.703$  years (range, 25–69 years). Thirty-eight patients suffered from CRSwNP. Cases are distributed according to Table 2.

Five patients (8.6%) answered "yes" to the question about difficulty of interpretation of the items. On average, the questionnaire took  $5.53 \pm 1.127$  min (range, 4–8 min) to complete. Fifty-six patients (96.6%) reported that the RhinoQOL-pv was not too long to complete.

Internal consistency (Cronbach's  $\alpha$ ) was 0.77, 0.88, and 0.56 for the frequency, impact, and bothersomeness scores, respectively.

As depicted in Table 3, male sex was associated with lower total score in the Symptom Impact Scale than female sex (Student's *t*-test significance = 0.018). Moreover, CRSwNP was associated with higher frequency scale scores than CRSsNP (Student's *t*-test significance = 0.009) (Table 4).

Mean Lund–Mackay global score was  $13.52 \pm 4.94$  (range, 4–23). Patients with CRSwNP presented with higher Lund–Mackay scores compared to patients with CRSsNP (Table 5). A modest positive correlation ( $r = 0.380$ ) was obtained between the symptom frequency sub-scale of the

**Table 3** Total score by sex for each sub-scale.

Sex	n	Frequency scale		Impact scale		Bothersomeness scale	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Male	30	14.71	5.01	17.60	4.66	13.07	6.31
Female	28	12.93	4.24	22.71	9.97	15.46	6.41
Significance ( $\alpha = 0.05$ )		0.149		0.018		0.157	

**Table 4** Total score by type of CRS for each sub-scale.

	n	Frequency scale		Impact scale		Bothersomeness scale	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
CRSwNP	38	14.79	5.10	19.37	6.72	14.95	7.15
CRSsNP	20	11.90	3.02	21.40	10.18	12.85	4.56
Significance ( $\alpha = 0.05$ )		0.009		0.428		0.180	

CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRSsNP, chronic rhinosinusitis without nasal polyps.

**Table 5** Lund–Mackay total score by type of CRS.

	n	Mean	SD	Significance ( $\alpha = 0.05$ )
CRS <sub>w</sub> NP	38	15.89	3.965	<0.001
CRS <sub>s</sub> NP	20	9.00	3.112	

CRS<sub>w</sub>NP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRS<sub>s</sub>NP, chronic rhinosinusitis without nasal polyps.

RhinoQOL-pv and the total Lund–MacKay score ( $p = 0.003$ ). No association with other sub-scales was identified.

Scores of every individual item of the RhinoQOL-pv correlated significantly with total score of each sub-scale, as shown in Table 6.

Scores on each sub-scale at baseline and three month follow-up are shown in Table 7. There was a significant decrease from baseline for all sub-scale scores, indicating clinical improvement. At three months, the effect size in all patients was considered large for all sub-scales (Table 8).

**Discussion**

Clinical evaluation of CRS, with and without nasal polyps, is essentially focused on patient complaints of nasal blockage and discharge, facial pain/pressure, and reduction or loss of smell, with objective evidence of disease demonstrated by endoscopy or CT. There is a wide range of additional assessment tools; most of them are mainly used for research purposes.<sup>1</sup>

Questionnaires that integrate patient reported symptoms and their impact on HRQL are increasingly useful, and their use is now becoming a routine procedure in the assessment of patients with rhinosinusitis. To date, the only validated Portuguese version of such questionnaires published in international literature is the translated version of the Sinonasal Outcome Test (SNOT-22).<sup>14</sup>

**Table 6** Spearman coefficient and significance (two-tailed) for correlation between individual items and total score of each sub-scale of the RhinoQOL-pv ( $\alpha = 0.05$ ).

Sub-scale of RhinoQOL	Item	Spearman	Significance
Frequency	1	0.489	<0.001
	2	0.605	<0.001
	3	0.907	<0.001
	4	0.838	<0.001
	5	0.763	<0.001
Impact	1	0.739	<0.001
	2	0.689	<0.001
	3	0.676	<0.001
	4	0.643	<0.001
	5	0.390	0.002
Bothersomeness	6	0.844	<0.001
	7	0.834	<0.001
	8	0.663	<0.001
	9	0.653	<0.001
Bothersomeness	1	0.675	<0.001
	2	0.670	<0.001
	3	0.829	<0.001

The RhinoQOL is a new questionnaire that showed validity and responsiveness comparable to the RSOM-31 and SNOT instruments, and demonstrated excellent responsiveness to change over time associated with surgery.<sup>9</sup> The RhinoQOL-pv proved to be an adequate translation of the English version as shown by similar internal consistency as the original questionnaire for each sub-scale (Table 9), and strong correlation between individual items and total score. In addition, patients to whom the RhinoQOL-pv was administered did not experience major difficulties.

Of the variables tested, sex was associated with differences in the total score of the impact sub-scale of the RhinoQOL-pv, with men presenting statistically significant

**Table 7** Responsiveness: scores at baseline and at three-month postoperative follow-up ( $\alpha = 0.05$ ).

RhinoQOL sub-scales	Baseline			Three-month follow-up			p-Value
	n	Mean	SD	n	Mean	SD	
Frequency	58	13.79	4.67	58	8.79	2.19	<0.001
Impact	58	20.07	8.05	58	12.95	4.35	<0.001
Bothersomeness	58	14.22	6.42	58	5.31	3.81	<0.001

**Table 8** Responsiveness: magnitude of effect – total sample and by type of CRS.

RhinoQOL sub-scales	(Mean <sub>baseline</sub> – Mean <sub>3month</sub> )/SD <sub>baseline</sub>			Improvement in QOL
	Total	CRS <sub>w</sub> NP	CRS <sub>s</sub> NP	
Frequency	1.07	1.19	0.99	Large
Impact	0.88	0.95	0.83	Large
Bothersomeness	1.39	1.31	1.77	Large

QOL, quality of life; CRS<sub>w</sub>NP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CRS<sub>s</sub>NP, chronic rhinosinusitis without nasal polyps.

**Table 9** Internal consistency reliability – Cronbach's  $\alpha$ .

	RhinoQOL (original) <sup>9</sup>	RhinoQOL-pv
Cronbach's $\alpha$ [Frequency]	0.68	0.77
Cronbach's $\alpha$ [Impact]	0.89	0.88
Cronbach's $\alpha$ [Bothersomeness]	0.57	0.56

lower scores. This finding raises the question whether levels of reported distress may reflect higher levels of comorbid anxiety disorders known to be more prevalent in women.<sup>15</sup> Also, patients with CRSwNP showed significant higher frequency sub-scale scores compared to patients without nasal polyps, but without any statistically significant differences in bothersomeness and impact sub-scale scores, suggesting that tolerability to disease is not different in the two conditions.

Although many studies have demonstrated lack of correlation between patient rated measures of symptom severity in CRS and objective measures,<sup>1</sup> a significant yet modest positive correlation was verified between the symptom frequency sub-scale and the radiological Lund-Mackay scoring system.

Score changes from baseline to the three-month postoperative follow-up showed that the RhinoQOL-pv is a useful tool in the assessment of ESS results, with good responsiveness to change. In fact, interpretation of raw data from the RhinoQOL-pv in a single (static) moment of time may prove to be difficult, as results are not intuitively inferred; however, interpretation of differences before and after surgical treatment appeared to be much easier to perceive.

## Conclusion

The RhinoQOL-pv can be used for Portuguese speaking patients with CRS as an equivalent of the original English version, because they have similar face and content validity. This study provides an instrument with good responsiveness to change, which could be especially valuable to measure the outcome of ESS.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. The European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinology*. 2012; Suppl. 23:1-299.
2. Piccirillo JF. Psychometric and clinimetric validity of the 31-item rhinosinusitis outcome measure. *Am J Rhinol*. 1995;9:297-306.
3. Anderson ER, Murphy MP, Weymuller EA Jr. Clinimetric evaluation of the Sinonasal Outcome Test-16. Student Research Award 1998. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;121:702-7.
4. Piccirillo JF, Merritt MG Jr, Richards ML. Psychometric and clinimetric validity of the 20-Item Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-20). *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;126:41-7.
5. Hopkins C, Browne J, Slack R, Lund V, Topham J, Reeves B, et al. The national comparative audit of surgery for nasal polyposis and rhinosinusitis. *Clin Otolaryngol*. 2006;31:390-8.
6. Hopkins C, Gillett S, Slack R, Lund VJ, Browne JP. Psychometric validity of the 22-item Sinonasal Outcome Test. *Clin Otolaryngol*. 2009;4:447-54.
7. Benninger MS, Senior BA. The development of the Rhinosinusitis Disability Index. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123:1175-9.
8. Atlas SJ, Gallagher PM, Wu YA, Singer DE, Gliklich RE, Metson RB, et al. Development and validation of a new health-related quality of life instrument for patients with sinusitis. *Qual Life Res*. 2005;14:1375-86.
9. Atlas SJ, Metson RB, Singer DE, Wu YA, Gliklich RE. Validity of a new health-related quality of life instrument for patients with chronic sinusitis. *Laryngoscope*. 2005;115:846-54.
10. Marro M, Mondina M, Stoll D, de Gabory L. French validation of the NOSE and RhinoQOL questionnaires in the management of nasal obstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;144:988-93.
11. van Oene CM, van Reij E, Sprangers MA, Fokkens WJ. Quality-assessment of disease-specific quality of life questionnaires for rhinitis and rhinosinusitis: a systematic review. *Allergy*. 2007;62:1359-71 [Review].
12. Messerklinger W. *Endoscopy of the nose*. Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1978.
13. Lund V, Mackay I. Staging of rhinosinusitis. *Rhinology*. 1993;31:183-4.
14. Kosugi E, Chen V, Fonseca V, Cursino M, Neto J, Gregório L. Translation, cross-cultural adaptation and validation of Sinonasal Outcome Test (SNOT) – 22 to Brazilian Portuguese. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011;77:663-9.
15. Merikangas KR. Anxiety disorders: epidemiology. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. *Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry*. 8th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

**8.**

**DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÕES**



A investigação científica na RSC tem-se acompanhado de importantes avanços e descobertas, tanto na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à doença, como na apresentação de novas opções terapêuticas, médicas e cirúrgicas, que têm melhorado substancialmente a qualidade de vida dos doentes.

No entanto, apesar de todo o esforço e investimento já realizado, estamos ainda longe de atingir um conhecimento satisfatório a vários níveis: epidemiologia, fatores desencadeantes e predisponentes da doença, patofisiologia, e desenvolvimento de tratamentos específicos e dirigidos. Por outro lado, a própria avaliação clínica dos doentes com RSC e os sistemas de estadiamento existentes são ainda incapazes de permitir uma abordagem global, que integre os dados objetivos (do exame físico, endoscopia nasal e imagiologia) com as queixas subjetivas do doente e seu impacto na qualidade de vida.

O trabalho por nós desenvolvido, que compreende uma abordagem de investigação multinível, com trabalho de campo ao nível epidemiológico, clínico e também das ciências básicas, teve como propósito contribuir para responder a algumas destas questões.

O estudo de prevalência de pólipos nasais no cadáver, na região Norte de Portugal, é um estudo que, por ser baseado na endoscopia, vem acrescentar dados objetivos sobre um assunto em que existe falta de informação confiável a nível mundial. Através dele foram obtidos em Portugal os primeiros resultados epidemiológicos credíveis sobre a prevalência da polipose nasal. No entanto, para o futuro, seria desejável o desenvolvimento de um estudo populacional, multicêntrico, baseado na endoscopia, semelhante aos estudos realizados na Coreia<sup>124</sup> e na Suécia<sup>14</sup>, para uma correta caracterização epidemiológica da RSC em Portugal. Um estudo deste tipo permitiria definir as áreas de maior prevalência e determinar fatores de risco ambientais e/ou ocupacionais e co-morbilidades associadas à RSC. Por outro lado, permitiria também a caracterização da prevalência da doença segundo o escalão etário, uma vez que, embora tenha sido sugerido que a frequência da RSCcPN aumenta com a idade<sup>14,125,126</sup>, este tema carece ainda de maior esclarecimento. Finalmente, tornaria possível desenvolver estratégias públicas apropriadas de combate e prevenção da RSC.

No que respeita à investigação fisiopatológica da RSC, este trabalho aborda o problema de um ângulo até agora inexplorado, concentrando-se na possível regulação central da resposta inflamatória nas doenças inflamatórias nasossinusais. A tendência de investigação atual na RSC tem sido a de colocar o foco nos fatores de ação local na mucosa, como sejam os agentes

infeciosos, a função ciliar, a alergia, e outros, procurando determinar em que medida a sua interação com as células de resposta inata e adaptativa do hospedeiro induz um estado de inflamação crónica, que culmina na remodelação tecidual.

No entanto, os estudos realizados nos últimos anos revelaram que a transmissão colinérgica tem a capacidade de modificar vários aspetos da resposta imune e que o sistema imunitário não pode mais ser visto como completamente autónomo<sup>94</sup>. Foi mostrado que a acetilcolina exibe uma ação anti-inflamatória, através de uma ação autócrina/parácrina (as células do sistema imunitário são capazes de secretar acetilcolina) e através da estimulação nervosa<sup>93,127</sup>. O efeito protetor da “via colinérgica anti-inflamatória”, mediada pelo nervo vago, requer a ativação do recetor  $\alpha 7$ nACh e é um exemplo de como os potenciais de ação originados nos neurónios modulam continuamente o sistema imune.

A grande maioria dos resultados apresentados sobre o “reflexo inflamatório” refere-se a estudos de experimentação animal<sup>94,97,128-130</sup>. Contudo, foram recentemente publicados estudos em células humanas que pretendem explorar a ação do  $\alpha 7$ nAChR nas doenças inflamatórias crónicas sistémicas.

Um estudo, que utilizou biópsias humanas de tecido adiposo, reportou uma diminuição da expressão de ARNm e também da expressão proteica do  $\alpha 7$ nAChR nos doentes obesos em comparação com os indivíduos de peso normal; a severidade da inflamação tipicamente observada na obesidade poderá assim relacionar-se com uma via colinérgica anti-inflamatória hipofuncionante<sup>131</sup>. Os autores realizaram também a estimulação *in vitro* dos adipócitos com o agonista específico PNU282987, tendo observado um efeito anti-inflamatório significativo (redução de IL6, MCP-1 e TNF $\alpha$ ), e concluído que o  $\alpha 7$ nAChR modula a expressão de genes inflamatórios nos adipócitos humanos.

Um outro trabalho mostrou que o recetor  $\alpha 7$ nACh se encontrava aumentado em células imunes de mulheres infetadas com VIH<sup>132</sup>. Os autores especulam que o estado de inflamação crónica existente nos pacientes VIH+ se pode dever a uma disrupção da via colinérgica anti-inflamatória causada pela proteína do envelope do VIH gp120IIIB. Foi verificado que, apesar do aumento da expressão do recetor  $\alpha 7$ , este é incapaz de inibir a libertação de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos, existindo assim uma associação paradoxal entre inflamação crónica e expressão aumentada do  $\alpha 7$ nAChR.

Estes estudos colocam em evidência a complexidade da resposta inflamatória tecidual e os vários níveis a que esta pode ser modulada; no caso dos doentes obesos, o estado de inflamação parece resultar de uma via colinérgica anti-inflamatória hipofuncionante por défice da expressão dos recetores; no caso das doentes com VIH, a inflamação crónica associa-se a ausência de efeito anti-inflamatório apesar da expressão aumentada do recetor  $\alpha 7$ nACh.

É interessante verificar que também no nosso estudo, em doentes com RSC, se observou um aumento da expressão proteica do recetor  $\alpha 7nACh$  num estado de inflamação crónica (RSCcPN e RSCsPN). Este resultado é significativo uma vez que identifica uma alteração previamente desconhecida e aponta para a existência e relevância de uma via colinérgica anti-inflamatória no nariz. Serão necessários mais estudos para definir, com certeza, a anatomia funcional dessa via colinérgica intranasal e para determinar se estamos perante uma resposta fisiológica a um ambiente de inflamação crónica que induz um aumento da atividade da via colinérgica anti-inflamatória ou, pelo contrário, se o aumento da expressão do  $\alpha 7nAChR$  não se acompanha de uma resposta anti-inflamatória, por disrupção da via colinérgica na RSC por um mecanismo ainda desconhecido.

O trabalho que apresentamos constitui, assim, o primeiro passo para a necessária elucidação e possível exploração terapêutica dos mecanismos centrais de regulação da resposta inflamatória na RSC. No futuro, terá de ser estudada a atividade funcional do  $\alpha 7nAChR$  nas células da mucosa nasal a nível basal, e após ativação por via neural (i.e. nervo facial) ou por estimulação local com agonistas e antagonistas, em indivíduos normais e doentes. Estes estudos poderão avaliar potenciais efeitos sinérgicos dos agonistas  $\alpha 7nAChR$  com a corticoterapia, que é hoje o tratamento de primeira linha na RSC.

A possível administração tópica de novos fármacos, moduladores da resposta inflamatória pela ativação do  $\alpha 7nAChR$ , constitui ainda uma “vantagem” da patologia inflamatória nasossinusal relativamente a outras doenças de atingimento mais geral, que exigirão fármacos de distribuição sistémica, mais difíceis de obter. Assim, o modelo humano de estudo dos mecanismos colinérgicos na RSC poderá ser o mais apropriado para elucidar e explorar os mecanismos de regulação central do sistema imunitário, com possível impacto terapêutico nas doenças inflamatórias, nasossinusais e sistémicas.

Com a validação da versão portuguesa do RhinoQOL, ficou disponível um questionário em língua portuguesa, breve e fácil de usar, específico para rinossinusite, e que avalia o que o doente sente relativamente à sua doença e o impacto da mesma no seu dia a dia. É um instrumento que pode e deve ser utilizado na avaliação de rotina do doente com rinossinusite, tratado médica e/ou cirurgicamente, pois permite detetar diferenças na qualidade de vida entre pacientes num determinado momento (é um instrumento discriminativo) e detetar diferenças longitudinais no mesmo paciente ao longo tempo (antes e após o tratamento).

Uma das maiores limitações na abordagem inicial do doente com RSC é a inexistência de uma ferramenta de avaliação que apresente boa correlação entre os dados objetivos do exame

físico, endoscópico e imagiológico e as queixas do doente e a interferência das mesmas na sua qualidade de vida<sup>2</sup>. Em consonância com isso mesmo, verificámos uma correlação apenas modesta entre a subescala de frequência de sintomas da versão portuguesa do RhinoQOL e o *score* imagiológico de Lund-Mackay, sendo que as restantes subescalas não evidenciaram qualquer correlação. A investigação futura deverá centrar-se neste campo, por forma a permitir uma avaliação clínica integrada, objetiva e subjetiva, do doente com RSC.

Em conclusão, com este trabalho obtiveram-se novos dados sobre a prevalência da RSC em Portugal e abriu-se uma nova perspetiva na investigação etiopatogénica desta doença, que terá de ser corroborada e desenvolvida no futuro. Foi ainda disponibilizada a versão portuguesa de um questionário de qualidade de vida para uso de rotina nos doentes com rinossinusite crónica. Em última análise, os resultados apresentados poderão ter um impacto significativo na qualidade do tratamento oferecido aos doentes com RSC.

**9.**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe – an underestimated disease. A GA2LEN study. *Allergy* 2011; 66: 1216-1223.
2. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. The European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinology* 2012; 50 (Suppl 23): 1-299.
3. Meltzer EO, Hamilos DL. Rhinosinusitis diagnosis and management for the clinician: a synopsis of recent consensus guidelines. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic* 2011; 86:427-43.
4. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, et al. Clinical Practice Guideline (Update): Adult Sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 152 (2 Suppl):S1-S39.
5. Rank MA, Adolphson CR, Kita H. Antifungal therapy for chronic rhinosinusitis: the controversy persists. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9:67-72.
6. Atlas SJ, Gallagher PM, Wu YA, Singer DE, Gliklich RE, Metson RB, et al. Development and validation of a new healthrelated quality of life instrument for patients with sinusitis. *Qual Life Res* 2005; 14: 1375-86.
7. Atlas SJ, Metson RB, Singer DE, Wu YA, Gliklich RE. Validity of a new healthrelated quality of life instrument for patients with chronic sinusitis. *Laryngoscope* 2005; 115: 846–54.
8. Metson RB, Gliklich RE. Clinical outcomes in patients with chronic sinusitis. *Laryngoscope* 2000; 3:24-28.
9. Bousquet J, Bachert C, Canonica GW, Casale TB, et al. Unmet needs in severe chronic upper airway disease (SCUAD). *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 428-33.
10. Hughes RG, Jones NS. The role of nasal endoscopy in outpatient management. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1998; 23:224-6.
11. Bhattacharyya N. Clinical and symptom criteria for the accurate diagnosis of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006; 116(7 Pt 2 Suppl 110):1-22.
12. Shashy RG, Moore EJ, Weaver A. Prevalence of the chronic sinusitis diagnosis in Olmsted County, Minnesota. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 320-3.
13. Bonfils P, Halimi P, Le Bihan C, Nores JM, Avan P, Landais P. Correlation between nasosinus symptoms and topographic diagnosis in chronic rhinosinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005; 114: 74-83.
14. Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melen I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skovde population based study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112: 625-629.
15. DeMarcantonio MA, Han JK. Nasal polyps: pathogenesis and treatment implications. *Otolaryngol Clin North Am* 2011; 44: 685-95.
16. Akdis CA, Bachert C, Cingi C, et al. Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and

- the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:1479-90.
17. Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:155-212.
  18. Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, Hamilos DL, Jacobs M, Kennedy DW, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129(suppl):S1-32.
  19. Larson DA, Han JK. Microbiology of sinusitis: does allergy or endoscopic sinus surgery affect the microbiologic flora? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;19:199-203.
  20. Akdis M, Simon HU, Weigl L, Kreyden O, Blaser K, Akdis CA. Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD81 T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol* 1999;163:466-75.
  21. Patou J, Gevaert P, Van Zele T, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:110-5.
  22. Van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: Inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:728-32.
  23. Shimizu T, Suzaki H. Past, present and future of macrolide therapy for chronic rhinosinusitis in Japan. *Auris Nasus Larynx* 2015 Oct 1. pii: S0385-8146(15)00214-X. doi: 10.1016/j.anl.2015.08.014. [Epub ahead of print]
  24. Psaltis AJ, Weitzel EK, Ha KR, Wormald PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol* 2008; 22:1-6.
  25. Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M. Biofilm formation by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134:991-6.
  26. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin proc* 1999; 74:877-84.
  27. Braun H, Buzina W, Freudenschuss K, Beham A, Stammberger H. 'Eosinophilic fungal rhinosinusitis': a common disorder in Europe? *Laryngoscope* 2003; 113 :264-9.
  28. Psaltis AJ, Bruhn MA, Ooi EH, Tan LW, Wormald PJ. Nasal mucosa expression of lactoferrin in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2007; 117:2030-5.

29. Tewfik MA, Latterich M, DiFalco MR, Samaha M. Proteomics of nasal mucus in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2007; 21:680-5.
30. Richer SL, Truong-Tran AQ, Conley DB, Carter R, Vermylen D, Grammer LC, et al. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Am J Rhinol* 2008; 22:228-34.
31. Seshadri S, Lin DC, Rosati M, Carter RG, Norton JE, Kato A, et al. Reduced expression of antimicrobial palate, lung and nasal epithelial clone (PLUNC) protein in polyps from patients with chronic rhinosinusitis is due to decreased number of glands [abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: AB141.
32. Tieu DD, Peters AT, Carter RG, Suh L, Conley DB, Chandra R, et al. Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 667-75.
33. Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* 2008; 22: 549-59.
34. Peters AT, Kato A, Zhang N, Conley DB, Suh L, Tancowny B, et al. Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 397-403.
35. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 2007; 357: 1608-19.
36. Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: The regulation of tight junctions by IFN-gamma and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 1087-96.
37. Kast JI, Wanke K, Soyka MB, Wawrzyniak P, Akdis D, Kingo K, et al. The broad spectrum of interepithelial junctions in skin and lung. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130:544-7.
38. Basinski TM, Holzmann D, Eiwegger T, Zimmermann M, Klunker S, Meyer N, et al. Dual nature of T cell-epithelium interaction in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:74-80.
39. Richer SL, Truong-Tran AQ, Conley DB, Carter R, Vermylen D, Grammer LC, et al. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Am J Rhinol* 2008; 22: 228-34.
40. Schleimer RP, Kato A, Peters A, Conley D, Kim J, Liu MC, et al. Epithelium, inflammation, and immunity in the upper airways of humans: studies in chronic rhinosinusitis. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6:288-94.
41. Zhang N, Holtappels G, Gevaert P, Patou J, Dhaliwal B, Gould H, et al. Mucosal tissue polyclonal IgE is functional in response to allergen and SEB. *Allergy* 2011; 66:141-8.

42. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol* 2011;29:273-93.
43. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 2010; 28:445-89.
44. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 505-18.
45. Kato A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 2015; 64:121-30.
46. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediat Inflamm* 2013; 2013: 928315.
47. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 49–57.
48. Meyer N, Christoph J, Makrinioti H, Indermitte P, Rhyner C, Soyka M, et al. Inhibition of angiogenesis by IL-32: possible role in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 964-73.
49. Soyka MB, Treis A, Eiwegger T, Menz G, Zhang S, Holzmann D, et al. Regulation and expression of IL-32 in chronic rhinosinusitis. *Allergy* 2012; 67: 790-8.
50. Keswani A, Chustz RT, Suh L, Carter R, Peters AT, Tan BK, et al. Differential expression of interleukin-32 in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy* 2012; 67: 25-32.
51. Baraniuk JN. Neural control of human nasal secretion. *Pulm Pharmacol* 1991; 4: 20-31.
52. Baraniuk JN. Sensory, parasympathetic, and sympathetic neural influences in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90(6 Pt 2): 1045-50.
53. Baraniuk JN. Neurogenic Mechanisms in Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001; 1: 252–261.
54. Canning BJ. Neurology of allergic inflammation and rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2: 210–215.
55. Riccio MM, Proud D. Evidence that enhanced nasal reactivity to bradykinin in patients with symptomatic allergy is mediated by neural reflexes. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1252–1263.
56. Figueroa JM, Mansilla E, Suburo AM. Innervation of nasal turbinate blood vessels in rhinitic and nonrhinitic children. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1959–1966.
57. Sarin S, Udem B, Sanico A, Togias A. The role of the nervous system in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 999–1016.

58. Tai CF, Baraniuk JN. Upper airway neurogenic mechanisms. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 11–19.
59. Lucier GE, Egizii R. Characterization of cat nasal afferents and brain stem neurones receiving ethmoidal input. *Exp Neurol* 1989; 103: 83-9.
60. Anton F, Peppel P. Central projections of trigeminal primary afferents innervating the nasal mucosa: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 1991; 41: 617-28.
61. Wallois F, Gros F, Masmoudi K, Larnicol N. C-Fos-like immunoreactivity in the cat brainstem evoked by sneeze-inducing air puff stimulation of the nasal mucosa. *Brain Res* 1995; 687: 143-54.
62. Kenins P. Identification of the unmyelinated sensory nerves which evoke plasma extravasation in response to antidromic stimulation. *Neurosci Lett* 1981; 25: 137-41.
63. Lisney S, Bharali L. The axon reflex: an outdated idea or a valid hypothesis? *NIPS Proc* 1989; 4: 45-8.
64. Baraniuk J, Lundgren J, Goff J, Peden D, Merida M, Shelhamer J, et al. Gastrin-releasing peptide in human nasal mucosa. *J Clin Invest* 1990; 85: 998-1005.
65. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 1967; 31: 138-51.
66. Pernow B. Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J Immunol* 1985; 135: 812-5.
67. Lundberg J, Saria A. Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea. *Acta Physiol Scand* 1982; 115: 521-3.
68. Lundblad L, Lundberg J, Anggard A. Capsaicin sensitive substance-P nerves: antidromic vasodilation and increased vascular permeability in the nasal mucosa [abstract]. *Br J Pharmacol* 1982; 77:378P.
69. Lundblad L, Saria A, Lundberg J, Anggard A. Increased vascular permeability In rat nasal mucosa induced by substance P and stimulation of capsaicin-sensitive trigeminal neurons. *Acta Otolaryngol* 1983; 96: 479-84.
70. Lundblad L, Lundberg J, Anggard A. Local and systemic capsaicin pretreatment inhibits sneezing and the increase in nasal vascular permeability induced by certain chemical irritants. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 326: 254-61.
71. McDonald D. Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes and epithelial cells. *J Neurocytol* 1988; 17: 583-603.
72. McDonald D, Mitchell R, Gabella G, Haskell A. Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. *J Neurocytol* 1988; 17: 605-28.

73. Baraniuk J, Kaliner M. Neuropeptides and nasal secretion. *Am J Physiol* 1990; 261: 223-35.
74. Umeno E, Nadel J, McDonald D. Neurogenic inflammation of the rat trachea: fate of neutrophils that adhere to venules. *J Appl Physiol* 1990; 69: 2131-6.
75. Baluk P, Bertrand C, Geppetti P, McDonald D, Nadel J. NK1 receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1995; 268: L263-9.
76. James DE, Nijkamp FP. Neuro-immune interactions in the lung. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1309-19.
77. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004; 201: 167-80.
78. Bannister L, ed. Respiratory system. In: Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, Ferguson M, eds. *Gray's Anatomy*. 38<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone, 1995; p1627-1682.
79. Ruskell GL. Distribution of pterygopalatine ganglion efferents to the lacrimal gland in man. *Exp Eye Res*. 2004; 78: 329-335.
80. Ruskell GL. Orbital passage of pterygopalatine ganglion efferents to paranasal sinuses and nasal mucosa in man. *Cells Tissues Organs*. 2003; 175: 223–228.
81. Bleier BS, Schlosser RJ. Endoscopic anatomy of the postganglionic pterygopalatine innervation of the posterolateral nasal mucosa. *Int Forum Allergy Rhinol* 2011; 1: 113-7.
82. Kaliner M. The physiology and pathophysiology of the parasympathetic nervous system in nasal disease: an overview. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 1044-5.
83. Yao W, Sheikh S, Ottesen B, Jorgensen J. The effect of neuropeptides on vessel tone and cAMP production. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 805: 784-8.
84. Albuquerque EX, Pereira EFR, Castro NG, Alkondon M, Reinhardt S, Schroder H, Maelicke A. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1995; 757: 48-72.
85. Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 699–729.
86. Eglen RM. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem* 2005; 43: 105–136.
87. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 2004; 74: 363–396.
88. Wess J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 308-13.
89. Barnes P. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Eur Respir J* 1993; 6: 378-82.

90. Okayama M, Mullol J, Baraniuk J, Hausfeld J, Feldman B, Merida M, et al. Muscarinic receptor subtypes in human nasal mucosa: characterization, autoradiographic localization, and function in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 176-87.
91. Nakaya M, Yuasa T, Usui N. Immunohistochemical localization of subtypes of muscarinic receptors in human inferior turbinate mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111: 593-7.
92. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009; 89: 73–120.
93. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458–62.
94. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 418–28.
95. Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384–388.
96. Marrero MB, Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R. Application of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonists in inflammatory diseases: an overview. *Pharm Res* 2011; 28: 413–6.
97. Andersson U, Tracey KJ. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 313–35.
98. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev* 2012; 248: 188–204.
99. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2006; 203: 1623–1628.
100. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 11008–11013.
101. Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 1201–9.
102. Drisdell RC, Green WN. Neuronal  $\alpha$ -bungarotoxin receptors are  $\alpha 7$  subunit homomers. *J Neurosci* 2000; 20: 133–139.
103. Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL. Rat nicotinic ACh receptor  $\alpha 7$  and  $\beta 2$  subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 2002; 540: 425–434.

104. Palma E, Maggi L, Barabino B, Eusebi F, Ballivet M. Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the  $\alpha 7$  and  $\beta 3$  subunits. *J Biol Chem* 1999; 274: 18335–18340.
105. Yu CR, Role LW. Functional contribution of the  $\alpha 5$  subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurones. *J Physiol* 1998; 509: 667–681.
106. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 1113–1123.
107. Wang H, Liao H, Ochani M, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Med* 2004; 10: 1216–1221.
108. Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, et al. Modulation of TNF release by choline requires  $\alpha 7$  subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Mol Med* 2008; 14: 567–574.
109. Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, et al. Selective  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35: 1139–1144.
110. Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, et al. Stimulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the Toll-like receptor 4 expression in human monocytes. *Shock* 2006; 26: 358–364.
111. Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I- $\kappa$ B phosphorylation and nuclear factor- $\kappa$ B transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$ . *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 116–123.
112. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2–STAT3 signaling pathway. *Nature Immunol* 2005; 6: 844–851.
113. Razani-Boroujerdi S, Boyd RT, Davila-Garcia MI, et al. T cells express  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor subunits that require a functional TCR and leukocyte-specific protein tyrosine kinase for nicotine-induced  $Ca^{2+}$  response. *J Immunol* 2007; 179: 2889–2898.
114. Takahashi H K, Iwagaki H, Hamano R, et al. The immunosuppressive effects of nicotine during human mixed lymphocyte reaction. *Eur J Pharmacol* 2007; 559: 69–74.
115. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* 2002; 195: 781–788.
116. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology* 1993; 31: 183–4.
117. Lund VJ, Kennedy DW. Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1995; 167: 17-21.

118. Ryan WR, Ramachandra T, Hwang PH. Correlations between symptoms, nasal endoscopy, and in-office computed tomography in post-surgical chronic rhinosinusitis patients. *Laryngoscope* 2011; 121: 674–678.
119. Hopkins C, Browne J, Slack R, Lund V, Brown P. The Lund–Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 137: 555–61.
120. Psaltis AJ, Li G, Vaezeafshar R, Cho KS, Hwang PH. Modification of the Lund-Kennedy endoscopic scoring system improves its reliability and correlation with patient-reported outcome measures. *Laryngoscope* 2014; 124: 2216-23.
121. Dykewicz MS. 7. Rhinitis and sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl): S520-9.
122. Williams JW, Jr., Simel DL, Roberts L, Samsa GP. Clinical evaluation for sinusitis. Making the diagnosis by history and physical examination. *Ann Intern Med.* 1992; 117: 705-10.
123. Damm M, Quante G, Jungehuelsing M, Stennert E. Impact of functional endoscopic sinus surgery on symptoms and quality of life in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2002; 112: 310-5.
124. Min YG, Jung HW, Kim HS, Park SK, Yoo KY. Prevalence and risk factors of chronic sinusitis in Korea: results of a nationwide survey. *Eur ArchOtorhinolaryngol* 1996; 253: 435-439.
125. Grigoreas C, Vourdas D, Petalas K, et al. Nasal polyps in patients with rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23: 169-174.
126. Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 1996; 17: 231-236.
127. Reardon C, Duncan GS, Brüstle A, et al. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 1410-1415.
128. Santos CC, dos dos, Shan Y, Akram A, Slutsky AS, Haitsma JJ. Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 471–482.
129. Su X, Feng X, Terrando N, Yan Y, Chawla A, Koch LG et al. Dysfunction of inflammation-resolving pathways is associated with exaggerated postoperative cognitive decline in a rat model of the metabolic syndrome. *Mol Med Camb Mass* 2012; 18: 1481–1490.
130. Norman GJ, Morris JS, Karelina K, Weil ZM, Zhang N, Al-Abed Y et al. Cardiopulmonary arrest and resuscitation disrupts cholinergic anti-inflammatory processes: a role for cholinergic  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2011; 31: 3446–3452.
131. Canello R, Zulian A, Maestrini S, et al. The nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  in subcutaneous mature adipocytes: downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36: 1552-7.

132. Delgado-Vélez M, Báez-Pagán CA, Gerena Y, et al. The  $\alpha 7$ -nicotinic receptor is upregulated in immune cells from HIV-seropositive women: consequences to the cholinergic anti-inflammatory response. *Clin Transl Immunology* 2015; 4(12):e53.

**10.**  
**ANEXO**



Documento 1



To whom it may concern:

**RE: ORAL PRESENTATION AT ERS/ISIAN 2014**

We hereby confirm that the following oral presentation was presented at the **The 25th Congress of the European Rhinologic Society, in conjunction with the 32nd International Symposium on Infection and Allergy of the Nose**, which took place in Amsterdam, The Netherlands, 22-26 June, 2014.

**Title: “PREVALENCE OF NASAL POLYPS IN NORTHERN PORTUGAL - A CADAVER ENDOSCOPIC STUDY”**

**Authors participating in this work were listed as: R. Cerejeira<sup>1</sup>, R. Veloso-Teles<sup>2</sup>, N. Lousan<sup>1</sup>, C.P. Moura<sup>3</sup>.**

**Presented by: R. Cerejeira<sup>1</sup>**

Yours sincerely,

Niels Fundter  
Project Manager  
Kenes International



Documento 2



Prague, 19<sup>th</sup> June 2015

## CONFIRMATION

We hereby confirm that the following abstract was presented as an


**oral presentation**

at the 3<sup>rd</sup> Congress of European ORL-HNS, held in Prague, Czech Republic  
on 7-11 June 2015:

Title: CHRONIC RHINOSINUSITIS IS ASSOCIATED WITH  
INCREASED PROTEIN EXPRESSION OF ALPHA7NACHR:  
THE INTRANASAL CHOLINERGIC ANTI-INFLAMMATORY  
HYPOTHESIS

Authors: Cerejeira R., Fernandes S., Moura C. P. (Portugal)

On behalf of the Organizing Committee



Jan Betka, MD, DrSc, FCMA  
Professor of Otolaryngology  
Congress President ORL-HNS 2015

Congress Secretariat  
GUARANT International  
Na Pankráci 17, 140 21 Prague 4, Czech Republic, tel.: +420 284 001 444, fax: +420 284 001 448, e-mail: orl-hns2015@guarant.cz

Documento 3



Prague, 19<sup>th</sup> June 2015

## CONFIRMATION

We hereby confirm that the following abstract was presented as a

**poster**

at the 3<sup>rd</sup> Congress of European ORL-HNS, held in Prague, Czech Republic  
on 7-11 June 2015:

Title: THE PORTUGUESE VERSION OF RHINOQOL  
QUESTIONNAIRE: AN EASY CLINICAL OUTCOME  
ASSESSMENT TEST FOR ENDOSCOPIC SINUS SURGERY  
IN CHRONIC RHINOSINUSITIS

Authors: Cerejeira R., Veloso-Teles R., Lousan N., Moura C. P.  
(Portugal)

On behalf of the Organizing Committee



Jan Betka, MD, DrSc, FCMA  
Professor of Otolaryngology  
Congress President ORL-HNS 2015

Congress Secretariat  
GUARANT International

Na Pankráci 17, 140 21 Prague 4, Czech Republic, tel.: +420 284 001 444, fax: +420 284 001 448, e-mail: orl-hns2015@guarant.cz

Documento 4



Certificado de Apresentação de Poster

09.12.2014  
AUDITÓRIO CIM-FMUP

Certifica-se que  
**RUI ANTÓNIO SOARES CEREJEIRA**  
participou no **4º Encontro de Doutorandos da FMUP,**  
realizado no dia 9 de dezembro de 2014, onde apresentou o Poster intitulado  
**"PREVALENCE OF NASAL POLYPS IN NORTHERN PORTUGAL - A CADAVER  
ENDOSCOPIC STUDY"**

A Organização do 4º Encontro de Doutorandos

