



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELLEN CRISTINE DUARTE GARCIA

**PERDA OLFATÓRIA NA RINOSSINUSITE CRÔNICA:
ANÁLISE DO EPITÉLIO OLFATÓRIO**

Londrina
2021

ELLEN CRISTINE DUARTE GARCIA

**PERDA OLFATÓRIA NA RINOSSINUSITE CRÔNICA:
ANÁLISE DO EPITÉLIO OLFATÓRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri
Coorientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G216p Garcia, Ellen Cristine Duarte.
Perda olfatória na Rinossinusite Crônica: análise do epitélio olfatório / Ellen Cristine Duarte Garcia. - Londrina, 2021.
113 f. : il.

Orientador: Marco Aurélio Fornazieri.
Coorientador: Waldiceu Aparecido Verri Jr.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Olfato - Tese. 2. Rinossinusite crônica - Tese. 3. Biópsia - Tese. 4. Epitélio olfatório - Tese. I. Fornazieri, Marco Aurélio . II. Verri Jr, Waldiceu Aparecido. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 61

ELLEN CRISTINE DUARTE GARCIA

**PERDA OLFATÓRIA NA RINOSSINUSITE CRÔNICA:
ANÁLISE DO EPITÉLIO OLFATÓRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Antônio Marcelo Barbante Casella
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fábio de Rezende Pinna
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná-
PUCPR

Londrina, 09 de setembro de 2021.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela sua infinita bondade, a meu querido esposo e mãe pelos seus constantes apoio, amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Marco Aurélio Fornazieri por toda a dedicação e empenho para realização desse projeto, pela oportunidade de aprendizado e paciência no ensino.

Ao meu coorientador prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior pela oportunidade e apoio para realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente Ana Carolina Rossaneis Guidoni, Natália Medeiros Dias Lopes, Mariana Marques Bertozzi, Telma Saraiva dos Santos, Tiago H. Zaninelli, Daiane Silva Campaner e Simone Cristina Rocha, pela paciência e disposição em ajudar.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina pela estrutura oferecida e a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná pela bolsa concedida.

***“A persistência é o menor caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)***

GARCIA, Ellen Cristine Duarte. **Perda olfatória na rinossinusite crônica**: análise do epitélio olfatório. 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Introdução: Pacientes com Rinossinusite Crônica (RSC) frequentemente apresentam disfunção olfatória. As causas desse distúrbio não estão totalmente elucidadas, sendo que a descoberta de alterações epiteliais nesses pacientes pode possibilitar novas linhas de tratamento. **Objetivo:** avaliar a segurança da realização de biópsias de mucosa nasal e verificar possíveis alterações no epitélio olfatório de pacientes com RSC com e sem polipose com relação aos níveis de marcadores neuronais, presença de eosinófilos, estresse oxidativo, apoptose e sinalização do odor, correlacionando os achados epiteliais com o olfato. **Métodos:** Trinta e quatro indivíduos com diagnóstico de RSC com e sem polipose nasossinusal, assim como 24 indivíduos controles foram submetidos à biópsia do epitélio olfatório, questionários de Avaliação dos sintomas de obstrução nasal, Teste de desfecho sinonasal, Teste de Identificação do Olfato da Universidade da Pensilvânia e Pico de fluxo inspiratório nasal. As biópsias foram analisadas através de imuno-histoquímica e imunofluorescência, avaliando a neurônios totais, maduros e imaturos, de segundos mensageiros (cAMP e cGMP), receptor de acetilcolina M3, estresse oxidativo (nitrotirosina e iNOS), apoptose (caspase 3) e presença de eosinófilos. Foram utilizados os testes: Anova seguido de Bonferroni, Kruskal-Wallis seguido de Dunn, Qui-quadrado e coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman para análise estatística. **Resultados:** Não houve alteração na função olfatória unilateral e bilateral com a realização da biópsia em concha nasal superior. Os pacientes com RSC com e sem polipose tiveram uma pontuação do teste olfatório significativamente menor ($p = 0,001$). Não foi encontrada diferença entre a obstrução nasal entre os grupos. Não houve diferença significativa na expressão de nenhum dos marcadores avaliados. Porém, os grupos RSC com e sem pólipos apresentaram tendência a alteração de segundos mensageiros, apoptose, estresse oxidativo e eosinófilos. Houve uma correlação moderada negativa entre o cheiro e o GAP43 ($R = -0,5$, $p = 0,01$) e cGMP ($R = 0,5$, $p = 0,03$). **Conclusão:** Os dados mostram que a biópsia em concha nasal superior é segura para o olfato e que pacientes com RSC com e sem pólipos tendem a apresentar níveis mais elevados de estresse oxidativo e apoptose no epitélio olfatório e menor expressão de AMPc, o que pode levar à perda do olfato. Amostras maiores devem ser usadas para provar este mecanismo.

Palavras-chave: olfato; hiposmia; biópsia; estresse oxidativo; inflamação.

GARCIA, Ellen Cristine Duarte. **Olfactory loss in chronic rhinosinusitis: analysis of the olfactory epithelium.** 2021. 114 p. Thesis (Doctorate in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Introduction: Patients with Chronic Rhinosinusitis often present olfactory dysfunction. The causes of this disorder are not fully elucidated, and the discovery of epithelial changes in these patients may enable new lines of treatment. **Objective:** to assess the safety of performing nasal mucosa biopsies and to verify possible changes in the olfactory epithelium of patients with CRS with and without polyposis in the levels of neuronal markers, presence of eosinophils, oxidative stress, apoptosis and odor signaling, correlating the epithelial findings with the sense of smell. **Methods:** Thirty-four individuals diagnosed with CRS with and without nasosinusal polyposis, as well as 24 control individuals were submitted to olfactory epithelium biopsy, nasal obstruction symptom assessment questionnaires, sinonasal outcome test, University Smell Identification Test of Pennsylvania and Peak Inspiratory Nasal Flow. Biopsies were analyzed by immunohistochemistry and immunofluorescence, evaluating total, mature and immature neurons, second messengers (cAMP and cGMP), acetylcholine M3 receptor, oxidative stress (nitrotyrosine and iNOS), apoptosis (caspase 3) and presence of eosinophils. Anova followed by Bonferroni, Kruskal-Wallis followed by Dunn, Chi-square and Pearson or Spearman correlation coefficient were used for statistical analysis. **Results:** There was no alteration in the unilateral and bilateral olfactory function with the performance of the biopsy in the superior nasal concha. Patients with CRS with and without polyps had a significantly lower olfactory test score ($p = 0.001$). No difference was found between nasal obstruction between groups. There was no significant difference in the expression of any of the evaluated markers. However, the CRS with and without polyps groups showed possible changes in second messengers, apoptosis, oxidative stress and eosinophils. There was a correlation between smell and GAP43 ($R = - 0.5$, $p = 0.01$) and cGMP ($R = 0.5$, $p = 0.03$). **Conclusion:** The data show that the upper nasal concha biopsy is safe for smell and that patients with CRS with and without polyps tend to have higher levels of oxidative stress and apoptosis in the olfactory epithelium and lower expression of cAMP, which can lead to loss of smell. Larger samples should be used to prove this mechanism.

Key words: smell; hyposmia; biopsy; oxidative stress; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição do epitélio olfatório na cavidade nasal.....	15
Figura 2 – Componentes celulares do epitélio olfatório.....	16
ARTIGO 1	
Figura 1 – Olfactory mucosal biopsy technique.....	57
Figura 2 – Superior and inferior turbinate biopsies browned marked for olfactory marker protein	57
ARTIGO 2	
Figura 1 – Fluorescence emission intensity (gray scale in an area for of 0.02 mm ²).	69
Figura 2 – Immunofluorescence of the olfactory epithelium for neuronal, apoptosis and oxidative stress expression	71
Figura 3 – Immunofluorescence of the olfactory epithelium for eosinophilia, second messengers and acetylcholine receptor expression	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da função olfatória pelo teste olfatório	47
Tabela 2 – Lista de anticorpos primários	49
ARTIGO 1	
Tabela 1 – Methods of confirmation of olfactory epithelium	53
Tabela 2 – Patients' capacity to identify specific odorants before and after olfactory epithelium biopsy	54
ARTIGO 2	
Tabela 1 – List of primary antibodies	66
Tabela 2 – Description of the studied population	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
IF	Imunofluorescência
OMP	Proteína marcadora olfatória
SD	Desvio padrão
UPSIT	Teste de Identificação do Olfato da Universidade da Pensilvânia
RSC	Rinossinusite crônica
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL	Interleucina
NO	Óxido nítrico
ECP	Proteína catiônica eosinofílica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	OLFATO	14
2.1.1	Epitélio Olfatório	14
2.1.1.1	Localização e composição	14
2.1.1.2	Proteínas e neurotransmissores.....	17
2.1.1.3	Biópsia.....	20
2.1.1.4	Imunofluorescência	22
2.1.2	Alterações Olfatórias	23
2.1.2.1	Envelhecimento	24
2.1.2.2	Trauma	25
2.1.2.3	Infecção	26
2.1.2.4	Doenças neurodegenerativas e neurológicas	27
2.1.2.5	Doenças nasais	28
2.1.2.6	Testes olfatórios	30
2.2	RINOSSINUSITE	31
2.2.1	Rinossinusite Aguda.....	31
2.2.2	Rinossinusite Crônica.....	31
2.2.2.1	Alterações genéticas	32
2.2.2.2	Papel dos microrganismos	33
2.2.2.3	Sistema imunológico	33
2.2.2.3.1	<i>Estresse oxidativo</i>	34
2.2.2.3.2	<i>Mediadores inflamatórios</i>	36
2.2.2.4	Polipose nasal	39
2.2.2.5	Perda olfatória na Rinossinusite Crônica.....	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL.....	45
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46

4.1	PARTICIPANTES	46
4.2	PROCEDIMENTOS	46
4.2.1	Teste de Identificação do Olfato da Universidade da Pensilvânia	47
4.2.2	Imunohistoquímica	47
4.2.3	Imunofluorescência	48
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXOS	111
	ANEXO A- Questionário dados gerais.....	112
	ANEXO B- Questionário de inclusão	113
	ANEXO C- Termo de consentimento livre e esclarecido	114

1 INTRODUÇÃO

A rinossinusite crônica (RSC) é uma doença inflamatória que atinge milhares de pessoas em todo mundo (Fokkens *et al.*, 2020). Muitas dessas pessoas são afetadas por alteração do olfato, o que atrapalha sua qualidade de vida podendo alterar os hábitos alimentares e trazer preocupações com riscos, como vazamento de gás (Deems *et al.*, 1991; Miwa *et al.*, 2001). As causas da RSC ainda estão sendo estudadas, destacando-se algumas alterações genéticas (Kim *et al.*, 2004; Richer *et al.*, 2008), no microbioma (Abreu *et al.*, 2012), nos mecanismos associados ao estresse oxidativo (Fordham *et al.*, 2013) e em marcadores inflamatórios (Schlosser *et al.*, 2016). A perda do olfato nesses pacientes também tem causas variadas, sendo que nem todos os mecanismos são conhecidos até o momento. A obstrução nasal por pólipos ou edema pode trazer diminuição da capacidade olfatória (Pfaar *et al.*, 2006). Além disso, outros mecanismos vêm sendo estudados como padrões inflamatórios, deficiência na regeneração epitelial e alteração morfológica no epitélio olfatório (Andrew P. Lane *et al.*, 2010; Yee *et al.*, 2010; Chen, Reed and Lane, 2019).

Para estudo da RSC com perda olfatória, é necessária a realização de biópsia de mucosa nasal. Esse procedimento também é importante para investigação de outras doenças como Alzheimer e perda olfatória pós-infecciosa e pós-traumática (Seiden, 2004; Godoy *et al.*, 2018). Para isso, sua segurança deve ser testada em todos os perfis de pacientes, para que não haja prejuízos ao olfato.

Até o momento a presença de estresse oxidativo na mucosa nasal e alterações nas vias de sinalização, como segundos mensageiros e acetilcolina, não foram relacionadas a diminuição da capacidade olfatória e danos celulares no epitélio olfatório na RSC. Essa elucidação poderia contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia da doença e direcionar estudos para novas terapias para perda olfatória na RSC com menores efeitos colaterais que as terapias atuais com corticoides.

No presente estudo, amostras de epitélio olfatório de pacientes com RSC com e sem polipose foram comparadas com amostras de pacientes hígidos analisando seus componentes neuronais (neurônios olfatórios maduros e imaturos), vias de sinalização (segundos mensageiros e acetilcolina) e possíveis vias causadoras de danos epiteliais (apoptose, estresse oxidativo, presença de eosinófilos), correlacionando com a função olfatória para esclarecer o papel dessas vias na disfunção olfatória presente na RSC. Também foi verificada a segurança desse procedimento quanto a função olfatória total, unilateral e específica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OLFATO

O olfato é um sentido neurossensorial responsável pela percepção e distinção dos odores, composto pelos receptores olfatórios, bulbo olfatório, encéfalo e córtex cerebral (Moran *et al.*, 1982; Gottfried *et al.*, 2002; Gritti *et al.*, 2002; Johnson and Leon, 2007; Escada, 2013). As partículas odoríferas atingem o epitélio olfatório e se ligam aos receptores olfatórios presentes nos cílios dos neurônios olfatórios. Isso causa a despolarização desses neurônios que se comunicam com outros neurônios dentro do bulbo olfatório. Essas terminações nervosas se ramificam para o córtex olfativo e córtex orbitofrontal onde os odores são distinguidos (Doty, 2009a).

O sentido do olfato tem um papel muito importante no dia-a-dia dos indivíduos. Ele permite a interação entre os indivíduos com o meio, está envolvido com a qualidade de vida e fatores como a emoção e pode auxiliar na percepção de perigo, como em casos de vazamento de gás de cozinha e comida estragada (Deems *et al.*, 1991; Miwa *et al.*, 2001). O olfato também impacta na alimentação dos indivíduos. O sabor final sentido dos alimentos é derivado de um conjunto do sentido do paladar e olfato; portanto o olfato pode interferir na escolha e ingestão de alimentos (Deems *et al.*, 1991; Miwa *et al.*, 2001).

Além do papel fundamental do olfato no consumo de alimentos, um estudo em animais demonstrou um possível envolvimento do olfato também no balanço energético. Camundongos que tiveram os neurônios olfatórios sensoriais maduros (OSNs) suprimidos foram resistentes à obesidade induzida por dieta, acompanhada por aumento da termogênese em depósitos de gordura marrom e inguinal e melhora da resistência à insulina. O estímulo olfativo reduzido estimula a atividade nervosa simpática, resultando na ativação de receptores β -adrenérgicos em adipócitos brancos e marrons para promover a lipólise. Por outro lado, a ablação condicional do receptor IGF1 (fator de crescimento semelhante a insulina-1) em OSNs aumenta o desempenho olfativo em camundongos e leva ao aumento da adiposidade e resistência à insulina. Esses achados desvendam uma nova função para o sistema olfatório no controle da homeostase energética em resposta a sinais sensoriais e hormonais (Riera *et al.*, 2017).

2.1.1 Epitélio Olfatório

2.1.1.1 Localização e composição

O epitélio olfatório é um epitélio estratificado de revestimento especializado localizado principalmente na região póstero-superior da cavidade nasal (De Rezende Pinna *et al.*, 2013) com área estimada de 100-400 mm² (Leopold *et al.*, 2000). Estudos demonstram

maior quantidade de epitélio olfatório na concha superior e septo nasal (Féron *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000a; Leopold *et al.*, 2000; De Rezende Pinna *et al.*, 2013; Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016) mas também pode ser encontrado na concha média em menor quantidade (Leopold *et al.*, 2000; De Rezende Pinna *et al.*, 2013) (Figura 1).

Figura 1. Distribuição do epitélio olfatório na cavidade nasal

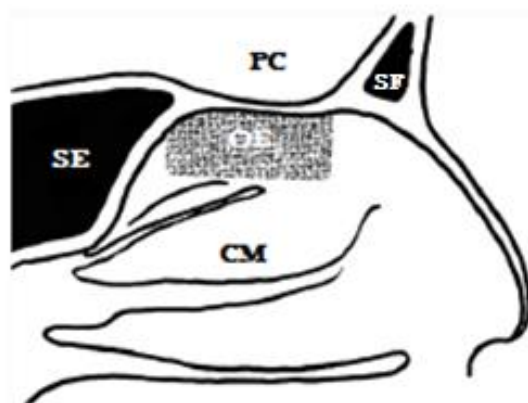


Imagem demonstrativa da principal área de localização do epitélio olfatório (OE) (região em cinza) entre a concha nasal superior e o septo nasal. CM: concha média, PC: placa cribiforme, SE: seio esfenoidal, SF: seio frontal.

Fonte: Modificado de (Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016).

Na cavidade nasal, além do epitélio olfatório também podem ser encontrados outros tipos de epitélio como o epitélio estratificado escamoso, encontrado na região do vestíbulo nasal, provável função de proteção; epitélio composto de células não ciliadas cuboides ou células colunares e basais, chamado de transição; epitélio respiratório com células caliciformes; epitélio associado ao sistema linfático com provável função de defesa, o linfoepitélio; e o epitélio olfatório, responsável pela ligação com as partículas odoríferas (Harkema, Carey and Wagner, 2006; Chen *et al.*, 2014).

O epitélio olfatório é composto pelas células basais, neurônios olfatórios maduros e imaturos, células microvilares e células de sustentação (Moran, Rowley 3rd and Jafek, 1982; Moran *et al.*, 1992; Yee *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2013). Figura 2).

Figura 2. Componentes celulares do epitélio olfatório

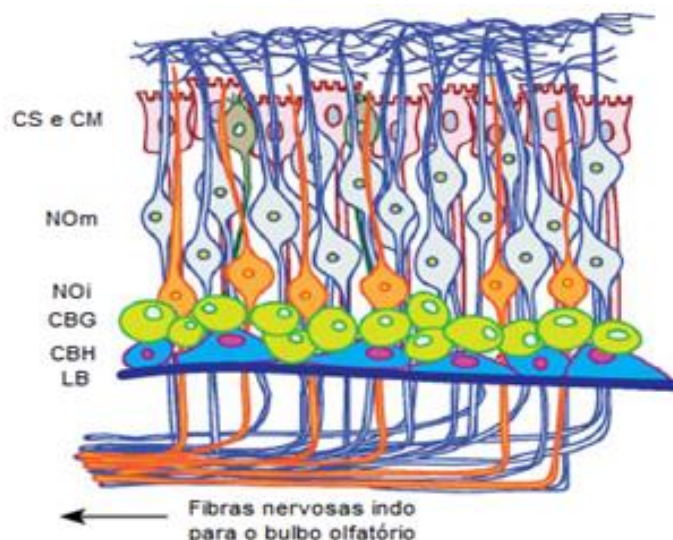


Ilustração do epitélio olfatório com seus componentes: neurônios olfatórios maduros (NOM) e imaturos (NOI), células basais globosas (CBG) e horizontais (CBH), células de sustentação (CS) e células microvilares (CM) e a lâmina basal (LB).

Fonte: Modificado de (Choi and Goldstein, 2018).

As células basais são as células responsáveis pela capacidade de regeneração desse epitélio, repondo células envelhecidas ou no caso de injúria no tecido (Huard *et al.*, 1998; Schwob and Ph, 2012). As células basais podem ser do tipo globosas que são constitutivamente ativas fazendo a reposição normal das células, sendo capazes de se diferenciar em qualquer uma das células presentes no epitélio, ou horizontais que são ativadas em casos de lesão, funcionando como células-tronco de reserva (Schnittke *et al.*, 2015). Outras células presentes no epitélio olfatório são as células de sustentação, que são células colunares que dão alicerce para o epitélio olfatório, tem função de fagocitose de células mortas e possui comunicação com os neurônios do epitélio (Jafek, 1983; Suzuki, Takeda and Farbman, 1996; Hegg, Irwin and Lucero, 2009) e as células microvilares ainda com função incerta (Chen *et al.*, 2014). Na lâmina própria do epitélio olfatório estão presentes glândulas de Bowman que secretam muco que auxilia as partículas odoríferas atingirem os receptores olfatórios (Jafek, 1983).

As células olfatórias são neurônios bipolares ciliados que contêm os receptores olfatórios (Douek, Bannister and Dodson, 1975) onde as partículas odoríferas que atingem o epitélio olfatório se ligam e são reconhecidas (Buck and Axel, 1991). Os axônios dos neurônios olfatórios penetram a lâmina basal do epitélio formando feixes nervosos na lâmina própria do tecido. Esses neurônios fazem sinapse com outros neurônios nos glomérulos do bulbo olfatório, transmitindo o estímulo odorífero para o sistema nervoso central (Mombaerts, 2004; Zou, Chesler and Firestein, 2009).

O epitélio olfatório dos mamíferos possui 4 regiões a partir da região dorsal para a ventral (zonas 1-4) na mucosa nasal (Vassar, Ngai and Axel, 1993; Sullivan *et al.*, 1996), sendo que os neurônios olfatórios se distribuem nessas zonas do epitélio olfatório de acordo com os tipos de receptores que apresentam (Ressler, Sullivan and Buck, 1993; Mombaerts, 2001). Em camundongos encontrou-se que esses receptores são específicos para determinados grupos de partículas odoríferas que possuem estruturas semelhantes e os variados odores são reconhecidos através de diferentes combinações de receptores (Malnic *et al.*, 1999; Nara *et al.*, 2011). Uma classificação para os receptores olfatórios é a primeira, que identifica odores solúveis em água (classe I) e a segunda, odores voláteis (classe II) (Freitag *et al.*, 1998). Na zona I do epitélio olfatório ocorre maior expressão gênica dos receptores olfatórios de classe I tendo pouca dos de classe II (Tsuboi *et al.*, 2006), já nas zonas 2-4 ocorre maior expressão dos genes dos receptores de classe II (Miyamichi *et al.*, 2005). Em humanos, a percepção dos odores também é irregular através do epitélio olfatório, onde cada odor estimula uma determinada região, sendo que odores do mesmo tipo (agradáveis ou desagradáveis) causam ativação em regiões compatíveis (Lapid *et al.*, 2011). Em estudo com animais mostrou-se que a identificação dos odores tem um mecanismo complexo, com interação e modulação da ativação dos receptores quando há o contato com conjunto de odores, em vez de odores individuais. Essa ativação neuronal não se soma somente no caso de vários odores, mas ocorre uma interação na ativação e interpretação dos cheiros (Xu *et al.*, 2020). O bulbo olfatório também está organizado em regiões e os axônios dos neurônios que expressam um mesmo tipo de receptor convergem para o mesmo glomérulo dentro do bulbo olfatório (Vassar *et al.*, 1994; Sullivan *et al.*, 1995).

2.1.1.2 Proteínas e neurotransmissores

Uma proteína encontrada no epitélio olfatório é a GAP-43 (proteína associada ao crescimento 43) que é responsável pelo crescimento de axônios dos neurônios (Benowitz and Routtenberg, 1997). Em animais foi demonstrado que o aumento da expressão do gene dessa proteína causa formação de conexões anormais (Aigner and Caroni, 1995). Também participa do crescimento neuronal no processo de regeneração do epitélio olfatório (Verhaagen *et al.*, 1990). Foi demonstrado em ratos que a proteína GAP-43 participa desde a formação embrionária do epitélio olfatório (Pellier *et al.*, 1994), no período neonatal, expressa em toda população de neurônios olfatórios e na fase adulta, onde se encontra apenas nos neurônios próximos a camada de células basais, incluindo os processos dendríticos periféricos e axonais (Verhaagen, 1989), sendo encontrada em neurônios olfatórios imaturos (Yee *et al.*, 2010) e feixes nervosos. Presente no citoplasma todo dos neurônios (axônios, dendritos e corpo celular) (Weiler and Benali, 2006).

A proteína marcadora olfativa (OMP) está presente no citoplasma dos neurônios olfatórios maduros tendo papel importante na cascata de detecção do estímulo odorífero e transdução desse sinal para o bulbo olfatório (Buiakova *et al.*, 1996). Também participa regulando essa transmissão, controlando níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Dibattista and Reisert, 2016). Essa proteína está presente nos corpos celulares, dendritos e axônios dos neurônios maduros no epitélio olfatório humano (Holbrook *et al.*, 2011). Um importante anticorpo utilizado para marcação do epitélio olfatório é o anti-proteína marcadora olfatória (anti-OMP) (Féron *et al.*, 1998; Leopold *et al.*, 2000; Witt *et al.*, 2009; Holbrook *et al.*, 2011; Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016). As regiões das células de suporte não ficam totalmente negativas pra marcação pela grande quantidade de dendritos que passam por elas (Weiler and Benali, 2006). Outro marcador neuronal para o epitélio olfatório é Tuj-1, anticorpo monoclonal anti-beta-tubulina III (proteína dos microtúbulos específica para neurônios). A beta-tubulina III está presente em corpos celulares, dendritos e axônios de todos os neurônios do epitélio, maduros e imaturos (Féron *et al.*, 1998; Witt *et al.*, 2009; Holbrook *et al.*, 2011; De Rezende Pinna *et al.*, 2013; Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016).

A acetilcolina é um neurotransmissor com importante papel na transmissão do sinal do odor, modulando a resposta dos receptores olfatórios aos estímulos odoríferos aumentando os níveis de cAMP (Li and Matsunami, 2011). O bulbo olfatório é uma região de suma importância no processamento do odor e seu volume tem relação com a função olfativa (Gudziol *et al.*, 2009). Essa região de neurogênese é altamente inervada com fibras colinérgicas (Zaborszky *et al.*, 1986). Em cultura de bulbo olfatório primário de ratos, a acetilcolina mostrou ter efeito sobre os receptores nicotínicos causando crescimento neurítico (Coronas *et al.*, 2000). Os receptores muscarínicos tipo 3 de acetilcolina estão presentes nos neurônios olfatórios e agem sinergicamente com os receptores de odorantes (Li and Matsunami, 2011). A acetilcolina e a substância P podem afetar o funcionamento das células receptoras olfatórias (Bouvet, Delaleu and Holley, 1988). Foi identificada uma deficiência de receptor de acetilcolina acompanhada de uma diminuição da função olfatória em pacientes com miastenia grave (Leon-Sarmiento *et al.*, 2012). Em pacientes com Parkinson as pontuações dos testes olfatórios estavam correlacionadas com a atividade da acetilcolinesterase em regiões cerebrais (formação hipocampal, amígdala e neocórtex) e com escores de medidas cognitivas. Esses achados indicam um possível mecanismo de perda olfatória nos pacientes com Parkinson moderadamente grave e indica uma possibilidade do uso de análise do olfato para identificação dos pacientes em risco de comprometimento cognitivo clinicamente significativo (Bohnen *et al.*, 2010). Já pacientes com RSC com e sem polipose tiveram maiores níveis de expressão de proteínas do receptor nicotínico alfa ($\alpha 7nACh$) em biópsias nasais (Cerejeira, Fernandes and Pinto Moura, 2016). Mais estudos investigando o papel da acetilcolina na patogênese da RSC devem ser realizados.

O primeiro passo na percepção olfatória se dá pela interação da partícula odorífera com os receptores olfatórios localizados nos cílios dos neurônios olfatórios (Buck and Axel, 1991). Esses receptores são acoplados a uma proteína G que ativa adenilato ciclase III, enzima que faz a conversão do AMP (monofosfato de adenosina) em cAMP (Bakalyar and Reed, 1990; Wong *et al.*, 2000). O estímulo odorífero também estimula a formação do cGMP (guanosina monofosfato cíclico), através da ativação da enzima guanilato ciclase. O aumento do cGMP não é imediato como do cAMP, podendo estar envolvido na dessensibilização olfatória (Zufall and Leinders-zufall, 1997) e na resposta a estímulos odoríferos fortes (Breer, Klemm and Boekhoff, 1992). O cGMP causa aumento do cAMP, que por sua vez regula negativamente a guanilato ciclase, limitando a síntese de cGMP (Moon *et al.*, 1998). A atividade da guanilato ciclase também é modulada positivamente pelo óxido nítrico (NO) (Breer, Klemm and Boekhoff, 1992). Devido ao menor índice de NO nasal presente em pacientes com RSC, os níveis de cGMP podem estar diminuídos nesses pacientes com a possibilidade de reversão pelo tratamento com corticosteroides. O aumento de cAMP (Brunet, Gold and Ngai, 1996) e cGMP no neurônio olfatório causa abertura dos canais e influxo de cálcio, geração do potencial de ação na membrana neuronal levando a sua despolarização e transmissão do sinal olfatório (Nakamura and Gold, 1987; Brunet, Gold and Ngai, 1996; Leinders-Zufall, Shepherd and Zufall, 1996). O cGMP mantém esses canais de cálcio abertos por mais tempo, causando uma diminuição da sensibilidade dos neurônios a estímulos odoríferos repetidos (Leinders-Zufall, Shepherd and Zufall, 1996). O cGMP e o cAMP também atuam como fatores de crescimento na mucosa olfatória, sendo essenciais para o desenvolvimento e funcionalidade dos neurônios olfatórios (Henkin, 2013). Em pacientes com hiposmia foi encontrado menor quantidade de cAMP e cGMP em amostras de muco nasal (Henkin and Velicu, 2011). Durante o estado inflamatório ocorre um aumento de prostaglandina E2 que através da ligação com o receptor EP3, leva a uma diminuição de cAMP e consequente perda da eficácia dos neurônios (Fukuiri *et al.*, 2012; Natura *et al.*, 2013). Pela RSC ser uma doença inflamatória, os níveis de cAMP podem estar diminuídos. Com o uso de glicocorticoide espera-se um retorno aos níveis normais de cAMP pela inibição da fosfolipase A2 e diminuição dos derivados do ácido araquidônico (incluindo a PGE2).

A apoptose é o processo de morte celular programada altamente regulado que exerce uma importante função no controle do número de células e tamanho dos tecidos, além de proteger o organismo de células potencialmente perigosas (Hengartner, 2000). No epitélio olfatório, a apoptose participa da renovação celular, podendo ocorrer em neurônios olfatórios na mucosa olfatória normal (Nakagawa *et al.*, 1996). As caspases são proteases constituídas por cisteína que desempenham um papel fundamental na apoptose, podendo ser iniciadores ou executoras dentro do processo de morte (Thornberry *et al.*, 1997). Dentre as diversas enzimas participantes, a caspase 3 é um importante componente por ser ativada em

ambas vias principais de apoptose (via mitocondrial e via receptor de morte) (Hengartner, 2000; Kern *et al.*, 2004) participando do desenvolvimento e maturação normal do epitélio olfatório (Cowan *et al.*, 2001). Em mucosa olfatória de pacientes com distúrbios olfatórios causados pela idade, trauma e sinusite, foram encontrados níveis aumentados de atividade da caspase-3 em relação ao tecido de indivíduos com função olfatória normal (Kern *et al.*, 2004).

2.1.1.3 Biópsia

O epitélio olfatório tem distribuição irregular pela cavidade nasal e pode ser danificado por infecções e pelo envelhecimento, dificultando os estudos desse tecido. (Lovell *et al.*, 1982; Nakashima *et al.*, 1984; Paik *et al.*, 1992; Leopold *et al.*, 2000; Holbrook *et al.*, 2011; Doty and Kamath, 2014). Para obtenção do epitélio olfatório normal ou em patologias para estudo de sua morfologia e funcionalidade é necessária a realização de uma biópsia, que é utilizada faz mais de 20 anos (B W Jafek *et al.*, 2002a). Além disso, a biópsia possibilita também análise dos axônios neuronais na lâmina própria do epitélio que pode ser utilizado para prever o estado do epitélio e a função olfatória (Holbrook, Leopold and Schwob, 2005).

Estudos consideraram a biópsia segura para o olfato dos indivíduos. A função olfatória total de pacientes, medida por testes de identificação do olfato antes e 6 semanas ou 3 meses após a realização da biópsia não foi alterada (Lanza *et al.*, 1994; Winstead *et al.*, 2005). A capacidade olfatória também não alterou-se quando comparados os resultados obtidos em dois grupos de pacientes com rinosinusite crônica (RSC), um deles submetido a biópsia e o outro não (Andrews *et al.*, 2016). Apesar dos estudos já realizados para verificação da segurança da realização da biópsia de epitélio olfatório, a manutenção da capacidade olfativa para odores específicos não foi avaliada.

A biópsia não tem uma técnica ou região padronizada como melhor parâmetro para coleta de epitélio olfatório (Féron *et al.*, 1998; Wrobel *et al.*, 2013; Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016) e as taxas de obtenção variam bastante (16 – 100%) de acordo com a técnica e região utilizada (Lane *et al.*, 2002; Say *et al.*, 2004; Holbrook, Leopold and Schwob, 2005; Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016).

As primeiras biópsias foram validadas em 1982 sem uso do endoscópio, realizadas utilizando o Instrumento de biópsia olfatória e solução de cocaína para vasoconstrução, encontrando epitélio em aproximadamente 17-25% das amostras de tecido. As amostras foram analisadas através de microscopia eletrônica e foram coletadas em região de septo nasal. Nesse estudo não fica recomendado o uso da biópsia na prática clínica

pela dificuldade da técnica e os riscos de penetrar a lâmina cribiforme e de hemorragia local (Lovell *et al.*, 1982).

Com o advento do endoscópio, houve uma diminuição nos riscos do procedimento e facilitou a realização de biópsias nasais. Isso também trouxe uma melhora nas taxas de obtenção de epitélio (59,5% em região de septo nasal). Foi utilizada anestesia local e o mesmo instrumento para biópsia e avaliação do tecido por microscopia eletrônica (Moran *et al.*, 1992). Também foi utilizada em outro estudo a pinça do tipo girafa para diminuir o sangramento local, obtendo resultados semelhantes ao instrumento de biópsia (Lanza *et al.*, 1993). Ainda na década de 90, foram obtidas taxas elevadas de epitélio olfatório (73% em concha superior e 76% em septo nasal) usando anestesia geral e pinça etmoide (Féron *et al.*, 1998). Outras pinças também já foram utilizadas, como a pinça em concha (42% de obtenção em concha média e 47% em septo nasal) (Leopold *et al.*, 2000) e a pinça Blakesley (61% de amostras de concha superior e septo nasal) (Lee *et al.*, 2000b). Usando pinça pediátrica Blakesley ou pinça de biópsia em concha de 3 mm, foi encontrado epitélio olfatório em 80% das amostras de septo nasal anterior, retirado com anestesia local (algodão ou angiocatéter flexível com mistura de lidocaína (2%) com oximetazolina (0,025%)) e endoscópio de 0 grau rígido e analisado por imunofluorescência (Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016). Também foi obtido epitélio olfatório de cadáveres através do uso de endoscópio, obtendo epitélio olfatório em 82,9% de concha superior e em 17,1% em concha média. A retirada post-mortem do material (de 2 a 12 horas) dificultou a reatividade do tecido na realização de imunohistoquímica (De Rezende Pinna *et al.*, 2013).

Para obtenção de células para cultivo, a substituição da pinça do tipo girafa pela de perfuração aumentou a taxa de 23% para 76% (Winstead *et al.*, 2005). Para o cultivo também podem ser obtidas células viáveis usando pinça etmoidal Takahashi e neuroendoscópio em região de septo nasal durante cirurgia (Miedzybrodzki *et al.*, 2006) e em região de concha média e septo superior posterior (98,8%) usando pinça em concha de 2 mm. Nesse estudo foi utilizado spray de lidocaína 1% + oximetazolina 0,05% e algodão embebido nessa solução e injetou-se epinefrina 1:100.000 na mucosa após 5 minutos. Indica-se o uso da concha média por mais facilidade de acesso e realização em ambulatório (Wrobel *et al.*, 2013).

2.1.1.4 Imunofluorescência

Após a coleta do epitélio olfatório através da biópsia da mucosa nasal, o tecido pode ser analisado por meio de diversas técnicas. A técnica histológica mais comum na rotina laboratorial, a coloração com hematoxilina e eosina (HE), pode ser utilizada para análise dos componentes epiteliais, como a morfologia e espessura das camadas celulares e a presença de feixes nervosos na lâmina basal (Yee *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2017). A imunohistoquímica também pode ser usada para esse fim, com a vantagem de ser mais específica pela utilização de anticorpos para marcação de componentes do epitélio, podendo diferenciar regiões de epitélio olfatório de outros tipos de epitélio na cavidade nasal, usando um marcador neuronal (Kern, 2000; Yee *et al.*, 2010; Holbrook *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2017). Além das técnicas histológicas, o epitélio olfatório pode ser analisado por meio de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas imunoenzimáticas como a enzima imunoensaio (ELISA) (Lavin *et al.*, 2017). Essas técnicas podem avaliar a expressão gênica no tecido e dosar proteínas específicas, respectivamente (Lavin *et al.*, 2017). Outra técnica que pode ser utilizada para análise do epitélio olfatório, é a imunofluorescência. Através dela pode-se avaliar a morfologia do tecido, diferenciar de outros epitélios, e além disso avaliar a expressão de proteínas (Winstead *et al.*, 2005; Andrew P. Lane *et al.*, 2010; Yee *et al.*, 2010; Holbrook *et al.*, 2011; Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016; Garcia *et al.*, 2017).

Desde de 1942, a imunofluorescência tem sido utilizada na análise tecidual (Coons *et al.*, 1942), podendo ser aplicada para estudo de proteínas (Coons, 1961), estudo de componentes intracelulares como complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1990), diagnóstico e estudo de diversas doenças como câncer, tuberculose e doenças autoimunes (Betterle and Zanchetta, 2012; Yang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018).

O princípio da técnica está baseado na aplicação de anticorpos no tecido acoplados com fluorocromos (corantes fluorescentes). Esses anticorpos se ligam a determinados componentes teciduais. Os fluorocromos absorvem a luz ultra-violeta e emitem em comprimento de onda específico, que são observados em microscópios apropriados, como o de fluorescência (Coons *et al.*, 1942) e confocal, que permite a análise tridimensional dos tecidos (Minsky, 1987). Os fluorocromos mais comuns são o isotiocianato de fluoresceína (FITC), o qual produz uma fluorescência verde-amarelada (The and Feltkamp, 1970) e o isotiocianato rodamina (TRICT) de coloração vermelha (Magde, Wong and Seybold, 2002).

Existem dois tipos de imunofluorescência de acordo com o tipo de anticorpo primário utilizado. Na imunofluorescência direta o anticorpo primário é conjugado com fluorocromo, sendo necessário somente ele para visualização da marcação (Coons *et al.*, 1942). Já a imunofluorescência indireta o anticorpo primário não emite fluorescência, sendo necessário a aplicação de um anticorpo secundário para se acoplar a ele e tornar possível a visualização dos locais onde o anticorpo se complexou (Donaldson, 2015). Na forma indireta, torna-se possível a utilização de anticorpos secundários com fluorescências diferentes, gerando uma imagem com cores distintas, dependendo da marcação. (Donaldson, 2015). Isso possibilita por exemplo a análise dos componentes do epitélio olfatório diferenciando-o dos outros tipos epiteliais ao mesmo tempo.

Para melhor visualização do tecido na imunofluorescência com boa marcação, alguns cuidados são necessários. Uma etapa importante é a coleta, sendo crucial um manejo delicado com a amostra a fim de não danificar o tecido e uma fixação rápida e correta para manter as características do mesmo. Outro ponto importante é a avaliação e padronização da diluição dos anticorpos, sendo que uso de controles de marcação é essencial para confirmação dos resultados (Donaldson, 2015).

2.1.2 Alterações Olfatórias

A perda da capacidade de sentir odores pode ser de forma parcial (hiposmia) ou total (anosmia) (Jafek, Murrow and Linschoten, 2000). Diversas doenças são capazes de causar alterações na função olfatória. Entre elas estão doenças sistêmicas como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (Hummel *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2010), infecções (Twomey *et al.*, 1979; Seiden, 2004) e doenças nasais como a RSC (Yee *et al.*, 2010). Além disso, o olfato pode diminuir com o passar do tempo decorrente do envelhecimento (Sorokowska *et al.*, 2015) ou por consequência de trauma crânio-encefálico (Duncan and Seiden, 1995). Estudos apontam que a hiposmia pode ocorrer em uma a cada quatro pessoas e anosmia em uma a cada 200 pessoas na população geral, além dos casos não reportados (Lopes *et al.*, 2018).

A perda do olfato pode ocasionar perda do interesse pela alimentação e perda de peso (Deems *et al.*, 1991) e pode ocorrer um aumento da ingestão de sal e açúcar (Henkin, 2014), podendo contribuir para o aparecimento de doenças como obesidade, hipertensão e diabetes. Em estudo com pacientes com perda olfatória demonstrou que alterações no olfato podem alterar a ingestão alimentar dos indivíduos. Foi encontrado que 29% dos pacientes tiveram menor ingestão de alimentos, 39% passaram a usar maior quantidade de tempero na comida, 37% comeram menos doces, 48% beberam menos bebidas

doces. A alteração também impactou o hábito de comer fora em 47% das pessoas (Aschenbrenner *et al.*, 2009).

Outras consequências da ausência ou diminuição do olfato são perda da qualidade de vida (Miwa *et al.*, 2001), diminuição do rendimento para realização de atividades diárias (Frasnelli and Hummel, 2005), aumento do risco de acidentes domésticos com gás de cozinha e ingestão de alimentos estragados, estes sendo fonte de preocupação para maior parte dos pacientes (Miwa *et al.*, 2001).

2.1.2.1 Envelhecimento

Em estudo realizado com 1422 indivíduos entre 4 e 80 anos, dividindo-os em 8 faixas etárias, demonstrou o impacto da idade na capacidade olfatória. Foi encontrado que pacientes com mais de 70 anos tinham pontuação inferior no teste olfatório (Sniffin Sticks) (Sorokowska *et al.*, 2015).

O envelhecimento é um fator de risco para o déficit olfatório, ocorrendo em 62,5% entre 80 e 97 anos em comparação com 24,5% encontrado no grupo geral (avaliadas 2491 pessoas entre 53 e 97 anos). Os distúrbios olfatórios estão associados também ao sexo masculino, fumantes, epilepsia, AVC, congestão nasal e infecções do trato respiratório (Murphy *et al.*, 2002).

A discriminação dos odores fica prejudicada com a idade avançada. A amplitude e latência das ondas cerebrais em mensuração eletrofisiológica também são alteradas pela idade mostrando um possível envolvimento das vias centrais na diminuição do olfato com o passar dos anos (Hummel *et al.*, 1998).

Apesar da idade, pacientes com média de idade de 73 anos tiveram ativação cerebral semelhante quanto as regiões mais comumente ativadas, regiões frontais inferiores direitas e as zonas frontal e perisilviana superiores direita e esquerda em comparação ao grupo de jovens (média de 24 anos). Entretanto, com relação a quantidade de ativação, o grupo jovem revelou maior volume de voxels ativados nos lobos frontais, regiões perisilvianas e giros cingulados em ressonância magnética funcional com estímulo odorífero, (D M Yousem *et al.*, 1999).

A regeneração epitelial fica prejudicada com a idade. Com o envelhecimento o epitélio olfatório é danificado e é menor a chance de ser encontrado em biópsias, ocorrendo alta incidência de substituição por epitélio respiratório sendo outra possível explicação para a diminuição do olfato na população idosa (Paik *et al.*, 1992). Em estudo com modelo animal transgênico, no epitélio envelhecido ocorre o desaparecimento das células basais globosas e não houve ativação das células basais horizontais, mostrando um provável mecanismo da perda olfatória causada pelo envelhecimento e possível alvo de tratamento (Child *et al.*, 2018).

Níveis elevados de alguns fatores inflamatórios (IL-12, MCP-1, MCP-1, IL-8, IL-13 e VEGF) no muco olfatório de idosos foram associados à redução sensibilidade olfativa, sugerindo que a inflamação pode desempenhar um papel no declínio olfativo associado ao envelhecimento (Wang *et al.*, 2018).

O tratamento tópico com fator de crescimento de fibroblastos 2 e fator de crescimento semelhante a insulina 1 em camundongos com epitélio envelhecido pela ação de metimazol trouxe aumento nos neurônios olfatórios e da espessura do epitélio, sendo uma possibilidade promissora para o tratamento da perda olfatória devido ao envelhecimento (Fukuda *et al.*, 2018).

2.1.2.2 Trauma

O trauma craniano é uma causa de perda olfatória, atingindo cerca de 17% dos pacientes, dentre todas causas de perda olfatória (Temmel *et al.*, 2002) e 33% quando excluídas causas sinusais, sendo anosmia mais prevalente entre os pacientes pós-traumáticos (Fonteyn *et al.*, 2014).

O trauma cranioencefálico leve em crianças pode levar a uma diminuição da pontuação em teste de limiar olfatório em relação a crianças que não sofreram esse trauma, mas a pontuação ainda se mantém dentro da normalidade. A capacidade de identificação dos odores não foi afetada pelo trauma leve (Schriever *et al.*, 2014).

O trauma de cabeça acontece na maioria dos casos, devido a quedas, acidentes automobilísticos, intencionais e assaltos (Langlois, Rutland-Brown and Wald, 2006). A perda olfatória pós-traumática pode ocorrer quando a injúria atinge regiões importantes para o sentido do olfato, como o bulbo olfatório e lobo frontal (David M Yousem *et al.*, 1999).

Em estudo realizado com 20 pacientes com perda olfatória pós-traumática, 35% tiveram melhora de pelo menos 4 pontos no teste olfatório após aproximadamente 40 meses em média entre o teste inicial e final (Duncan and Seiden, 1995). Apesar da dificuldade da recuperação espontânea tardia, foi relatada uma melhora após 9 anos do trauma em um paciente que voltou a sentir odores, melhorando por 3 anos após isso até a recuperação da capacidade normal do olfato sem uso de tratamento (Mueller and Hummel, 2009).

Alguns estudos encontraram resultados favoráveis de melhora da capacidade olfatória nesses pacientes após o uso de corticoides, sendo o local da injúria e idade do paciente fatores que influenciaram nos resultados (Ikeda *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2010).

Outro tratamento já utilizado para esse tipo de anosmia é o treinamento olfatório. Proposto por Hummel e colaboradores em 2009, esse tratamento consiste na exposição repetitiva a odores de forma a estimular a regeneração neuronal no epitélio

olfatório. Ele foi utilizado primeiramente por 12 semanas, duas vezes por dia com 4 odores intensos (álcool fenilético, eucaliptol, citronelal e eugenol) e trouxe melhora para a sensibilidade olfatória em pacientes com perda olfatória pós-traumática e pós-infecciosa (Hummel *et al.*, 2009). No Brasil, esse treinamento obteve uma taxa de melhora clinicamente significativa de 23,5% e 25%, em 3 e 6 meses de tratamento. A adesão dos pacientes após 3 meses de tratamento foi de 88%, e após 6 meses, 56%. Não houve relação entre os parâmetros analisados quanto à adesão e eficácia do treinamento (Fornazieri *et al.*, 2020).

2.1.2.3 Infecção

O sentido do olfato pode ser também afetado através de infecções virais. O vírus *Herpes simplex*, por exemplo, tem tropismo pelo sistema nervoso central, infectando os neurônios na mucosa olfatória podendo causar anosmia (Twomey *et al.*, 1979). Também pode ocorrer perda olfatória após infecção viral das vias áreas superiores (POPI). Muitas vezes essa perda pode ser reversível, mas em alguns casos permanece após o término dos sintomas nasais (Reden *et al.*, 2006). A causa da perda persistente pode ser por degeneração dos caminhos olfatórios centrais, como o bulbo olfatório, ou destruição das células receptoras olfatórias (Seiden, 2004).

Em biópsias de pacientes com perda olfatória pós-viral foi observada substituição do epitélio olfatório por epitélio respiratório (Douek, Bannister and Dodson, 1975), redução do número de receptores olfatórios e epitélio desorganizado (Jafek *et al.*, 1990).

Por outro lado, a hipótese de que alterações nas vias centrais também pode corroborar com a perda continua sendo estudada e considerada por pesquisadores (Mohammed *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1995; Mueller *et al.*, 2005). Foi encontrada diminuição do volume do bulbo olfatório e presença de partículas virais nessa região em pacientes com essa etiologia (Barnett, Cassell and Perlman, 1993; Mueller *et al.*, 2005)

A POPI é uma importante causa de perda olfatória, atingindo entre 13 a 36 % dos pacientes com disfunção do olfato (Seiden and Duncan, 2001; Temmel *et al.*, 2002; Fornazieri *et al.*, 2014). Esse tipo de perda afeta mais o sexo feminino e pessoas com mais de 40 anos (Sugiura, Tsunemasa Aiba, Junko Mori, 1998; Temmel *et al.*, 2002).

Alguns vírus têm sido reportados como associados a POPI. O vírus Parainfluenza III foi encontrado em 88% dos casos de pacientes com POPI em lavado nasal (Wang, Kwon and Jang, 2007). O rinovírus que tem grande prevalência nos resfriados foi relacionado com alteração olfatória (Wat, 2004; Suzuki *et al.*, 2007). Os vírus Influenza e Coronavirus neurotrópico que são capazes de chegar ao sistema nervoso central através dos nervos olfatórios (Perlman, Evans and Afifi, 1990; van Riel, Verdijk and Kuiken, 2015). Além desses, outros vírus são investigados como prováveis causadores de POPI também como

picornavírus, Epstein Barr Vírus, parainfluenza I e II (Mori *et al.*, 1995; Sugiura, Tsunemasa Aiba, Junko Mori, 1998; Suzuki *et al.*, 2007).

O olfato dos pacientes afetados por infecções pode ser recuperado através da regeneração do epitélio olfatório e outras vias atingidas. As taxas de recuperação espontânea nesses casos varia de 20,7% a 67,8% (Duncan and Seiden, 1995; Reden *et al.*, 2011, 2012; Konstantinidis *et al.*, 2013). A menor gravidade dos danos teciduais, não ser fumante, ser do sexo feminino, apresentar disosmia e ter idade não avançada são fatores que constituem bom prognóstico para recuperação espontânea (Deems *et al.*, 1991; Hummel, Landis and Hüttenbrink, 2011).

Atualmente não se tem um tratamento bem estabelecido para essa disfunção olfatória. Terapias com zinco e aminociclina não apresentaram resultados satisfatórios (Reden *et al.*, 2011, 2012). Já o ácido alfa-lipoico e vitamina A tiveram resultados positivos (Hummel, Heilmann and K.-B. Hüttenbrink, 2002; Hummel *et al.*, 2017). O uso de ácido alfa-lipóico em pacientes com perda olfatória pós-infecciosa concomitante com terapia padrão trouxe melhora significativa para o olfato (Hummel, Heilmann and K. B. Hüttenbrink, 2002). Assim como a perda olfatória pós-traumática, a perda do olfato por infecção pode ser recuperada pelo treinamento olfatório. Esse tratamento tem como base a modulação do processo regenerativo do epitélio olfatório através do estímulo repetitivo a odores (Youngentob and Kent, 1995). O primeiro estudo que avaliou esse treinamento em pacientes com POPI, perda olfatória pós-traumática e de causa idiopática obteve uma melhora clinicamente significativa em 28% dos pacientes após 3 meses de treinamento (Hummel *et al.*, 2009). Outros estudos tiveram resultados parecidos e até melhores tendo essa taxa ficado entre aproximadamente 20 e 68% em pacientes com POPI (Konstantinidis *et al.*, 2013; Damm *et al.*, 2014; Wegener *et al.*, 2015; Fornazieri *et al.*, 2020). O tratamento mostrou-se 2 vezes mais eficaz em indivíduos com tempo de disfunção inferior a 1 ano (Damm *et al.*, 2014).

2.1.2.4 Doenças neurodegenerativas e neurológicas

A perda olfatória parcial pode ocorrer precocemente em pacientes com doença de Alzheimer (Devanand *et al.*, 2000) e está associada com a perda da cognição podendo servir como fator preditor para o declínio da função cognitiva desses pacientes (Sohrabi *et al.*, 2012). Foi encontrada maior presença de proteína Tau e beta-amiloide no epitélio nasal de pacientes com doença de Alzheimer, quando comparado com indivíduos sem doença, correlacionando com as alterações patológicas que ocorrem no cérebro desses pacientes (Arnold *et al.*, 2010). Testes olfatórios tem sido validados e estudos com biópsias de mucosa nasal tem sido feitos para utilização na triagem para auxílio no diagnóstico precoce da doença (Godoy *et al.*, 2018; Zendeabad *et al.*, 2020).

Foi demonstrada uma correlação entre a pontuação baixa em teste olfatório com aumento da concentração de proteína tau e menores graus em medidas de cognição em pacientes com Alzheimer (Reijs *et al.*, 2017).

Em estudo post-mortem em nervos olfativos de pacientes com perda cognitiva leve e Alzheimer (moderada a grave), foi encontrado que os neurônios sofrem alterações morfológicas e de sinalização precoces e que seguem conforme o desenvolvimento da demência, sugerindo que eles possam propagar o desequilíbrio para regiões centrais superiores (Bathini *et al.*, 2019).

Na doença de Parkinson caracterizada pela diminuição da síntese de dopamina no cérebro, também ocorrem alterações no sentido do olfato, mas diferentemente do Alzheimer, não foram encontradas alterações morfológicas e em marcação IHQ no epitélio olfatório (Witt *et al.*, 2009).

Em pacientes com Parkinson, alterações basais no olfato não foram associadas dificuldades motoras, mas foi relacionada a disfunção cognitiva e o prognóstico, sugerindo que o comprometimento olfativo grave pode refletir envolvimento cortical precoce, provavelmente na região frontotemporal (Yoo *et al.*, 2020).

Outro estudo com pacientes com essa doença encontraram que o relato de perda olfatória é subestimada, sendo importante o uso de testes objetivos para avaliação do olfato nesses pacientes (Leonhardt *et al.*, 2019).

O tratamento com estimulação cerebral em pacientes com Parkinson mostrou ter impacto positivo também sobre a recuperação da capacidade olfatória (Saatçi *et al.*, 2019).

O olfato também pode estar alterado em outras doenças envolvendo o sistema nervoso, como esquizofrenia e outras psicoses (Brewer *et al.*, 2001), não sendo encontradas diferenças com relação ao olfato entre os grupos com transtorno afetivo (Striebel *et al.*, 1999). Alterações olfatórias foram relatadas em pacientes com desordens psiquiátricas como depressão e esquizofrenia, sendo mais frequentes na mulheres esquizofrênicas (Kopala, Good and Honer, 1994). Também foi encontrada uma diminuição da capacidade olfatória em pacientes com depressão grave (Pause *et al.*, 2001).

2.1.2.5 Doenças nasais

Em algumas doenças nasais e nasossinusais, como a rinosinusite crônica e rinite alérgica, podem ocorrer perda olfatória (Guilemany *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014), sendo que por vezes essa perda ocorre devido a obstrução nasal. Pela distribuição posterior do epitélio olfatório, as partículas odoríferas precisam chegar em regiões mais interiores da cavidade nasal para que possam atingir os receptores olfatórios. Nas doenças onde ocorre aumento de secreção nasal podem impedir esse trânsito das partículas e diminuir o olfato

(Cowart *et al.*, 1993; Pfaar *et al.*, 2006). Outra linha de estudo é que devido a inflamação local, o epitélio olfatório possa ser danificado e ter perda de função (Alt *et al.*, 2014).

Pacientes com rinite alérgica relataram maior gravidade de perda olfatória e apresentaram pontuações piores nos testes olfatórios de limiar, identificação e discriminação (Guilemany *et al.*, 2009). Foi encontrada um aumento do limiar olfatório em pacientes com rinite alérgica e maior resistência nasal (Cowart *et al.*, 1993). Também houve uma melhora do olfato e outros sintomas em pacientes com rinite alérgica persistente com levocetirizina, em estudo randomizado, duplo-cego e controlado com placebo (Guilemany *et al.*, 2012). Em estudo com pacientes com rinite alérgica ao pólen, houve piora do olfato durante a exposição natural ao alérgeno, o que pode estar relacionado aos mecanismos inflamatórios alérgicos (Klimek and Eggers, 1997). Entretanto, pacientes com rinite são afetados por distúrbios olfatórios, sendo ou não alérgicos (Simola and Malmberg, 1998).

A rinossinusite está entre as doenças nasais que pode afetar o olfato dos pacientes (Kern, 2000; Mori *et al.*, 2013; Alt *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014) sendo que os tratamentos (com corticosteroides tópicos ou sistêmicos, antibióticos ou lavagem com salina) iniciados mais precocemente apresentam resultados mais eficazes (Whitcroft *et al.*, 2018). Informações mais detalhadas sobre rinossinusites estão no item 2.2.

Outra doença nasal, o desvio septal, tem resultados controversos quanto a sua capacidade de afetar o olfato. Um estudo encontrou que o lado com desvio septal grave teve pior resultado no teste olfatório. Também encontrou menor volume do bulbo olfatório correlacionado a função olfatória no lado com desvio (Altundag *et al.*, 2014). Pacientes que foram submetidos a septoplastia e turbinectomia inferior tiveram melhora na obstrução nasal e qualidade de vida após o procedimento (Yamasaki *et al.*, 2019). Avaliando o impacto da cirurgia de correção de desvio septal e hipertrofia de concha, esse procedimento mostrou resultados positivos na capacidade respiratória e olfativa em estudo com 30 pacientes. Oitenta e sete por cento dos pacientes apresentaram aumento do fluxo de ar, 80% melhoraram a função olfativa relacionada a identificação de odores, 70% a discriminação de odores e 54% melhoraram a capacidade olfatória em termos de limiar de odor (Damm *et al.*, 2003). Já em outro estudo, a narina obstruída por desvio septal teve maior limiar do odor e após a cirurgia os resultados de discriminação do odor foram menores (Pfaar, Hüttenbrink and Hummel, 2004).

Por outro lado, em outro trabalho não houve diferença entre a cavidade com desvio de septo e cavidade não obstruída com relação a capacidade de identificação dos odores e não houve mudança significativa após a cirurgia de correção (Pfaar, Hüttenbrink and Hummel, 2004). Em outro estudo, o procedimento cirúrgico não afetou o olfato dos pacientes (Kilicaslan *et al.*, 2016), também não houve melhora significativa no olfato após 3,5 e 12 meses após septoplastia avaliado com teste olfatório (Schriever *et al.*, 2013). Já no trabalho

Kimmelman, ao contrário do esperado, houve diminuição da pontuação no teste após a cirurgia nasal em 34% dos pacientes (Kimmelman, 1994). Mais estudos utilizando critérios de inclusão e exclusão bem definidos para tirar possíveis fatores de confusão e avaliando as narinas unilateralmente devem ser feitos para elucidar o impacto do desvio septal na função olfatória.

2.1.2.6 Testes olfatórios

Os exames que analisam o olfato estão baseados nas 3 bases da capacidade olfativa: identificação, limiar e discriminação.

Um dos principais testes olfatórios utilizados é o University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT), desenvolvido por pesquisadores americanos na década de 80 (R. Doty *et al.*, 1984). Esse teste teve uma versão traduzida, padronizada e validada para a população brasileira em 2015 (Fornazieri *et al.*, 2015). O teste consiste na identificação de 40 odores, impregnados nas páginas que ao serem riscadas, liberam os mesmos. O paciente então escolhe entre 4 alternativas com o que o odor se parece. Ao final do teste com a pontuação obtida é possível a classificação da capacidade olfatória do indivíduo em normosmia, hiposmia (leve, moderada e grave) e anosmia de acordo com o sexo do paciente. O teste também pode ser utilizado para análise da função unilateral, obstruindo a narina oposta ao teste com fita porosa (Doty, 2009b).

Outro teste muito utilizado para avaliação do olfato é o Sniffin Sticks. Esse teste é constituído por 3 subpartes, todas compostas por odores distribuídos em canetas. A primeira parte avalia o limiar do odor, tendo canetas com diferentes concentrações de n-butanol. A segunda parte é composta por 16 pares de odores onde o indivíduo precisa distinguir entre os odores o correto, avaliando a discriminação do odor. E a terceira parte, de identificação do odor, é composta por 16 canetas e o paciente escolhe entre 4 alternativas a resposta correta (Hummel *et al.*, 1997). Esse teste já foi adaptado e validado para população portuguesa (Ribeiro *et al.*, 2016) e foi adaptado e usado pela primeira vez na população brasileira em 2008 (Silveira-Moriyama *et al.*, 2008), sendo posteriormente também adaptado para população pediátrica (BASTOS, 2015).

Outro teste de avaliação do limiar olfatório é composto por 17 diferentes concentrações de álcool feniletílico (com cheiro de rosa) e o branco (somente com o diluente neutro, propilenoglicol). Sempre são apresentados 2 frascos, um contendo o odor e outro o branco, e o indivíduo precisa identificar qual contém o odor. Ao final é calculado o limiar atingido e classificado de acordo com a idade do paciente (Doty, 2009b).

Ambos os testes de avaliação do limiar olfatório, com butanol ou álcool feniletílico, apresentam boa reprodutibilidade e resultados semelhantes. Os testes tiveram uma correlação moderada quanto aos resultados ($R=0,60$) e ambos foram capazes de

distinguir pacientes com disfunção olfatória em estudo que comparou as duas formas de análise (Croy *et al.*, 2009).

2.2 RINOSSINUSITE

A rinosinusite (RS) é caracterizada pela inflamação da mucosa do nariz e seios paranasais, constituindo-se em uma das afecções mais prevalentes das vias aéreas superiores, com um custo financeiro elevado para a sociedade. A RS viral é a mais prevalente. A rinosinusite aguda (RSA) é infecciosa por natureza, enquanto a RSC é considerada multifatorial. A classificação mais comum das RSs se baseia no tempo de evolução dos sintomas e na frequência de seu aparecimento: rinosinusite aguda (RSA): aquela cujos sintomas teriam duração de até 4 semanas; rinosinusite crônica (RSC): duração maior que 12 semanas; rinosinusite recorrente (RSR), quatro ou mais episódios de RSA no intervalo de um ano, com resolução completa dos sintomas entre eles; rinosinusite crônica com períodos de agudização (RSCA), duração de mais de 12 semanas com sintomas leves e períodos de intensificação (Stamm *et al.*, 2008; Fokkens *et al.*, 2020).

2.2.1 Rinosinusite Aguda

Alguns fatores estão associados ao desenvolvimento da rinosinusite aguda, como quadros de gripes e resfriados e rinite alérgica, enquanto que outros como tabaco e alterações anatômicas, ainda não se tem confirmação (Stamm *et al.*, 2008).

Em um recente artigo holandês, utilizando o questionário GA2LEN, foi encontrada uma prevalência de 18% (17-21%) para sintomas que apontam para rinosinusite aguda pós-viral em três cidades diferentes na Holanda (Hoffmans *et al.*, 2018). A rinosinusite aguda bacteriana é uma doença rara, com incidência de 0,5-2% de rinosinusite aguda viral (resfriado comum) (Revai *et al.*, 2007).

Devido a cascata de inflamação iniciada pelas células epiteliais nasais, ocasiona danos pelas células infiltrantes, causando edema, ingurgitamento, extravasamento de fluidos, produção de muco e obstrução sinusal no processo, levando a rinosinusite aguda ou agravando o quadro (Fokkens *et al.*, 2020).

2.2.2 Rinosinusite Crônica (RSC)

A RSC caracteriza-se por um processo inflamatório da mucosa nasal e paranasal por um período mínimo de 12 semanas (Fokkens *et al.*, 2012; Bachert *et al.*, 2014), sendo causa comum de disfunção do olfato (Kern, 2000; Raviv and Kern, 2004; Alt *et al.*,

2014). Muitas vezes, esse sintoma não é valorizado pelos médicos (Raviv and Kern, 2006), apesar da sua grande importância para a qualidade de vida do paciente (Hummel and Nordin, 2005; Croy, Nordin and Hummel, 2014).

A prevalência da RSC na população brasileira não foi estabelecida e na população mundial essa taxa varia entre 5%-15% de acordo com o país analisado (Fokkens, Lund and Mullol, no date). Em São Paulo, a prevalência foi de 5,51% na população com 12 anos ou mais e a RSC estava associada a rinite, asma e baixa renda (Pilan *et al.*, 2012). Nos EUA, o custo total do tratamento da rinossinusite crônica foi de 2.609 dólares por ano para cada paciente. Já na Europa, os custos em um hospital universitário foram de 1861 dólares por ano para cada paciente (Fokkens *et al.*, 2012).

A RSC pode ser classificada em com ou sem polipose baseando-se nas apresentações fenotípicas da doença (Van Zele *et al.*, 2006; Akdis *et al.*, 2011). Uma nova classificação tem sido proposta com base na fisiopatologia, através da análise dos endótipos inflamatórios (Tomassen *et al.*, 2016; Divekar *et al.*, 2017).

Não se tem totalmente claras as causas da RSC, mas algumas alterações têm sido encontradas como possíveis fatores causais. Esses mecanismos serão abordados nos tópicos a seguir.

2.2.2.1 Alterações genéticas

Em pacientes com RSC foi encontrada uma elevação na regulação em genes (*MUC5AC* e *MUC5B*) das mucinas (glicoproteínas mucosas), que pode desempenhar papel importante na patogênese da hipersecreção dos seios nasais que ocorre nessa doença (Kim *et al.*, 2004).

Em modelo animal para RSC investigando-se o papel do gene *Tbox1*, foi encontrado que esses camundongos tinham maior expressão do gene e proteína em mucosa sinusal em comparação aos animais sem a doença. Além disso, estudando-se animais com gene silenciado e com aumento de expressão, os resultados do estudo sugerem que o silenciamento do gene diminui a transição mesenquimal epitelial e inflamação na RSC, através da inibição da via de sinalização TGF β -Smad2 / 3. Esse gene pode ser um futuro alvo de terapias para controle da inflamação e tratamento dessa doença (Zhong, Li and Zhang, 2019).

Também foi encontrado em estudo com pacientes com RSC com e sem polipose um aumento da metilação no DNA no locus da Linfopoietina do estroma tímico (TSLP). A metilação do DNA foi correlacionada com a avaliação do olfato (olfatometria) e a resistência nasal unilateral. A resistência total e os níveis de IgE no soro não foram relacionados com a metilação do DNA (Li *et al.*, 2019).

Houve uma expressão diminuída dos genes *S100A7* e *S100A8* em estudo genético com pacientes com RSC com e sem polipose em comparação a controles. No caso dos indivíduos com RSC com polipose, houve diminuição da expressão do gene *SPINK5* e nos sem polipose, houve diminuição do gene *S100A9*. A proteína *SPINK5* estava diminuída em amostras de pólipos. Os genes avaliados tem envolvimento na manutenção e reparo da barreira epitelial e sua diminuição pode estar envolvida no estado inflamatório da RSC (Richer *et al.*, 2008).

2.2.2.2 Papel dos Microorganismos

Há estudos sobre a presença de biofilme estar envolvida na patogênese da RSC e prognóstico da doença (You *et al.*, 2011), mas também foi encontrado em mucosa normal (Mladina *et al.*, 2010) permanecendo incerto sua participação na doença.

Pacientes com RSC apresentam menor diversidade de microbiota sinonasal, apresentando destaque para presença de *Corynebacterium tuberculostearicum*. Em modelo animal essa espécie apresentou potencial patogênico, sendo que *Lactobacillus sakei* foi identificada como potencial protetora dos seus efeitos (Abreu *et al.*, 2012).

Em estudo realizado com pacientes com RSC com e sem pólipo, com e sem biofilme em tecido sinonasal houve alteração nos genes envolvidos na regulação das espécies reativas do oxigênio, mostrando que os pólipos e biofilmes estão associados a mudanças específicas na expressão gênica. Isso aponta para respostas imunes inatas prejudicadas diferentemente de acordo com os subgrupos de RSC (Jardeleza *et al.*, 2013).

A exposição a antibióticos pode causar aumento de maior que o dobro de risco de desenvolver RSC sem polipose (odds ratio 2,21) e diminui a qualidade de vida em até 2 anos após o uso (Maxfield *et al.*, 2017).

Como forma de tratamento, os probióticos tem sido estudados. Usando probiótico (*Staphylococcus epidermidis*) obteve-se resultado positivo para conter os efeitos do *Staphylococcus aureus* em modelo animal para RSC (Cleland *et al.*, 2014).

2.2.2.3 Sistema imunológico

O sistema imunológico é responsável pela proteção do organismo a ataques de microorganismos. Dele fazem parte a imunidade inata e adaptativa que através de diversos mecanismos matam e eliminam possíveis invasores. No entanto, defeitos ou alterações nesses mecanismos podem causar doenças e levar a danos ao próprio indivíduo (Abbas, Lichtman and Pillai, 2015). Dentre as reações a patógenos, são comuns a geração de estresse oxidativo e aumento de mediadores inflamatórios a nível local e sistêmico.

2.2.2.3.1 Estresse oxidativo

Nas células do corpo humano são produzidas espécies reativas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) normalmente, devido aos processos fisiológicos, como a respiração celular (Turrens and Boveris, 1980). Os principais EROs são: radicais hidroxila, superóxido, hidroperóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlet e ERNs: óxido nítrico (NO), peroxinitrito, ânion nitroxil, óxido nitroso, trióxido de dinitrogênio, nitrito e nitrato (Katzung and Trevor, 2017; Robbins, 2018) .

Essas substâncias formadas são inativadas ou transformadas em moléculas não danosas por componentes não enzimáticos como vitamina A e E, pró-beta-caroteno e ácido úrico, ou por algumas enzimas como superóxido dismutase (SOD) catalase e sistema glutatona. A catalase e a superóxido dismutase catalisam a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (McCord and Fridovich, 1969; Kirkman, Galianoe and Gaetanie, 1987) neutralizando seus efeitos. O sistema glutatona representa importante mecanismo de proteção contra a formação de radicais livres. A glutatona reduzida reage com radicais presentes no meio celular (reação catalisada pela glutatona peroxidase) impedindo sua reação com outras moléculas. Após a reação a glutatona fica oxidada e sua recuperação é feita pela enzima glutatona redutase (Meister and Anderson, 1983).

O desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes causa o quadro chamado estresse oxidativo (Sies, 1985). O acúmulo dos EROs provoca peroxidação de lipídeos (Minotti and Auste, 1987), danos ao DNA (Filho, Hoffmann and Meneghini, 1984) e proteínas (GARRISON, JAYKO and BENNETT, 1962), podendo causar morte celular (Johnson *et al.*, 1996) .

As células do sistema imune produzem EROs para matar agentes externos como microrganismos invasores, mas essa reação se não controlada pode causar danos ao tecido (Allen, Stjernholm and Steele, 1972; Babior, Kipnes and Cumvu, 1973). O estresse oxidativo está envolvido no processo do envelhecimento (Sohal and Weindruch, 1996; Melov *et al.*, 2000) e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Lin and Beal, 2006; Gemelli *et al.*, 2013).

A maioria das proteínas apresentam resíduos de tirosina em sua composição, um aminoácido aromático não essencial (Held, 2006). Esses resíduos são sensíveis a modificações como nitração e nitrosilação pelos ERNs, resultando na formação de nitrotirosina (Souza *et al.*, 1999; Ischiropoulos, 2003), podendo ser utilizada como marcador do estresse oxidativo derivado dos ERNS.

Em animais que fizeram exercícios e com restrição calórica foi encontrado aumento do estresse oxidativo no epitélio olfatório, apoptose e diminuição dos neurônios olfatórios maduros (Tuerdi *et al.*, 2018).

Em modelo murino para rinosinusite com deleção do *Nrf2* houve aumento da inflamação e citocinas como interleucina-33 (IL-33) e linfopoetina estromal tímica (TSLP) em lavagem nasal e tecido nasossinusal, com exacerbação de eosinófilos e hiperplasia de células caliciformes. Além disso, os camundongos apresentaram aumento de albumina sérica no lavado nasal, mostrando alteração na barreira. Os dados sugerem um papel importante do *Nrf2* na regulação na inflamação e barreira epitelial da cavidade nasal, sendo um possível alvo terapêutico para essa doença (London *et al.*, 2019).

Pacientes com RSC com polipose apresentaram menores níveis de vitamina D₃ em amostras de soro (48 nm/l a 85 nm/l (média 60 nm/l) comparando-se com controles (78 nm/l a 112 nm/l; média 97 nm/l), estando abaixo do normal em 71% dos pacientes e apenas 7% nos controles (Boeva *et al.*, 2018).

Outro estudo não encontrou diferença nos níveis de vitamina D entre pacientes com RSC com e sem polipose e controles no soro, mas os pacientes com RSC tiveram menos receptor de vitamina D (por imunohistoquímica) em células epiteliais de amostras de mucosa do complexo ostiomeatal (Tomaszewska *et al.*, 2018).

A mucosa de pacientes com RSC apresentou redução significativa nos níveis de glutathiona reduzida e ácido úrico, diminuindo a defesa antioxidante, podendo estar relacionada com a patogênese da doença. Não houve diferença nos níveis de glutathiona oxidada e vitamina E (Westerveld *et al.*, 1997). Quando comparados com indivíduos hígidos, os pacientes com RSC apresentaram menores níveis de Vitamina C em amostras sanguíneas e não tiveram diferença em relação aos hormônios relacionados com a tireoide (Reddy *et al.*, 2017). Em crianças portadoras de RSC, amostras sanguíneas apresentam menor quantidade de vitaminas E e C, cobre e zinco (Ünal *et al.*, 2004). Não foi encontrada correlação entre a presença da RSC com e sem polipose com polimorfismos da glutathiona S-transferase, asma, intolerância a aspirina ou alergias (Fruth *et al.*, 2011).

Foi encontrada maior quantidade de células com positividade para espécies reativas do oxigênio em amostra de epitélio nasal de pacientes com RSC com polipose, seguido por RSC sem pólipos e controles. Os dados sugerem que pacientes com RSC possam ter maiores níveis de espécies reativas do oxigênio no epitélio, causando danos teciduais (Fordham *et al.*, 2013).

Pacientes com RSC apresentaram menores níveis de IL-12 no soro e de vitamina E em mucosa nasal, sendo que pacientes com RSC severa apresentaram níveis menores do que na os pacientes com RSC leve. Houve correlação positiva entre os índices de vitamina E, IL-12 e ácido úrico e correlação negativa entre a severidade da doença e os níveis de ácido úrico e glutathiona reduzida (Nassar *et al.*, 2003).

Em modelo animal com indução da rinosinusite bacteriana foi observado um aumento nos níveis de malondialdeído e redução da atividade da superóxido dismutase e

glutaciona em comparação ao grupo controle (Tatar *et al.*, 2017). Coelhos com rinossinusite maxilar aguda induzida por *Staphylococcus aureus* obtiveram maior atividade da superóxido dismutase na mucosa inflamada e menor da glutaciona peroxidase. Não foram encontradas diferenças nas atividades da catalase e nos níveis de malondialdeído (Uslu, Taysi and Bakan, 2003).

Pacientes com polipose tratados com esteroide nasal com adição oral de antioxidantes (vitaminas A, C, E e selênio) obtiveram níveis mais baixos de malondialdeído tecidual e sérico em relação a terapia padrão (Sagit *et al.*, 2011).

2.2.2.3.2 Mediadores inflamatórios

O NO é uma molécula gasosa produzida pelas enzimas NOS (óxido nítrico sintases) (Wang and Marsden, 1995), sendo geralmente utilizada a arginina para sua síntese (Palmer, Ashton and Moncada, 1988; Wu and Morris, 1998; Wiesinger, 2001). Três isoformas de NOS são descritas, sendo duas NOS constitutivas (nNOS e eNOS) e uma NOS induzida (iNOS) (Kiechle and Malinski, 1993). A isoforma I ou óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) pode ser encontrada em neurônios, células epiteliais, sistema nervoso, músculo esquelético entre outros. A isoforma II ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, endotélio e musculatura lisa vascular, não sendo detectável em condições basais e não é regulada pelo cálcio. Produz grande quantidade de NO que inibe enzimas contendo ferro causando efeito citostático e também fragmentação de DNA. Atua em parasitas e células tumorais. A isoforma III ou óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) é constitutiva e produz NO em endotélio vascular sob condições basais (Forstermann *et al.*, 1994).

O LPS ou endotoxinas bacterianas, citocinas, como TNF- α , IL-1 β ou IFN- γ , induzem a síntese de iNOS. A iNOS requer síntese protéica para sua expressão e sua atividade persiste por mais de 24 horas. A indução de iNOS pode ser suprimida por TGFbeta, IL-4, IL-10 sozinhos ou sinergicamente com macrófagos, por IL-8 e por glicocorticóides, que inibem a indução, mas não a atividade das enzimas já induzidas (Davies, Fulton and Hagen, 1995). A indução da iNOS é responsável pelas propriedades citotóxicas do NO (Kiechle and Malinski, 1993).

O NO produzido por essas enzimas é responsável por diversas funções como: antagonista de contrações da musculatura lisa vascular, inibição da ativação plaquetária, modificação da adesividade leucocitária e diapedese dos neutrófilos (através da atuação nas integrinas), neurotransmissão (Flora Filho and Zilberstein, 2000), vasodilatação (Furchgott *et al.*, 1984), manutenção do calibre brônquico e regulação da frequência dos movimentos ciliares (Flora Filho and Zilberstein, 2000).

O óxido nítrico pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio (Archer, 1993), sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato. O NO é citotóxico e vasodilatador (Moncada, Palmer and Higgs, 1991) e modula reações inflamatórias ou antiinflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo (Adams, 1996). A molécula do NO tem um elétron não pareado e reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre (Kiechle and Malinski, 1993).

A função do NO nasal não está bem esclarecida, mas acredita-se que esteja envolvido em vários processos no trato respiratório, como na defesa do hospedeiro por eliminar microrganismos por toxicidade e estimular a motilidade ciliar (Lundberg and Weitzberg, 1999).

Foi encontrado menor índice de NO nasal nos pacientes com RSC (Lindberg, Cervin and Runer, 1997) e RSC com polipose comparados com controles (Lee *et al.*, 2015). Os níveis de NO também foram menores em pacientes com RSC com polipose do que em pacientes com RSC sem polipose e controles (Bommarito *et al.*, 2008). Houve aumento nos níveis de NO depois de procedimento cirúrgico e esse aumento foi relacionado com a melhora nos valores da análise endoscópica (Lee *et al.*, 2015).

Em pacientes com RSC com polipose os níveis de metabólitos do NO (nitrito e nitrato) (fluido de lavagem nasal) e a atividade da superóxido dismutase (tecido) foram menores, essa estando associada ao aumento de nitrotirosina. Os níveis de arginina, metilarginina e inibidores endógenos de NOS foram semelhantes em ambos (Cannady *et al.*, 2007).

A administração de LPS (lipopolissacarídeo) nasal em modelo animal repetidamente causou diminuição do bulbo olfatório, processo revertido após término da indução, mas a recuperação do epitélio olfatório foi incompleta (Hasegawa-Ishii, Shimada and Imamura, 2018).

A citocina pró-inflamatória IL-32 também pode fazer parte da patogênese da RSC. Maior expressão dessa citocina foi encontrada em raspado nasal de pacientes com RSC, sendo que pacientes de RSC sem pólipos tiveram maior expressão de IL-32 nas células epiteliais (Keswani *et al.*, 2012) induzida pela resposta do tipo TH1 (Keswani *et al.*, 2012; Soyka *et al.*, 2012). Em pacientes com RSC com pólipos a IL-32 foi mais abundante no tecido submucoso e nos polipos. Pela localização da marcação positiva para IL-32 e CD3 e CD68, supõe-se que as células T e macrófagos são os principais produtores de IL-32 nos pólipos (Keswani *et al.*, 2012).

O tratamento com um glicosaminoglicano sintético (GM-1111) em animais modelo de RSC demonstrou reduções significativas nos sinais clínicos ($p < 0,05$), alterações teciduais degenerativas, hiperplasia das células caliciformes, infiltração de células

inflamatórias ($p < 0,01$), imunidade inata (tlr2, tlr4, myd88, il1b, tnfa, il6 e il12) e expressão gênica de citocinas associadas à imunidade adaptativa (ccl11, ccl24, ccl5, il4, il5 e il13) ($p < 0,05$ a $p < 0,0001$) em tecidos nasossinusais e níveis séricos de IgE ($p < 0,01$). Os dados sugerem que o GM-1111 reduz significativamente os efeitos locais e sistêmicos da inflamação sinonasal associada à RSC (Alt *et al.*, 2018).

Citocinas inflamatórias foram encontradas no muco coletado da fenda olfatória. Os níveis de IL-5 foram inversamente correlacionados com as pontuações obtidas em teste olfatório em pacientes com RSC com e sem polipose, enquanto que IL-6, IL-7 e o fator de crescimento endotelial vascular A correlacionou-se positivamente em pacientes com pólipos. Mais pesquisas são necessárias para estabelecer a fonte de citocinas mucosas e estabelecer se elas desempenham um papel causal na perda olfatória (Schlosser *et al.*, 2016).

A avaliação de 17 proteínas no muco coletado na concha inferior e fenda olfatória de pacientes com RSC encontrou correlação inversa entre a pontuação do teste olfatório e a concentração do inibidor de quinase dependente de ciclina 2A, fator básico de crescimento de fibroblastos, ligante de quimiocina 2 e 20 e fator estimulador de colônias de macrófagos e correlação positiva com a expressão de fator de células-tronco (Yoo *et al.*, 2019).

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) é uma glicoproteína de cadeia única purificada em 1974 (Olsson and Venge, 1974) e constitui a maior parte, cerca de 30% das proteínas presentes nos grânulos do eosinófilo (Dahl, Venge and Olsson, 1978). Apresenta funções citotóxicas e não citotóxicas, como induzir a liberação de histamina dos mastócitos e basófilos e facilitar a fibrose através da síntese de proteoglicanos (Venge and HÅKANSSON, 1991) e está envolvida no processo alérgico (Jonsson *et al.*, 2002). A ECP exerce diversas atividades biológicas como antibacteriana (Lehrer *et al.*, 1989) e antiparasitária (McLaren *et al.*, 1981).

A ECP pode exercer atividade citotóxica com mecanismo ainda não totalmente elucidado, mas sugere-se que a ECP desestruturou a bicamada fosfolipídica criando poros nas membranas celulares, o que permite a passagem de água e pequenas moléculas, resultando em lise osmótica (Carreras *et al.*, 2005), além da condensação da cromatina, produção de espécies reativas de oxigênio e ativação da atividade semelhante à caspase-3 (Navarro *et al.*, 2008). A ECP também pode ter efeito neurotóxico através da indução de apoptose aumentando a concentração de cálcio intracelular e ativando as caspases 8 e 9 (Navarro *et al.*, 2010).

Pacientes com RSC podem ter aumento de eosinófilos, principalmente em pacientes com polipose (Wu *et al.*, 2018) e o perfil de eosinofilia pode ser usado também como forma de classificação para a RSC (Okada *et al.*, 2018).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é um mediador pró-inflamatório (Beutler and Ceramit, 1989). Não é conhecida sua função na fisiologia olfatória humana (Andrew P. Lane *et al.*, 2010) e nem como afeta a função dos neurônios olfatórios (Sultan, May and Lane, 2011). Foi encontrado mRNA e receptor de TNF- α em epitélio olfatório normal (Farbman *et al.*, 1999) e induziu apoptose de neurônios maduros de epitélio olfatório (Suzuki and Farbman, 2000).

A produção de TNF- α causou danos ao epitélio olfatório e diminuição da resposta olfativa em ratos transgênicos de modo reversível (Andrew P Lane *et al.*, 2010), mas sem a intervenção medicamentosa, a regressão espontânea da inflamação na RSC é mínima (Kuehnemund *et al.*, 2004). Foi encontrada maior expressão dos genes do TNF- α e de outros mediadores inflamatórios (IL-6, IL-12, IL-13) em pacientes com RSC comparado com controles (Anand *et al.*, 2006).

A concentração de várias citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-3, GM-CSF, ICAM-1, marcadores de neutrófilos (MPO) e proteína catiônica eosinofílica (ECP) encontram-se aumentadas na RSC (Stamm *et al.*, 2008).

Em hibridização *in situ*, a densidade do TNF- α estava aumentada em pacientes com sinusite com polipose não alérgica em relação aos controles e aos pacientes com sinusite com polipose alérgica (Hamilos *et al.*, 1996).

Em estudo realizado com camundongos modificados geneticamente demonstrou o envolvimento do receptor de TNF- α 1 nos efeitos inflamatórios e danificação neuronal do TNF- α no epitélio olfatório (Garcia *et al.*, 2017).

2.2.2.4 Polipose nasal

Nos pólipos nasais (crescimento de massa celular com forma de esfera ou grão de uva) ocorre maior absorção de sódio e permeabilidade ao cloreto do que nos epitélios das conchas nasais, pela liberação local de mediadores inflamatórios. O aumento da absorção de sódio derivado do aumento do recrutamento de células inflamatórias leva a uma maior absorção de líquido epitelial contribuindo para o desenvolvimento de pólipos nasais (Bernstein *et al.*, 1997).

Não se tem totalmente elucidada a causa de alguns pacientes com RSC apresentarem a formação de pólipos e outros não. Algumas diferenças tem sido encontradas entre esses pacientes. Pacientes com RSC com pólipo tiveram um aumento na ativação de células T e marcadores eosinofílicos comparados com pacientes com RSC sem pólipo e controles. Os pacientes com RSC sem polipose apresentou padrão de resposta Th1 e altos níveis de IFN- γ e TGF- β , enquanto que pacientes com polipose apresentaram padrão Th2 e concentração elevada de IL-5 e IgE. Esses dados reforçam a hipótese de RSC com e sem

polipose serem doenças distintas (Van Zele *et al.*, 2006). Foram encontrados altos níveis de IL-5 e IgE na secreção nasal de pacientes com RSC com polipose (Riechelmann *et al.*, 2005) e não foram encontrados neurônios olfatórios em pólipos nasais de concha média (Bhutta *et al.*, 2011). A IL-17C (induzida por estímulo bacteriano ou inflamatório) foi encontrada em maior quantidade no epitélio de pacientes com RSC com polipose, principalmente nos pólipos nasais eosinofílicos podendo estar associada a patogênese da RSC com polipose, especialmente pólipos nasais eosinofílicos (Jin *et al.*, 2013). Foi encontrado um aumento da expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em pacientes com RSC com polipose, promovendo crescimento celular e inibição de apoptose (Lee, Myers and Kim, 2009).

Foi encontrado menor nível de NO nasal em pacientes com polipose. O tratamento com corticosteroides foi eficiente na redução dos pólipos e melhorou os níveis de NO (Colantonio *et al.*, 2002). Em amostras sanguíneas, houve maiores níveis de NO de pacientes com polipose, além de maior quantidade de danos ao DNA dos linfócitos (Mrowicka *et al.*, 2015). Pacientes com RSC com polipose que receberam prednisona oral tiveram uma melhora na regularização de expressão de proteínas, principalmente as que estavam anteriormente subexpressas, sendo que 89% delas aumentaram os níveis de expressão após o tratamento (Workman *et al.*, 2020).

Em análise por citometria de fluxo em muco nasal, foram encontrados maiores níveis de IL-5 e IL-13 em pacientes com RSC com pólipo e menor quantidade de IL-17 em pacientes com RSC sem pólipo. Os pacientes com RSC com pólipo também apresentaram eosinofilia tecidual mais severa e pior olfato. A função olfatória dos pacientes foi inversamente correlacionada com níveis de IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Wu *et al.*, 2018).

Também é possível classificar os pacientes com RSC com polipose de acordo com o fenótipo apresentado em eosinofílico ou não (Nakayama *et al.*, 2011), sendo que os primeiros tem pior prognóstico que pode estar associado a maior expressão dos genes relacionados a células T auxiliares 2 (TH2), a eosinófilos (IL-4, IL-5), fator de estimulação de colônia 2 e também genes reguladores de ciclo celular (inibidor de quinase ciclina dependente 1 A e ciclina D1) e uma molécula relacionada com fibrose tecidual (TGFbeta) (Okada *et al.*, 2018).

Pacientes com polipose nasal apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo do que pacientes sem pólipo. Em amostras de tecido (biópsia de pólipo) e sangue de pacientes com polipose nasal, o estado oxidante total e o índice de estresse oxidativo estavam aumentados, enquanto que o estado antioxidante total encontrava-se diminuído em relação aos controles (pacientes com desvio de septo ou hipertrofia de concha média, biópsia de lamela lateral ou concha média). Nos pacientes com polipose o índice de estresse oxidativo correlacionou moderadamente com a idade, sugerindo uma possível relação do aumento do estresse oxidativo causado pelo envelhecimento levar a formação de pólipos nasais (Bozkus

et al., 2013). Em análise de pólipos nasais foi encontrado maior nível de espécies reativas do oxigênio que pode estar relacionado com o dano tecidual (Uneri *et al.*, 2005) e pacientes com RSC com polipose apresentaram maior expressão de espécies reativas do oxigênio em seu tecido sinusal, seguidos pelos pacientes com RSC sem pólipo e controles (Fordham *et al.*, 2013). Houve correlação entre ECP de lavado nasal em pacientes com polipose nasal e severidade da doença, entre estresse oxidativo e obstrução nasal, NO e congestão nasal (Topal, Kulaksizoglu and Erbek, 2014).

A adição de dupilumab subcutâneo (anticorpo para IL-4 que inibe IL-4 e IL-13, citocinas centrais na inflamação mediada pelas células TH2) ao spray nasal furoato de mometasona reduziu a carga de pólipo nasal endoscópica após 16 semanas (Bachert *et al.*, 2016). O uso de dexamipexol causou diminuição da quantidade de eosinófilos totais no sangue e nos pólipos nasais, mas não houve redução dos pólipos e outros aspectos clínicos (Laidlaw *et al.*, 2019). O uso de glicocorticoides antes da cirurgia melhorou o olfato de pacientes com RSC com polipose, tendo o pico de melhora 1 mês após a cirurgia. A resposta ao tratamento com corticoide correlaciona com a melhora pós cirurgia. Entretanto, essa melhora parece ser passageira, sendo que a capacidade olfatória diminuiu após 3 meses (Bogdanov *et al.*, 2019).

Além da classificação em com e sem polipose, recentemente uma nova classificação foi indicada: RSC primária (tipo II, com aumento de eosinófilos ou não tipo 2) ou secundária (relacionada a outras doenças como infecção fúngica e fibrose cística). Ambos os tipos podem ser difusas ou localizadas de acordo com a distribuição da inflamação (Fokkens *et al.*, 2020).

2.2.2.5 Perda olfatória na Rinossinusite Crônica

A perda olfatória na RSC pode atingir até 84% dos pacientes (Soler, Mace and Smith, 2008). Uma meta-análise feita com 35 artigos que avaliaram prevalência da perda olfatória na RSC, encontrou uma perda em 30% usando Teste Breve de Identificação de Cheiro, 67% usando Teste de Identificação do Olfato e e 78,2 quando usado o teste de Sniffin 'Sticks (Kohli *et al.*, 2017). Essa perda do olfato tem várias possíveis causas descritas até o momento. Uma dessas causas é a obstrução nasal por edema de mucosa ou presença de pólipos (Doty and Mishra, 2001; Pfaar *et al.*, 2006; Malaty and Malaty, 2013; Alt *et al.*, 2014; Rimmer *et al.*, 2014; Zhen *et al.*, 2014), tendo correlação entre a piora na severidade da doença avaliada através de tomografia computadorizada e exame endoscópico com uma pior função olfatória e a presença de pólipos sendo um forte preditor para disfunção olfatória (Alt *et al.*, 2014).

Outra possível causa da perda olfatória em pacientes com rinossinusite crônica é a injúria do neuroepitélio olfatório pelo processo inflamatório (Alt *et al.*, 2014) que leva a uma perda sensorial (Kern, 2000; Andrew P Lane *et al.*, 2010). Na mucosa de pacientes com RSC o epitélio olfatório pode apresentar hiperplasia de células caliciformes e metaplasia escamosa e erosiva, sendo esta última de maior dano olfatório com exposição da membrana basal (Lee *et al.*, 2000b; Bruce W Jafek *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2009).

A injúria do neuroepitélio olfatório pelo processo inflamatório (Alt *et al.*, 2014) causa perda sensorial (Kern, 2000; Andrew P. Lane *et al.*, 2010) sendo outra causa de perda olfatória em pacientes com RSC. A gravidade da perda olfatória é maior e mais frequente em pacientes com eosinofilia (Mori *et al.*, 2013).

Na mucosa de pacientes com RSC o epitélio olfatório pode apresentar hiperplasia de células caliciformes e metaplasia escamosa e erosiva, sendo esta última de maior dano olfatório com exposição da membrana basal (Lee *et al.*, 2000b; Yee *et al.*, 2009).

Em estudo de 2002, foram encontrados danos em receptores olfatórios ciliados, metaplasia escamosa e fibrose em pacientes com sinusite através da microscopia eletrônica de transmissão (B W Jafek *et al.*, 2002b).

Em ratos transgênicos, modelo animal proposto para estudo da RSC, a produção de TNF- α no epitélio olfatório causou danos e diminuição da espessura do epitélio e da resposta a odores. Com a interrupção da indução da produção de TNF- α , o epitélio mostrou capacidade de recuperação histológica e funcional. Esses resultados corroboram com a participação da inflamação na perda olfatória na RSC (Andrew P Lane *et al.*, 2010). Nesse modelo animal com indução de expressão de TNF- α também foi encontrada uma maior expressão das proteínas JNK (quinases c-Jun-N-terminal) e apoptose, o que não ocorreu em animais com receptor TNFR1 suprimido, demonstrando uma possível via de ação do TNF- α levando a apoptose neuronal. Pacientes com RSC também tiveram maior expressão das proteínas JNK em epitélio olfatório. Portanto, os receptores TNFR1 podem ser futuros alvos terapêuticos para o tratamento da perda olfatória na RSC (Victores *et al.*, 2018).

Houve diminuição de neurônios olfatórios maduros e imaturos no epitélio olfatório de camundongos transgênicos com a indução de inflamação e produção de TNF- α com doxiciclina (modelo animal para RSC) com reversão dos efeitos após término da indução (Turner *et al.*, 2010) e aumento de apoptose de neurônios olfatórios em epitélio de pacientes com RSC (Raviv and Kern, 2004).

Em estudo realizado em biópsias de concha média e secreção nasal de pacientes com RSC leve estável que ficaram sem tratamento por 4 semanas foi encontrada uma diminuição não significativa nos níveis de mRNA, IL-1 β , IL-6, IL-8, proteína quimiotática de monócitos 1, TNF- α , prostaglandina E2 e leucotrieno nesse período, mostrando que uma

regressão espontânea dos mediadores inflamatórios no curso natural da RSC é mínima, indicando a persistência da inflamação (Kuehnemund *et al.*, 2004).

Foi encontrado menos NO nasal em pacientes com RSC correlacionado com a função olfativa nesses pacientes. Essa correlação não foi encontrada em indivíduos sem a doença, podendo não haver influência direta entre os dois parâmetros, mas os dois serem afetados pela inflamação presente nessa doença (Elsherif *et al.*, 2007).

Os neurônios olfatórios se renovam no epitélio olfatório normal, mas no epitélio de pacientes com RSC ocorre um aumento de morte desses neurônios por apoptose (Raviv and Kern, 2004).

Na RSC ocorre também uma deficiência na regeneração normal do epitélio olfatório. A inflamação inicial causa a ativação das células basais horizontais, mas no caso da persistência da inflamação, essas células passam a ficar em um estado indiferenciado incapaz de regeneração. Esse processo é mediado por citocinas e quimiocinas reguladas pelo NF- κ B, como CCL19, CCL20 e CXCL10. Essas células indiferenciadas também levam a produção de quimiocinas pró-inflamatórias, contribuindo para permanência da inflamação local (Chen, Reed and Lane, 2019). Em pacientes com RSC devido a radioterapia apresentaram aumento de células basais não diferenciadas e também metaplasia escamosa no epitélio respiratório (Huang *et al.*, 2020).

Em modelo animal para RSC com polipose com perfil inflamatório tipo 2 / Th2, com aumento da IL-4, IL - 5 e IL - 13 no epitélio olfatório, houve aumento no número de mastócitos e eosinófilos, com infiltração dessas células na mucosa olfativa. Esses animais também tiveram menor quantidade de neurônios olfativos imaturos, provavelmente devido a menor renovação epitelial. Não houve alteração no número de neurônios maduros e nos resultados de acuidade olfatória por eletroolfatograma (Rouyar *et al.*, 2019).

Foi encontrada maior expressão genica para o marcador de eosinófilos (CLC: proteína cristalina de Charcot Leyden) em concha superior de pacientes com RSC com pólipos comparado a pacientes com RSC sem pólipos e controles. A expressão desse marcador também correlacionou com a expressão de IL-5, eotaxina-1 e com os níveis da proteína catiônica eosinofílica. A expressão de CLC foi inversamente relacionada com as pontuações dos testes de limiar e discriminação olfatória, reforçando a hipótese do influxo local de eosinófilos na fenda olfatória estar correlacionado com a perda olfatória na RSC (Lavin *et al.*, 2017).

Em relato de caso com uma paciente de 62 anos com asma e RSC com polipose encontrou uma melhora na capacidade olfatória após o uso do mepolizumab, anticorpo monoclonal que bloqueia a IL-5. A aplicação dessa medicação trouxe diminuição na obstrução nasal e dos seios paranasais e o que pode ter ocasionado a melhora no olfato (Cavaliere *et al.*, 2019). O uso de outro bloqueador de interleucina (IL-4 e IL-13), o dupilumab,

associado ao uso de spray nasal de furoato de mometasona, trouxe benefício para pacientes com RSC com polipose sintomáticos não responsivos a tratamento com corticoide, com diminuição dos pólipos nasais, melhora nos sintomas e qualidade de vida (SNOT-22) e do olfato (Bachert *et al.*, 2016).

A presença de eosinofilia tecidual está associada com a perda olfatória em pacientes com RSC com pólipos, independente da gravidade da doença. Essa associação não foi encontrada em pacientes com RSC sem polipose (Hauser *et al.*, 2017). Foi encontrada maior perda de olfato nos pacientes com RSCcp ($p < 0.001$). Essa perda também foi mais associada aos pacientes classificados no endótipo tipo 2, com níveis de ECP elevados demonstrada por PCR (reação em cadeia da polimerase) (Stevens *et al.*, 2019). Pacientes com RSC com eosinofilia tiveram maior quantidade de eosinófilos na mucosa olfatória e respiratória. Esses pacientes também tiveram menos quantidade de neurônios olfatórios maduros no epitélio e mais erosão em ambas as mucosas. Quando comparado ao grupo sem eosinofilia, tiveram menor recuperação da função olfatória após 3 e 12 meses de cirurgia, mostrando um possível envolvimento dos eosinófilos na disfunção olfatória na RSC (Kashiwagi *et al.*, 2019).

Estudo do muco nasal em 62 pacientes com RSC revelou que nos pacientes com polipose os níveis de ligante de quimiocina 2, 5 e 11 (CCL₂, CCL₅, CCL11), IL-5, IL-6, IL-13, IL-9, IL-10 e TNF- α tiveram correlação com a função olfatória. Já no caso dos pacientes sem polipose, somente o ligante C-X-C 5 apresentou correlação, mostrando diferentes perfis inflamatórios nos grupos. Os resultados também corroboram com a hipótese da inflamação estar envolvida na perda olfatória na RSC (Soler *et al.*, 2019).

Os níveis de IL-5 foram inversamente correlacionados com a pontuação no teste olfatório (TDI, Sniffin Sticks) em pacientes com RSC com e sem polipose. Já IL-6, IL-7 e o fator de crescimento endotelial vascular A foram relacionados positivamente com o resultado do teste nos pacientes com RSC com polipose (Schlosser *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o epitélio olfatório de pacientes com RSC com e sem polipose e comparar com epitélio de indivíduos sem a doença para verificar possíveis causas e mecanismos da perda olfatória na RSC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação da segurança da biópsia de concha nasal superior quanto à função olfatória e a eficácia do procedimento em conter epitélio olfatório para análises.

Análise de possíveis alterações em vias de sinalização do odor (segundos mensageiros e receptor de acetilcolina), neuronal, apoptose, eosinofilia e de estresse oxidativo no epitélio olfatório dos pacientes com RSC.

Verificar a possível correlação entre a expressão dos componentes no epitélio olfatório com a função olfatória.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARTICIPANTES

Foram recrutados pacientes com diagnóstico de RSC segundo critérios do EPOS 2012 (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps) (Fokkens *et al.*, 2012), com e sem polipose nasossinusal e indicação cirúrgica. Para análise do epitélio sem a doença e para a análise da segurança e eficácia da biópsia, foram recrutados pacientes aguardando cirurgia de septoplastia sem alterações no olfato. Todos os pacientes responderam o questionário de inclusão e foram excluídos: pacientes com idade inferior a 12 anos por tratar-se de outro perfil de pacientes; com idade superior a 70 anos para evitar os efeitos da idade na morfologia do epitélio olfatório; com história de cirurgia nasal prévia ou de traumatismo crânioencefálico; com discinesia ciliar conhecida; em uso de alguma medicação tópica nasal ou antioxidantes nos últimos 30 dias. Em todos os casos, antes da participação no trabalho, o paciente leu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (parecer: 1.024.603).

4.2 PROCEDIMENTOS

Para análise do epitélio olfatório foi realizada biópsia (3 mm) na região da concha nasal superior com pinça cortante, já descrita na literatura (B W Jafek *et al.*, 2002a; Winstead *et al.*, 2014) por um único otorrinolaringologista (M.A.F.) em centro cirúrgico com anestesia geral. Foram utilizadas 3 gotas de oximetazolina na cavidade nasal para vasoconstrição e as amostras coletadas com pinça de Takahashi e as amostras foram congeladas (-80°C) para realização da imunofluorescência. Outra amostra de mesmo tamanho e retirada da mesma região foi emblocada em parafina e feita imuno-histoquímica para análise da segurança olfatória. A função olfatória bilateral e unilateral dos pacientes foi avaliada através do Teste de Identificação do Olfato da Universidade da Pensilvânia (UPSIT) validado para população brasileira antes da cirurgia (Fornazieri *et al.*, 2015). Para análise da segurança da biópsia os controles tiveram o olfato avaliado antes e também um mês após o procedimento. A avaliação de obstrução nasal foi feita através da aplicação dos questionários NOSE (Nasal Obstruction Symptom Evaluation) e SNOT-22 (Sino-Nasal Outcome Test) em português (Alves *et al.*, 2010; Kosugi *et al.*, 2011) e pela aplicação do Peak Nasal Inspiratory Flow (PNIF), que avalia a capacidade de inspiração total em litros/minuto (Dufour *et al.*, 2007). Foram coletados os dados demográficos, como idade, sexo, grau de escolaridade, etnia, além de dados referentes à história pregressa de saúde do paciente, hábitos e vícios através de questionário.

4.2.1 Teste de Identificação do Olfato da Universidade da Pensilvânia (UPSIT)

O UPSIT é constituído de quatro cartelas de 10 odores com um odor por página. Os estímulos são embebidos em microcápsulas plásticas presentes em uma faixa marrom no rodapé de cada página. O examinador orienta a pessoa examinada a raspar com um lápis essa faixa, o que faz o odor ser liberado. Após isso, o paciente responde a uma questão de múltipla escolha para descrever com o que o odor se parece. A partir da pontuação obtida, pode-se classificar a função olfatória do indivíduo em normosmia, microsmia (leve, moderada e severa) e anosmia (R. L. Doty *et al.*, 1984; Fornazieri *et al.*, 2015) (Tabela 1). Para análise unilateral, foram utilizadas 20 perguntas para cada lado, sendo a narina oposta foi obstruída com Micropore™ (Doty, 2009b).

Tabela 1 – Classificação da função olfatório pelo teste olfatório

	Mulheres	Homens
Normosmia	35 - 40	32 - 40
Microsmia leve	31 - 34	28 - 31
Microsmia moderada	26 - 30	24 - 27
Microsmia severa	19 - 25	17 - 23
Anosmia	< 18	< 16

Fonte: Fornazieri, 2015

4.2.2 Imunohistoquímica

Para confirmação da presença de epitélio olfatório nas amostras coletadas para verificação da segurança da biópsia, foi utilizada imunohistoquímica. As amostras foram fixadas por 24 horas em formol 10% e desidratadas em soluções crescentes de álcool (80%, 95% e álcool absoluto). Foram submetidas a 4 banhos de xilol e 4 banhos de parafina de 30 minutos cada e incluídas em blocos de parafina. A seguir, foram cortadas em 3 µm de espessura e alocados em lâminas.

As lâminas foram desparafinizadas em estufa e colocadas em panela de pressão elétrica com tampão EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) por 3 minutos, seguida por choque térmico em água fria por 10 minutos. Em seguida, passaram para o bloqueio de peroxidase, lavagens com PBS (tampão fosfato-salino) e incubação com anticorpo anti-OMP (anticorpo policlonal de coelho anti-proteína marcadora olfatória, Abcam, USA, diluído 1:100 em solução de PBS com BSA - albumina de soro bovino- com bloqueio de proteína) para confirmação da presença de epitélio olfatório. Os procedimentos foram feitos em câmara úmida. A incubação com anticorpo secundário biotilado foi feita por 10 minutos, nova lavagem com PBS e incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano

(HRP) (Bio SB, USA) por 10 minutos, outra lavagem com PBS, seguida de banho de PBS por 5 minutos e aplicação do DAB (diaminobenzidina 3,3) (50 µL de DAB cromógeno diluído em 1 mL de DAB tampão, Bio SB, USA) por 10 minutos e lavagem com PBS. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina. A contagem de células marcadas foi feita no software Image J com fotos das lâminas em aumento de 400x em uma área de 237 µm² (área aproximada de epitélio, padronizada para todas as amostras). A confirmação de presença de epitélio olfatório foi feita quando o número de células positivas contadas ultrapassou 20 células. Valores inferiores a esse foram considerados artefatos de marcação. Esse valor foi obtido à partir da marcação de epitélio de 5 amostras de concha inferior, tecido cuja mucosa não há relatos de presença de células olfatórias e não tem expressão do gene de receptor olfatório (Verbeurgt *et al.*, 2014).

4.2.3 Imunofluorescência

As biópsias assim que retiradas foram colocadas em solução de paraformaldeído (PFA) 4% por 24 horas, em uma solução de sacarose 30% por 24 horas (solução crioprotetora) e em uma mistura de solução de sacarose 30 % com meio Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura) por 24 horas. Posteriormente as amostras foram congeladas com auxílio de meio Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura) e mantidas a - 80 ° C até o momento das análises.

As amostras foram cortadas em criostato (Leica CM 1520) com espessura de 15 micrômetros e colocadas em lâminas sinalizadas e lapidadas (Starfrost, Knittel Glass, Germany). Os cortes foram hidratados com PBS 1x (tampão fosfato-salino) em 3 lavagens de 5 minutos em câmara úmida e feita a recuperação antigênica (em suporte com solução de 2,16 ml de tampão acetato, 9,84 ml de tampão citrato, 108 ml de água destilada e 60 µl de Tween 20) em banho-maria 90°C. Após as lâminas foram colocadas no gelo até atingir 25°C, transferidas para a câmara úmida, feitas 3 lavagens com PBS 1x de 5 minutos cada e feito o bloqueio antigênico com solução de PBS t 0,1% (tampão fosfato-salino com triton) e BSA 3% (albumina de soro bovino). Foram feitas 3 lavagens com PBS 1x de 5 minutos cada e aplicação dos anticorpos primários diluídos em solução de PBSt 0,1% e BSA 2% conforme a Tabela 2, mantidas em câmara úmida overnight. Foram feitas 3 lavagens com PBS 1x de 5 minutos cada e aplicação dos anticorpos secundários (anti-coelho conjugado com DyLight® 650- GtxRb-003-D650NHSX 1:100 e anti-camundongo conjugado com FITC – F2761 1:200) por 2 horas. As lâminas foram montadas com meio de montagem (Fluoreguard Mounting Medium, SCYTEK) e analisadas usando microscópio confocal Leica Microsystems CMS TCS SP8 (Mannheim, Germany). Controles negativos foram feitos utilizando as lâminas com tecido, seguindo todo o procedimento normal mas sem a aplicação do anticorpo primário.

Foram quantificadas de 1 a 4 regiões de epitélio olfatório (confirmado pela marcação neuronal) por paciente e calculada a média final por avaliador cego. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência em escala de cinza por área.

Tabela 2 - Lista de anticorpos primários

Anticorpo	Espécie	Fabricante, País	Tipo	Diluição	Marcação
anti-OMP (anti- proteína marcadora olfatória)	Coelho	Biorbyt	Policlonal	1:100	Neurônios olfatórios maduros
Anti-beta tubulina III	Camundongo	Thermo Fisher	Monoclonal	1:100	Neurônios
anti-GAP-43 (anti- proteína associada ao crescimento 43)	Coelho	ABCAM, USA	Policlonal	1:200	Neurônios olfatórios imaturos
anti-cAMP (anti- adenosina monofosfato cíclico)	Camundongo	ABCAM, USA	Monoclonal	1:100	Transmissão do sinal
anti-cGMP (anti- guanosina monofosfato cíclico)	Coelho	ABCAM, USA	Policlonal	1:100	Transmissão do sinal
anti-caspase 3	Coelho	ABCAM, USA	Policlonal	1:100	Apoptose
Anti-ECP (proteína catiônica eosinofílica)	Coelho	Biorbyt	Policlonal	1:200	Eosinófilos
Anti-receptor muscarínico de acetilcolina M3	Coelho	Abcam	Policlonal	1:100	Transmissão do sinal
Anti-iNOS (óxido nítrico sintase indutível)	Coelho	Biorbyt	Policlonal	1:100	Estresse oxidativo
Anti-nitrotirosina	Camundongo	Millipore	Monoclonal	1:200	Estresse oxidativo

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados utilizando o software Stata (versão 13; Stata Corp., Texas, Estados Unidos da América). As variáveis contínuas foram expressas em média (M) e desvio padrão (DP) e comparadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguido de Bonferroni ou Kruskal-Wallis seguido por Dunn, após a verificação da normalidade da

distribuição dos dados utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. As análises de segurança por odor foram feitas através de Intervalo de confiança de 95% (IC 95%). As variáveis categóricas foram analisadas através do teste qui-quadrado. Foi adotado o nível de significância de 5%. As análises de correlação da emissão de fluorescência com a pontuação no teste olfatório foram feitas através do coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

European Archives of Oto-Rhino-Laryngology
<https://doi.org/10.1007/s00405-019-05728-7>

RHINOLOGY



Safety and efficacy of superior turbinate biopsies as a source of olfactory epithelium appropriate for morphological analysis

Ellen Cristine Duarte Garcia¹ · Ana Carolina Rossaneis² · Alexandre Salvatore Pipino¹ · Gustavo Vasconcelos Gomes¹ · Fábio de Rezende Pinna³ · Richard Louis Voegels³ · Richard L. Doty⁴ · Waldiceu Aparecido Verri Jr.² · Marco Aurélio Fornazieri^{1,3,5}

Received: 30 July 2019 / Accepted: 7 November 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose There is no standardized approach for preserving olfactory function in the side of the nose where biopsy of the olfactory epithelium (OE) is performed. Moreover, a gold standard technique for obtaining human OE *in vivo* is still lacking. We determined the efficacy of obtaining good-quality OE specimens suitable for pathological analysis from the lower half of the superior turbinate and verified the safety of this procedure in maintaining bilateral and unilateral olfactory function.

Methods In 21 individuals without olfactory complaints and who had undergone septoplasty and inferior turbinectomy OE biopsy was made during septoplasty. Olfactory function, both unilateral and bilateral, was assessed using the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT) before and 1 month after the procedure. Specimens were marked with the olfactory marker protein for confirmation of OE presence.

Results Ninety percent of the samples contained OE, although clear histological characterization was possible from only 62%. There was no deterioration of UPSIT scores either bilaterally or unilaterally on the side of the biopsy. Patients also maintained the ability to identify individual odorants.

Conclusion Biopsies of the lower half of the superior turbinate do not affect olfactory function and show strong efficacy in yielding OE tissue and moderate efficacy for yielding tissue appropriate for morphological analysis. Future studies are needed to assess the safety of this procedure in other OE regions.

Keywords Smell · Immunohistochemistry · Smell tests · Morphology · Nasal mucosa · Olfactory function

Introduction

Biopsies of the human olfactory epithelium (OE) have the potential to shed light on the pathophysiology, diagnosis, and even treatment of a number of diseases. For example, such biopsies have been found useful for (a) assessing the normal and pathological morphology of the olfactory neuroepithelium of fetuses and adults [1–9], (b) obtaining stem cells for spinal cord transplantations and other biologic needs [10–12], (c) enhancing the understanding of pathological processes of such diseases as Alzheimer's and herpes simplex-related encephalitis [13, 14], and (d) defining the epithelial changes caused by such nasal diseases as chronic rhinosinusitis and virus-induced anosmia [15–17].

Despite the substantial potential of olfactory epithelial biopsies for clinical assessments and research purposes, there is no standardized technique for biopsying human OE *in vivo* [18–20]. Difficulties in obtaining OE biopsies

✉ Marco Aurélio Fornazieri
marcofornazieri@gmail.com

¹ Department of Clinical Surgery, Londrina State University (UEL), Londrina, PR, Brazil

² Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy and Cancer, Department of Pathological Sciences, UEL, Londrina, PR, Brazil

³ Department of Otorhinolaryngology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Smell and Taste Center, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

⁵ Department of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina, Brazil

include the absence of straightforward physical access to the olfactory region and the irregular distribution of the OE due to viral, bacterial, and xenobiotic insults, a number of which cumulate over the course of a lifetime [5, 8, 21–24]. OE biopsy success rates range from 16 to 100%, depending upon the technique used and the region that is targeted. Thus, studies have described success rates of 40–89% for the superior septum [9, 10, 18, 20, 22, 25–28], 16–100% for the superior turbinate [10, 18, 25, 29–32], and 42% for the middle turbinate [22]. Importantly, although some studies have reported high percentages of OE acquisition from superior turbinate biopsies, they do not describe the number of specimens that yielded good-quality material suitable for microscopic analysis.

Among studies that have obtained endoscopy-guided OE biopsies, there are no reports of reduced-unilateral olfactory capacity using properly validated-olfactory tests [10, 27, 30, 32]. Since bilateral testing typically reflects in the better functioning side of the nose, and biopsies are typically performed on only one side of the nose, one must establish whether function is altered on the side of the biopsy, a procedure that is largely lacking in the literature [27, 30, 32]. Moreover, preservation of the ability to identify a range of individual odors after this procedure has yet to be explored. Each olfactory neuron expresses only one of over nearly 300 types of receptor proteins [33], and there is evidence, at least in animals, that receptors are not uniformly distributed throughout the OE [34, 35]. Thus, biopsies could remove a group of receptor cells expressing only a subset of the full complement of types of olfactory receptors and thereby compromise the recognition and identification of specific odorants. Other mechanisms related to a possible reduction in olfactory capacity include a reduction in the total number of bipolar neurons, scarring near the olfactory cleft that prevents odorants from reaching the olfactory cleft, and trauma in the cribriform plate [27]. More details about the techniques described to obtain OE, the percentages of OE present in the biopsy samples, and the safety of these procedures with respect to olfactory function are presented in Table 1.

This study determined the efficacy of a technique in obtaining intact OE from the lower half of the superior turbinate and employed a well-validated and sensitive olfactory test to assess its safety in maintaining bilateral (total), unilateral, and lesion-side specific olfactory function.

Materials and methods

Participants

OE biopsies were performed in 21 patients from an outpatient otorhinolaryngology clinic. All patients reported no olfactory complaints and had undergone septoplasty

and inferior turbinectomy for breathing problems. Among these 21 patients, 15 were men (mean age: 29.4 years; SD 12.5 years) and 6 were women (mean 30.6 years; SD 12.5 years).

Olfactory test

Bilateral- and unilateral olfactory function was assessed pre-operatively and 1-month postoperatively using the version of the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT) that has been adapted and validated for the Brazilian population [39]. As described previously, to measure olfactory performance on the side where the biopsy was performed, volunteers were tested unilaterally (20 UPSIT items on each side) with the opposite nostril blocked with Micropore™ tape (3 M do Brasil, Sumaré, SP, Brazil) [27, 40]. The study was approved by the local ethics research committee and each participant provided informed consent after being properly made aware of the methods and purposes of the study.

Olfactory epithelium collection

An otolaryngologist collected the samples under general anesthesia. Vasoconstriction was achieved topically with three drops of oxymetazoline in each nasal cavity, and pledgets were not put over the OE region to avoid scarification. After satisfactory superior turbinate visualization, olfactory mucosa was collected from the lower half of this turbinate using a pair of Takahashi forceps (Fig. 1).

Biopsy preparation

Samples were marked with anti-olfactory marker protein (OMP). Specimens were fixed for 24 h in 10% formalin, decalcified, dehydrated, and processed in paraffin. Serial sections of 3- μ m thickness were obtained from each specimen and placed on slides. Samples were deparaffinized, and the slides were placed in a commercial food steamer with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer for 3 min for antigen retrieval, followed by a heat shock in cold water for 10 min. Peroxidase blocking was performed; the samples were then rinsed with PBS (phosphate-buffered saline) and incubated in a humid chamber with anti-OMP antibody (rabbit polyclonal antibody anti-OMP, 1:750, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) diluted in PBS with BSA (bovine serum albumin), and protein blocking was assessed to confirm the presence of OE. Incubation with the secondary biotinylated antibody (Bio SB, Santa Barbara, California, USA) was performed for 10 min, followed by rinsing with PBS and incubation with streptavidin conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Bio SB, Santa Barbara, California, USA) for 10

Table 1 Methods of confirmation of olfactory epithelium (OE) presence, success rates for obtaining OE according to the region biopsied, and verification of olfactory function maintenance after the procedure in previous studies performing OE biopsies

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Lowell et al. [21]	1982	Twelve subjects were patients undergoing septorhinoplasty, one had a total thyroidectomy under general anesthesia, one was hypoxic, and two were normal volunteers	Not reported	The head of the supine patient is positioned so the surgeon can see the space between the nasal septum and middle turbinate. The instrument is advanced through the nares along the septum to a depth of 60–70 mm, with the cutting edge in an anteroposterior orientation. When the olfactory area is reached, the instrument is rotated medially, the cutting edge is pressed against the septum, and the instrument and specimen are carefully withdrawn	Electron microscopy	Not reported	No subjects exhibited either subjective or clinically detectable olfactory deficits following the procedure
Moran et al. [9]	1992	Thirty-nine patients with chemosensory complaints	Not reported	Guided by endoscopy, under local anesthesia, a small piece of nasal epithelium (1 mm ²) was removed from the superior region of the nasal septum (6–7 cm in depth) using a specially made biopsy instrument	Electron microscopy	59.5% (superior septum)	Not reported
Leopold et al. [26]	1992	Five patients with a congenital lack of olfactory ability	14 to 38 years (mean 22)	Similar to Lovell (1982)	Electron microscopy	40% (upper septum)	-
Yamagishi et al. [26]	1994	Thirteen patients with olfactory disturbances after URI (6 women and 7 men)	26 to 72 years (mean 48.3)	The olfactory cleft was inspected with a micro-endoscope and Takahara's forceps were inserted carefully without anesthesia. When the tip reached the tip, it was pressed softly and the forceps closed	Morphological criteria and immunohistochemistry (neuro-specific enolase and S100)	92.3% (olfactory cleft)	Not reported
Lanza et al. [27]	1994	Nineteen subjects, seven were controls, 8 had PD, 3 AD, and 1 had Pick's disease	Not reported	Under local anesthesia, a hook-shaped olfactory biopsy instrument was brought endoscopically to the skull base between the superior turbinate and nasal septum. It was turned so that its biting surface faced the septum and was then withdrawn from the olfactory cleft	Electron microscopy and immunohistochemistry (neuro-specific enolase and S100)	89% (superior septum)	No. Preservation of unilateral and bilateral function using the UPSIT

Table 1 (continued)

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Féron et al. [18]	1998	Thirty-three individuals (24 men and 9 women). Ten had nasal abnormalities, as polyps. Others were undergoing septoplasty or turbinectomy	21–74 years	During nasal surgery, guided by endoscopy and under general anesthesia, with the use of an ethmoid forceps, human nasal mucosa was obtained from the septum, superior and middle turbinates	Anti-olfactory marker protein, anti-microtubule-associated protein 5 and anti-beta tubulin III	76% (posterior region of the superior septum) and 73% (posterior region of the superior turbinate)	Not reported
Féron et al. [37]	1999	Ten patients with schizophrenia (5 men and 5 women) and ten controls (6 men and 4 women)	20–48 years	Under local anesthesia. Similar to Féron et al. (1988)	Cell cultures and immunohistochemistry with Anti-olfactory marker protein and anti-beta tubulin III	100% (not reported)	No. No change in bilateral UPSIT score after biopsy
Lee et al. [25]	2000	Twenty-one patients (11 men and 10 women). Fifteen patients were anosmic and six normosmic	24–61 years (mean 40.1)	Upon identification of the olfactory cleft with a microscope and/or endoscope, the presumptive olfactory mucosa of the nasal septum and superior turbinate was incised and elevated with a sickle knife. Then, it was removed by a small Binkley forceps	Anti-microtubule associated protein-5	61% (superior turbinate and nasal septum)	Not reported
Kern [28]	2000	Thirty patients (14 men and 16 women) undergoing nasal or sinus surgery	22–39 years	Biopsies of the olfactory region were taken along the upper septum, posterior to the head of the middle turbinate. Two biopsies were taken from each side	Morphological criteria and in cases in which the identity of the mucosa was unclear, staining for the presence of olfactory marker protein was performed.	6.3% (upper septum)	Not reported
Leopold et al. [26]	2000	Fifteen normosmic volunteers (6 women and 6 men)	21–48 years	Biopsy specimens were obtained of healthy pink mucosa in the anterior and superior nasal cavity from both the medial and lateral walls. Cupped forceps, knife incisions, or sharp curettes were used to minimize tissue damage	Anti-olfactory marker protein and anti-neurotubulin	42% (anterior superior region of the middle turbinate) and 47% (anterior superior region of the nasal septum)	Not reported

Table 1 (continued)

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Lane et al. [29]	2002	Four patients undergoing partial superior turbinate resection as part of an endoscopic sinus procedure with self-report normal olfaction	Not reported	The removal of the inferior portion of the superior turbinate was performed with fine through-cutting ethmoid forceps to provide wide exposure of the face of the sphenoid sinus	Anti-olfactory marker protein	100% (superior turbinate)	None of the study subjects reported subjective olfactory dysfunction after surgery or during the 6-to 8-month follow-up period, although no formal olfactory testing was performed pre- or postoperatively
Say et al. [30]	2004	Thirty-one patients (17 men and 14 women) undergoing endoscopic sphenoidectomy for chronic rhinosinusitis	Mean 46 years	The inferior one-third of the superior turbinate was removed sharply using scissors and knife cuts to avoid tissue damage	Anti-olfactory marker protein	16% (superior turbinate)	Unilateral 12-item Cross-Cultural Smell Identification Test showed that six nostrils (12%) had a decrease in olfactory ability by more than one odorant, 27 nostrils (52%) had no more than a one odorant change, and 18 nostrils (55%) had greater than one odorant improvement
Winstead et al. [10]	2005	Forty-two individuals (28 women and 14 men) undergoing endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis	18–61 years	A 0° endoscope was used to visualize the presumptive olfactory area. All biopsies were performed under general anesthesia. A 70° forward-biting cup forceps was used to perform the biopsy. Three biopsies, each ~3 mm ² , were performed unilaterally from the dorsoanterior nasal septum, medial wall of the superior turbinate, and posterior aspect of the middle turbinate	Positive cultures producing olfactory progenitor cells	50% (posterosuperior septum and medial wall of superior/middle turbinates)	No. The mean postoperative bilateral UPSIT score was higher than the preoperative score

Table 1 (continued)

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Holbrook et al. [38]	2005	Twenty-seven patients (8 men and 17 women). Nine were hyposmic, 10 normosmic, 4 were anosmic, 3 were phantosmic, and 1 was anosmic/epihouranic	21–77 years	Some samples were harvested as part of a planned rhinologic or sinus procedure under general anesthesia. Other samples were obtained under local anesthesia induced by the application of cocaine-soaked pledgets. Specimens were obtained using cupped forceps, knife incisions, or sharp curettes	Anti-olfactory marker protein and anti-neurotubulin	85.2% (olfactory region)	Not reported
Kadramanoglou et al. [31]	2013	Forty-three patients (25 men and 18 women)	18–81 years mean 44 (SD 17)	Under general anesthesia, a portion of the middle third of the superior turbinate was resected using endoscopic microscissors	Anti-human low-affinity neurotrophin receptor and anti-S100	94.1% (superior turbinate)	Not reported
Andrews et al. [32]	2016	Sixty-five patients undergoing functional endoscopic sinus surgery	Mean 47.2 (SD 14.5)	The middle section of the superior turbinate was excised through two horizontal incisions fashioned with curved endoscopic forceps and completed posteriorly. The middle section was excised in total ensuring mucosa and turbinate bone remain intact and gently removed using endoscopic forceps	Histological and cell culture analysis	100% (superior turbinate)	No. There was no change in bilateral UPSIT score pre- and post biopsy. Unilateral test was not done
Holbrook et al. [20]	2016	Fourteen subjects (7 men and 7 women). Seven subjects had smell loss related to URI, 3 had smell loss related to head trauma, 2 had no subjective loss and tested normal, and 2 subjects tested hyposmic	22–68 years (mean 53.4)	Four subjects had biopsies in the operating room (OR). The remaining 10 underwent biopsies in the clinic. Biopsies performed in the clinic were obtained from subjects without the use of sedation in an upright sitting position. Rigid endoscopy was performed using a 2.7-mm, 0-degree endoscope and after mucosal incision, a small, cupped, biopsy forceps was used to obtain specimens approximately 2–3 mm in size	Anti-protein gene product 9.5 and anti-olfactory marker protein	80% of those biopsied in the clinic (superior septum within the olfactory cleft)	Not reported

UPSIT University of Pennsylvania smell identification test, PD Parkinson's disease, AD Alzheimer's disease, URI upper respiratory infection, OMP anti-olfactory marker protein



Fig. 1 Olfactory mucosal biopsy technique. Left superior turbinate view (a) lower half punch with Takahashi forceps (b) and status post-procedure (c) As the image shows, the bleeding was minimal

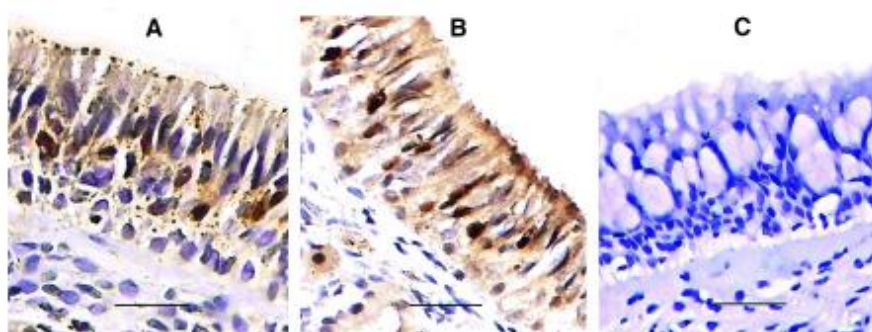


Fig. 2 Superior and inferior turbinate biopsies browned marked for olfactory marker protein (OMP, 1:750). Biopsies a and b illustrate two patients' biopsies of the superior turbinate that were positive for

the olfactory epithelium, and c shows a negative control from the respiratory epithelium at the inferior turbinate (400 \times magnification; scale bar, 50 μ m)

more minutes. The samples were then rinsed with PBS in a PBS bath for 5 min, followed by DAB (diaminobenzidine 3,3) and 50 μ l. of DAB chromogen diluted in 1 ml of DAB buffer for 10 min, and again rinsed with PBS. Slides were counterstained with hematoxylin. Five biopsies of the inferior turbinate—without olfactory cells [35]—were used as negative controls. A biopsy was considered successful for the presence of OE when the epithelium was not crushed during the procedure, was positive for anti-OMP, and exhibited all cell layers in at least one high-power field visualization.

Statistical analysis

Continuous variables, such as age and UPSIT scores, were expressed as means and standard deviations. The bilateral and unilateral UPSIT mean scores and percentages of correct answers for each odorant pre- and post-procedure were compared and the respective 95% confidence intervals were determined.

Results

Ninety percent of the harvested samples contained OE (19/21). Sixty-two percent (13/21) were suitable for pathological analysis (Fig. 2), reflecting samples that were not damaged by the biopsy or the tissue-processing processes.

The olfactory biopsies did not compromise olfactory function either bilaterally (pre-biopsy bilateral UPSIT mean score: 28.9, 95% CI 26.6–31.1; post-biopsy score: 30.6, 95% CI 28.8–32.3) or on the side of the nasal cavity where biopsy was performed (pre-biopsy unilateral UPSIT mean score: 14.2, 95% CI 11.4–17; post-biopsy score: 13.9, CI 95% 11–16.8). Olfactory function also remained normal in the nasal cavity that was not biopsied (pre-surgery unilateral UPSIT mean score: 13.3, 95% CI 10.7–15.9; post-surgery score: 13.7, 95% CI 10.6–16.8).

As shown in Table 2, patients also maintained the capacity to correctly identify specific odorants (Table 2). In other words, there was no evidence that our biopsy procedure

Table 2 Patients' capacity to identify specific odorants before and after olfactory epithelium biopsy

Odor	Before (% of correct answers, CI 95%)	After (% of correct answers, CI 95%)
Pizza	53.3 (24.7–81.9)	55.5 (30.1–80.9)
Bubble gum	86.7 (67.2–110)	88.9 (71.8–100)
Menthol	86.7 (67.2–110)	77.8 (56.5–99.1)
Cherry	86.7 (67.2–110)	88.9 (72.8–100)
Motor oil	53.3 (24.7–81.9)	55.6 (30.1–81)
Peppermint	80 (57.1–100)	77.8 (56.6–99.1)
Banana	53.3 (24.7–81.9)	72.2 (49.3–95.1)
Clove	80 (57.1–100)	88.9 (72.8–100)
Leather	46.7 (18.1–75.3)	77.8 (56.6–99.1)
Coconut	66.7 (39.6–93.7)	94.4 (82.7–110)
Onion	93.3 (79–110)	94.4 (82.7–110)
Fruit juice	60 (31.9–88.1)	72.2 (49.3–95.1)
Baby powder	86.7 (67.2–110)	100 (100–100)
Jasmine	73.3 (48–98.7)	77.8 (56.5–99.1)
Cinnamon	60 (31.9–88.1)	88.9 (72.8–100)
Gasoline	20 (– 2.9–42.9)	33.3 (9.2–57.5)
Strawberry	66.7 (39.6–96.7)	88.9 (72.8–100)
Coffee	73.3 (48–98.7)	72.2 (49.3–95.1)
Gingerbread	60 (31.9–88.1)	72.2 (49.3–95.1)
Apple	60 (31.9–88.1)	77.8 (56.5–99.1)
Perfume	80 (57.1–100)	88.9 (72.8–100)
Flower	80 (57.1–100)	83.3 (64.3–100)
Peach	53.3 (24.7–81.9)	77.8 (56.5–99.1)
Tire	73.3 (48–98.7)	83.3 (64.3–100)
Pickles	33.3 (6.3–60.4)	55.6 (30.1–81)
Pineapple	80 (57.1–100)	77.8 (56.5–99.1)
Raspberry	73.7 (47–98.7)	94.4 (82.7–110)
Orange	80 (57.1–100)	77.8 (56.5–99.1)
Walnuts	46.7 (18.1–75.3)	72.2 (49.3–95.1)
Watermelon	66.7 (39.6–93.7)	88.9 (71.8–100)
Solvent	53.3 (24.7–81.9)	61.1 (36.2–86.1)
Grass	86.7 (67.2–110)	83.3 (64.3–100)
Smoke	73.3 (48–98.7)	66.7 (42.5–90.8)
Wood	53.3 (24.7–81.9)	72.2 (49.3–95.1)
Grape	86.7 (67.2–110)	88.9 (72.8–100)
Garlic	60 (31.9–88.1)	72.2 (49.3–95.1)
Soap	73.3 (48.0–98.7)	55.6 (30.1–81.0)
Natural gas	73.3 (48.0–98.7)	88.9 (72.8–100)
Rose	40 (11.9–68.1)	55.6 (30.1–81)
Peanut	66.7 (39.6–93.7)	66.7 (42.5–90.8)

compromised bilateral smell-function for any of the 40 odorants employed on the UPSIT. Moreover, the technique was

not associated with any complication such as continuous bleeding or a cerebrospinal fluid leak.

Discussion

This study demonstrated that biopsies taken from the inferior portion of the superior turbinate are safe, in that they did not adversely affect olfactory test scores on the biopsied side of nose, both sides of the nose tested together, or the perception of specific odorants bilaterally. We also demonstrated that the technique employed shows moderate efficacy for obtaining intact OE for microscopic evaluation. A detailed description of the OE biopsy technique was provided to facilitate the standardization of this procedure, making it more comparable to other studies that have explored this topic. Notably, in our procedure, only a small mucosal piece with a diameter of 3–5 mm was removed from the superior turbinate. Future research is needed to determine to what degree our finding of safety for preserving smell ability can be extrapolated to surgeries in which larger amounts of epithelium are compromised, such as in partial turbinal resections employed in some transsphenoidal pituitary surgeries.

Our preservation of olfactory capacity after OE biopsy concurs with the findings of previous studies [10, 27, 32]. Some studies also noted preservation of unilateral olfactory function [27, 30]. However, our sample is the first sample that included only patients without diseases that cause moderate to severe olfactory dysfunction, such as chronic rhinosinusitis and neurodegenerative diseases, making it a more appropriate sample for safety analyses. We did not observe any selective deficits to the perception of specific UPSIT odorants following the biopsy. Although identification of some specific smells theoretically could be affected since olfactory neurons are distributed to some degree regionally in the OE according to the type of olfactory receptor they possess in primates [34] and because olfactory receptors have specificity for certain types of odor structures [33], we did not observe any selective anosmia after the biopsy. However, most UPSIT odorants, indeed most natural odors in general, are comprised of multiple chemicals, so redundancy may be present that mitigates the meaningfulness of this observation.

The patients' ability to perceive both pleasant and unpleasant smells of food and identify different types of substances on the basis of olfactory cues remained intact following our biopsies. One might argue that this maintenance of olfactory acuity could also reflect the improvement of nasal flow after surgery. However, there is no evidence that septoplasty associated with inferior

turbinate-partial resection improves olfaction [41–45]. In Table 2, despite not being statistically significant, it is noteworthy that 31 out of 40 odors were more correctly chosen after the biopsy than before. This could reflect learning of the smells or practice effect, as it is unlikely that taking the biopsy would improve olfactory function.

OE collection from the lower half of the superior turbinate was moderately effective, yielding OE appropriate for microscopic analysis in 62% of the patients. This percentage was smaller than the corresponding values reported in previous studies, such as the rate of 80% in the nasal septum with local anesthesia using cupped biopsy forceps [20], and 73% in the superior turbinate with ethmoidal forceps [18]. On the other hand, our success rate was superior to those obtained in the superior turbinate and septum with Blakesley forceps (61%) [25], and in the middle turbinate using various tools (42%) [22]. Our moderate efficacy is related to the fact that we considered a positive biopsy only when tissue integrity was preserved. However, if one considers all specimens collected that possessed OE, our efficacy exceeded 90% (90.5%). Future studies aiming for these success rates while obtaining intact OE for morphological analysis from regions other than the superior turbinate are necessary. Abrasion of an OE specimen can hinder proper evaluation of the OE components and prevent comparisons among the different groups of patients from whom the OE was collected.

That being said, in the majority of cases our sampling technique allowed for harvesting OE biopsies without damaging the specimens and facilitated easy bleeding control. One limitation, which is not exclusive to this technique when trying to collect human OE samples, is the reduced size of the material and its fragility, both of which reduce the number of samples available for analysis. Importantly, success in obtaining OE with this procedure may vary according to patient's age [24]. The patients included in our study were only young adults. Other studies should clarify whether such success and safety is also evident in older individuals. Another possible limitation of the study was immunohistochemistry employment alone for OE identification. Although typically OMP is not expressed in the inferior turbinate region, some samples can show background marking. Use of complementary techniques such as immunofluorescence could be advantageous in this respect, because increasing the number of markers would be expected to more accurately detect the presence of OE. Moreover, the use of frozen tissue could help decrease background marking.

We believe that general anesthesia is the best approach for OE biopsy in the superior turbinate. In addition to allowing better pain- and bleeding control, general anesthesia allows better access to the superior turbinate, since access in an awake individual with normal nasal anatomy

is very narrow and challenging even for the most trained surgeons. Other advantages of general anesthesia are the possibility of obtaining a bigger specimen for analysis and reaching the region without patient discomfort.

Conclusion

Biopsy from the lower half of the superior turbinate with a pair of Takahashi forceps is safe for bilateral, unilateral, and specific olfactory function. It also yields OE without scarification that is appropriate for morphological analysis in more than half of the attempts. More research is needed to continue making OE biopsy techniques more consistent for keeping results comparable and safe across studies.

Acknowledgements The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária for PhD, Post-Doc and PQ for financial support. We especially thank professor Eric H. Holbrook for helping in the final review of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflicts of Interest Richard L. Doty receives funding from the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. He is a consultant to Acorda Therapeutics, Eisai Co, Ltd, Merck, and Johnson & Johnson. He receives royalties from Cambridge University Press, Johns Hopkins University Press, and John Wiley & Sons, Inc. He is President of, and a major shareholder in, Sensonics International, a manufacturer and distributor of smell- and taste tests. The other authors have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Douek E, Bannister LH, Dodson HC (1975) Recent advances in the pathology of olfaction. *Proc R Soc Med* 68(8):467–470
2. Polyzonis BM, Kafandaris PM, Gijis PI, Demetriou T (1979) An electron microscopic study of human olfactory mucosa. *J Anat* 128(Pt 1):77–83
3. Moran DT, Rowley JC, Jafek BW (1982) Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res* 253(1–2):39–46
4. Jafek BW (1983) Ultrastructure of human nasal mucosa. *Laryngoscope* 93(12):1576–1599
5. Nakashima T, Kimmelman CP, Snow JB, Kimmelman ChP (1984) Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol* 110(10):641–646. <https://doi.org/10.1001/archotol.1984.00800360013003>
6. Hasegawa S, Yamagishi M, Nakano Y (1986) Microscopic studies of human olfactory epithelia following traumatic anosmia. *Arch Otorhinolaryngol* 243(2):112–116. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3718322. Accessed 5 Dec 2018
7. Yamagishi M, Hasegawa S, Nakano Y (1988) Examination and classification of human olfactory mucosa in patients with clinical olfactory disturbances. *Arch Otorhinolaryngol* 245(5):316–320

8. Paik SI, Lehman MN, Seiden AM, Duncan HJ, Smith DV (1992) Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118(7):731–738
9. Moran DT, Jafek BW, Eiler PM, Rowley JC (1992) Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction. *Microsc Res Tech* 23(2):103–110. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070230202>
10. Winstead W, Marshall CT, Lu CL, Klueber KM, Roisen FJ (2005) Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells. *Am J Rhinol* 19(1):83–90
11. Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC et al (2013) Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia* 61(3):368–382. <https://doi.org/10.1002/glia.22440>
12. Feron F, Perry C, Girard SD, Mackay-Sim A (2013) Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa. *Methods Mol Biol* 1059:107–114. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-574-3_10
13. Twomey JA, Barker CM, Robinson G, Howell DA (1979) Olfactory mucosa in herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42(11):983–987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC490390/>. Accessed 10 Feb 2017
14. Arnold SE, Lee EB, Moberg P et al (2010) Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 67(4):462–469. <https://doi.org/10.1002/ana.21910>
15. Seiden AM (2004) Postviral olfactory loss. *Otolaryngol Clin North Am* 37(6 SPEC ISS.):1159–1166. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2004.06.007>
16. Yee KK, Pribitkin EA, Cowart BJ et al (2010) Neuropathology of the olfactory mucosa in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 24(2):110–120. <https://doi.org/10.2500/wjra.2010.24.3435>
17. Hummel T, Whitcroft KL, Andrews P et al (2017) Position paper on olfactory dysfunction. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/Rhin16.248>
18. Féron F, Perry C, McGrath JJ, Mackay-Sim A (1998) New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:861–866. <https://doi.org/10.1001/archotol.124.8.861>
19. Wrobel BB, Mazza JM, Evgrafov OV, Knowles JA (2013) Assessing the efficacy of endoscopic office olfactory biopsy sites to produce neural progenitor cell cultures for the study of neuropsychiatric disorders. *Int Forum Allergy Rhinol* 3(2):133–138. <https://doi.org/10.1002/ialr.21080>
20. Holbrook EH, Rebeiz L, Schwob JE (2016) Office-based olfactory mucosa biopsies. *Int Forum Allergy Rhinol*. <https://doi.org/10.1002/ialr.21711>
21. Lowell MA, Jafek BW, Moran DT, Rowley JC 3rd (1982) Biopsy of human olfactory mucosa. An instrument and a technique. *Arch Otolaryngol* 108(4):247–249
22. Leopold DA, Hummel T, Schwob JE, Hong SC, Knecht M, Kobal G (2000) Anterior distribution of human olfactory epithelium. *Laryngoscope* 110(3 Pt 1):417–421. <https://doi.org/10.1097/00005537-200003000-00016>
23. Holbrook EH, Wu E, Curry WT, Lin DT, Schwob JE (2011) Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope* 121(8):1687–1701. <https://doi.org/10.1002/lary.21856>
24. Doty RL, Kamath V (2014) The influences of age on olfaction: a review. *Front Psychol* 5(FEB):1–20. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00020>
25. Lee SH, Lim HH, Park HJ, Lee HM, Choi JO (2000) Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109(8 Pt 1):720–725
26. Leopold DA, Hornung DE, Schwob J (1992) Congenital lack of olfactory ability. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101(3):229–236
27. Lanza DC, Deems DA, Doty RL et al (1994) The effect of human olfactory biopsy on olfaction—a preliminary report. *Laryngoscope* 104(7):837–840
28. Kern R (2000) Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope* 110(7):1071–1077
29. Lane AP, Gomez G, Dankulich T et al (2002) The superior turbinate as a source of functional human olfactory receptor neurons. *Laryngoscope*. 112(7 Pt 1):1183–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169895>. Accessed 03 Aug 2018
30. Say P, Leopold D, Cochran G et al (2004) Resection of the inferior superior turbinate: does it affect olfactory ability or contain olfactory neuronal tissue? *Am J Rhinol* 18(3):157–160
31. Kachramanoglou C, Law S, Andrews P, Li D, Choi D (2013) Culture of olfactory ensheathing cells for central nerve repair: the limitations and potential of endoscopic olfactory mucosal biopsy. *Neurosurgery* 72(2):170–178. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e31827b99be>
32. Andrews PJ, Poirrier A, Lund VJ et al (2016) Safety of human olfactory mucosal biopsy for the purpose of olfactory ensheathing cell harvest and nerve repair: a prospective controlled study in patients undergoing endoscopic sinus surgery. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/rhin15.365>
33. Malnic B, Hirono J, Sato T et al (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96(5):713–723. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80581-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80581-4)
34. Mombaerts P, Wang F, Dulac C et al (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87(4):675–686. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81387-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81387-2)
35. Verbeugt C, Wilkin F, Tarabichi M et al (2014) Profiling of olfactory receptor gene expression in whole human olfactory mucosa. *PLoS One* 9(5):21–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096333>
36. Yamagishi M, Fujiwara M, Nakamura H (1994) Olfactory mucosal findings and clinical course in patients with olfactory disorders following upper respiratory viral infection. *Rhinology* 32(3):113–118
37. Féron F, Perry C, Hirning MH et al (1999) Altered adhesion, proliferation and death in neural cultures from adults with schizophrenia. *Schizophr Res* 40(3):211–218
38. Holbrook EH, Leopold DA, Schwob JE (2005) Abnormalities of axon growth in human olfactory mucosa. *Laryngoscope* 115(12):2144–2154
39. Fornazieri MA, Santos CA, Bezerra TFP et al (2015) Development of normative data for the Brazilian adaptation of the University of Pennsylvania smell identification test. *Chem Senses* 40(2):141–149. <https://doi.org/10.1093/chemse/bju068>
40. Doty RL (ed) (2009) The smell threshold test administration manual, 2nd edn. Sensonics International, Philadelphia, p 14
41. Altundag A, Salihoglu M, Tekeli H, Saglam M, Cayonu M, Hummel T (2014) Lateralized differences in olfactory function and olfactory bulb volume relate to nasal septum deviation. *J Craniofac Surg* 25(2):359–362
42. Damm M, Eckel HE, Jungeholsing M, Hummel T (2003) Olfactory changes at threshold and suprathreshold levels following septoplasty with partial inferior turbinectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112(1):91–97
43. Pade J, Hummel T (2008) Olfactory function following nasal surgery. *Laryngoscope* 118(7):1260–1264
44. Kilicaslan A, Acar GO, Tekin M, Ozdamar OI (2016) Assessment the long-term effects of septoplasty surgery on olfactory function. *Acta Otolaryngol* 6489:1–6
45. Kimmelman CP (1994) The risk to olfaction from nasal surgery. *Laryngoscope* 104:981–988

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Olfactory loss in chronic rhinosinusitis: evaluation of the olfactory epithelium

Authors

Ellen Cristine Duarte Garcia, Msc. ^a (ellencdgarcia@gmail.com)

Waldiceu Aparecido Verri Jr, PhD ^b (waldiceujr@yahoo.com.br)

Marco Aurélio Fornazieri, MD, PhD ^{a,c,d} (marcofornazieri@gmail.com)

Affiliations

a Department of Clinical Surgery, Londrina State University (UEL), Londrina, PR, Brazil (86038-350)

b Department of Pathological Sciences, Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy and Cancer, UEL, Londrina, PR, Brazil (86057-970)

c Department of Otorhinolaryngology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil (01246-000)

d Department of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná (80215-901)

*Corresponding author

E-mail: marcofornazieri@gmail.com (MAF), +55 43 988133812

Orcid: 0000-0001-5213-2337

Abstract

Background: Chronic rhinosinusitis (CRS) has a symptom of loss of smell and not all the mechanisms involved have been fully elucidated.

Objective: Check for possible changes in olfactory epithelium in patients with CRS and analyze the correlation of the findings with olfactory function.

Methods: Patients with CRS with and without polyps and healthy individuals (controls). Smell was assessed by the University of Pennsylvania's Smell Identification Test and nasal obstruction by NOSE, SNOT-22 and PNIF. The analysis of the olfactory epithelium was performed with immunofluorescence in nasal biopsy. ANOVA tests followed by Bonferroni, Kruskal-Wallis followed Dunn, Chi-square, Pearson's and Spearman correlation coefficient were used for statistical analysis.

Results: Forty-four patients were evaluated (mean: 37.4 years, SD: 12.9 years). Fifteen participants had CRS with polyps, 19 CRS without polyps and 10 controls. CRS patients had a significantly lower olfactory test score (UPSIT) ($p = 0.001$). No difference was found between nasal obstruction between groups. There was no significant difference in the expression of any of the evaluated markers. However, the CRS groups showed possible alteration of second messengers, apoptosis, oxidative stress and eosinophils. There was a correlation between smell and the GAP43 ($R = -0.5$, $p = 0.01$) and cGMP ($R = 0.5$, $p = 0.03$).

Conclusion: Patients with CRS tend to have higher levels of oxidative stress and apoptosis in the olfactory epithelium and lower expression of cAMP, which could lead to loss of smell. Larger samples should be used to prove this mechanism.

Key-words: oxidative stress, smell, apoptosis, biopsy

Introduction

Olfactory dysfunction is a prevalent symptom among patients with Chronic Rhinosinusitis (CRS), about 84%(Kern, 2000; Raviv and Kern, 2004; Soler, Mace and Smith, 2008; Alt *et al.*, 2014). CRS is an inflammatory disease that affects thousands of people (Fokkens *et al.*, 2012). The obstructive factor of the disease is one of the causes for the olfactory alteration (Doty and Mishra, 2001; Pfaar *et al.*, 2006; Malaty and Malaty, 2013; Alt *et al.*, 2014; Rimmer *et al.*, 2014; Zhen *et al.*, 2014), but the local inflammatory process is also related (Kern, 2000; Lane *et al.*, 2010; Alt *et al.*, 2014; Chen, Reed and Lane, 2019). These patients had apoptosis of olfactory neurons (Raviv and Kern, 2004) morphological changes, such as squamous metaplasia (Yee *et al.*, 2010), eosinophilia (Mori *et al.*, 2013; Hauser *et al.*, 2017; Lavin *et al.*, 2017; Kashiwagi *et al.*, 2019), change in regenerative capacity (Chen, Reed and Lane, 2019) and presence of reactive oxygen species (Fordham *et al.*, 2013) in the nasal mucosa. Other molecules that could also be involved in olfactory loss in CRS, such as cAMP, cGMP and acetylcholine receptor, were altered in other diseases with hyposmia (Henkin and Velicu, 2011; Leon-Sarmiento *et al.*, 2012), but have not been studied in CSR.

So far, the presence of oxidative stress in the nasal mucosa and changes in signaling pathways, such as second messengers and acetylcholine, have not been related to decreased olfactory capacity and cellular damage in the olfactory epithelium in CRS. This approach could contribute to clarify the pathophysiology of the disease and direct studies to new therapies for olfactory loss in CRS with less side effects than current therapies with corticosteroids.

In the present exploratory study, samples of olfactory epithelium from patients with CRS with and without polyposis were compared with samples from healthy patients through immunofluorescence by analyzing their neuronal components (mature and immature olfactory neurons), signaling pathways (second messengers and acetylcholine) and damage (apoptosis, oxidative stress, eosinophils), correlating with olfactory function to clarify the role of these pathways in olfactory dysfunction present in CRS.

Material and methods

Subjects

Patients diagnosed with CRS according to EPOS 2012 criteria (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps) were recruited for evaluation (Fokkens *et al.*, 2012), with and without nasosinusoidal polyposis and surgical indication. For analysis of the epithelium without the disease, healthy individuals were evaluated, awaiting septoplasty surgery without changes in smell confirmed by olfactory test. The following were excluded: patients younger than 12 years old or older than 70 years to avoid the effects of age on the olfactory epithelium morphology; with a history of previous nasal surgery or traumatic brain injury; with known ciliary dyskinesia; using some topical nasal medication or antioxidants in the last 30 days, patients with allergic or medicated rhinitis and patients with RSC secondary (with known ciliary dyskinesia; cystic fibrosis; nasal tumor; granulomatous disease; fungal ball; immunodeficiencies, Wegener; polyangitis; odontogenic rhinosinusitis (Fokkens *et al.*, 2020)). The research was approved by the local ethics committee and in all cases, before participating in the work, the patient or guardian read and signed the Free and Informed Consent Form.

Analysis of olfactory function and nasal obstruction

The olfactory function of patients was assessed using the University of Pennsylvania's Smell Identification Test (UPSIT), adapted and validated for the Brazilian population (Fornazieri *et al.*, 2015). The test consists of four cards with 10 odors, one odor per page. The odors are impregnated in a brown band present on each page. The patient scratches with a pencil in the region to release the odor and chooses between 4 alternatives with what the odor looks like. The olfactory function is then classified according to the final score obtained in normosmia (degree of loss 0), light microsmia (degree of loss 1), moderate (degree of loss 2) or severe (degree of loss 3) and anosmia (degree of loss 4).

The evaluation of nasal obstruction was carried out using the NOSE (Nasal Obstruction Symptom Evaluation) and SNOT-22 (Sino-Nasal Outcome Test) questionnaires in Portuguese (Alves *et al.*, 2010; Kosugi *et al.*, 2011) and the application of Peak Nasal Inspiratory Flow (PNIF), which assesses the total inspiration capacity in liters / minute (Dufour *et al.*, 2007).

Immunofluorescence

For immunofluorescence analysis of the olfactory epithelium, samples of the nasal mucosa were collected in the upper nasal turbinate region by a single otolaryngologist (M.A.F.) in a surgical center with general anesthesia. 3 drops of oxymetazoline were used in the nasal cavity for vasoconstriction and the samples collected with Takahashi forceps.

The biopsies as soon as they were removed were placed in a 4% paraformaldehyde (PFA) solution for 24 hours, in a 30% sucrose solution for 24 hours (cryoprotectant solution) and in a mixture of 30% sucrose solution with Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura) for 24 hours in pure Tissue-Tek for 24 hours. Subsequently, the samples were frozen with the aid of Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura) and kept at -80°C until the time of analysis.

The samples were cut in a cryostat (Leica CM 1520) with a thickness of 15 micrometers and placed on marked and polished slides (Jiangsu Huida Medical Instruments, China). The cuts were hydrated with 1x PBS (phosphate-saline buffer) in 3 5-minute washes in a humid chamber and antigenic recovery was performed (in support with 2.16 ml acetate buffer, 9.84 ml citrate buffer, 108 ml of distilled water and 60 µl of Tween 20) in a water bath at 90°C. Afterwards, the slides were placed on ice until reaching 25°C, transferred to the humid chamber, 3 washes were made with PBS 1x for 5 minutes each and the antigen was blocked with PBS + 0.1% solution (phosphate-saline buffer with triton) and 3% BSA (serum albumin bovine). Three washes were made with PBS 1x of 5 minutes each and application of the primary antibodies diluted in a solution of PBSt 0.1% and BSA 2% according to Table 1, kept in a humid chamber overnight. 3 washes were performed with 1x PBS of 5 minutes each and application of secondary antibodies (anti-rabbit conjugated with DyLight® 650- GtxRb-003-D650NHSX 1: 100 and anti-mouse conjugated with FITC - F2761 1: 200) for 2 hours. The slides were mounted with mounting medium (Fluoreguard Mounting Medium, SCYTEK) and analyzed using Leica Microsystems CMS TCS SP8 confocal microscope (Mannheim, Germany). Negative controls were performed using the tissue slides, following the entire procedure, but without the application of the primary antibody. 1 to 4 representative regions of olfactory epithelium (confirmed by neuronal marking) were quantified per patient and the final average was calculated by an

early evaluator. The results were expressed in gray scale fluorescence intensity in an area of 0.02 mm². The thickness of the OE in micrometers was evaluated in the images measuring in the region of greater thickness of the sample and averaged for comparison between the groups. The percentage of OE (positive for neuronal marking), the presence of intact OE (with marked neurons, with all cell layers and at least 200 µm in length) and the presence of nerve bundles in the lamina propria were also evaluated in percentage.

Table 1 - List of primary antibodies

Antibody	Species	Company	Class	Concentration	Antigen	Target
OMP	Rabbit	Biorbyt	Polyclonal	1:100	Olfactory marker protein	Mature olfactory neurons
B3	Mouse	Thermo Fisher	Monoclonal	1:100	beta tubulin III	Neurons
GAP-43	Rabbit	ABCAM	Polyclonal	1:200	growth associated protein 43	Immature olfactory neurons
cAMP	Mouse	ABCAM	Monoclonal	1:100	cyclic adenosine monophosphate	Signal transmission
cGMP	Rabbit	ABCAM	Polyclonal	1:100	cyclic guanosine monophosphate	Signal transmission
CASP3	Rabbit	ABCAM	Polyclonal	1:100	caspase 3	Apoptosis
ECP	Rabbit	Biorbyt	Polyclonal	1:200	eosinophil cationic protein	Eosinophils
ACh	Rabbit	ABCAM	Polyclonal	1:100	muscarinic acetylcholine M3 receptor	Signal transmission
INOS	Rabbit	Biorbyt	Polyclonal	1:100	inducible nitric oxide synthase	Oxidative stress
NITRO	Mouse	Millipore	Monoclonal	1:200	nitrotyrosine	Oxidative stress

Statistical analysis

Data formed was analyzed using the Stata software (version 13; Stata Corp., Texas, United States of America). Continuous variables were expressed as mean (M) and standard deviation (SD) and compared using analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni or Kruskal-Wallis followed by Dunn Test, after verifying the normality of data distribution using the Shapiro-Wilk test. Categorical variables were analyzed using the chi-square test. The significance level of 5% was adopted. The correlation analyzes of the fluorescence emission with the olfactory test score were performed using Pearson's correlation coefficient or Spearman correlation.

Results

Subjects description and olfactory function

Forty-four patients aged between 14 and 67 years were evaluated (mean: 37.4 years, SD: 12.9 years). Twenty-seven were men (61%). Fifteen participants had CRS with polyps, 19 CRS without polyps and 10 did not have CRS (control group). The groups were similar with respect to age, schooling and the number of males. The values of nasal obstruction tests did not differ between groups. CRS patients with and without polyps had a significantly lower olfactory test score (UPSIT) than the control group (CRS with polyps x controls $p < 0.0001$, CRS without polyps x controls $p = 0.03$). There was no difference between the groups CRS with polyps x CRS without polyps ($p = 0.1$) (Table 2).

Table 2. Description of the studied population

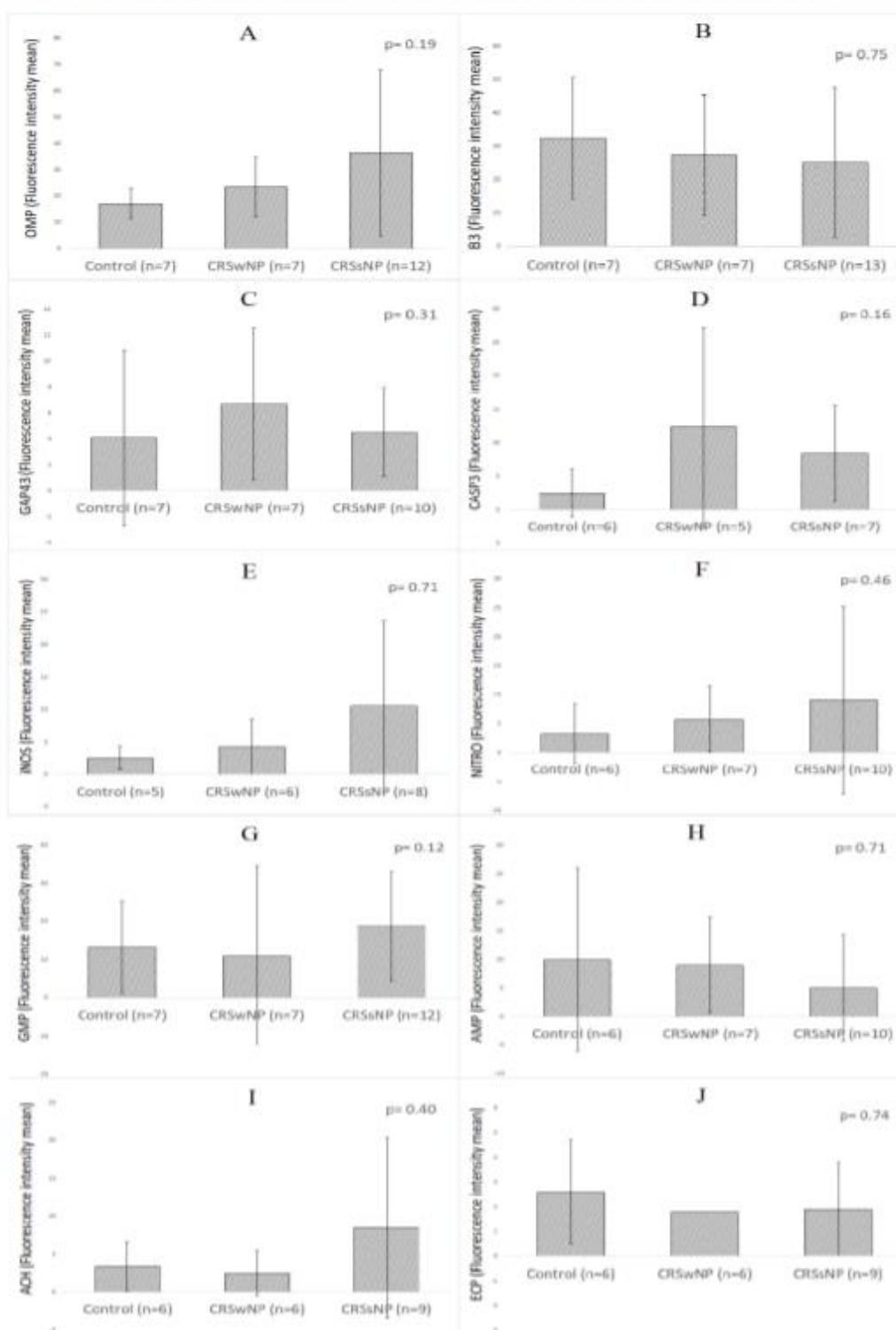
Variable	Controls N= 10	CRS with polyps N= 15	CRS without polyps N= 19	p-value
Age – years (SD)	33.5 (11.6)	38.2 (13.5)	38.8(13.6)	0.6
Male %	80	52.6	60	0.4
Scholarity – years (SD)	16.9 (6)	12.4 (6.7)	17.7 (7.3)	0.2
UPSIT (SD)	35.1 (2.8)	23 (6.6)	29.1 (6.9)	0.0001 *
PNIF (SD)	80 (0)	78.1 (36.6)	85.6 (29)	0.9
SNOT-22 (SD)	50 (41.5)	47.1 (18.5)	53.1 (14.8)	0.9
NOSE (SD)	14.7 (4.2)	14.5 (5.2)	15.2 (3.9)	0.9

SD: Standard deviation, UPSIT = University of Pennsylvania Smell Identification Test, PNIF = Peak Nasal Inspiratory Flow, SNOT-22 = Sinonasal Outcome Test, NOSE: Nasal Obstruction Symptom Evaluation. Chi-square was used for gender analysis. Age, SNOT and NOSE analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni was used and Kruskal-Wallis followed by Dunn Teste for UPSIT, PNIF and Scholarity. * statistically significant value

Immunofluorescence

The results of the comparisons of the averages of fluorescence emission by marker used are shown in figure 1. The control group showed a greater amount of expression of cAMP and B3 and a lower amount of OMP, GAP43, caspase 3, iNOS, NITRO. The levels of cGMP and ACh were higher in CRS without polyps and ECP were similar between groups. However, these results were not statistically significant.

Figure 1 - Fluorescence emission intensity (gray scale in an area of 0.02 mm²)

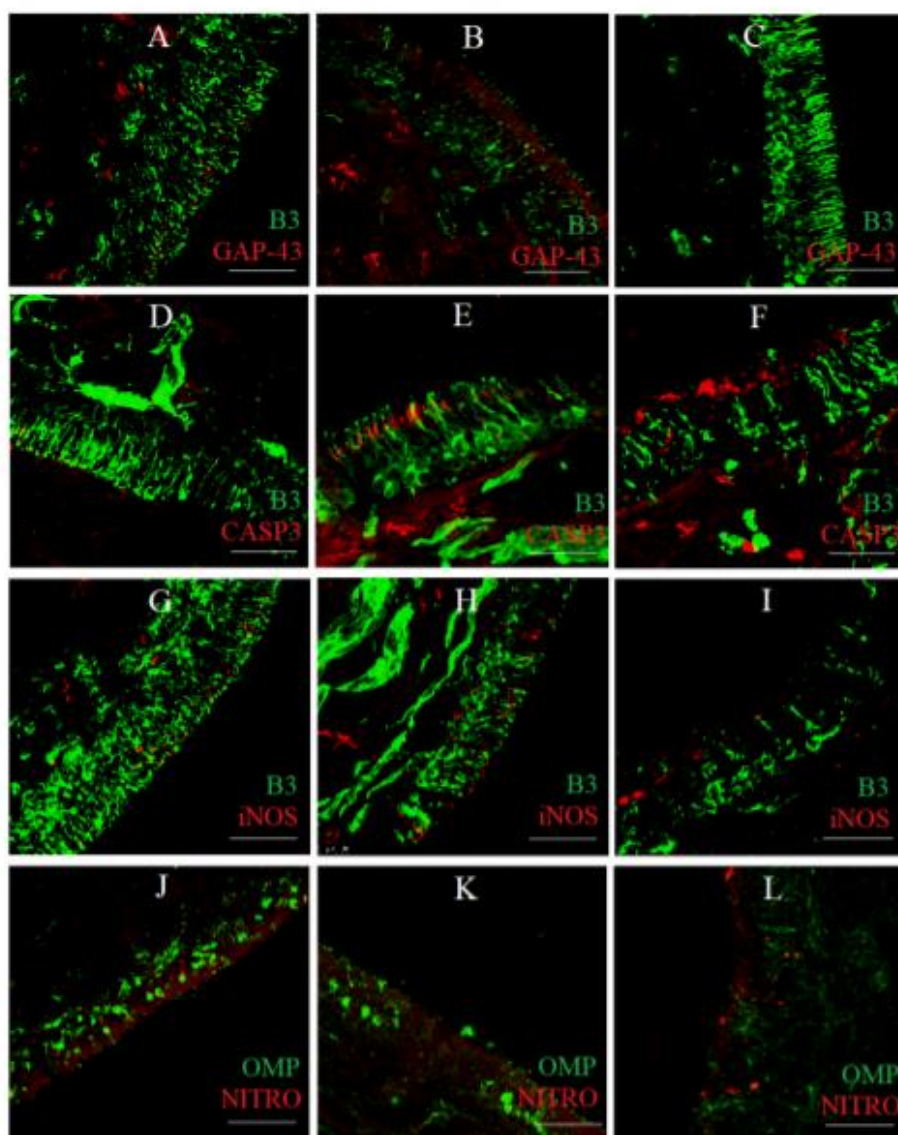


The graphs show the average intensity of fluorescence emission per group for each marker with standard deviation. ANOVA statistical test (for OMP and B3) or Kruskal-Wallis (others markers) was used. A: B3 (Beta-tubulin 3), B: OMP (Olfactory marker protein), C: GAP43 (Growth Associated Protein 43), D: CASP3 (Caspase 3), E: iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), F: NITRO (Nitrotyrosine), G: cGMP (Cyclic guanosine monophosphate), H: cAMP (Cyclic adenosine monophosphate), I: ACh (muscarinic acetylcholine M3 receptor). J: ECP (Eosinophil cationic protein). CRSwNP: Chronic rhinosinusitis with polyps, CRSsNP: Chronic rhinosinusitis without polyps.

Figure 2 shows the expression of neurons (B3 total neurons and GAP43 immature neurons, A,B,C), apoptosis (CASP3 caspase 3, D,E,F) and oxidative stress (iNOS, G,H,I and NITRO nitrotyrosine J,K,L) in immunofluorescence images. In the images, the CRS with polyps group has lower expression of GAP43 (C) than controls (A) and CRS with polyps (B). The groups with CRS with and without polyps also showed greater expression of apoptosis (E,F) and oxidative stress (H,I,K,L) than controls (D,G,J).

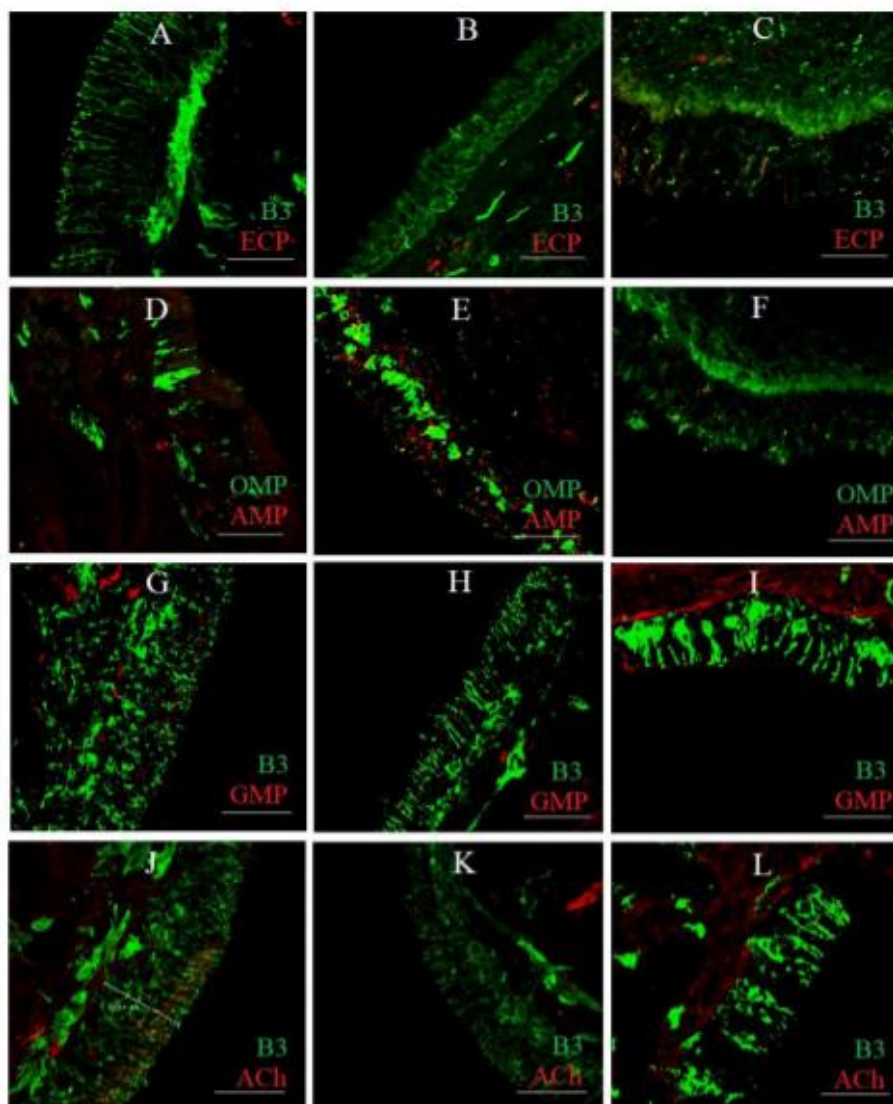
In figure 3 we can also see the location of eosinophils in the region below the olfactory epithelium and also some within the region epithelial in a patient with CRS with and without polyposis (B,C), superior to find in the slides obtained from the controls (A). It is possible to see a lower expression of cAMP in the CRS group without polyps (F) than in the controls (D) and CRS with polyps (E). Images are variable as to B3 and OMP levels. The group CRS without polyps presents stronger expression of GMP, mainly in regions below the epithelium (I). In the images difference in acetylcholine receptors is not evident (J,K,L).

Figure 2. Immunofluorescence of the olfactory epithelium for neuronal, apoptosis and oxidative stress expression



The images show immunofluorescence of the human olfactory epithelium. The first column shows samples from the control group (A,D,G,J), the second column shows samples from the group Chronic rhinosinusitis with polyps (B,E,H,K) and the third column shows samples from the group Chronic rhinosinusitis without polyps (C,F,I,L). B3: beta-tubulin 3; GAP-43: Growth Associated Protein 43; CASP3: caspase 3; iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase; NITRO: Nitrotyrosine; OMP: Olfactory marker protein. The scale bars are 50 μ m.

Figure 3. Immunofluorescence of the olfactory epithelium for eosinophilia, second messengers and acetylcholine receptor expression



The images show immunofluorescence of the human olfactory epithelium. The first column shows samples from the control group (A,D,G,J), the second column shows samples from the group Chronic rhinosinusitis with polyps (B,E,H,K) and the third column shows samples from the group Chronic rhinosinusitis without polyps (C,F,I,L). B3: beta-tubulin 3; ECP: Eosinophil cationic protein; OMP: Olfactory marker protein; AMP: Cyclic adenosine monophosphate; GMP: Cyclic guanosine monophosphate; ACh: muscarinic acetylcholine M3 receptor. Image J shows the measurement of the thickness of the epithelium in control. The scale bars are 50 μ m.

There was a negative correlation between the score obtained on the olfactory test and the GAP43 ($R = -0.5$, $p = 0.01$) and positive with a marker for the cGMP ($R = 0.5$, $p = 0.03$). There was no significant correlation between the olfactory test and the expression of the other evaluated molecules (cAMP $R = -0.1$, $p = 0.6$; OMP $R = -0.1$, $p = 0.5$; B3 $R = 0.05$, $p = 0.8$; Nitro $R = -0.1$, $p = 0.6$; iNOS $R = 0.2$, $p = 0.3$; Caspase-3 $R = -0.3$, $p = 0.3$; ECP $R = 0.2$, $p = 0.5$; ACh $R = 0.3$, $p = 0.3$).

Olfactory epithelium obtainment and thickness

Among the 44 patients in which the biopsy was performed, olfactory epithelium was obtained for analysis in 27 patients (63%). In controls, the rate of achievement was 70%, 47% in CRS with polyps and 72% CRS without polyps ($p = 0.3$). Only in 1 patient with CRS with polyps there was another type of epithelium than non-olfactory, in the others there was no epithelial type. Considering only intact EO, in the control group there was 70%, in the RSC with polyps 47% and without polyps 67% ($p = 0.4$). All patients had nerve bundles in the lamina propria.

There was no difference in the analysis of the thickness of the EO when comparing patients with CRS with and without polyposis and controls (Mean controls = $72.7 \mu\text{m} \pm 14.4 \mu\text{m}$, CRS with polyps = $71.2 \mu\text{m} \pm 14.5 \mu\text{m}$ and CRS without polyps = $69.7 \mu\text{m} \pm 11.9 \mu\text{m}$, $p = 0.9$), an example of measurement can be seen in figure 3 J.

Discussion

The present study found a tendency to lower values in the CRS for cAMP and higher for cGMP. The CRS patients also had a higher expression of apoptosis and oxidative stress. Furthermore, show the presence of eosinophils in the olfactory epithelium in CRS. These results show a probable role of these mechanisms in olfactory loss in CRS. Patients with CRS had no nasal obstruction significantly greater than the control group (assessed by PNIF, NOSE and SNOT-

22), and had a significant difference in the olfactory function, demonstrating that this change in smell is not due to obstructive factors.

In our work, no significant difference was found in neuronal markers, both total, mature and immature neurons. However, we found correlation between the score obtained on the olfactory test and the GAP43 ($R = -0.5$, $p = 0.01$). These results were contrary to those found in animal models that had changes in neuronal levels (Lane *et al.*, 2010; Rouyar *et al.*, 2019). In humans, patients with eosinophilia had fewer mature neurons in the epithelium (Kashiwagi *et al.*, 2019). The data suggest a difference between patient profiles within CRS, with or without alteration of neurons at the epithelial level. There was also no significant increase in apoptosis in the OE, but CRS patients had a higher mean expression. In a previous study, an increase in apoptosis was found in neurons (Raviv and Kern, 2004). In our study, caspase 3 expression was not co-located with neuronal labeling (data not shown), showing that it could be other epithelial cells that were in the process of apoptosis.

Levels of oxidative stress markers (nitrotyrosine and iNOS) had no significant difference between groups in this study. However, both markers were more expressed in the CRS groups. Data corroborate previous studies, where CRS patients had lower levels of antioxidants, such as vitamin E (Nassar *et al.*, 2003), vitamin C (Reddy *et al.*, 2017), reduced glutathione and uric acid (Westerveld *et al.*, 1997), and greater amount of reactive oxygen species (Fordham *et al.*, 2013). This shows a possible participation of this mechanism in the loss of olfaction in CRS and being an alternative to a therapeutic target.

The second messengers cAMP and cGMP play a fundamental role in the sense of smell, since they are elevated when the odorous particle binds to the receptor in the OE, causing neuronal depolarization and odorous signal transmission. (Nakamura and Gold, 1987; Brunet, Gold and Ngai, 1996; Leinders-Zufall, Shepherd and Zufall, 1996). In our results, we found an average of less cAMP in patients with CRS with and without polyps, and higher cGMP in the group without polyposis, but not significant. We also found positive correlation between olfactory test and marker for the cGMP ($R = 0.5$, $p = 0.03$). These findings corroborate in part with that found in patients with hyposmia, where they had less cAMP and cGMP in nasal mucus samples (Henkin and Velicu, 2011).

During the inflammatory state, an increase in prostaglandin E2 occurs which, through binding with the EP3 receptor, leads to a decrease in cAMP and a consequent loss of the effectiveness of neurons (Fukuiri *et al.*, 2012; Natura *et al.*, 2013), this could also explain the decrease in cAMP levels in patients with CRS. The increased levels of cGMP could be due to the lack of regulation that occurs by the cAMP molecule on the enzyme guanylate cyclase (Moon *et al.*, 1998).

Acetylcholine is a neurotransmitter with an important role in the transmission of the odorous signal, increasing cAMP levels and the type 3 muscarinic receptor is present in olfactory cells (Li and Matsunami, 2011). A deficit in this type of receptor could prevent the correct identification of odors. The results were not statistically significant as for the expression of these receptors, but the CRS without polyps group had a higher mean. In other diseases such as myasthenia gravis, acetylcholine receptor deficiency has been found accompanied by a decrease in olfactory function (Leon-Sarmiento *et al.*, 2012). Patients with CRS with and without polyps had higher levels of $\alpha 7nACh$ nicotinic receptor protein expression (involved with the inflammatory response) in nasal biopsies, (Cerejeira, Fernandes and Pinto Moura, 2016), but so far a relationship with muscarinic receptors has not been reported. The expression of the receptors does not represent the levels of free acetylcholine either. More studies should be done to investigate this possible relationship using a larger number of patients for evaluation.

The presence of eosinophils in the OE did not show a statistically significant difference between controls and patients with CRS, but these individuals had a greater number of these cells, mainly in the region below the epithelium. Other studies have shown eosinophils in the nasal mucosa in an animal model and in patients with CRS (Lavin *et al.*, 2017; Rouyar *et al.*, 2019) and correlation between that presence and smell (Hauser *et al.*, 2017). This justifies the lack of significance, as the fluorescence emission assessment was made within the epithelial region. The presence of these cells could be linked to damage to nerve bundles that advance from the epithelium into the nasal mucosa, causing olfactory deficit. These results corroborate the findings of other studies that found greater eosinophilia in patients with CRS (Lavin *et al.*, 2017) and greater loss of smell in patients classified as type 2 endotype, with high levels

of ECP (Stevens *et al.*, 2019) both demonstrated by PCR (polymerase chain reaction) technique. However, another study found no relationship between mucosal eosinophilia and smell (Farrell *et al.*, 2021). Further studies are needed to elucidate the markers that mediate inflammation in olfactory function in CRS.

Interestingly, there was no significant difference in obtaining total or intact OE between groups. However CRS with polyps have lower rate of intact OE (47% and control 70%). Of the samples where no OE was found, only one contained another type of epithelium, the rest did not have any type of epithelium. This fact and the presence of nerve bundles, found in 100% of patients, indicates that there was previously OE. We believe that the antigenic recovery technique may have contributed to the loss of the epithelium during the procedure. This procedure serves to better expose the epitopes and obtain a more defined marking and studies similar to ours used this step (Holbrook, Leopold and Schwob, 2005; Holbrook *et al.*, 2011; Holbrook, Rebeiz and Schwob, 2016). In future studies, it may be attempted to perform immunofluorescence without this step to verify a greater quantity of slides with epithelium, but checking the quality of image acquisition.

In our study, the thickness of the OE was not significantly changed by the RSC. However, the mean obtained in the sick groups was lower than that found in the controls. This result is similar to that found by Yee and collaborators, where also the average number of patients (CRS with and without polyposis) was lower, but not statistically significant. (Yee *et al.*, 2010). In transgenic rats, an animal model proposed for the study of CRS, the production of TNF- α (tumor necrosis factor alpha) in the olfactory epithelium caused damage and decreased thickness of the epithelium and the response to odors. With the interruption of the production of TNF- α , the epithelium showed capacity for histological and functional recovery (Lane *et al.*, 2010), however, a decrease in thickness in the EO was not found in human biopsies.

One limitation was the use of individuals with septal deviation in the control group, who may also have some degree of nasal obstruction. In addition, due to the large variation found among individuals in the same group (presenting an increased standard deviation), a larger sample would be important to confirm the results. But due to the fact that biopsy is an invasive procedure, the procedure

had to be performed in a surgical environment, so the difficulty in obtaining material of individuals without any type of alteration in large numbers.

The evaluations performed did not include elderly or pediatric patients, as well as individuals with secondary CRS were excluded. For extrapolation of data to these populations further studies should be carried out.

Conclusions

The data show that patients with CRS with and without polyps tend to have higher levels of oxidative stress and apoptosis in the olfactory epithelium and lower expression of cAMP, which could lead to loss of smell. Studies with a larger number of participants should be carried out to confirm these findings and to influence new targets for the treatment of this disorder.

Acknowledgments

The authors thank Fundação Araucária for PhD financial support.

References

- Alt, J. A. *et al.* (2014) 'Predictors of olfactory dysfunction in rhinosinusitis using the brief smell identification test', *Laryngoscope*, 124(7), pp. 1–19. doi: 10.1002/lary.24587.
- Alves, S. *et al.* (2010) "'NOSE" Validação em Português e aplicação na septoplastia', *Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial*, pp. 9–14. Available at: <http://www.journalsporl.com/index.php/sporl/article/view/256>.
- Brunet, L. J., Gold, G. H. and Ngai, J. (1996) 'General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel.', *Neuron*. United States, 17(4), pp. 681–693.
- Cerejeira, R., Fernandes, S. and Pinto Moura, C. (2016) 'Increased expression of $\alpha 7nAChR$ in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis', *Auris Nasus Larynx*. Elsevier Ireland Ltd, 43(2), pp.

176–181. doi: 10.1016/j.anl.2015.08.011.

Chen, M., Reed, R. R. and Lane, A. P. (2019) 'Chronic Inflammation Directs an Olfactory Stem Cell Functional Switch from Neuroregeneration to Immune Defense', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., October(3), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.stem.2019.08.011.

Doty, R. L. and Mishra, a (2001) 'Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis.', *The Laryngoscope*, 111(3), pp. 409–423. doi: 10.1097/00005537-200103000-00008.

Dufour, X. *et al.* (2007) 'Peak Nasal Inspiratory Flow : apprentissage de la méthode de mesure et reproductibilité', *Annales d'Oto-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale*, 124(3), pp. 115–119. doi: 10.1016/j.aorl.2007.03.002.

Farrell, N. *et al.* (2021) 'Mucosal Eosinophilia and Neutrophilia Are Not Associated With QOL or Olfactory Function in Chronic Rhinosinusitis', *Am J Rhinol Allergy*, 11(jan), pp. 1–5.

Fokkens, W. J. *et al.* (2012) 'EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists.', *Rhinology*. Netherlands, 50(1), pp. 1–12. doi: 10.4193/Rhino50E2.

Fokkens, W. J. *et al.* (2020) 'EPOS 2020: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020', *Rhinology. Supplement*, 58(February), pp. 1–481.

Fordham, M. T. *et al.* (2013) 'Reactive Oxygen Species in Chronic Rhinosinusitis and Secondhand Smoke Exposure', *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. SAGE Publications Inc, 149(4), pp. 633–638. doi: 10.1177/0194599813496377.

Fornazieri, M. A. *et al.* (2015) 'Development of normative data for the Brazilian adaptation of the University of Pennsylvania Smell Identification Test.', *Chemical senses*. England, 40(2), pp. 141–149. doi: 10.1093/chemse/bju068.

Fukuiri, T. *et al.* (2012) 'Expression of prostanoid receptors (EP1, 2, 3, and 4) in normal and methimazole-treated mouse olfactory epithelium.', *Acta oto-laryngologica*. doi: 10.3109/00016489.2012.712214.

Hauser, L. J. *et al.* (2017) 'Role of tissue eosinophils in chronic rhinosinusitis-associated olfactory loss', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 7(10), pp. 957–962. doi: 10.1002/alr.21994.

- Henkin, R. I. and Velicu, I. (2011) 'Differences between and within human parotid saliva and nasal mucus cAMP and cGMP in normal subjects and in patients with taste and smell dysfunction', pp. 504–509. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00986.x.
- Holbrook, E. H. *et al.* (2011) 'Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue.', *The Laryngoscope*. United States, 121(8), pp. 1687–1701. doi: 10.1002/lary.21856.
- Holbrook, E. H., Leopold, D. a and Schwob, J. E. (2005) 'Abnormalities of axon growth in human olfactory mucosa.', *The Laryngoscope*, 115(12), pp. 2144–54. doi: 10.1097/01.MLG.0000181493.83661.CE.
- Holbrook, E. H., Rebeiz, L. and Schwob, J. E. (2016) 'Office-based olfactory mucosa biopsies', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 6(6), pp. 646–653. doi: 10.1002/alr.21711.
- Kashiwagi, T. *et al.* (2019) 'Postoperative evaluation of olfactory dysfunction in eosinophilic chronic rhinosinusitis – comparison of histopathological and clinical findings', *Acta Oto-Laryngologica*. Taylor & Francis, 139(10), pp. 881–889. doi: 10.1080/00016489.2019.1654131.
- Kern, R. (2000) 'Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa.', *Laryngoscope*2, 110(7), pp. 1071–7. doi: 10.1097/00005537-200007000-00001.
- Kosugi, E. M. *et al.* (2011) 'Translation, cross-cultural adaptation and validation of SinoNasal Outcome Test (SNOT): 22 to Brazilian Portuguese.', *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. Brazil, 77(5), pp. 663–669.
- Lane, A. P. *et al.* (2010) 'A Genetic Model of Chronic Rhinosinusitis-Associated Olfactory Inflammation Reveals Reversible Functional Impairment and Dramatic Neuroepithelial Reorganization', *Journal of Neuroscience*, 30(6), pp. 2324–2329. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4507-09.2010.
- Lavin, J. *et al.* (2017) 'Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients', *The Laryngoscope*, 127(10), pp. 2210–2218. doi: 10.1002/lary.26555.
- Leinders-Zufall, T., Shepherd, G. M. and Zufall, F. (1996) 'Modulation by cyclic GMP of the odour sensitivity of vertebrate olfactory receptor cells.', *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 263(1371), pp. 803–11. doi: 10.1098/rspb.1996.0120.

- Leon-Sarmiento, F. E. *et al.* (2012) 'Profound Olfactory Dysfunction in Myasthenia Gravis', *PLoS ONE*, 7(10), pp. 1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0045544.
- Li, Y. R. and Matsunami, H. (2011) 'Activation state of the M3 muscarinic acetylcholine receptor modulates mammalian odorant receptor signaling.', *Science signaling*, 4(155), p. ra1. doi: 10.1126/scisignal.2001230.
- Malaty, J. and Malaty, I. A. C. (2013) 'Smell and taste disorders in primary care', *American Family Physician*, 88(12), pp. 852–859.
- Moon, C. *et al.* (1998) 'Calcium-sensitive particulate guanylyl cyclase as a modulator of cAMP in olfactory receptor neurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. United States, 18(9), pp. 3195–3205.
- Mori, E. *et al.* (2013) 'Risk factors for olfactory dysfunction in chronic rhinosinusitis', *Auris Nasus Larynx*. Elsevier Ireland Ltd, 40(5), pp. 465–569. doi: 10.1016/j.anl.2012.12.005.
- Nakamura, T. and Gold, G. H. (1987) 'A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia.', *Nature*. England, 325(6103), pp. 442–444. doi: 10.1038/325442a0.
- Nassar, M. *et al.* (2003) 'The role of interleukin-12 and tissue antioxidants in chronic sinusitis', *International Congress Series*, 1240(C), pp. 557–568. doi: 10.1016/S0531-5131(03)01104-X.
- Natura, G. *et al.* (2013) 'Neuronal prostaglandin E2 receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), pp. 1–6. doi: 10.1073/pnas.1300820110.
- Pfaar, O. *et al.* (2006) 'Mechanical obstruction of the olfactory cleft reveals differences between orthonasal and retronasal olfactory functions', *Chemical Senses*, 31(1), pp. 27–31. doi: 10.1093/chemse/bjj002.
- Raviv, J. R. and Kern, R. C. (2004) 'Chronic sinusitis and olfactory dysfunction', *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6 SPEC.ISS.), pp. 1143–1157. doi: 10.1016/j.otc.2004.06.003.
- Reddy, E. P. *et al.* (2017) 'Evaluation of thyroid profile and oxidative stress and antioxidants parameters in chronic sinusitis', *Int. J.Res.Pharm. Sci*, 8, pp. 455–458.

- Rimmer, J. *et al.* (2014) 'Surgical versus medical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, p. CD006991. doi: 10.1002/14651858.CD006991.pub2.
- Rouyar, A. *et al.* (2019) 'Type 2/Th2-driven inflammation impairs olfactory sensory neurogenesis in mouse chronic rhinosinusitis model', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 74(3), pp. 549–559. doi: 10.1111/all.13559.
- Soler, Z. M., Mace, J. and Smith, T. L. (2008) 'Symptom-based presentation of chronic rhinosinusitis and symptom-specific outcomes after endoscopic sinus surgery', *American Journal of Rhinology*, 22(3), pp. 297–301. doi: 10.2500/ajr.2008.22.3172.
- Stevens, W. W. *et al.* (2019) 'Associations Between Inflammatory Endotypes and Clinical Presentations in Chronic Rhinosinusitis', *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. Elsevier Inc, 7(8), pp. 2812-2820.e3. doi: 10.1016/j.jaip.2019.05.009.
- Westerveld, G. J. *et al.* (1997) 'Antioxidant levels in the nasal mucosa of patients with chronic sinusitis and healthy controls.', *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*. United States, 123(2), pp. 201–204.
- Yee, K. K. *et al.* (2010) 'Neuropathology of the olfactory mucosa in chronic rhinosinusitis', *American Journal of Rhinology and Allergy*, 24(2), pp. 110–120. doi: 10.2500/ajra.2010.24.3435.
- Zhen, Z. *et al.* (2014) '[Factors influencing olfactory dysfunction in patients with chronic rhinosinusitis].', *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, 28(17), pp. 1282–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25522558>.

6 CONCLUSÕES

A realização de biópsia em concha nasal superior é segura para a função olfatória do paciente, não alterando a capacidade total e específica de identificar odores. Essa técnica também é eficaz em obter epitélio olfatório para análises morfológicas e funcionais. Pacientes com RSC apresentam tendência a menor quantidade de cAMP e maior expressão de apoptose, estresse oxidativo e presença de eosinófilos na mucosa nasal, indicando possível mecanismo de perda olfatória na RSC.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2015) *Imunologia celular e molecular*.
- Abreu, N. A. *et al.* (2012) 'Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostearicum* enrichment mediates rhinosinusitis.', *Science translational medicine*. United States, 4(151), p. 151ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.3003783.
- Adams, H. R. (1996) 'Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide.', *Journal of the American Veterinary Medical Association*. United States, 209(7), pp. 1297–1302.
- Aigner, L. and Caroni, P. (1995) 'Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43- depleted growth cones', *The Journal of Cell Biology*, pp. 647–660.
- Akdis, C. A. *et al.* (2011) 'Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA(2)LEN study.', *Allergy*. Denmark, 131(9), pp. 1479–1490. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02646.x.
- Allen, R. C., Stjernholm, R. L. and Steele, R. H. (1972) 'Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity.', *Biochemical and biophysical research communications*. United States, 47(4), pp. 679–684.
- Alt, J. A. *et al.* (2014) 'Predictors of olfactory dysfunction in rhinosinusitis using the brief smell identification test', *Laryngoscope*, 124(7), pp. 1–19. doi: 10.1002/lary.24587.
- Alt, J. A. *et al.* (2018) 'A synthetic glycosaminoglycan reduces sinonasal inflammation in a murine model of chronic rhinosinusitis', *Plos One*, 13(9), p. e0204709. doi: 10.1371/journal.pone.0204709.
- Altundag, A. *et al.* (2014) 'Lateralized differences in olfactory function and olfactory bulb volume relate to nasal septum deviation.', *The Journal of craniofacial surgery*. United States, 25(2), pp. 359–362. doi: 10.1097/SCS.0000000000000617.
- Alves, S. *et al.* (2010) "'NOSE" Validação em Português e aplicação na septoplastia', *Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial*, pp. 9–14. Available at: <http://www.journalsporl.com/index.php/sporl/article/view/256>.
- Anand, V. K. *et al.* (2006) 'Inflammatory pathway gene expression in chronic rhinosinusitis.', *American journal of rhinology*. United States, 20(4), pp. 471–476.
- Andrews, P. J. *et al.* (2016) 'Safety of human olfactory mucosal biopsy for the purpose of olfactory ensheathing cell harvest and nerve repair : a prospective controlled study in patients undergoing endoscopic si ... Safety of human olfactory mucosal biopsy for the purpose of

olfactory', (June), pp. 183–191. doi: 10.4193/Rhin15.365.

Archer, S. (1993) 'Measurement of nitric oxide in biological models.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. United States, 7(2), pp. 349–360.

Arnold, S. E. *et al.* (2010) 'Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease.', *Annals of neurology*. United States, 67(4), pp. 462–469. doi: 10.1002/ana.21910.

Aschenbrenner, K. *et al.* (2009) 'The Influence of Olfactory Loss on Dietary Behaviors', *The Laryngoscope*, 118(1), pp. 135–144.

Babior, B. M., Kipnes, R. S. and Cumvu, J. T. (1973) 'CONCISE Biological Defense Mechanisms', 52(March), pp. 741–744.

Bachert, C. *et al.* (2014) 'ICON : chronic rhinosinusitis', *World Allergy Organization Journal*, 7(25), pp. 1–28.

Bachert, C. *et al.* (2016) 'Effect of subcutaneous dupilumab on nasal polyp burden in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis: A randomized clinical trial', *JAMA*, 315(5), pp. 469–479. Available at: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2015.19330>.

Bakalyar, H. A. and Reed, R. R. (1990) 'Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 250(4986), pp. 1403–1406.

Barnett, E. M., Cassell, M. D. and Perlman, S. (1993) 'Two neurotropic viruses, herpes simplex virus type 1 and mouse hepatitis virus, spread along different neural pathways from the main olfactory bulb', *Neuroscience*, 57(4), pp. 1007–1025. doi: 10.1016/0306-4522(93)90045-H.

BASTOS, L. O. D. (2015) *ADAPTAÇÃO DO TESTE DE OLFATO SNIFFIN' STICKS PARA UMA POPULAÇÃO PEDIÁTRICA BRASILEIRA*, *Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas*. doi: 10.1145/3132847.3132886.

Bathini, P. *et al.* (2019) 'Progressive signaling changes in the olfactory nerve of patients with Alzheimer's disease', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc, 76(0), pp. 80–95. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.12.006.

Benowitz, L. I. and Routtenberg, A. (1997) 'GAP-43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity', *Trends in Neurosciences*, 20(2), pp. 84–91. doi: 10.1016/S0166-2236(96)10072-2.

Bernstein, J. M. *et al.* (1997) 'Nasal polyposis: immunohistochemistry and bioelectrical findings (a hypothesis for the development of nasal polyps).', *The Journal of allergy and*

clinical immunology. United States, 99(2), pp. 165–175.

Betterle, C. and Zanchetta, R. (2012) 'The immunofluorescence techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases', pp. 67–78. doi: 10.1007/s13317-012-0034-3.

Beutler, B. and Ceramit, A. (1989) 'THE BIOLOGY OF CACHECTIN/TNFA PRIMARY MEDIATOR OF THE HOST RESPONSE', *Ann. Rev. Immunol.*, 7(1), pp. 625–55. doi: 10.1016/s0168-7069(02)08018-7.

Bhutta, M. F. *et al.* (2011) 'Nasal polyps do not contain olfactory structures.', *Rhinology*. Netherlands, 49(2), pp. 185–189. doi: 10.4193/Rhino09.171.

Boeva, V. I. *et al.* (2018) '[The influence of the vitamin D3 level in the blood serum of lactase gene polymorphism on the development of chronic polypous rhinosinusitis].', *Vestnik otorinolaringologii*. Russia (Federation), 83(5), pp. 49–54. doi: 10.17116/otorino20188305149.

Bogdanov, V. *et al.* (2019) 'Response to Glucocorticosteroids Predicts Olfactory Outcome After ESS in Chronic Rhinosinusitis', *The Laryngoscope*, 00(2019), pp. 1–6. doi: 10.1002/lary.28233.

Bohnen, N. I. *et al.* (2010) 'Olfactory dysfunction , central cholinergic integrity and cognitive impairment in Parkinson ' s disease', *Brain*, 133, pp. 1747–1754 |. doi: 10.1093/brain/awq079.

Bommarito, L. *et al.* (2008) 'Nasal nitric oxide concentration in suspected chronic rhinosinusitis.', *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. United States, 101(4), pp. 358–362. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60310-9.

Bouvet, J. F., Delaleu, J. C. and Holley, A. (1988) 'The activity of olfactory receptor cells is affected by acetylcholine and substance P.', *Neuroscience research*. Ireland, 5(3), pp. 214–223.

Bozkus, F. *et al.* (2013) *Evaluation of total oxidative stress parameters in patients with nasal polyps*, *Acta otorhinolaryngologica Italica*.

Breer, H., Klemm, T. and Boekhoff, I. (1992) 'Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system.', *Neuroreport*. England, 3(11), pp. 1030–1032.

Brewer, W. J. *et al.* (2001) 'Stability of olfactory identification deficits in neuroleptic-naive patients with first-episode psychosis', *American Journal of Psychiatry*, 158(1), pp. 107–115. doi: 10.1176/appi.ajp.158.1.107.

Brunet, L. J., Gold, G. H. and Ngai, J. (1996) 'General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel.', *Neuron*. United

States, 17(4), pp. 681–693.

Buck, L. and Axel, R. (1991) 'A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition', *Cell*, 65(1), pp. 175–187. doi: 10.1016/0092-8674(91)90418-X.

Buiakova, O. I. *et al.* (1996) 'Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), pp. 9858–9863. doi: 10.1073/pnas.93.18.9858.

Cannady, S. B. *et al.* (2007) 'Signal transduction and oxidative processes in sinonasal polyposis', pp. 1346–1353. doi: 10.1016/j.jaci.2007.07.067.

Carreras, E. *et al.* (2005) 'Surface-exposed amino acids of eosinophil cationic protein play a critical role in the inhibition of mammalian cell proliferation.', *Molecular and cellular biochemistry*. Netherlands, 272(1–2), pp. 1–7.

Cavaliere, C. *et al.* (2019) 'Recovery of smell sense loss by mepolizumab in a patient allergic to Dermatophagoides and affected by chronic rhinosinusitis with nasal polyps', *Clinical and Molecular Allergy*. BioMed Central, 17(1), pp. 2–5. doi: 10.1186/s12948-019-0106-2.

Cerejeira, R., Fernandes, S. and Pinto Moura, C. (2016) 'Increased expression of $\alpha 7nAChR$ in chronic rhinosinusitis: The intranasal cholinergic anti-inflammatory hypothesis', *Auris Nasus Larynx*. Elsevier Ireland Ltd, 43(2), pp. 176–181. doi: 10.1016/j.anl.2015.08.011.

Chen, C. R. *et al.* (2014) 'Anatomy and Cellular Constituents of the Human Olfactory Mucosa: A Review', *Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base*, 75(5), pp. 293–300. doi: 10.1055/s-0033-1361837.

Chen, M., Reed, R. R. and Lane, A. P. (2019) 'Chronic Inflammation Directs an Olfactory Stem Cell Functional Switch from Neuroregeneration to Immune Defense', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., October(3), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.stem.2019.08.011.

Child, K. M. *et al.* (2018) 'The Neuroregenerative Capacity of Olfactory Stem Cells Is Not Limitless: Implications for Aging', *The Journal of Neuroscience*, 38(31), pp. 6806–6824. doi: 10.1523/jneurosci.3261-17.2018.

Choi, R. and Goldstein, B. J. (2018) 'Olfactory epithelium: Cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche', *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, (December 2017), pp. 35–42. doi: 10.1002/lio2.135.

Cleland, E. J. *et al.* (2014) 'Probiotic manipulation of the chronic rhinosinusitis microbiome.', *International forum of allergy & rhinology*. United States, 4(4), pp. 309–314. doi: 10.1002/alr.21279.

- Colantonio, D. *et al.* (2002) 'Paradoxical low nasal nitric oxide in nasal polyposis.', *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. England, 32(5), pp. 698–701.
- Coons, A. *et al.* (1942) 'The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody', *J Immunol*, 45(3), pp. 159–170.
- Coons, A. H. (1961) 'The beginnings of immunofluorescence.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 87, pp. 499–503.
- Coronas, V. *et al.* (2000) 'Acetylcholine induces neuritic outgrowth in rat primary olfactory bulb cultures', *Neuroscience*, 98(2), pp. 213–219. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00143-3.
- Cowan, C. M. *et al.* (2001) 'Caspases 3 and 9 send a pro-apoptotic signal from synapse to cell body in olfactory receptor neurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), pp. 7099–7109. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1111-01.2001 [pii].
- Cowart, B. J. *et al.* (1993) 'Hyposmia in allergic rhinitis', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 91(3), pp. 747–751. doi: 10.1016/0091-6749(93)90194-K.
- Croy, I. *et al.* (2009) 'Comparison between Odor Thresholds for Phenyl Ethyl Alcohol and Butanol', *Chemical senses*, 34(6), pp. 523–527. doi: 10.1093/chemse/bjp029.
- Croy, I., Nordin, S. and Hummel, T. (2014) 'Olfactory disorders and quality of life-an updated review', *Chemical Senses*, 39(3), pp. 185–194. doi: 10.1093/chemse/bjt072.
- Dahl, R., Venge, P. and Olsson, I. (1978) 'The content of eosinophil cationic protein in eosinophil leucocytes. Study on normal controls and patients with bronchial asthma.', *Allergy*. Denmark, 33(3), pp. 152–154.
- Damm, M. *et al.* (2003) 'Olfactory changes at threshold and suprathreshold levels following septoplasty with partial inferior turbinectomy', *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 112(1), pp. 91–97.
- Damm, M. *et al.* (2014) 'Olfactory training is helpful in postinfectious olfactory loss: A randomized, controlled, multicenter study', *Laryngoscope*, 124(4), pp. 826–831. doi: 10.1002/lary.24340.
- Davies, M. G., Fulton, G. J. and Hagen, P. O. (1995) 'Clinical biology of nitric oxide.', *The British journal of surgery*. England, 82(12), pp. 1598–1610.
- Deems, D. *et al.* (1991) 'Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center.', *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 117(5), pp. 519–528.
- Devanand, D. P. *et al.* (2000) 'Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment

predict Alzheimer's disease at follow-up.', *The American journal of psychiatry*. United States, 157(9), pp. 1399–1405. doi: 10.1176/appi.ajp.157.9.1399.

Dibattista, M. and Reisert, J. (2016) 'The odorant receptor-dependent role of olfactory marker protein in olfactory receptor neurons', *Journal of Neuroscience*, 36(10), pp. 2995–3006. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4209-15.2016.

Divekar, R. *et al.* (2017) 'Unsupervised network mapping of commercially available immunoassay yields three distinct chronic rhinosinusitis endotypes', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 7(4), pp. 373–379. doi: 10.1002/alr.21904.

Donaldson, J. G. (2015) 'Immunofluorescence Staining', *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 69(December), pp. 1–7. doi: 10.1002/0471143030.cb0403s69.

Doty, R. *et al.* (1984) 'University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic', *Laryngoscope*, 94(2), pp. 176–8.

Doty, R. L. *et al.* (1984) 'University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic', *Laryngoscope*, 94(2 Pt 1), pp. 176–178.

Doty, R. L. (2009a) 'The olfactory system and its disorders', *Seminars in Neurology*, 29(1), pp. 74–81. doi: 10.1055/s-0028-1124025.

Doty, R. L. (2009b) *The Smell Threshold Test Administration Manual*. 2nd edn. Edited by R. L. Doty. Philadelphia: Sensonics International.

Doty, R. L. and Kamath, V. (2014) 'The influences of age on olfaction: A review', *Frontiers in Psychology*, 5(FEB), pp. 1–20. doi: 10.3389/fpsyg.2014.00020.

Doty, R. L. and Mishra, a (2001) 'Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis.', *The Laryngoscope*, 111(3), pp. 409–423. doi: 10.1097/00005537-200103000-00008.

Douek, E., Bannister, L. H. and Dodson, H. C. (1975) 'Recent advances in the pathology of olfaction.', *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. ENGLAND, 68(8), pp. 467–470.

Dufour, X. *et al.* (2007) 'Peak Nasal Inspiratory Flow : apprentissage de la méthode de mesure et reproductibilité', *Annales d'Oto-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale*, 124(3), pp. 115–119. doi: 10.1016/j.aorl.2007.03.002.

Duncan, H. J. and Seiden, A. M. (1995) 'Long-term Follow-up of Olfactory Loss Secondary to Head Trauma and Upper Respiratory Tract Infection', *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 121.

Elsherif, H. S. *et al.* (2007) 'Olfactory function and nasal nitric oxide', *Clinical Otolaryngology*, 32(5), pp. 356–360. doi: 10.1111/j.1749-4486.2007.01534.x.

- Escada, P. (2013) 'Localization and Distribution of Human Olfactory Mucosa in the Nasal Cavities', *Acta Med Port*, 26(3), pp. 200–207.
- Farbman, A. I. *et al.* (1999) 'A molecular basis of cell death in olfactory epithelium.', *The Journal of comparative neurology*. United States, 414(3), pp. 306–314.
- Féron, F. *et al.* (1998) 'New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons.', *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 124, pp. 861–866. doi: 10.1001/archotol.124.8.861.
- Filho, A. C. M., Hoffmann, M. E. and Meneghini, R. (1984) 'Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron', 218, pp. 273–275.
- Flora Filho, R. and Zilberstein, B. (2000) 'Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções', *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46(3), pp. 265–271. doi: 10.1590/S0104-42302000000300012.
- Fokkens, W. J. *et al.* (2012) 'EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists.', *Rhinology*. Netherlands, 50(1), pp. 1–12. doi: 10.4193/Rhino50E2.
- Fokkens, W. J. *et al.* (2020) 'EPOS 2020: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020', *Rhinology. Supplement*, 58(February), pp. 1–481.
- Fokkens, W. J., Lund, V. J. and Mullol, J. (no date) 'European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps'.
- Fonteyn, S. *et al.* (2014) 'Non-sinonasal-related olfactory dysfunction: A cohort of 496 patients', *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. Elsevier Masson SAS, 131(2), pp. 87–91. doi: 10.1016/j.anorl.2013.03.006.
- Fordham, M. T. *et al.* (2013) 'Reactive Oxygen Species in Chronic Rhinosinusitis and Secondhand Smoke Exposure', *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. SAGE Publications Inc, 149(4), pp. 633–638. doi: 10.1177/0194599813496377.
- Fornazieri, M. A. *et al.* (2014) 'Main causes and diagnostic evaluation in patients with primary complaint of olfactory disturbances', *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial, 80(3), pp. 202–207. doi: 10.1016/j.bjorl.2014.02.001.
- Fornazieri, M. A. *et al.* (2015) 'Development of normative data for the Brazilian adaptation of the University of Pennsylvania Smell Identification Test.', *Chemical senses*. England, 40(2), pp. 141–149. doi: 10.1093/chemse/bju068.
- Fornazieri, M. A. *et al.* (2020) 'Adherence and Efficacy of Olfactory Training as a Treatment for Persistent Olfactory Loss', *American Journal of Rhinology and Allergy*, 34(2), pp. 238–

248. doi: 10.1177/1945892419887895.

Forstermann, U. *et al.* (1994) 'Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.', *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*. United States, 23(6 Pt 2), pp. 1121–1131.

Frasnelli, J. and Hummel, T. (2005) 'Olfactory dysfunction and daily life.', *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. Germany, 262(3), pp. 231–235. doi: 10.1007/s00405-004-0796-y.

Freitag, J. *et al.* (1998) 'Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates.', *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*. Germany, 183(5), pp. 635–650.

Fruth, K. *et al.* (2011) 'No evidence for a correlation of glutathione S-transferase polymorphisms and chronic rhinosinusitis.', *Rhinology*. Netherlands, 49(2), pp. 180–184. doi: 10.4193/Rhino10.064.

Fukuda, Y. *et al.* (2018) 'Effect of intranasal administration of neurotrophic factors on regeneration of chemically degenerated olfactory epithelium in aging mice', *NeuroReport*, 29(16), pp. 1400–1404. doi: 10.1097/WNR.0000000000001125.

Fukuri, T. *et al.* (2012) 'Expression of prostanoid receptors (EP1, 2, 3, and 4) in normal and methimazole-treated mouse olfactory epithelium.', *Acta oto-laryngologica*. doi: 10.3109/00016489.2012.712214.

Furchgott, R. F. *et al.* (1984) 'Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries.', *Journal of cardiovascular pharmacology*. United States, 6 Suppl 2, pp. S336-43.

Garcia, D. S. *et al.* (2017) 'Role of the type I tumor necrosis factor receptor in inflammation-associated olfactory dysfunction', *Int Forum Allergy Rhinol.*, 7(2), pp. 160–168. doi: 10.1002/alr.21855.Role.

GARRISON, W. M., JAYKO, M. E. and BENNETT, W. (1962) 'Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution.', *Radiation research*. United States, 16, pp. 483–502.

Gemelli, T. *et al.* (2013) 'Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da doença de alzheimer', *REVISTA UNIARA*, pp. 67–78.

Godoy, M. D. C. L. *et al.* (2018) 'Is Olfactory Epithelium Biopsy Useful for Confirming Alzheimer's Disease?', *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 128(3), pp. 184–192. doi: 10.1177/0003489418814865.

Gottfried, J. A. *et al.* (2002) 'Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-

related functional magnetic resonance imaging study.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. United States, 22(24), pp. 10819–10828.

Gritti, A. *et al.* (2002) 'Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. United States, 22(2), pp. 437–445.

Gudziol, V. *et al.* (2009) 'Increasing olfactory bulb volume due to treatment of chronic rhinosinusitis-a longitudinal study', *Brain*, 132(11), pp. 3096–3101. doi: 10.1093/brain/awp243.

Guilemany, J. M. *et al.* (2009) 'Persistent allergic rhinitis has a Moderate impact on the sense of smell, depending on both nasal congestion and inflammation', *Laryngoscope*, 119(2), pp. 233–238. doi: 10.1002/lary.20075.

Guilemany, J. M. *et al.* (2012) 'The loss of smell in persistent allergic rhinitis is improved by levocetirizine due to reduction of nasal inflammation but not nasal congestion (the CIRANO study)', *International Archives of Allergy and Immunology*, 158(2), pp. 184–190. doi: 10.1159/000331329.

Hamilos, D. L. *et al.* (1996) 'Eosinophil infiltration in nonallergic chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (CHS/NP) is associated with endothelial VCAM-1 upregulation and expression of TNF-alpha.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*. United States, 15(4), pp. 443–450. doi: 10.1165/ajrcmb.15.4.8879177.

Harkema, J. R., Carey, S. and Wagner, J. G. (2006) 'The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium.', *Toxicologic pathology*, 34(3), pp. 252–269. doi: 10.1080/01926230600713475.

Hasegawa-Ishii, S., Shimada, A. and Imamura, F. (2018) 'Neuroplastic changes in the olfactory bulb associated with nasal inflammation in mice', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Inc., 143(3), pp. 978-989.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2018.09.028.

Hauser, L. J. *et al.* (2017) 'Role of tissue eosinophils in chronic rhinosinusitis-associated olfactory loss', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 7(10), pp. 957–962. doi: 10.1002/alr.21994.

Hegg, C. C., Irwin, M. and Lucero, M. T. (2009) 'Calcium store-mediated signaling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium.', *Glia*. United States, 57(6), pp. 634–644. doi: 10.1002/glia.20792.

Held, P. K. (2006) 'Disorders of tyrosine catabolism', in *Molecular Genetics and Metabolism*, pp. 2–3.

Hengartner, M. O. (2000) 'The biochemistry of apoptosis.', *Nature*, 407(6805), pp. 770–6.

doi: 10.1038/35037710.

Henkin, R. I. (2013) 'Nasal mucus contains cAMP and cGMP which are critical factors in preservation of normal olfaction', *The FASEB Journal*, 27(1).

Henkin, R. I. (2014) 'Effects of smell loss (hyposmia) on salt usage', *Nutrition*, 30(6), pp. 690–695. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.11.003>.

Henkin, R. I. and Velicu, I. (2011) 'Differences between and within human parotid saliva and nasal mucus cAMP and cGMP in normal subjects and in patients with taste and smell dysfunction', pp. 504–509. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00986.x.

Hoffmans, R. *et al.* (2018) 'Acute and chronic rhinosinusitis and allergic rhinitis in relation to comorbidity, ethnicity and environment', *PLoS ONE*, 13(2), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0192330.

Holbrook, E. H. *et al.* (2011) 'Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue.', *The Laryngoscope*. United States, 121(8), pp. 1687–1701. doi: 10.1002/lary.21856.

Holbrook, E. H., Leopold, D. a and Schwob, J. E. (2005) 'Abnormalities of axon growth in human olfactory mucosa.', *The Laryngoscope*, 115(12), pp. 2144–54. doi: 10.1097/01.MLG.0000181493.83661.CE.

Holbrook, E. H., Rebeiz, L. and Schwob, J. E. (2016) 'Office-based olfactory mucosa biopsies', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 6(6), pp. 646–653. doi: 10.1002/alr.21711.

Huang, H. *et al.* (2020) 'P63+Krt5+basal cells are increased in the squamous metaplastic epithelium of patients with radiation-induced chronic Rhinosinusitis', *Radiation Oncology*. Radiation Oncology, 15(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13014-020-01656-7.

Huard, J. M. *et al.* (1998) 'Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells.', *The Journal of comparative neurology*. United States, 400(4), pp. 469–486.

Hummel, T. *et al.* (1997) "'Sniffin" sticks'. Olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold', *Chemical Senses*, 22(1), pp. 39–52. doi: 10.1093/chemse/22.1.39.

Hummel, T. *et al.* (1998) 'Chemosensory event-related potentials change with age', *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, 108(2), pp. 208–217. doi: 10.1016/s0168-5597(97)00074-9.

Hummel, T. *et al.* (2009) 'Effects of olfactory Training in patients with olfactory loss', *Laryngoscope*, 119(3), pp. 496–499. doi: 10.1002/lary.20101.

- Hummel, T. *et al.* (2017) 'Position paper on olfactory dysfunction'.
- Hummel, T., Heilmann, S. and Hüttenbrink, K.-B. (2002) 'Lipoic acid in the treatment of smell dysfunction following viral infection of the upper respiratory tract.', *The Laryngoscope*, 112(11), pp. 2076–2080. doi: 10.1097/00005537-200211000-00031.
- Hummel, T., Heilmann, S. and Hüttenbrink, K. B. (2002) 'Lipoic acid in the treatment of smell dysfunction following viral infection of the upper respiratory tract', *Laryngoscope*, 112(11), pp. 2076–2080. doi: 10.1097/00005537-200211000-00031.
- Hummel, T., Landis, B. N. and Hüttenbrink, K.-B. (2011) 'Smell and taste disorders.', *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*, 10, p. Doc04. doi: 10.3205/cto000077.
- Hummel, T. and Nordin, S. (2005) 'Olfactory disorders and their consequences for quality of life.', *Acta oto-laryngologica*, 125(2), pp. 116–121. doi: 10.1080/00016480410022787.
- Ikeda, K. *et al.* (1995) 'Anosmia following head trauma: preliminary study of steroid treatment.', *Tohoku J Exp Med.*, 177(4), pp. 343–51. doi: 10.1017/S1755146300168532.
- Ischiropoulos, H. (2003) 'Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration', *Biochemical and biophysical research communications*, 305, pp. 776–783. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00814-3.
- Jafek, B. W. (1983) 'Ultrastructure of human nasal mucosa.', *The Laryngoscope*. UNITED STATES, 93(12), pp. 1576–1599.
- Jafek, B. W. *et al.* (1990) 'Postviral Olfactory Dysfunction', *American Journal of Rhinology*, 4(3), pp. 91–100. doi: 10.2500/105065890782009497.
- Jafek, Bruce W *et al.* (2002) 'Biopsies of human olfactory epithelium.', *Chemical senses*. England, 27(7), pp. 623–628.
- Jafek, B W *et al.* (2002a) 'Biopsies of Human Olfactory Epithelium', *Chemical Senses*, 27(7), pp. 623–628. doi: 10.1093/chemse/27.7.623.
- Jafek, B W *et al.* (2002b) 'Biopsies of Human Olfactory Epithelium', *Chemical Senses*, 27(7), pp. 623–628. doi: 10.1093/chemse/27.7.623.
- Jafek, B. W., Murrow, B. and Linschoten, M. (2000) 'Evaluation and treatment of anosmia', *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.*, 8, pp. 63–67.
- Jardeleza, C. *et al.* (2013) 'Gene expression differences in nitric oxide and reactive oxygen species regulation point to an altered innate immune response in chronic rhinosinusitis', *International Forum of Allergy & Rhinology*, 3(3), pp. 193–198. doi: 10.1002/alr.21114.
- Jiang, R. S. *et al.* (2010) 'Steroid treatment of posttraumatic anosmia', *European Archives of*

Oto-Rhino-Laryngology, 267(10), pp. 1563–1567. doi: 10.1007/s00405-010-1240-0.

Jin, J. *et al.* (2013) *IL-17C expression in nasal epithelial cells of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*, *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. doi: 10.1007/s00405-013-2683-x.

Johnson, B. A. and Leon, M. (2007) 'Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system', *J Comp Neurol*, 503(1), pp. 1–34.

Johnson, T. M. *et al.* (1996) 'Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis', 93(October), pp. 11848–11852.

Jonsson, U.-B. *et al.* (2002) 'Polymorphism of the eosinophil cationic protein-gene is related to the expression of allergic symptoms.', *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. England, 32(7), pp. 1092–1095.

Kashiwagi, T. *et al.* (2019) 'Postoperative evaluation of olfactory dysfunction in eosinophilic chronic rhinosinusitis – comparison of histopathological and clinical findings', *Acta Oto-Laryngologica*. Taylor & Francis, 139(10), pp. 881–889. doi: 10.1080/00016489.2019.1654131.

Katzung, B. G. and Trevor, A. J. (2017) *Farmacologia Básica e Clínica*.

Kern, R. (2000) 'Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa.', *Laryngoscope*, 110(7), pp. 1071–7. doi: 10.1097/00005537-200007000-00001.

Kern, R. C. *et al.* (2004) 'Pathology of the olfactory mucosa: implications for the treatment of olfactory dysfunction.', *The Laryngoscope*, 114(2), pp. 279–285. doi: 10.1097/00005537-200402000-00018.

Keswani, A. *et al.* (2012) 'Differential expression of interleukin-32 in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps', *Allergy*, 67(1), pp. 25–32. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02706.x.

Kiechle, F. L. and Malinski, T. (1993) 'Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection.', *American journal of clinical pathology*. England, 100(5), pp. 567–575.

Kilicaslan, A. *et al.* (2016) 'Assessment the long-term effects of septoplasty surgery on olfactory function.', *Acta oto-laryngologica*, 6489(June), pp. 1–6. doi: 10.1080/00016489.2016.1183168.

Kim, D. *et al.* (2004) 'Up-regulation of muc5ac and muc5b mucin genes in chronic rhinosinusitis', *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 130(6), pp. 747–752. Available at: <http://dx.doi.org/10.1001/archotol.130.6.747>.

- Kimmelman, C. P. (1994) 'The risk to olfaction from nasal surgery.', *The Laryngoscope*, pp. 981–8. doi: 10.1288/00005537-199408000-00012.
- Kirkman, H. N., Galianoe, S. and Gaetanie, F. (1987) 'The Function of Catalase-bound NADPH *', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 262(2), pp. 660–666.
- Klimek, L. and Eggers, G. (1997) 'Olfactory dysfunction in allergic rhinitis is related to nasal eosinophilic inflammation', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(2), pp. 158–164. doi: 10.1016/S0091-6749(97)70218-5.
- Kohli, P. *et al.* (2017) 'The prevalence of olfactory dysfunction in chronic rhinosinusitis', *Laryngoscope*, 127(2), pp. 309–320. doi: 10.1002/lary.26316.
- Konstantinidis, I. *et al.* (2013) 'Use of olfactory training in post-traumatic and postinfectious olfactory dysfunction', *Laryngoscope*, 123(12), pp. 1–6. doi: 10.1002/lary.24390.
- Kopala, L. C., Good, K. P. and Honer, W. G. (1994) 'Olfactory hallucinations and olfactory identification ability in patients with schizophrenia and other psychiatric disorders', *Schizophrenia Research*, 12(3), pp. 205–211. doi: 10.1016/0920-9964(94)90030-2.
- Kosugi, E. M. *et al.* (2011) 'Translation, cross-cultural adaptation and validation of SinoNasal Outcome Test (SNOT): 22 to Brazilian Portuguese.', *Brazilian journal of otorhinolaryngology. Brazil*, 77(5), pp. 663–669.
- Kuehnemund, M. *et al.* (2004) 'Untreated Chronic Rhinosinusitis : A Comparison of Symptoms and Mediator Profiles', *The Laryngoscope*, 114(March), pp. 561–565.
- Laidlaw, T. M. *et al.* (2019) 'Dexamipexole depletes blood and tissue eosinophils in nasal polyps with no change in polyp size', *Laryngoscope*, 129(2), pp. E61–E66. doi: 10.1002/lary.27564.
- Lane, A. P. *et al.* (2002) 'The superior turbinate as a source of functional human olfactory receptor neurons.', *The Laryngoscope*, 112(7 Pt 1), pp. 1183–9. doi: 10.1097/00005537-200207000-00007.
- Lane, Andrew P. *et al.* (2010) 'A Genetic Model of Chronic Rhinosinusitis-Associated Olfactory Inflammation Reveals Reversible Functional Impairment and Dramatic Neuroepithelial Reorganization', *Journal of Neuroscience*, 30(6), pp. 2324–2329. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4507-09.2010.
- Lane, Andrew P *et al.* (2010) 'NIH Public Access', 30(6), pp. 2324–2329. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4507-09.2010.A.
- Langlois, J. A., Rutland-Brown, W. and Wald, M. M. (2006) 'The epidemiology and impact of traumatic brain injury: A brief overview', *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 21(5), pp. 375–378. doi: 10.1097/00001199-200609000-00001.

- Lanza, D. C. *et al.* (1993) 'Endoscopic human olfactory biopsy technique: a preliminary report.', *The Laryngoscope*. UNITED STATES, 103(7), pp. 815–819. doi: 10.1288/00005537-199307000-00017.
- Lanza, D. C. *et al.* (1994) 'The effect of human olfactory biopsy on olfaction - a preliminary-report', *Laryngoscope*, pp. 837–840.
- Lapid, H. *et al.* (2011) 'Neural activity at the human olfactory epithelium reflects olfactory perception', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(11), pp. 1455–1461. doi: 10.1038/nn.2926.
- Lavin, J. *et al.* (2017) 'Superior turbinate eosinophilia correlates with olfactory deficit in chronic rhinosinusitis patients', *The Laryngoscope*, 127(10), pp. 2210–2218. doi: 10.1002/lary.26555.
- Lee, H. S., Myers, A. and Kim, J. (2009) 'Vascular Endothelial Growth Factor Drives Autocrine Epithelial Cell Proliferation and Survival in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, pp. 1056–1067. doi: 10.1164/rccm.200905-0740OC.
- Lee, J. M. *et al.* (2015) 'Nasal nitric oxide as a marker of sinus mucosal health in patients with nasal polyposis', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 5(10), pp. 894–899. doi: 10.1002/alr.21598.
- Lee, S. H. *et al.* (2000a) 'Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery', *Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, 109, pp. 720–725.
- Lee, S. H. *et al.* (2000b) 'Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery', *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 109(8 I), pp. 720–725.
- Lehrer, R. I. *et al.* (1989) 'Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 142(12), pp. 4428–4434.
- Leinders-Zufall, T., Shepherd, G. M. and Zufall, F. (1996) 'Modulation by cyclic GMP of the odour sensitivity of vertebrate olfactory receptor cells.', *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 263(1371), pp. 803–11. doi: 10.1098/rspb.1996.0120.
- Leon-Sarmiento, F. E. *et al.* (2012) 'Profound Olfactory Dysfunction in Myasthenia Gravis', *PLoS ONE*, 7(10), pp. 1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0045544.
- Leonhardt, B. *et al.* (2019) 'Awareness of olfactory dysfunction in Parkinson's disease', *Neuropsychology*, 33(5), pp. 633–641. doi: 10.1037/neu0000544.

- Leopold, D. A. *et al.* (2000) 'Anterior distribution of human olfactory epithelium.', *The Laryngoscope*, 110(3 Pt 1), pp. 417–421. doi: 10.1097/00005537-200003000-00016.
- Li, J. *et al.* (2019) 'Association between methylation in nasal epithelial TSLP gene and chronic rhinosinusitis with nasal polyps', *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. BioMed Central, 15(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s13223-019-0389-3.
- Li, Y. R. and Matsunami, H. (2011) 'Activation state of the M3 muscarinic acetylcholine receptor modulates mammalian odorant receptor signaling.', *Science signaling*, 4(155), p. ra1. doi: 10.1126/scisignal.2001230.
- Lin, M. T. and Beal, M. F. (2006) 'Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases', 443(October), pp. 787–795. doi: 10.1038/nature05292.
- Lindberg, S., Cervin, A. and Runer, T. (1997) 'Nitric oxide (NO) production in the upper airways is decreased in chronic sinusitis.', *Acta oto-laryngologica*. England, 117(1), pp. 113–117.
- Lippincott-Schwartz, J. *et al.* (1990) 'Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway.', *Cell*. United States, 60(5), pp. 821–836.
- London, N. R. *et al.* (2019) 'Deletion of Nrf2 enhances susceptibility to eosinophilic sinonasal inflammation in a murine model of rhinosinusitis', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 9(1), pp. 114–119. doi: 10.1002/alr.22222.
- Lopes, T. N. *et al.* (2018) 'Olfactory dysfunction in primary health care', *Acta Otorrinolaringológica Gallega*, 11(1), pp. 18–32.
- Lovell, M. A. *et al.* (1982) 'Biopsy of human olfactory mucosa. An instrument and a technique.', *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)*. UNITED STATES, 108(4), pp. 247–249.
- Lundberg, J. O. and Weitzberg, E. (1999) 'Nasal nitric oxide in man', *Thorax*, 54(10), pp. 947–52. doi: 10.1136/thx.54.10.947.
- Magde, D., Wong, R. and Seybold, P. G. (2002) 'Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields.', *Photochemistry and photobiology*. United States, 75(4), pp. 327–334.
- Malaty, J. and Malaty, I. A. C. (2013) 'Smell and taste disorders in primary care', *American Family Physician*, 88(12), pp. 852–859.
- Malnic, B. *et al.* (1999) 'Combinatorial Receptor Codes for Odors', *Cell*, 96(5), pp. 713–723. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80581-4.

- Maxfield, A. Z. *et al.* (2017) 'General antibiotic exposure is associated with increased risk of developing chronic rhinosinusitis', *Laryngoscope*, 127(2), pp. 296–302. doi: 10.1002/lary.26232.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) 'Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)', *The Journal of biological chemistry*, (22).
- McLaren, D. J. *et al.* (1981) 'Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins in vitro.', *Parasite immunology*. England, 3(4), pp. 359–373.
- Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) 'Glutathione', *Annu Rev Biochem.*, 52, pp. 711–760.
- Melov, S. *et al.* (2000) 'Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 289(5484), pp. 1567–1569.
- Miedzybrodzki, R. *et al.* (2006) 'The olfactory bulb and olfactory mucosa obtained from human cadaver donors as a source of olfactory ensheathing cells.', *Glia*. United States, 54(6), pp. 557–565. doi: 10.1002/glia.20395.
- Minotti, G. and Auste, S. D. (1987) 'The Requirement for Iron(II) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide*', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 262(3), pp. 1098–1104.
- Minsky, M. (1987) 'Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope', *SCANNING*, 10(1 988), pp. 128–138.
- Miwa, T. *et al.* (2001) 'Impact of olfactory impairment on quality of life and disability.', *Archives of Otolaryngology Head Neck Surgery*, 127(5), pp. 497–503. doi: 10.1001/archotol.127.5.497.
- Miyamichi, K. *et al.* (2005) 'Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. United States, 25(14), pp. 3586–3592. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0324-05.2005.
- Mladina, R. *et al.* (2010) 'A biofilm exists on healthy mucosa of the paranasal sinuses: A prospectively performed, blinded, scanning electron microscope study', *Clinical Otolaryngology*, 35(2), pp. 104–110. doi: 10.1111/j.1749-4486.2010.02097.x.
- Mohammed, A. K. *et al.* (1990) 'Behavioural deficits and serotonin depletion in adult rats after transient infant nasal viral infection', *Neuroscience*, 35(2), pp. 355–363. doi: 10.1016/0306-4522(90)90089-M.
- Mombaerts, P. (2001) 'How smell develops.', *Nature neuroscience*, 4 Suppl(november), pp.

1192–8. doi: 10.1038/nn751.

Mombaerts, P. (2004) 'Love at first smell--the 2004 Nobel Prize in Physiology or Medicine.', *The New England journal of medicine*, 351(25), pp. 2579–2580. doi: 10.1056/NEJMp048325.

Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. (1991) 'Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.', *Pharmacological reviews*. United States, 43(2), pp. 109–142.

Moon, C. *et al.* (1998) 'Calcium-sensitive particulate guanylyl cyclase as a modulator of cAMP in olfactory receptor neurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. United States, 18(9), pp. 3195–3205.

Moran, D. T. *et al.* (1982) 'The fine structure of the olfactory mucosa in man.', *Journal of neurocytology*. United States, 11(5), pp. 721–746.

Moran, D. T. *et al.* (1992) 'Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction', *Microscopy Research and Technique*, 23(2), pp. 103–110. doi: 10.1002/jemt.1070230202.

Moran, D. T., Rowley 3rd, J. C. and Jafek, B. W. (1982) 'Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell', *Brain Res*, 253(1–2), pp. 39–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7150975>.

Mori, E. *et al.* (2013) 'Auris Nasus Larynx Risk factors for olfactory dysfunction in chronic rhinosinusitis §', *Auris Nasus Larynx*. Elsevier Ireland Ltd, 40(5), pp. 465–469. doi: 10.1016/j.anl.2012.12.005.

Mori, I. *et al.* (1995) 'Parainfluenza virus type 1 infects olfactory neurons and establishes long-term persistence in the nerve tissue.', *The Journal of general virology*, 76 (Pt 5)(1995), pp. 1251–4. doi: 10.1099/0022-1317-76-5-1251.

Mrowicka, M. *et al.* (2015) 'Evaluation of oxidative DNA damage and antioxidant defense in patients with nasal polyps Evaluation of oxidative DNA damage and antioxidant defense in patients with nasal polyps', *Redox Report*, 20(4), pp. 177–183. doi: 10.1179/1351000215Y.0000000001.

Mueller, A. *et al.* (2005) 'Reduced olfactory bulb volume in post-traumatic and post-infectious olfactory dysfunction', *Neuroreport*, 16(5), pp. 475–478. doi: 00001756-200504040-00011 [pii].

Mueller, C. A. and Hummel, T. (2009) 'Recovery of olfactory function after nine years of post-traumatic anosmia: A case report', *Journal of Medical Case Reports*, 3(9283), pp. 2–4. doi: 10.4076/1752-1947-3-9283.

Murphy, C. *et al.* (2002) 'Prevalence of olfactory impairment in older adults.', *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 288(18), pp. 2307–2312. doi:

10.1001/jama.288.18.2307.

Nakagawa, T. *et al.* (1996) 'Apoptosis in the normal olfactory epithelium of the adult guinea pig', *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 253(6), pp. 371–373. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00178295>.

Nakamura, T. and Gold, G. H. (1987) 'A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia.', *Nature*. England, 325(6103), pp. 442–444. doi: 10.1038/325442a0.

Nakashima, T. *et al.* (1984) 'Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium', *Arch Otolaryngol*, 110(10), pp. 641–646. doi: 10.1001/archotol.1984.00800360013003.

Nakayama, T. *et al.* (2011) 'Mucosal eosinophilia and recurrence of nasal polyps - new classification of chronic rhinosinusitis.', *Rhinology*. Netherlands, 49(4), pp. 392–396. doi: 10.4193/Rhino10.261.

Nara, K. *et al.* (2011) 'A Large-Scale Analysis of Odor Coding in the Olfactory Epithelium', *The Journal of Neuroscience*, 31(25), pp. 9179–9191. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1282-11.2011.

Nassar, M. *et al.* (2003) 'The role of interleukin-12 and tissue antioxidants in chronic sinusitis', *International Congress Series*, 1240(C), pp. 557–568. doi: 10.1016/S0531-5131(03)01104-X.

Natura, G. *et al.* (2013) 'Neuronal prostaglandin E2 receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), pp. 1–6. doi: 10.1073/pnas.1300820110.

Navarro, S. *et al.* (2008) 'The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane.', *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Switzerland, 65(2), pp. 324–337. doi: 10.1007/s00018-007-7499-7.

Navarro, S. *et al.* (2010) 'Eosinophil-induced neurotoxicity: the role of eosinophil cationic protein/RNase 3.', *Journal of neuroimmunology*. Netherlands, 227(1–2), pp. 60–70. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.06.012.

Okada, N. *et al.* (2018) 'Distinct gene expression profiles and regulation networks of nasal polyps in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 00(0), pp. 1–13. doi: 10.1002/alr.22083.

Olsson, I. and Venge, P. (1974) 'Cationic proteins of human granulocytes. II. Separation of the cationic pro-teins of the granules of leukemic myeloid cells', *Blood*, 44(2), pp. 235–346.

Paik, S. I. *et al.* (1992) 'Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution.', *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. UNITED STATES, 118(7),

pp. 731–738.

Palmer, R. M., Ashton, D. S. and Moncada, S. (1988) 'Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.', *Nature*. England, 333(6174), pp. 664–666. doi: 10.1038/333664a0.

Pause, B. M. *et al.* (2001) 'Reduced olfactory performance in patients with major depression', *Journal of Psychiatric Research*, 35(5), pp. 271–277. doi: 10.1016/S0022-3956(01)00029-2.

Pellier, V. *et al.* (1994) 'B-50 / GAP-43 expression by the olfactory receptor cells and the neurons migrating from the olfactory placode in embryonic rats', *Developmental Brain Research*, 80, pp. 63–72.

Perlman, S., Evans, G. and Afifi, a (1990) 'Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain.', *The Journal of experimental medicine*, 172(4), pp. 1127–32. doi: 10.1084/jem.172.4.1127.

Pfaar, O. *et al.* (2006) 'Mechanical obstruction of the olfactory cleft reveals differences between orthonasal and retronasal olfactory functions', *Chemical Senses*, 31(1), pp. 27–31. doi: 10.1093/chemse/bjj002.

Pfaar, O., Hüttenbrink, K. B. and Hummel, T. (2004) 'Assessment of olfactory function after septoplasty: A longitudinal study', *Rhinology*, 42(4), pp. 195–199.

Pilan, R. R. *et al.* (2012) 'Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo.', *Rhinology*. Netherlands, 50(2), pp. 129–138. doi: 10.4193/Rhino11.256.

Raviv, J. R. and Kern, R. C. (2004) 'Chronic sinusitis and olfactory dysfunction', *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6 SPEC.ISS.), pp. 1143–1157. doi: 10.1016/j.otc.2004.06.003.

Raviv, J. R. and Kern, R. C. (2006) 'Chronic rhinosinusitis and olfactory dysfunction', *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, pp. 108–124. doi: 10.1159/000093757.

Reddy, E. P. *et al.* (2017) 'Evaluation of thyroid profile and oxidative stress and antioxidants parameters in chronic sinusitis', *Int. J.Res.Pharm. Sci*, 8, pp. 455–458.

Reden, J. *et al.* (2006) 'Recovery of olfactory function following closed head injury or infections of the upper respiratory tract.', *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. United States, 132(3), pp. 265–269. doi: 10.1001/archotol.132.3.265.

Reden, J. *et al.* (2011) 'Treatment of postinfectious olfactory disorders with minocycline: A double-blind, placebo-controlled study', *Laryngoscope*, 121(3), pp. 679–682. doi: 10.1002/lary.21401.

Reden, J. *et al.* (2012) 'Olfactory function in patients with postinfectious and posttraumatic

smell disorders before and after treatment with vitamin A: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial', *Laryngoscope*, 122(9), pp. 1906–1909. doi: 10.1002/lary.23405.

Reijs, B. L. R. *et al.* (2017) 'Relation of odor identification with Alzheimer's disease markers in cerebrospinal fluid and cognition', *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(3), pp. 1025–1034. doi: 10.3233/JAD-170564.

Ressler, K. J., Sullivan, S. L. and Buck, L. B. (1993) 'A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium', *Cell*, 73(3), pp. 597–609. doi: 10.1016/0092-8674(93)90145-G.

Revai, K. *et al.* (2007) 'Incidence of acute otitis media and sinusitis complicating upper respiratory tract infection: The effect of age', *Pediatrics*, 119(6), pp. 1408–12. doi: 10.1542/peds.2006-2881.

De Rezende Pinna, F. *et al.* (2013) 'Olfactory neuroepithelium in the superior and middle turbinates: Which is the optimal biopsy site?', *International Archives of Otorhinolaryngology*, 17(2), pp. 131–138. doi: 10.7162/S1809-97772013000200004.

Ribeiro, J. C. *et al.* (2016) 'Cultural adaptation of the Portuguese version of the "Sniffin" Sticks" smell test: Reliability, validity, and normative data"', *PLoS ONE*, 11(2), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0148937.

Richer, S. L. *et al.* (2008) 'Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps', *Am J Rhinol*, 22(3), pp. 228–234. doi: 10.2500/ajr.2008.22.3162.Epithelial.

Riechelmann, H. *et al.* (2005) 'Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis.', *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. England, 35(9), pp. 1186–1191. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02316.x.

van Riel, D., Verdijk, R. and Kuiken, T. (2015) 'The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system.', *The Journal of pathology*, 235(2), pp. 277–87. doi: 10.1002/path.4461.

Riera, C. E. *et al.* (2017) 'The Sense of Smell Impacts Metabolic Health and Obesity', *Cell Metabolism*. Elsevier, 26(1), pp. 198-211.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.015.

Rimmer, J. *et al.* (2014) 'Surgical versus medical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, p. CD006991. doi: 10.1002/14651858.CD006991.pub2.

Robbins, S. L. (2018) *Robbins Patologia Básica*.

Rouyar, A. *et al.* (2019) 'Type 2/Th2-driven inflammation impairs olfactory sensory neurogenesis in mouse chronic rhinosinusitis model', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 74(3), pp. 549–559. doi: 10.1111/all.13559.

- Saatçi, Ö. *et al.* (2019) 'The therapeutic effect of deep brain stimulation on olfactory functions and clinical scores in Parkinson's disease', *Journal of Clinical Neuroscience*, 68(10), pp. 55–61. doi: 10.1016/j.jocn.2019.07.055.
- Sagit, M. *et al.* (2011) 'Effect of antioxidants on the clinical outcome of patients with nasal polyposis', *The Journal of laryngology and otology*, 125, pp. 811–815. doi: 10.1017/S0022215111001149.
- Say, P. *et al.* (2004) 'Resection of the inferior superior turbinate: does it affect olfactory ability or contain olfactory neuronal tissue?', *American journal of rhinology*. United States, 18(3), pp. 157–160.
- Schlosser, R. J. *et al.* (2016) 'Mucous Cytokine Levels in Chronic Rhinosinusitis–Associated Olfactory Loss', *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 142(8), pp. 731–737. doi: 10.1001/jamaoto.2016.0927.Mucous.
- Schnittke, N. *et al.* (2015) 'Transcription factor p63 controls the reserve status but not the stemness of horizontal basal cells in the olfactory epithelium.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), pp. E5068-77. doi: 10.1073/pnas.1512272112.
- Schriever, V. A. *et al.* (2013) 'Olfactory function following nasal surgery: A 1-year follow-up', *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 270(1), pp. 107–111. doi: 10.1007/s00405-012-1972-0.
- Schriever, V. A. *et al.* (2014) 'Olfactory function after mild head injury in children', *Chemical Senses*, 39(4), pp. 343–347. doi: 10.1093/chemse/bju005.
- Schwob, J. E. and Ph, D. (2012) 'Tissue', 121(8), pp. 1687–1701. doi: 10.1002/lary.21856.Immunohistochemical.
- Seiden, a M. and Duncan, H. J. (2001) 'The diagnosis of a conductive olfactory loss.', *The Laryngoscope*, 111(1), pp. 9–14. doi: 10.1097/00005537-200101000-00002.
- Seiden, A. M. (2004) 'Postviral olfactory loss', *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6 SPEC.ISS.), pp. 1159–1166. doi: 10.1016/j.otc.2004.06.007.
- Sies, H. (1985) 'Oxidative stress: introductory remarks', in *Oxidative stress*, pp. 1–507.
- Silveira-Moriyama, L. *et al.* (2008) 'The use of smell identification tests in the diagnosis of Parkinson's disease in Brazil', *Movement Disorders*, 23(16), pp. 2328–2334. doi: 10.1002/mds.22241.
- Simola, M. and Malmberg, H. (1998) 'Sense of smell in allergic and nonallergic rhinitis', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 53(2), pp. 190–194. doi: 10.1111/j.1398-9995.1998.tb03869.x.

- Sohal, R. S. . and Weindruch, R. (1996) 'Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging', *Science.*, 273(5271), pp. 59–63.
- Sohrabi, H. R. *et al.* (2012) 'Olfactory discrimination predicts cognitive decline among community-dwelling older adults', *Translational Psychiatry*. Nature Publishing Group, 2(5), pp. e118-7. doi: 10.1038/tp.2012.43.
- Soler, Z. M. *et al.* (2019) 'Correlation of mucus inflammatory proteins and olfaction in chronic rhinosinusitis', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 00(0), pp. 1–13. doi: 10.1002/alr.22499.
- Soler, Z. M., Mace, J. and Smith, T. L. (2008) 'Symptom-based presentation of chronic rhinosinusitis and symptom-specific outcomes after endoscopic sinus surgery', *American Journal of Rhinology*, 22(3), pp. 297–301. doi: 10.2500/ajr.2008.22.3172.
- Sorokowska, A. *et al.* (2015) 'Changes of olfactory abilities in relation to age: odor identification in more than 1400 people aged 4 to 80 years', *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272(8), pp. 1937–1944. doi: 10.1007/s00405-014-3263-4.
- Souza, M. *et al.* (1999) 'Factors Determining the Selectivity of Protein Tyrosine Nitration', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 371(2), pp. 169–178.
- Soyka, M. B. *et al.* (2012) 'Regulation and expression of IL-32 in chronic rhinosinusitis.', *Allergy*. Denmark, 67(6), pp. 790–798. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02820.x.
- Stamm, A. *et al.* (2008) 'Diretrizes Brasileiras de Rinossinusites', *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 74, pp. 6–59. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992008000700002>.
- Stevens, W. W. *et al.* (2019) 'Associations Between Inflammatory Endotypes and Clinical Presentations in Chronic Rhinosinusitis', *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. Elsevier Inc, 7(8), pp. 2812-2820.e3. doi: 10.1016/j.jaip.2019.05.009.
- Striebel, K. M. *et al.* (1999) 'Olfactory identification and psychosis', *Biological Psychiatry*, 45(11), pp. 1419–1425. doi: 10.1016/S0006-3223(98)00245-5.
- Sugiura, Tsunemasa Aiba, Junko Mori, M. (1998) 'An Epidemiological Study of Postviral Olfactory Disorder', *Acta Oto-Laryngologica*, 118(544), pp. 191–196. doi: 10.1080/00016489850182918.
- Sullivan, S. L. *et al.* (1995) 'Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium', *Neuron*, 15(4), pp. 779–789. doi: 10.1016/0896-6273(95)90170-1.
- Sullivan, S. L. *et al.* (1996) 'The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), pp. 884–888. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC40152/>.

Sultan, B., May, L. A. and Lane, A. P. (2011) 'The role of TNF-alpha in inflammatory olfactory loss.', *The Laryngoscope*. United States, 121(11), pp. 2481–2486. doi: 10.1002/lary.22190.

Suzuki, J. *et al.* (2013) 'Neural crest-derived horizontal basal cells as tissue stem cells in the adult olfactory epithelium', *Neuroscience Research*, 75(2), pp. 112–120. doi: 10.1016/j.neures.2012.11.005.

Suzuki, M. *et al.* (2007) 'Identification of viruses in patients with postviral olfactory dysfunction.', *The Laryngoscope*, 117(2), pp. 272–277. doi: 10.1097/01.mlg.0000249922.37381.1e.r00005537-200702000-00016 [pii].

Suzuki, Y. and Farbman, A. I. (2000) 'Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in olfactory epithelium in vitro: possible roles of caspase 1 (ICE), caspase 2 (ICH-1), and caspase 3 (CPP32).', *Experimental neurology*, 165(1), pp. 35–45. doi: 10.1006/exnr.2000.7465.

Suzuki, Y., Takeda, M. and Farbman, A. I. (1996) 'Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy.', *The Journal of comparative neurology*. United States, 376(4), pp. 509–517. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<509::AID-CNE1>3.0.CO;2-5.

Tatar, A. *et al.* (2017) 'The potential role of amlodipine on experimentally induced bacterial rhinosinusitis &', *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology (Versão em Português)*.

Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial, 83(6), pp. 619–626. doi: 10.1016/j.bjorlp.2017.05.006.

Temmel, A. F. P. *et al.* (2002) 'Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss.', *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 128(6), pp. 635–641. doi: ooa00128 [pii].

The, T. H. and Feltkamp, T. E. W. (1970) 'Conjugation of Fluorescein Isothiocyanate to Antibodies', *Immunology*, 18, pp. 865–873.

Thornberry, N. A. *et al.* (1997) 'A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 272(29), pp. 17907–17911.

Tomassen, P. *et al.* (2016) 'Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers.', *The Journal of allergy and clinical immunology*. United States, 137(5), pp. 1449-1456.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1324.

Tomaszewska, M. *et al.* (2018) 'Role of Vitamin D and Its Receptors in the Pathophysiology of Chronic Rhinosinusitis', *Journal of the American College of Nutrition*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–11. doi: 10.1080/07315724.2018.1503102.

- Topal, O., Kulaksızoglu, S. and Erbek, S. S. (2014) 'Oxidative stress and nasal polyposis: Does it affect the severity of the disease?', *American Journal of Rhinology & Allergy*, 28(1), pp. 1–4. doi: 10.2500/ajra.2014.28.3963.
- Tsuboi, A. *et al.* (2006) 'Olfactory sensory neurons expressing class I odorant receptors converge their axons on an antero-dorsal domain of the olfactory bulb in the mouse.', *The European journal of neuroscience*. France, 23(6), pp. 1436–1444. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04675.x.
- Tuerdi, A. *et al.* (2018) 'Dorsal-zone-specific reduction of sensory neuron density in the olfactory epithelium following long-term exercise or caloric restriction', *Scientific Reports*, 8(November), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-018-35607-w.
- Turner, J. H. *et al.* (2010) 'Reversible loss of neuronal marker protein expression in a transgenic mouse model for sinusitis-associated olfactory dysfunction.', *American journal of rhinology & allergy*. United States, 24(3), pp. 192–196. doi: 10.2500/ajra.2010.24.3460.
- Turrens, J. F. and Boveris, A. (1980) 'Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria', 191, pp. 421–427.
- Twomey, J. A. *et al.* (1979) 'Olfactory mucosa in herpes simplex encephalitis.', *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 42(11), pp. 983–987. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC490390/>.
- Ünal, M. *et al.* (2004) 'Serum levels of antioxidant vitamins, copper, zinc and magnesium in children with chronic rhinosinusitis', *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(2), pp. 189–192. doi: 10.1016/j.jtemb.2004.07.005.
- Uneri, C. *et al.* (2005) *Determination of reactive oxygen species in nasal polyps*, *Rhinology*.
- Uslu, C., Taysi, S. and Bakan, N. (2003) 'Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme', *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 33(1), pp. 18–22.
- Vassar, R. *et al.* (1994) 'Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb', *Cell*, 79(6), pp. 981–991. doi: 10.1016/0092-8674(94)90029-9.
- Vassar, R., Ngai, J. and Axel, R. (1993) 'Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium', *Cell*, 74(2), pp. 309–318. doi: 10.1016/0092-8674(93)90422-M.
- Venge, P. and HÅKANSSON, L. (1991) 'Current understanding of the role of the eosinophil granulocyte in asthma', *Clinical and experimental allergy*, 21(s3), pp. 31–37.
- Verbeurgt, C. *et al.* (2014) 'Profiling of olfactory receptor gene expression in whole human olfactory mucosa', *PLoS ONE*, 9(5), pp. 21–26. doi: 10.1371/journal.pone.0096333.

- Verhaagen, J. (1989) 'The Expression of the Growth Associated Protein B50 / GAP43 Olfactory System of Neonatal and Adult Rats', *The Journal of neuroscience*, (February), pp. 683–691.
- Verhaagen, J. *et al.* (1990) 'Neuroplasticity in the Olfactory System : Differential Effects of Central and Peripheral Lesions of the Primary Olfactory Pathway on the Expression of B = 50 / GAP43 and the Olfactory Marker Protein', 3144.
- Victores, A. J. *et al.* (2018) 'Olfactory loss in chronic rhinosinusitis is associated with neuronal activation of c-Jun N-terminal kinase', *Int Forum Allergy Rhinol*, 8(3), pp. 415–420. doi: 10.1002/alr.22053.Olfactory.
- Wang, H. *et al.* (2018) 'Cytokine profile in human olfactory cleft mucus and associated changes in olfactory function', *Biorxiv*, 5(28), pp. 1–30.
- Wang, J. H., Kwon, H. J. and Jang, Y. J. (2007) 'Detection of parainfluenza virus 3 in turbinate epithelial cells of postviral olfactory dysfunction patients', *Laryngoscope*, 117(8), pp. 1445–1449. doi: 10.1097/MLG.0b013e318063e878.
- Wang, Y. and Marsden, P. A. (1995) 'Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation.', *Current opinion in nephrology and hypertension*. England, 4(1), pp. 12–22.
- Wat, D. (2004) 'The common cold : a review of the literature', 15, pp. 79–88. doi: 10.1016/j.ejim.2004.01.006.
- Wegener, B.-A. *et al.* (2015) 'Olfactory training with older people', *Chemical Senses*, 40(7), p. 667. doi: 10.1002/gps.4725.
- Weiler, E. and Benali, A. (2006) 'Olfactory epithelia differentially express neuronal markers', 240(2005), pp. 217–240.
- Westerveld, G. J. *et al.* (1997) 'Antioxidant levels in the nasal mucosa of patients with chronic sinusitis and healthy controls.', *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. United States, 123(2), pp. 201–204.
- Whitcroft, K. L. *et al.* (2018) 'Monitoring olfactory function in chronic rhinosinusitis and the effect of disease duration on outcome', *Laryngoscope*, 00(0), pp. 1–8. doi: 10.1002/alr.22104.
- Wiesinger, H. (2001) 'Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system.', *Progress in neurobiology*. England, 64(4), pp. 365–391.
- Winstead, W. *et al.* (2005) 'Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells.', *American journal of rhinology*. United States, 19(1), pp. 83–90.
- Winstead, W. *et al.* (2014) 'Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of

- progenitor cells.', *American journal of rhinology*, 19(1), pp. 83–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15794081>.
- Witt, M. *et al.* (2009) 'Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease', *Movement Disorders*, 24(6), pp. 906–914. doi: 10.1002/mds.22464.
- Wong, S. T. *et al.* (2000) 'Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice.', *Neuron*. United States, 27(3), pp. 487–497.
- Workman, A. D. *et al.* (2020) 'Unexpected effects of systemic steroids on the CRSwNP proteome: is protein upregulation more important than inhibition?', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 10(3), pp. 334–342. doi: 10.1002/alr.22497.
- Wrobel, B. B. *et al.* (2013) 'Assessing the efficacy of endoscopic office olfactory biopsy sites to produce neural progenitor cell cultures for the study of neuropsychiatric disorders', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 3(2), pp. 133–138. doi: 10.1002/alr.21080.
- Wu, G. and Morris, S. M. J. (1998) 'Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.', *The Biochemical journal*. England, 336 (Pt 1, pp. 1–17.
- Wu, J. *et al.* (2018) 'Olfactory and middle meatal cytokine levels correlate with olfactory function in chronic rhinosinusitis', *The Laryngoscope*, pp. 16–19. doi: 10.1002/lary.27112.
- Xu, L. *et al.* (2020) 'Widespread receptor-driven modulation in peripheral olfactory coding', *Science*, 368(6487), pp. 154–164. doi: 10.1126/science.aaz5390.
- Yamasaki, A. *et al.* (2019) 'Improvement in nasal obstruction and quality of life after septorhinoplasty and turbinate surgery', *Laryngoscope*, 129(7), pp. 1554–1560. doi: 10.1002/lary.27859.
- Yang, Y. *et al.* (2018) 'Synergistic antitumour effects of triptolide plus gemcitabine in bladder cancer.', *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. France, 106, pp. 1307–1316. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.083.
- Yee, K. K. *et al.* (2009) 'Analysis of the olfactory mucosa in chronic rhinosinusitis', in *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 590–595. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04364.x.
- Yee, K. K. *et al.* (2010) 'Neuropathology of the olfactory mucosa in chronic rhinosinusitis', *American Journal of Rhinology and Allergy*, 24(2), pp. 110–120. doi: 10.2500/ajra.2010.24.3435.
- Yoo, F. *et al.* (2019) 'Olfactory cleft mucus proteins associated with olfactory dysfunction in a cohort without chronic rhinosinusitis', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 9(10), pp. 1151–1158. doi: 10.1002/alr.22391.

- Yoo, H. S. *et al.* (2020) 'Association between Olfactory Deficit and Motor and Cognitive Function in Parkinson's Disease', *Journal of Movement Disorders*, 6(4), pp. 1–10. doi: 10.14802/jmd.19082.
- You, H. *et al.* (2011) 'Factors affecting bacterial biofilm expression in chronic rhinosinusitis and the influences on prognosis', *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 32(6), pp. 583–590. doi: 10.1016/j.amjoto.2010.11.017.
- Youngentob, S. L. and Kent, P. F. (1995) 'Enhancement of odorant-induced mucosal activity patterns in rats trained on an odorant identification task', *Brain Research*, 670(1), pp. 82–88. doi: 10.1016/0006-8993(94)01275-M.
- Yousem, D M *et al.* (1999) 'Gender effects on odor-stimulated functional magnetic resonance imaging', *Brain Research.818(2):480-7*, (NETHERLANDS PT-Journal Article PT-Research Support, U.S. Gov't, P.H.S NO-P01 DC 00161-15 (United States NIDCD NIH HHS) LG-English), pp. 480–487.
- Yousem, David M *et al.* (1999) 'Posttraumatic Smell Loss : Bulbs and the Temporal', *Academic Radiology*, 6(5), pp. 264–272.
- Zaborszky, L. *et al.* (1986) 'Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band.', *The Journal of comparative neurology*. United States, 243(4), pp. 488–509. doi: 10.1002/cne.902430405.
- Van Zele, T. *et al.* (2006) 'Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 61(11), pp. 1280–1289. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01225.x.
- Zendehbad, A. S. *et al.* (2020) 'Validation of Iranian Smell Identification Test for screening of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *Applied Neuropsychology:Adult*. Routledge, 0(0), pp. 1–6. doi: 10.1080/23279095.2019.1710508.
- Zhang, H. *et al.* (2014) 'CD64 Expression Is Increased in Patients with Severe Acute Pancreatitis : Clinical Significance', 8(4), pp. 445–451.
- Zhao, K. *et al.* (2014) 'Conductive olfactory losses in chronic rhinosinusitis? A computational fluid dynamics study of 29 patients', *International Forum of Allergy and Rhinology*, 4(4), pp. 298–308. doi: 10.1002/alr.21272.
- Zhen, Z. *et al.* (2014) '[Factors influencing olfactory dysfunction in patients with chronic rhinosinusitis].', *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*, 28(17), pp. 1282–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25522558>.

Zhong, Y., Li, Y. and Zhang, H. (2019) 'Silencing TBX1 Exerts Suppressive Effects on Epithelial – Mesenchymal Transition and Inflammation of Chronic Rhinosinusitis Through Inhibition of the TGF b -Smad2 / 3 Signaling Pathway in Mice', *American Journal of Rhinology & Allergy*, 0(87), pp. 1–10. doi: 10.1177/1945892419866543.

Zhou, S.-H. *et al.* (2018) 'Influence of vitamin D deficiency on T cell subsets and related indices during spinal tuberculosis.', *Experimental and therapeutic medicine*. Greece, 16(2), pp. 718–722. doi: 10.3892/etm.2018.6203.

Zou, D.-J., Chesler, A. and Firestein, S. (2009) 'How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story?', *Nature Reviews. Neuroscience*. Nature Publishing Group, 10(8), pp. 611–8. doi: 10.1038/nrn2666.

Zufall, F. and Leinders-zufall, T. (1997) 'Identification of a Long-Lasting Form of Odor Adaptation that Depends on the Carbon Monoxide / cGMP Second- Messenger System', 17(8), pp. 2703–2712.

ANEXOS

ANEXO A- Questionário dados gerais

ENTREVISTADOR:		DATA: ____/____/____					
Nome: _____							
Data de Nascimento: ____/____/____			Idade: ____ anos				
Sexo:		1 - Masculino		2 - Feminino			
Endereço atual:							
Rua/Av/Al: _____					Nº _____		
Compl. _____			CEP: _____ - _____				
Bairro: _____			Região: _____				
Telefone para contato:							
Fixo: (____) _____ - _____		(____) _____ - _____					
Celular: (____) _____ - _____		(____) _____ - _____					
Município e Estado de Nascimento: _____ / _____							
1	Qual seu grupo étnico?	1. branco	2. negro	3. pardo	4. amarelo	5. índio	9. NS/NR
2	Qual a renda mensal da família:	1. menos ou igual a 724 reais	2. 725 a 2890 reais	3. 2891 a 7240 reais	4. mais de 7240 reais	9. NS/NR	
3a	Você fuma?	1 - Sim	2 - Não (pule para 3e)		9 - NS/NR (pule para 3e)		
3b	Quantos cigarros ou outros/dia? _____						
3c	Você traga?	1 - Sim	2 - Não		9 - NS/NR		
3d	Com que idade começou a fumar? _____ anos (pular para 4)						
3e	Você já fumou alguma vez?	1 - Sim	2 - Não (pule para 4)		9 - NS/NR (pule para 4)		
3f	Se sim, com que idade começou? _____ anos						
3g	Com que idade parou de fumar? _____ anos						
3h	Quantos cigarros fumava por dia? _____						
3i	Sua habilidade de sentir odores mudou após parar?	1 - Sim	2 - Não		9 - NS/NR		
3j	Quanto mudou (1-nada- a 10-muito)? _____						
4	Qual seu grau de Instrução?	1. ensino fundamental incompleto		3. ensino médio incompleto		5. ensino superior incompleto	
		2. ensino fundamental completo		4. ensino médio completo		6. ensino superior completo	
	Quantos anos de estudo? _____ anos						
	Qual a sua ocupação?						
5	Atualmente, você está utilizando algum tipo de medicação (incluindo anticoncepcional)?	1 - Sim	2 - Não (pule para 9)		9 - NS/NR (pule para 9)		
	Se sim, qual/quais?						
6	Atualmente você tem alguma doença nasal?	1 - Sim	2 - Não (pule para 10)		9 - NS/NR (pule para 10)		
	Se sim, qual/quais?						
7	Atualmente você tem alguma outra doença?	1 - Sim	2 - Não		9 - NS/NR		
	Se sim, qual/quais?						

ANEXO B- Questionário de inclusão

Critérios para Inclusão no estudo – Todas as questões devem ser respondidas, mas não poderá participar do estudo se alguma resposta obtida estiver em destaque. Pacientes do grupo de rinosinusite não serão excluídos caso respondam sim para as perguntas 8 e 9.

8	Você tem dificuldade em sentir o cheiro das coisas? Explique:	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
9	Você tem dificuldade em sentir o gosto das coisas? Explique:	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
10	Você está resfriado(a) ou gripado(a)?	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
11	Sofre de alguma destas doenças?			
	a) Parkinson	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
	b) Alzheimer	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
	c) Epilepsia	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
	d) Derrame	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
	e) Tumores no cérebro	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
	f) Paralisia de braço(s)/perna(s)	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
12	Toma algum remédio para doença psiquiátrica, da cabeça? <i>(não excluir se tomar somente antidepressivo)</i> Qual?	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
13	Problema grave de memória	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR
14	Alguma vez bateu a cabeça tão forte que ficou desacordado e foi para o hospital?	1 - Sim	2 - Não	9 – NS/NR

ANEXO C – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Ellen Cristine Duarte Garcia, Waldiceu Aparecido Verri Júnior e Marco Aurélio Fornazieri, responsáveis pela pesquisa intitulada “Análise do epitélio olfatório de pacientes com Rinossinusite Crônica”, estamos fazendo um convite para você participar como voluntário deste nosso estudo.

1 - Durante todo o período da pesquisa você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato, com o pesquisador ou com o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a). 2 - Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa descrever as alterações no epitélio olfatório nos pacientes portadores de rinossinusite crônica. Esse objetivo será alcançado através da biópsia do epitélio olfatório sob anestesia geral durante a cirurgia, aplicação de questionário e teste da sua capacidade de sentir cheiros. Pacientes voluntários sem rinossinusite crônica e sem alterações olfatórias com indicação de correção de desvio de septo serão submetidos à biópsia durante o procedimento cirúrgico e repetirão o teste olfatório 1 mês após a cirurgia. 3 - Não há desconforto ou risco esperado na realização do teste olfatório e do questionário. Há um risco mínimo de sangramento nasal após a biópsia nasal, que será controlado através da oximetazolina. Não há indícios de perda adicional do olfato pela biópsia, pois o epitélio olfatório possui capacidade de regeneração. 4 - Somente no final do estudo, poderemos concluir se há algum benefício para o participante; 5 - Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento sem nenhum tipo de prejuízo à continuidade de seu atendimento na Instituição. 6 - As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. 7 - Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Em caso de algum problema relacionado com a pesquisa, você terá direito à assistência gratuita que será prestada pelos pesquisadores do estudo.

Eu, _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário
obtenção do TCLE

Assinatura do responsável pela

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

Dados do Pesquisador: Marco Aurélio Fornazieri
Rua Farrapos, 70 Telefone: (43) 8813-3812 E-mail: marcofornazieri@gmail.com

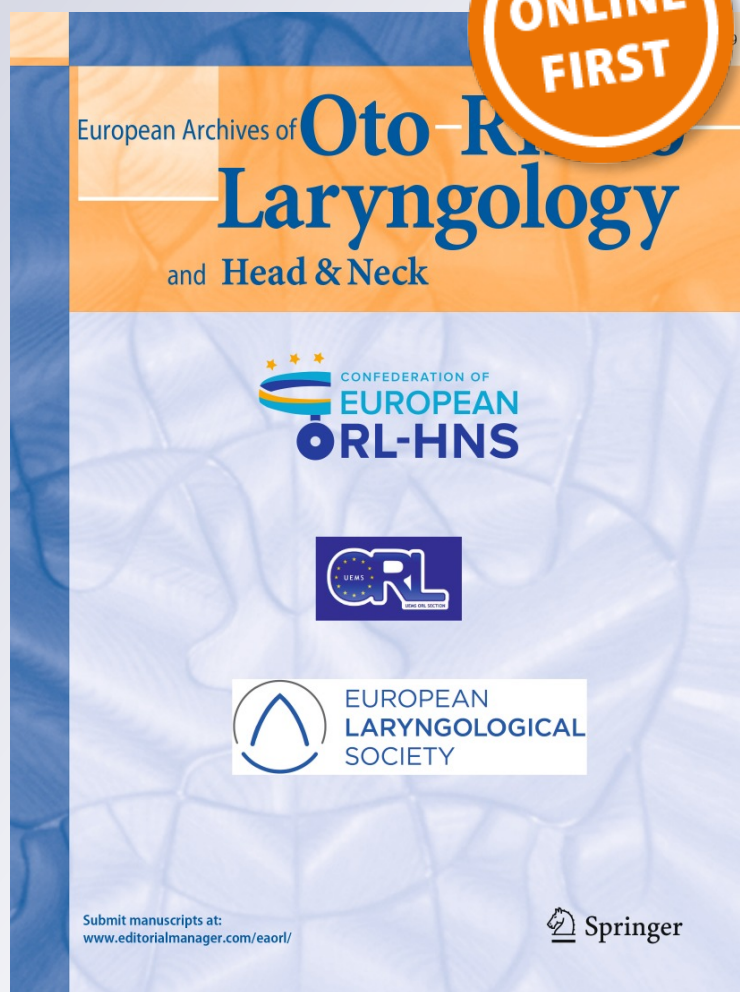
Safety and efficacy of superior turbinate biopsies as a source of olfactory epithelium appropriate for morphological analysis

Ellen Cristine Duarte Garcia, Ana Carolina Rossaneis, Alexandre Salvatore Pipino, Gustavo Vasconcelos Gomes, Fábio de Rezende Pinna, et al.

European Archives of Oto-Rhino-Laryngology
and Head & Neck

ISSN 0937-4477

Eur Arch Otorhinolaryngol
DOI 10.1007/s00405-019-05728-7



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Safety and efficacy of superior turbinate biopsies as a source of olfactory epithelium appropriate for morphological analysis

Ellen Cristine Duarte Garcia¹ · Ana Carolina Rossaneis² · Alexandre Salvatore Pipino¹ · Gustavo Vasconcelos Gomes¹ · Fábio de Rezende Pinna³ · Richard Louis Voegels³ · Richard L. Doty⁴ · Waldiceu Aparecido Verri Jr.² · Marco Aurélio Fornazieri^{1,3,5}

Received: 30 July 2019 / Accepted: 7 November 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose There is no standardized approach for preserving olfactory function in the side of the nose where biopsy of the olfactory epithelium (OE) is performed. Moreover, a gold standard technique for obtaining human OE in vivo is still lacking. We determined the efficacy of obtaining good-quality OE specimens suitable for pathological analysis from the lower half of the superior turbinate and verified the safety of this procedure in maintaining bilateral and unilateral olfactory function.

Methods In 21 individuals without olfactory complaints and who had undergone septoplasty and inferior turbinectomy OE biopsy was made during septoplasty. Olfactory function, both unilateral and bilateral, was assessed using the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT) before and 1 month after the procedure. Specimens were marked with the olfactory marker protein for confirmation of OE presence.

Results Ninety percent of the samples contained OE, although clear histological characterization was possible from only 62%. There was no deterioration of UPSIT scores either bilaterally or unilaterally on the side of the biopsy. Patients also maintained the ability to identify individual odors.

Conclusion Biopsies of the lower half of the superior turbinate do not affect olfactory function and show strong efficacy in yielding OE tissue and moderate efficacy for yielding tissue appropriate for morphological analysis. Future studies are needed to assess the safety of this procedure in other OE regions.

Keywords Smell · Immunohistochemistry · Smell tests · Morphology · Nasal mucosa · Olfactory function

Introduction

Biopsies of the human olfactory epithelium (OE) have the potential to shed light on the pathophysiology, diagnosis, and even treatment of a number of diseases. For example, such biopsies have been found useful for (a) assessing the normal and pathological morphology of the olfactory neuroepithelium of fetuses and adults [1–9], (b) obtaining stem cells for spinal cord transplantations and other biologic needs [10–12], (c) enhancing the understanding of pathological processes of such diseases as Alzheimer's and herpes simplex-related encephalitis [13, 14], and (d) defining the epithelial changes caused by such nasal diseases as chronic rhinosinusitis and virus-induced anosmia [15–17].

Despite the substantial potential of olfactory epithelial biopsies for clinical assessments and research purposes, there is no standardized technique for biopsying human OE in vivo [18–20]. Difficulties in obtaining OE biopsies

✉ Marco Aurélio Fornazieri
marcofornazieri@gmail.com

¹ Department of Clinical Surgery, Londrina State University (UEL), Londrina, PR, Brazil

² Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy and Cancer, Department of Pathological Sciences, UEL, Londrina, PR, Brazil

³ Department of Otorhinolaryngology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Smell and Taste Center, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

⁵ Department of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina, Brazil

include the absence of straightforward physical access to the olfactory region and the irregular distribution of the OE due to viral, bacterial, and xenobiotic insults, a number of which cumulate over the course of a lifetime [5, 8, 21–24]. OE biopsy success rates range from 16 to 100%, depending upon the technique used and the region that is targeted. Thus, studies have described success rates of 40–89% for the superior septum [9, 10, 18, 20, 22, 25–28], 16–100% for the superior turbinate [10, 18, 25, 29–32], and 42% for the middle turbinate [22]. Importantly, although some studies have reported high percentages of OE acquisition from superior turbinate biopsies, they do not describe the number of specimens that yielded good-quality material suitable for microscopic analysis.

Among studies that have obtained endoscopy-guided OE biopsies, there are no reports of reduced-unilateral olfactory capacity using properly validated-olfactory tests [10, 27, 30, 32]. Since bilateral testing typically reflects in the better functioning side of the nose, and biopsies are typically performed on only one side of the nose, one must establish whether function is altered on the side of the biopsy, a procedure that is largely lacking in the literature [27, 30, 32]. Moreover, preservation of the ability to identify a range of individual odors after this procedure has yet to be explored. Each olfactory neuron expresses only one of over nearly 300 types of receptor proteins [33], and there is evidence, at least in animals, that receptors are not uniformly distributed throughout the OE [34, 35]. Thus, biopsies could remove a group of receptor cells expressing only a subset of the full complement of types of olfactory receptors and thereby compromise the recognition and identification of specific odorants. Other mechanisms related to a possible reduction in olfactory capacity include a reduction in the total number of bipolar neurons, scarring near the olfactory cleft that prevents odorants from reaching the olfactory cleft, and trauma in the cribriform plate [27]. More details about the techniques described to obtain OE, the percentages of OE present in the biopsy samples, and the safety of these procedures with respect to olfactory function are presented in Table 1.

This study determined the efficacy of a technique in obtaining intact OE from the lower half of the superior turbinate and employed a well-validated and sensitive olfactory test to assess its safety in maintaining bilateral (total), unilateral, and lesion-side specific olfactory function.

Materials and methods

Participants

OE biopsies were performed in 21 patients from an outpatient otorhinolaryngology clinic. All patients reported no olfactory complaints and had undergone septoplasty

and inferior turbinectomy for breathing problems. Among these 21 patients, 15 were men (mean age: 29.4 years; SD 12.5 years) and 6 were women (mean 30.6 years; SD 12.5 years).

Olfactory test

Bilateral- and unilateral olfactory function was assessed pre-operatively and 1-month postoperatively using the version of the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT) that has been adapted and validated for the Brazilian population [39]. As described previously, to measure olfactory performance on the side where the biopsy was performed, volunteers were tested unilaterally (20 UPSIT items on each side) with the opposite nostril blocked with Micropore™ tape (3 M do Brasil, Sumaré, SP, Brazil) [27, 40]. The study was approved by the local ethics research committee and each participant provided informed consent after being properly made aware of the methods and purposes of the study.

Olfactory epithelium collection

An otolaryngologist collected the samples under general anesthesia. Vasoconstriction was achieved topically with three drops of oxymetazoline in each nasal cavity, and pledgets were not put over the OE region to avoid scarification. After satisfactory superior turbinate visualization, olfactory mucosa was collected from the lower half of this turbinate using a pair of Takahashi forceps (Fig. 1).

Biopsy preparation

Samples were marked with anti-olfactory marker protein (OMP). Specimens were fixed for 24 h in 10% formalin, decalcified, dehydrated, and processed in paraffin. Serial sections of 3- μ m thickness were obtained from each specimen and placed on slides. Samples were deparaffinized, and the slides were placed in a commercial food steamer with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer for 3 min for antigen retrieval, followed by a heat shock in cold water for 10 min. Peroxidase blocking was performed; the samples were then rinsed with PBS (phosphate-buffered saline) and incubated in a humid chamber with anti-OMP antibody (rabbit polyclonal antibody anti-OMP, 1:750, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) diluted in PBS with BSA (bovine serum albumin), and protein blocking was assessed to confirm the presence of OE. Incubation with the secondary biotinylated antibody (Bio SB, Santa Barbara, California, USA) was performed for 10 min, followed by rinsing with PBS and incubation with streptavidin conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Bio SB, Santa Barbara, California, USA) for 10

Table 1 Methods of confirmation of olfactory epithelium (OE) presence, success rates for obtaining OE according to the region biopsied, and verification of olfactory function maintenance after the procedure in previous studies performing OE biopsies

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Lovell et al. [21]	1982	Twelve subjects. Eight were patients undergoing septorhinoplasty, one had a total thyroidectomy under general anesthesia, one was hyposmic, and two were normal volunteers	Not reported	The head of the supine patient is positioned so the surgeon can see the space between the nasal septum and middle turbinate. The instrument is advanced through the nares along the septum to a depth of 60–70 mm, with the cutting edge in an anteroposterior orientation. When the olfactory area is reached, the instrument is rotated medially, the cutting edge is pressed against the septum, and the instrument and specimen are carefully withdrawn	Electron microscopy	Not reported	No subjects exhibited either subjective or clinically detectable olfactory deficits following the procedure
Moran et al. [9]	1992	Thirty-nine patients with chemosensory complaints	Not reported	Guided by endoscopy, under local anesthesia, a small piece of nasal epithelium (1 mm ²) was removed from the superior region of the nasal septum (6–7 cm in depth) using a specially made biopsy instrument	Electron microscopy	59.5% (superior septum)	Not reported
Leopold et al. [26]	1992	Five patients with a congenital lack of olfactory ability	14 to 58 years (mean 22)	Similar to Lovell (1982)	Electron microscopy	40% (upper septum)	–
Yamagishi et al. [36]	1994	Thirteen patients with olfactory disturbances after URI (6 women and 7 men)	26 to 72 years (mean 48.3)	The olfactory cleft was inspected with a micro-endoscope and a Takahara's forceps were inserted carefully without anesthesia. When the tip reached the tegmen, it was pressed softly and the forceps closed	Morphological criteria and immunohistochemistry (neuron-specific enolase and S100)	92.3% (olfactory cleft)	Not reported
Lanza et al. [27]	1994	Nineteen subjects. Seven were controls, 8 had PD, 3 AD, and 1 had Pick's disease	Not reported	Under local anesthesia, a hook-shaped olfactory biopsy instrument was brought endoscopically to the skull base between the superior turbinate and nasal septum. It was turned so that its biting surface faced the septum and was then withdrawn from the olfactory cleft	Electron microscopy and immunohistochemistry (neuron-specific enolase and S100)	89% (superior septum)	No. Preservation of unilateral and bilateral function using the UPSIT

Table 1 (continued)

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Féron et al. [18]	1998	Thirty-three individuals (24 men and 9 women). Ten had nasal abnormalities, as polyps. Others were undergoing septoplasty or turbinectomy	21–74 years	During nasal surgery, guided by endoscopy and under general anesthesia, with the use of an ethmoid forceps, human nasal mucosa was obtained from the septum, superior and middle turbinates	Anti-olfactory marker protein, anti-microtubule-associated protein 5 and anti-beta tubulin III	76% (posterior region of the superior septum) and 73% (posterior region of the superior turbinate)	Not reported
Feron et al. [37]	1999	Ten patients with schizophrenia (5 men and 5 women) and ten controls (6 men and 4 women)	20–48 years	Under local anesthesia. Similar to Feron et al. (1988)	Cell cultures and immunohistochemistry with Anti-olfactory marker protein and anti-beta tubulin III	100% (not reported)	No. No change in bilateral UPSIT score after biopsy
Lee et al. [25]	2000	Twenty-one patients (11 men and 10 women). Fifteen patients were anosmic and six normosmic	24–61 years (mean 40.1)	Upon identification of the olfactory cleft with a microscope and/or endoscope, the presumptive olfactory mucosa of the nasal septum and superior turbinate was incised and elevated with a sickle knife. Then, it was removed by small Blakesley forceps	Anti-microtubule associated protein-5	61% (superior turbinate and nasal septum)	Not reported
Kern [28]	2000	Thirty patients (14 men and 16 women) undergoing nasal or sinus surgery	22–39 years	Biopsies of the olfactory region were taken along the upper septum, posterior to the head of the middle turbinate. Two biopsies were taken from each side	Morphological criteria and in cases in which the identity of the mucosa was unclear, staining for the presence of olfactory marker protein was performed.	63.3% (upper septum)	Not reported
Leopold et al. [26]	2000	Fifteen normosmic volunteers (6 women and 6 men)	21–48 years	Biopsy specimens were obtained of healthy pink mucosa in the anterior and superior nasal cavity from both the medial and lateral walls. Cupped forceps, knife incisions, or sharp curettes were used to minimize tissue damage	Anti-olfactory marker protein and anti-neurotubulin	42% (anterosuperior region of the middle turbinate) and 47% (anterosuperior region of the nasal septum)	Not reported

Table 1 (continued)

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Lane et al. [29]	2002	Four patients undergoing partial superior turbinate resection as part of an endoscopic sinus procedure with self-report normal olfaction	Not reported	The removal of the inferior portion of the superior turbinate was performed with fine through-cutting ethmoid forceps to provide wide exposure of the face of the sphenoid sinus	Anti-olfactory marker protein	100% (superior turbinate)	None of the study subjects reported subjective olfactory dysfunction after surgery or during the 6-to-8-month follow-up period, although no formal olfactory testing was performed pre- or postoperatively
Say et al. [30]	2004	Thirty-one patients (17 men and 14 women) undergoing endoscopic sphenoidotomy for chronic rhinosinusitis	Mean 46 years	The inferior one-third of the superior turbinate was removed sharply using scissors and knife cuts to avoid tissue damage	Anti-olfactory marker protein	16% (superior turbinate)	Unilateral 12-item Cross-Cultural Smell Identification Test showed that six nostrils (12%) had a decrease in olfactory ability by more than one odorant, 27 nostrils (52%) had no more than a one odorant change, and 18 nostrils (35%) had greater than one odorant improvement
Winstead et al. [10]	2005	Forty-two individuals (28 women and 14 men) undergoing endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis	18–61 years	A 0° endoscope was used to visualize the presumptive olfactory area. All biopsies were performed under general anesthesia. A 70° forward-biting cup forceps was used to perform the biopsy. Three biopsies, each ~3 mm ² , were performed unilaterally from the dorsoposterior nasal septum, medial wall of the superior turbinate, and posterior aspect of the middle turbinate	Positive cultures producing olfactory progenitor cells	50% (posterosuperior septum and medial wall of superior/middle turbinates)	No. The mean postoperative bilateral UPSIT score was higher than the preoperative score

Table 1 (continued)

Author	Year	Subjects (n)	Age	Technique	Method for confirmation of OE presence	Percentage (region)	Decreased olfactory function after the procedure?
Holbrook et al. [38]	2005	Twenty-seven patients (8 men and 17 women). Nine were hyposmic, 10 normosmic, 4 were anosmic, 3 were phantosmic, and 1 was anosmic/phantosmic	21–77 years	Some samples were harvested as part of a planned rhinologic or sinus procedure under general anesthesia. Other samples were obtained under local anesthesia induced by the application of cocaine-soaked pledgets. Specimens were obtained using cupped forceps, knife incisions, or sharp curettes	Anti-olfactory marker protein and anti-neurotubulin	85.2% (olfactory region)	Not reported
Kachramanoglou et al. [31]	2013	Forty-three patients (25 men and 18 women)	18–81 years mean 44 (SD 17)	Under general anesthesia, a portion of the middle third of the superior turbinate was resected using endoscopic microscissors	Anti-human low-affinity neurotrophin receptor and anti-S100	94.1% (superior turbinate)	Not reported
Andrews et al. [32]	2016	Sixty-five patients undergoing functional sinus surgery	Mean 47.2 (SD 14.5)	The middle section of the superior turbinate was excised through two horizontal incisions fashioned with curved endoscopic forceps and completed posteriorly. The middle section was excised in total ensuring mucosa and turbinate bone remain intact and gently removed using endoscopic forceps	Histological and cell culture analysis	100% (superior turbinate)	No. There was no change in bilateral UPSIT score pre- and post biopsy. Unilateral test was not done
Holbrook et al. [20]	2016	Fourteen subjects (7 men and 7 women). Seven subjects had smell loss related to URI, 3 had smell loss related to head trauma, 2 had no subjective loss and tested normal, and 2 subjects tested hyposmic	22–68 years (mean 53.4)	Four subjects had biopsies in the operating room (OR). The remaining 10 underwent biopsies in the clinic. Biopsies performed in the clinic were obtained from subjects without the use of sedation in an upright sitting position. Rigid endoscopy was performed using a 2.7-mm, 0-degree endoscope and after mucosal incision, a small, cupped, biopsy forceps was used to obtain specimens approximately 2–3 mm in size	Anti- protein gene product 9.5 and anti-olfactory marker protein	80% of those biopsied in the clinic (superior anterior septum within the olfactory cleft)	Not reported

UPSIT University of Pennsylvania smell identification test, PD Parkinson's disease, AD Alzheimer's disease, URI upper respiratory infection, OMP anti-olfactory-marker protein

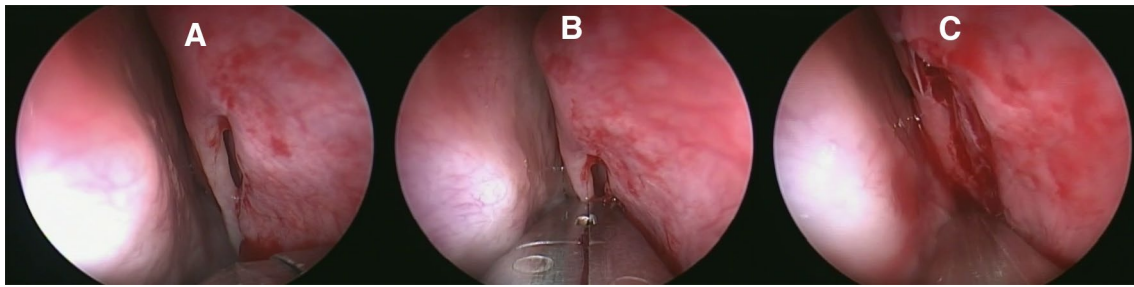


Fig. 1 Olfactory mucosal biopsy technique. Left superior turbinate view (a) lower half punch with Takahashi forceps (b) and status post-procedure (c) As the image shows, the bleeding was minimal

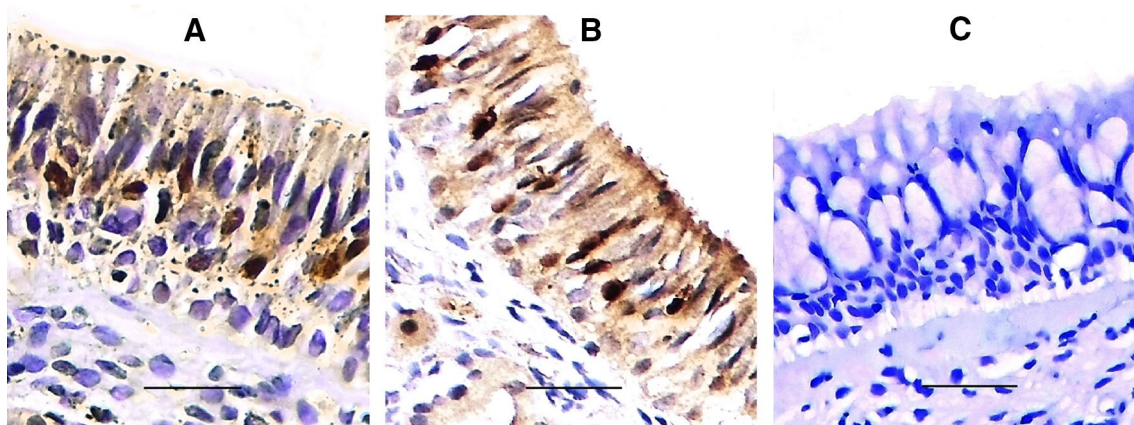


Fig. 2 Superior and inferior turbinate biopsies browned marked for olfactory marker protein (OMP, 1:750). Biopsies **a** and **b** illustrate two patients' biopsies of the superior turbinate that were positive for

the olfactory epithelium, and **c** shows a negative control from the respiratory epithelium at the inferior turbinate (400× magnification; scale bar, 50 μm)

more minutes. The samples were then rinsed with PBS in a PBS bath for 5 min, followed by DAB (diaminobenzidine 3,3) and 50 μL of DAB chromogen diluted in 1 ml of DAB buffer for 10 min, and again rinsed with PBS. Slides were counterstained with hematoxylin. Five biopsies of the inferior turbinate—without olfactory cells [35]—were used as negative controls. A biopsy was considered successful for the presence of OE when the epithelium was not crushed during the procedure, was positive for anti-OMP, and exhibited all cell layers in at least one high-power field visualization.

Statistical analysis

Continuous variables, such as age and UPSIT scores, were expressed as means and standard deviations. The bilateral and unilateral UPSIT mean scores and percentages of correct answers for each odorant pre- and post-procedure were compared and the respective 95% confidence intervals were determined.

Results

Ninety percent of the harvested samples contained OE (19/21). Sixty-two percent (13/21) were suitable for pathological analysis (Fig. 2), reflecting samples that were not damaged by the biopsy or the tissue-processing processes.

The olfactory biopsies did not compromise olfactory function either bilaterally (pre-biopsy bilateral UPSIT mean score: 28.9, 95% CI 26.6–31.1; post-biopsy score: 30.6, 95% CI 28.8–32.3) or on the side of the nasal cavity where biopsy was performed (pre-biopsy unilateral UPSIT mean score: 14.2, 95% CI 11.4–17; post-biopsy score: 13.9, CI 95% 11–16.8). Olfactory function also remained normal in the nasal cavity that was not biopsied (pre-surgery unilateral UPSIT mean score: 13.3, 95% CI 10.7–15.9; post-surgery score: 13.7, 95% CI 10.6–16.8).

As shown in Table 2, patients also maintained the capacity to correctly identify specific odorants (Table 2). In other words, there was no evidence that our biopsy procedure

Table 2 Patients' capacity to identify specific odorants before and after olfactory epithelium biopsy

Odor	Before (% of correct answers, CI 95%)	After (% of correct answers, CI 95%)
Pizza	53.3 (24.7–81.9)	55.5 (30.1–80.9)
Bubble gum	86.7 (67.2–110)	88.9 (71.8–100)
Menthol	86.7 (67.2–110)	77.8 (56.5–99.1)
Cherry	86.7 (67.2–110)	88.9 (72.8–100)
Motor oil	53.3 (24.7–81.9)	55.6 (30.1–81)
Peppermint	80 (57.1–100)	77.8 (56.6–99.1)
Banana	53.3 (24.7–81.9)	72.2 (49.3–95.1)
Clove	80 (57.1–100)	88.9 (72.8–100)
Leather	46.7 (18.1–75.3)	77.8 (56.6–99.1)
Coconut	66.7 (39.6–93.7)	94.4 (82.7–110)
Onion	93.3 (79–110)	94.4 (82.7–110)
Fruit juice	60 (31.9–88.1)	72.2 (49.3–95.1)
Baby powder	86.7 (67.2–110)	100 (100–100)
Jasmine	73.3 (48–98.7)	77.8 (56.5–99.1)
Cinnamon	60 (31.9–88.1)	88.9 (72.8–100)
Gasoline	20 (–2.9–42.9)	33.3 (9.2–57.5)
Strawberry	66.7 (39.6–96.7)	88.9 (72.8–100)
Coffee	73.3 (48–98.7)	72.2 (49.3–95.1)
Gingerbread	60 (31.9–88.1)	72.2 (49.3–95.1)
Apple	60 (31.9–88.1)	77.8 (56.5–99.1)
Perfume	80 (57.1–100)	88.9 (72.8–100)
Flower	80 (57.1–100)	83.3 (64.3–100)
Peach	53.3 (24.7–81.9)	77.8 (56.5–99.1)
Tire	73.3 (48–98.7)	83.3 (64.3–100)
Pickles	33.3 (6.3–60.4)	55.6 (30.1–81)
Pineapple	80 (57.1–100)	77.8 (56.5–99.1)
Raspberry	73.7 (47–98.7)	94.4 (82.7–110)
Orange	80 (57.1–100)	77.8 (56.5–99.1)
Walnuts	46.7 (18.1–75.3)	72.2 (49.3–95.1)
Watermelon	66.7 (39.6–93.7)	88.9 (71.8–100)
Solvent	53.3 (24.7–81.9)	61.1 (36.2–86.1)
Grass	86.7 (67.2–110)	83.3 (64.3–100)
Smoke	73.3 (48–98.7)	66.7 (42.5–90.8)
Wood	53.3 (24.7–81.9)	72.2 (49.3–95.1)
Grape	86.7 (67.2–110)	88.9 (72.8–100)
Garlic	60 (31.9–88.1)	72.2 (49.3–95.1)
Soap	73.3 (48.0–98.7)	55.6 (30.1–81.0)
Natural gas	73.3 (48.0–98.7)	88.9 (72.8–100)
Rose	40 (11.9–68.1)	55.6 (30.1–81)
Peanut	66.7 (39.6–93.7)	66.7 (42.5–90.8)

compromised bilateral smell-function for any of the 40 odorants employed on the UPSIT. Moreover, the technique was

not associated with any complication such as continuous bleeding or a cerebrospinal fluid leak.

Discussion

This study demonstrated that biopsies taken from the inferior portion of the superior turbinate are safe, in that they did not adversely affect olfactory test scores on the biopsied side of nose, both sides of the nose tested together, or the perception of specific odorants bilaterally. We also demonstrated that the technique employed shows moderate efficacy for obtaining intact OE for microscopic evaluation. A detailed description of the OE biopsy technique was provided to facilitate the standardization of this procedure, making it more comparable to other studies that have explored this topic. Notably, in our procedure, only a small mucosal piece with a diameter of 3–5 mm was removed from the superior turbinate. Future research is needed to determine to what degree our finding of safety for preserving smell ability can be extrapolated to surgeries in which larger amounts of epithelium are compromised, such as in partial turbinal resections employed in some transsphenoidal pituitary surgeries.

Our preservation of olfactory capacity after OE biopsy concurs with the findings of previous studies [10, 27, 32]. Some studies also noted preservation of unilateral olfactory function [27, 30]. However, our sample is the first sample that included only patients without diseases that cause moderate to severe olfactory dysfunction, such as chronic rhinosinusitis and neurodegenerative diseases, making it a more appropriate sample for safety analyses. We did not observe any selective deficits to the perception of specific UPSIT odorants following the biopsy. Although identification of some specific smells theoretically could be affected since olfactory neurons are distributed to some degree regionally in the OE according to the type of olfactory receptor they possess in primates [34] and because olfactory receptors have specificity for certain types of odor structures [33], we did not observe any selective anosmia after the biopsy. However, most UPSIT odorants, indeed most natural odors in general, are comprised of multiple chemicals, so redundancy may be present that mitigates the meaningfulness of this observation.

The patients' ability to perceive both pleasant and unpleasant smells of food and identify different types of substances on the basis of olfactory cues remained intact following our biopsies. One might argue that this maintenance of olfactory acuity could also reflect the improvement of nasal flow after surgery. However, there is no evidence that septoplasty associated with inferior

turbinate-partial resection improves olfaction [41–45]. In Table 2, despite not being statistically significant, it is noteworthy that 31 out of 40 odors were more correctly chosen after the biopsy than before. This could reflect learning of the smells or practice effect, as it is unlikely that taking the biopsy would improve olfactory function.

OE collection from the lower half of the superior turbinate was moderately effective, yielding OE appropriate for microscopic analysis in 62% of the patients. This percentage was smaller than the corresponding values reported in previous studies, such as the rate of 80% in the nasal septum with local anesthesia using cupped biopsy forceps [20], and 73% in the superior turbinate with ethmoidal forceps [18]. On the other hand, our success rate was superior to those obtained in the superior turbinate and septum with Blakesley forceps (61%) [25], and in the middle turbinate using various tools (42%) [22]. Our moderate efficacy is related to the fact that we considered a positive biopsy only when tissue integrity was preserved. However, if one considers all specimens collected that possessed OE, our efficacy exceeded 90% (90.5%). Future studies aiming for these success rates while obtaining intact OE for morphological analysis from regions other than the superior turbinate are necessary. Abrasion of an OE specimen can hinder proper evaluation of the OE components and prevent comparisons among the different groups of patients from whom the OE was collected.

That being said, in the majority of cases our sampling technique allowed for harvesting OE biopsies without damaging the specimens and facilitated easy bleeding control. One limitation, which is not exclusive to this technique when trying to collect human OE samples, is the reduced size of the material and its fragility, both of which reduce the number of samples available for analysis. Importantly, success in obtaining OE with this procedure may vary according to patient's age [24]. The patients included in our study were only young adults. Other studies should clarify whether such success and safety is also evident in older individuals. Another possible limitation of the study was immunohistochemistry employment alone for OE identification. Although typically OMP is not expressed in the inferior turbinate region, some samples can show background marking. Use of complementary techniques such as immunofluorescence could be advantageous in this respect, because increasing the number of markers would be expected to more accurately detect the presence of OE. Moreover, the use of frozen tissue could help decrease background marking.

We believe that general anesthesia is the best approach for OE biopsy in the superior turbinate. In addition to allowing better pain- and bleeding control, general anesthesia allows better access to the superior turbinate, since access in an awake individual with normal nasal anatomy

is very narrow and challenging even for the most trained surgeons. Other advantages of general anesthesia are the possibility of obtaining a bigger specimen for analysis and reaching the region without patient discomfort.

Conclusion

Biopsy from the lower half of the superior turbinate with a pair of Takahashi forceps is safe for bilateral, unilateral, and specific olfactory function. It also yields OE without scarification that is appropriate for morphological analysis in more than half of the attempts. More research is needed to continue making OE biopsy techniques more consistent for keeping results comparable and safe across studies.

Acknowledgements The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária for PhD, Post-Doc and PQ for financial support. We especially thank professor Eric H. Holbrook for helping in the final review of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest Richard L. Doty receives funding from the Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. He is a consultant to Acorda Therapeutics, Eisai Co, Ltd, Merck, and Johnson & Johnson. He receives royalties from Cambridge University Press, Johns Hopkins University Press, and John Wiley & Sons, Inc. He is President of, and a major shareholder in, Sonosics International, a manufacturer and distributor of smell- and taste tests. The other authors have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Douek E, Bannister LH, Dodson HC (1975) Recent advances in the pathology of olfaction. *Proc R Soc Med* 68(8):467–470
2. Polyzonis BM, Kafandaris PM, Gigis PI, Demetriou T (1979) An electron microscopic study of human olfactory mucosa. *J Anat* 128(Pt 1):77–83
3. Moran DT, Rowley JC, Jafek BW (1982) Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res* 253(1–2):39–46
4. Jafek BW (1983) Ultrastructure of human nasal mucosa. *Laryngoscope* 93(12):1576–1599
5. Nakashima T, Kimmelman CP, Snow JB, Kimmelman ChP (1984) Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol* 110(10):641–646. <https://doi.org/10.1001/archotol.1984.00800360013003>
6. Hasegawa S, Yamagishi M, Nakano Y (1986) Microscopic studies of human olfactory epithelia following traumatic anosmia. *Arch Otorhinolaryngol* 243(2):112–116. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3718322. Accessed 5 Dec 2018
7. Yamagishi M, Hasegawa S, Nakano Y (1988) Examination and classification of human olfactory mucosa in patients with clinical olfactory disturbances. *Arch Otorhinolaryngol* 245(5):316–320

8. Paik SI, Lehman MN, Seiden AM, Duncan HJ, Smith DV (1992) Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118(7):731–738
9. Moran DT, Jafek BW, Eller PM, Rowley JC (1992) Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction. *Microsc Res Tech* 23(2):103–110. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070230202>
10. Winstead W, Marshall CT, Lu CL, Klueber KM, Roisen FJ (2005) Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells. *Am J Rhinol* 19(1):83–90
11. Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC et al (2013) Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia* 61(3):368–382. <https://doi.org/10.1002/glia.22440>
12. Feron F, Perry C, Girard SD, Mackay-Sim A (2013) Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa. *Methods Mol Biol* 1059:107–114. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-574-3_10
13. Twomey JA, Barker CM, Robinson G, Howell DA (1979) Olfactory mucosa in herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42(11):983–987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC490390/>. Accessed 10 Feb 2017
14. Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ et al (2010) Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol* 67(4):462–469. <https://doi.org/10.1002/ana.21910>
15. Seiden AM (2004) Postviral olfactory loss. *Otolaryngol Clin North Am* 37(6 SPEC.ISS.):1159–1166. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2004.06.007>
16. Yee KK, Pribitkin EA, Cowart BJ et al (2010) Neuropathology of the olfactory mucosa in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 24(2):110–120. <https://doi.org/10.2500/ajra.2010.24.3435>
17. Hummel T, Whitcroft KL, Andrews P et al (2017) Position paper on olfactory dysfunction. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/Rhin16.248>
18. Féron F, Perry C, McGrath JJ, Mackay-Sim A (1998) New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:861–866. <https://doi.org/10.1001/archotol.124.8.861>
19. Wrobel BB, Mazza JM, Evgrafov OV, Knowles JA (2013) Assessing the efficacy of endoscopic office olfactory biopsy sites to produce neural progenitor cell cultures for the study of neuropsychiatric disorders. *Int Forum Allergy Rhinol* 3(2):133–138. <https://doi.org/10.1002/alar.21080>
20. Holbrook EH, Rebeiz L, Schwob JE (2016) Office-based olfactory mucosa biopsies. *Int Forum Allergy Rhinol*. <https://doi.org/10.1002/alar.21711>
21. Lovell MA, Jafek BW, Moran DT, Rowley JC 3rd (1982) Biopsy of human olfactory mucosa. An instrument and a technique. *Arch Otolaryngol* 108(4):247–249
22. Leopold DA, Hummel T, Schwob JE, Hong SC, Knecht M, Kobal G (2000) Anterior distribution of human olfactory epithelium. *Laryngoscope* 110(3 Pt 1):417–421. <https://doi.org/10.1097/00005537-200003000-00016>
23. Holbrook EH, Wu E, Curry WT, Lin DT, Schwob JE (2011) Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope* 121(8):1687–1701. <https://doi.org/10.1002/lary.21856>
24. Doty RL, Kamath V (2014) The influences of age on olfaction: a review. *Front Psychol* 5(FEB):1–20. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00020>
25. Lee SH, Lim HH, Park HJ, Lee HM, Choi JO (2000) Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109(8 I):720–725
26. Leopold DA, Hornung DE, Schwob J (1992) Congenital lack of olfactory ability. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101(3):229–236
27. Lanza DC, Deems DA, Doty RL et al (1994) The effect of human olfactory biopsy on olfaction—a preliminary-report. *Laryngoscope* 104(7):837–840
28. Kern R (2000) Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope* 110(7):1071–1077
29. Lane AP, Gomez G, Dankulich T et al (2002) The superior turbinate as a source of functional human olfactory receptor neurons. *Laryngoscope*. 112(7 Pt 1):1183–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169895>. Accessed 03 Aug 2018
30. Say P, Leopold D, Cochran G et al (2004) Resection of the inferior superior turbinate: does it affect olfactory ability or contain olfactory neuronal tissue? *Am J Rhinol* 18(3):157–160
31. Kachramanoglou C, Law S, Andrews P, Li D, Choi D (2013) Culture of olfactory ensheathing cells for central nerve repair: the limitations and potential of endoscopic olfactory mucosal biopsy. *Neurosurgery* 72(2):170–178. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e31827b99be>
32. Andrews PJ, Poirrier A, Lund VJ et al (2016) Safety of human olfactory mucosal biopsy for the purpose of olfactory ensheathing cell harvest and nerve repair: a prospective controlled study in patients undergoing endoscopic sinus surgery. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/rhin15.365>
33. Malnic B, Hirono J, Sato T et al (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96(5):713–723. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80581-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80581-4)
34. Mombaerts P, Wang F, Dulac C et al (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87(4):675–686. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81387-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81387-2)
35. Verbeurt C, Wilkin F, Tarabichi M et al (2014) Profiling of olfactory receptor gene expression in whole human olfactory mucosa. *PLoS One* 9(5):21–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096333>
36. Yamagishi M, Fujiwara M, Nakamura H (1994) Olfactory mucosal findings and clinical course in patients with olfactory disorders following upper respiratory viral infection. *Rhinology* 32(3):113–118
37. Féron F, Perry C, Hirning MH et al (1999) Altered adhesion, proliferation and death in neural cultures from adults with schizophrenia. *Schizophr Res* 40(3):211–218
38. Holbrook EH, Leopold DA, Schwob JE (2005) Abnormalities of axon growth in human olfactory mucosa. *Laryngoscope* 115(12):2144–2154
39. Fornazieri MA, dos Santos CA, Bezerra TFP et al (2015) Development of normative data for the Brazilian adaptation of the University of Pennsylvania smell identification test. *Chem Senses* 40(2):141–149. <https://doi.org/10.1093/chemse/bju068>
40. Doty RL (ed) (2009) The smell threshold test administration manual, 2nd edn. Sensonics International, Philadelphia, p 14
41. Altundag A, Salihoglu M, Tekeli H, Saglam M, Cayonu M, Hummel T (2014) Lateralized differences in olfactory function and olfactory bulb volume relate to nasal septum deviation. *J Craniofac Surg* 25(2):359–362
42. Damm M, Eckel HE, Jungeholsing M, Hummel T (2003) Olfactory changes at threshold and suprathreshold levels following septoplasty with partial inferior turbinectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112(1):91–97
43. Pade J, Hummel T (2008) Olfactory function following nasal surgery. *Laryngoscope* 118(7):1260–1264
44. Kilicaslan A, Acar GO, Tekin M, Ozdamar OI (2016) Assessment the long-term effects of septoplasty surgery on olfactory function. *Acta Otolaryngol* 6489:1–6
45. Kimmelman CP (1994) The risk to olfaction from nasal surgery. *Laryngoscope* 104:981–988

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.