



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ELLEN CRISTINE DUARTE GARCIA

**VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E MÉTODO DE  
CONFIRMAÇÃO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO POR  
IMUNOHISTOQUÍMICA E ANÁLISE MORFOLÓGICA EM  
BIÓPSIA DE CONCHA NASAL SUPERIOR**

---

Londrina  
2017

ELLEN CRISTINE DUARTE GARCIA

**VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E MÉTODO DE  
CONFIRMAÇÃO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO POR  
IMUNOHISTOQUÍMICA E ANÁLISE MORFOLÓGICA EM  
BIÓPSIA DE CONCHA NASAL SUPERIOR**

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

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri  
Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri

Londrina  
2017

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

Garcia, Ellen Cristine Duarte .

VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO POR IMUNOHISTOQUÍMICA E ANÁLISE MORFOLÓGICA EM BIÓPSIA DE CONCHA NASAL SUPERIOR / Ellen Cristine Duarte Garcia. - Londrina, 2017.

57 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Coorientador: Marco Aurélio Fornazieri.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Inclui bibliografia.

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

ELLEN CRISTINE DUARTE GARCIA

**VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E MÉTODO DE  
CONFIRMAÇÃO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO POR  
IMUNOHISTOQUÍMICA E ANÁLISE MORFOLÓGICA EM BIÓPSIA DE  
CONCHA NASAL SUPERIOR**

Dissertação 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. Waldiceu Aparecido Verri  
Junior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Andressa de Freitas Mendes Dionisio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que em tudo me sustém, a meu amado esposo e querida mãe que sempre estiveram comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador pela oportunidade e apoio na elaboração deste projeto.

Ao meu co-orientador pelo empenho dedicado para realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente Ana Carolina Rossaneis, pela paciência e disposição em ajudar.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina pela estrutura oferecida e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

***Bem aventurado o homem que acha sabedoria,  
e o homem que adquire conhecimento (Pr 3:13)***

GARCIA, Ellen Cristine Duarte. **Verificação da eficácia, segurança e método de confirmação de epitélio olfatório por imunohistoquímica e análise morfológica em biópsia de concha nasal superior.** 2017. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

**Introdução:** A biópsia de epitélio olfatório é um procedimento promissor para obtenção de células-tronco, estudo de doenças nasais e neurodegenerativas. Adicionada a dificuldade de acesso ao estreito teto de cada cavidade nasal, há um desafio quanto ao método de confirmação de presença de epitélio olfatório e o não comprometimento da habilidade olfatória específica prévia. **Objetivos:** Determinar a eficácia de obtenção de epitélio olfatório em face medial de concha nasal superior, avaliar a segurança do procedimento para manutenção da capacidade de identificar os quarenta odores incluídos no Teste de identificação do olfato da Universidade da Pensilvânia (University of Pennsylvania Smell Identification Test – UPSIT) e calcular a acurácia dos critérios morfológicos sem imunohistoquímica na identificação de epitélio olfatório. **Material e Métodos:** Foi realizada biópsia de epitélio olfatório em vinte e três indivíduos sem queixas olfatórias durante a septoplastia utilizando pinça do tipo Takahashi em face medial de concha nasal superior. A função olfatória foi avaliada antes e um mês após a biópsia. As amostras foram analisadas em lâminas coradas com hematoxilina-eosina utilizando-se alguns critérios morfológicos ou com marcação específica para proteína marcadora olfatória (OMP). **Resultados:** Foi possível obter epitélio olfatório em 77% das amostras de face medial da concha superior. Não houve deterioração na performance olfatória total e específica com a utilização desta técnica. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e acurácia dos critérios morfológicos sem imunohistoquímica foram respectivamente 88.2%, 20%, 33.3%, 78.9% e 72,7%. **Conclusão:** As biópsias de face medial de concha superior podem ser consideradas seguras com eficácia satisfatória para obtenção de epitélio olfatório. Entretanto, não é recomendado o uso exclusivo da avaliação morfológica para análise da presença de epitélio olfatório, podendo ser utilizada como auxiliar para a técnica de imunohistoquímica.

**Palavras-chave:** Olfato. Histologia. Imunohistoquímica. Biópsia. Epitélio olfatório.

GARCIA, Ellen Cristine Duarte. **Effectiveness verification, safety and olfactory epithelium confirmation method by immunohistochemistry and morphological analysis in the nasal concha biopsy**. 2017. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

**Introduction:** The olfactory epithelium biopsy is a promising procedure for obtaining stem cells, studying nasal and neurodegenerative diseases. Added to the difficulty of its access at the narrow roof of each nasal cavity, there is a challenge about the method for confirming its presence and not compromise the previous ability to smell any specific odorant. **Aims:** To determine the efficacy of obtaining olfactory epithelium from the medial surface of the superior turbinate, evaluate safety of this procedure for maintaining the capacity to smell the forty odorants included in the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT), and calculate accuracy of morphologic criteria without immunohistochemistry in olfactory epithelium identification. **Material and Methods:** It was performed biopsy of the olfactory epithelium in twenty-three individuals without olfactory complaints during septoplasty using Takahashi forceps in medial surface of the superior turbinate. Olfactory function was assessed before and one month after the biopsy. Samples were analyzed in blades stained with hematoxylin and eosin using some morphological criteria or specifically marked with Olfactory Marker Protein (OMP). **Results:** It was possible to obtain olfactory epithelium in 77% of the medial surface of the superior turbinate result similar to that found by other authors. There was no deterioration of total and specific olfactory performance with this performed technique. The sensibility, specificity, negative predictive value, positive predictive value and accuracy of morphological criteria without immunohistochemistry were 88.2%, 20%, 33.3%, 78.9% and 72.7%. **Conclusion:** Biopsies of the medial surface of the superior turbinate can be considered safe with satisfactory efficacy for obtaining olfactory epithelium. However, it is not recommended to use only morphological evaluation to analyze the presence of olfactory epithelium, can be used as an aid to the immunohistochemical technique.

**Key words:** Smell. Histology. Immunohistochemistry. Biopsy. Olfactory epithelium.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Ilustração do epitélio olfatório e a comunicação nervosa no bulbo olfatório.....	15
<b>Figura 2 -</b>	Distribuição dos receptores olfatórios e conexão com o bulbo olfatório.....	15
<b>Figura 3 -</b>	Instrumento de biópsia olfatória (A) e pinça do tipo girafa (B).....	18
<b>Figura 4 -</b>	Pinça de perfuração (A) e pinça do tipo girafa (B) .....	19
<b>Figura 5 -</b>	Técnica de biópsia de mucosa olfatória .....	23
<b>Figura 6 -</b>	Pinça do tipo Takahashi .....	24
<b>Figura 1 (artigo) -</b>	Olfactory mucosa biopsy technique. ....	30
<b>Figura 2 (artigo) -</b>	Number of cells expressing Olfactory Marker Protein (OMP) .....	32
<b>Figura 3 (artigo) -</b>	Immunohistochemistry staining for Olfactory marker protein (OMP).....	33
<b>Figura 4 (artigo) -</b>	Differences between respiratory (A and B) and olfactory epithelia (C and D), stained with hematoxylin-eosin .....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Methods for confirming the presence of olfactory epithelium (OE) and efficacy of obtaining this tissue according to the region.....	29
<b>Tabela 2 -</b>	Evaluation of the presence of olfactory epithelium given the morphological criteria.....	35
<b>Tabela 3 -</b>	Percentage of correct answers for odor before and after the biopsy .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
DAB	Diaminobenzidina
HE	Hematoxilina-eosina
IHQ	Imunohistoquímica
MAP-5	Proteína associada a microtúbulo 5
OMP	Proteína marcadora olfatória
p75 NGFr	Marcador para receptor de fator de crescimento neuronal
SD	Desvio padrão
Tuj-1	Marcador para beta-tubulina
UPSIT	Teste de Identificação do Olfato da Universidade da Pensilvânia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	
2.1	EPITÉLIO OLFATÓRIO .....	14
2.2	DOENÇAS RELACIONADAS À PERDA DO OLFATO E ALTERAÇÕES EPITELIAIS.....	16
2.3	BIÓPSIA DE MUCOSA NASAL .....	17
2.4	IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE PRESENÇA DE EPITÉLIO OLFATÓRIO .....	20
2.4.1	Marcadores Imunohistoquímicos .....	20
2.4.2	Análise Morfológica.....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
3.1	OBJETIVO PRIMÁRIO .....	22
3.2	OBJETIVO SECUNDÁRIO .....	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1	SUJEITOS .....	23
4.2	COLETA DE EPITÉLIO OLFATÓRIO .....	23
4.3	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	24
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	42
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>APÊNDICES</b>		
	<b>APÊNDICE A -</b> Termo de consentimento livre e esclarecido .....	49
<b>ANEXOS</b>		
	<b>ANEXO A -</b> Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	51
	<b>ANEXO B -</b> Questionário.....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A biópsia do epitélio olfatório possui grande potencial para auxiliar no esclarecimento da fisiopatologia, no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças. Através da obtenção desse tecido é possível o estudo da morfologia normal e patológica do epitélio olfatório (Douek et al. 1975; Polyzonis et al. 1979; Moran et al. 1982; Jafek 1983; Nakashima et al. 1984; Hasegawa et al. 1986; Yamagishi et al. 1988; Paik et al. 1992; Moran et al. 1992; Holbrook et al. 2016) possibilitando o avanço dos estudos de doenças sistêmicas como encefalite causada por *Herpes simplex*, Doença de Parkinson, de Alzheimer (Twomey et al. 1979; Hummel et al. 2009; Arnold et al. 2010) e as alterações epiteliais causadas pela doenças nasais como a perda pós-viral e rinossinusite crônica (Seiden 2004; Yee et al. 2010). Outro benefício da obtenção desse epitélio é a possível captação de células-tronco para cultivo e futuros tratamentos (Winstead et al. 2005; Miedzybrodzki et al. 2006; Lindsay et al. 2013; Feron et al. 2013).

Nos estudos até então conhecidos, não foi relatada perda olfatória após a biópsia (Lanza et al. 1994; Winstead et al. 2005; Andrews et al. 2016), mas a segurança quanto à manutenção da capacidade olfativa para odores específicos não está clara. A identificação de um determinado odor depende de uma combinação de receptores olfatórios específicos (Malnic et al. 1999) que se localizam nos cílios dos neurônios olfatórios distribuídos por regiões na mucosa nasal (Mombaerts 2001), portanto uma avaliação da segurança para função olfatória específica se faz necessária para esse procedimento.

A distribuição do epitélio olfatório é irregular de difícil acesso e pode ser degenerado por processos infecciosos e pela idade (Lovell et al. 1982; Nakashima et al. 1984; Paik et al. 1992; Leopold et al. 2000; Holbrook et al. 2011; Doty & Kamath 2014) o que dificulta a obtenção do mesmo para estudos. Não há uma padronização quanto ao sítio ideal de obtenção de epitélio olfatório (Féron et al. 1998; Wrobel et al. 2013; Holbrook et al. 2016) e além disso, a taxa de sucesso de obtenção do procedimento oscila de 14% a 82,9%, variando conforme a técnica empregada e a região coletada: 47%-80% em septo superior (Moran et al. 1992; Féron et al. 1998; Leopold et al. 2000; Holbrook et al. 2016) e 61-82,9% em concha nasal superior (Féron et al. 1998; Lee et al. 2000) e 14%-42% em concha média (Leopold et al. 2000; Witt et al. 2009; De Rezende Pinna et al. 2013).

O uso de anticorpos específicos como ferramenta para diferenciar tecidos é muito útil no estudo do epitélio olfatório (Kern 2000; Yee et al. 2010; Holbrook et al. 2016) sendo o anticorpo anti-proteína marcadora olfatória (anti-OMP) amplamente utilizado para esse fim. Alguns critérios morfológicos também foram utilizados para distinguir epitélio olfatório do epitélio respiratório na mucosa nasal, como a presença de feixes nervosos e ausência de células caliciformes, mas a acurácia desse método não foi avaliada (Kern 2000;

De Rezende Pinna et al. 2013). A capacidade de discernir os epitélios através da análise morfológica traria praticidade, rapidez e menor custo na avaliação do estado do tecido e facilitaria a implementação na prática clínica e em pesquisa.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EPITÉLIO OLFATÓRIO

O epitélio olfatório é um epitélio de revestimento especializado composto pelas células basais, neurônios olfatórios maduros e imaturos, células microvilares e células de sustentação (Moran et al. 1982), localizado principalmente na região póstero-superior da cavidade nasal (De Rezende Pinna et al. 2013) com área estimada de 100-400 mm<sup>2</sup> (Leopold et al. 2000).

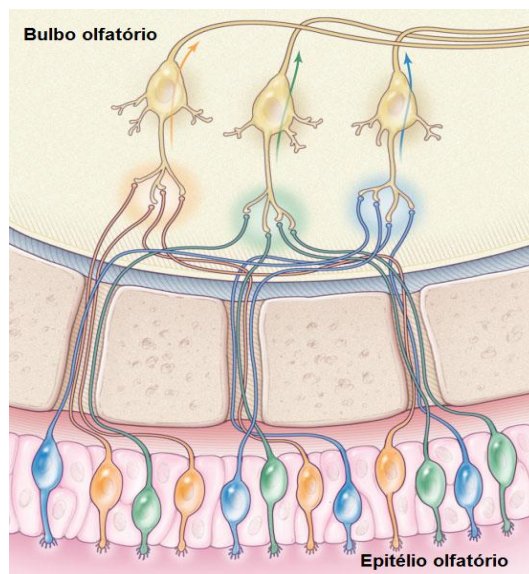
Esse epitélio formado por diferentes camadas celulares, é capaz de se regenerar de forma a repor células envelhecidas ou no caso de injúria no tecido (Huard et al. 1998; Schwob & Ph 2012). As células basais responsáveis por essa reposição celular podem ser de dois tipos distintos: globosas ou horizontais. As células basais globosas estão constitutivamente ativas podendo dar origem a qualquer uma das células que compõem o tecido normal. As células basais horizontais funcionam como células-tronco de reserva, sendo ativadas no caso de lesão tecidual (Schnittke et al. 2015).

As células de sustentação são células colunares que dão alicerce para o epitélio olfatório e as células microvilares ainda tem função incerta. Na lâmina própria do epitélio se encontram as 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 et al. 1975) onde as partículas odoríferas que atingem o epitélio olfatório se ligam e são reconhecidas (Buck & 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 et al. 2009) (Figura 1).

Os neurônios olfatórios se encontram distribuídos em quatro regiões (zona 1-4) na mucosa olfatória de mamíferos (Vassar et al. 1993) da região dorsal (zona 1) à região ventral (zona 4) do epitélio (Sullivan et al. 1996). Neurônios que apresentam os mesmos tipos de receptores estão distribuídos dentro da mesma zona no epitélio (Ressler et al. 1993; Mombaerts 2001). Os receptores olfatórios podem ser divididos em classe I, que identifica odores solúveis em água e classe II para odores voláteis (Freitag et al. 1998). Os genes dos receptores olfatórios de classe I tem expressão maior na zona I (Tsuboi et al. 2006) enquanto os de classe II também são expressos na zona I, mas em maior quantidade nas zonas 2-4 (Miyamichi et al. 2005).

**Figura 1.** Ilustração do epitélio olfatório e a comunicação nervosa no bulbo olfatório.

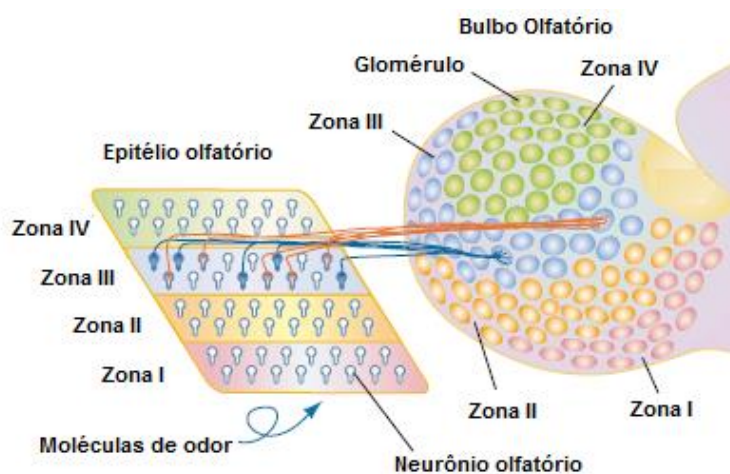


Mucosa olfatória com os neurônios olfatórios cilíndricos e a sinapse com outros neurônios dentro do bulbo olfatório.

**Fonte:** Modificado de Mombaerts, 2004.

Em estudo realizado com camundongos foi demonstrado que um receptor olfatório é específico, mas pode reconhecer várias partículas odoríferas com estruturas semelhantes e que diferentes odores são reconhecidos por diferentes combinações de receptores (Malnic et al. 1999). Os axônios dos neurônios que expressam um mesmo tipo de receptor convergem para um glomérulo dentro do bulbo olfatório que também está organizado em zonas conforme demonstrado na figura 2 (Vassar et al. 1994; Sullivan et al. 1995).

**Figura 2.** Distribuição dos receptores olfatórios e conexão com o bulbo olfatório.



Neurônios olfatórios organizados em regiões no epitélio olfatório.

**Fonte:** Modificado de Mombaerts, 2001.

## 2.2 DOENÇAS RELACIONADAS À PERDA DO OLFATO E ALTERAÇÕES EPITELIAIS

Diversas doenças são capazes de causar alterações na função olfatória podendo ser investigadas através do estudo de epitélio olfatório biopsiado. Entre elas estão doenças sistêmicas como encefalite causada por *Herpes simplex*, Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (Twomey et al. 1979; Hummel et al. 2009; Arnold et al. 2010) e doenças nasais como a perda olfatória pós-viral e rinosinusite crônica (Seiden 2004; Yee et al. 2010).

O vírus *Herpes simplex* 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 aéreas superiores, muitas vezes a perda pode ser reversível, mas em alguns casos permanece após o término dos sintomas nasais (Reden et al. 2006). A causa dessa 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 et al. 1975) e redução do número de receptores olfatórios (Jafek et al. 1990).

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).

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 imunohistoquímica no epitélio olfatório (Witt et al. 2009).

A perda olfatória na rinosinusite crônica tem várias possíveis causas descritas até o momento. Uma dessas causas é a obstrução nasal por edema de mucosa ou presença de pólipos (Doty & Mishra 2001; Pfaar et al. 2006; Malaty & Malaty 2013; Zhen et al. 2014; Rimmer et al. 2014; Alt et al. 2014), tendo correlação entre aumento da severidade da doença com pior função olfatória, sendo a presença de pólipos um forte preditor para disfunção olfatória (Alt et al. 2014). Outra possível causa da perda olfatória em pacientes com rinosinusite crônica é a injúria do neuroepitélio olfatório pelo processo inflamatório (Alt et al. 2014) que leva a uma perda sensorial (Lane et al. 2010; Kern 2000). Na mucosa de pacientes com rinosinusite crônica o epitélio olfatório pode apresentar hiperplasia de

células calciformes e metaplasia escamosa e erosiva, sendo esta última de maior dano olfatório com exposição da membrana basal (Lee et al. 2000; Yee et al. 2009; Jafek et al. 2002). Houve diminuição de neurônios olfatórios maduros e imaturos no epitélio olfatório de camundongos transgênicos com a indução de inflamação e produção de TNF- $\alpha$  com doxiciclina (modelo animal para rinosinusite) com reversão dos efeitos após término da indução (Turner et al. 2010) e aumento de apoptose de neurônios olfatórios em epitélio de pacientes com rinosinusite (Raviv & Kern 2004).

### 2.3 BIÓPSIA DE MUCOSA NASAL

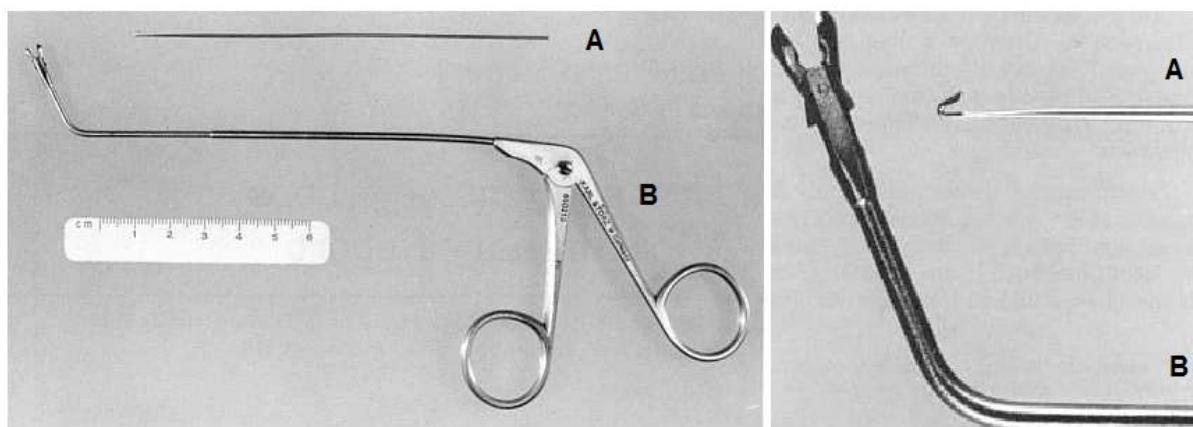
O estudo do epitélio olfatório apresenta certas dificuldades por sua distribuição irregular pela mucosa nasal e a degeneração causada por processos infecciosos e pela idade (Lovell et al. 1982; Nakashima et al. 1984; Paik et al. 1992; Leopold et al. 2000; Holbrook et al. 2011; Doty & Kamath 2014). Com 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 (Paik et al. 1992). A biópsia de epitélio olfatório vem sendo feita em várias regiões e com técnicas diferentes, por não se ter uma padronização da melhor forma de coleta (Féron et al. 1998; Wrobel et al. 2013; Holbrook et al. 2016).

Em 1982 Lovell validou uma técnica de biópsia utilizando o Instrumento de biópsia olfatória e solução de cocaína para vasoconstrução (sem uso do endoscópio), encontrando amostras de epitélio em 1 a cada 4 ou 6 amostras de tecido da região de septo nasal em análise por microscopia eletrônica. Entretanto, o autor não recomenda o uso da biópsia na rotina clínica devido aos impecilhos da técnica, a possibilidade de penetrar a lâmina cribiforme e risco de hemorragia local (Lovell et al. 1982).

O uso do endoscópio trouxe facilidade para a técnica de biópsia nasal, diminuindo os riscos de danos ao paciente e trazendo melhores resultados de obtenção de epitélio. Em 1992 Moran obteve 59,5% de eficácia em encontrar epitélio olfatório em septo nasal com anestesia local usando o mesmo instrumento para biópsia que Lovell e avaliação do tecido por microscopia eletrônica, mas com endoscópio (Moran et al. 1992).

Como um método alternativo ao uso do Instrumento de biópsia olfatória para evitar sangramento local, pode ser utilizada a pinça do tipo girafa (Figura 3) que obtêm resultados semelhantes, podendo também ser utilizada para esse fim (Lanza et al. 1993).

**Figura 3.** Instrumento de biópsia olfatória (A) e pinça do tipo girafa (B).



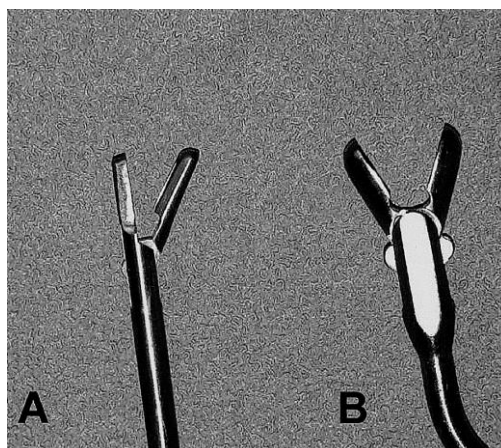
**Fonte:** Lanza et al, 1993 com adaptações

Utilizando pinça em concha e endoscópio durante cirurgia foi encontrado epitélio olfatório em 42% das biópsias de concha média e 47% em septo nasal (Leopold et al. 2000), já utilizando pinça Blakesley foi encontrado epitélio olfatório em 61% de amostras de concha superior e septo nasal (Lee et al. 2000). Resultados melhores foram obtidos anteriormente por Féron que encontrou 73% e 76% de eficácia de obtenção de epitélio olfatório em concha superior e septo nasal respectivamente utilizando anestesia geral e pinça etmoide (Féron et al. 1998).

Winstead e colaboradores (2005) obtiveram um aumento de 23% para 76% na taxa de obtenção de células viáveis para cultivo em biópsias substituindo a pinça do tipo girafa por pinça de perfuração (Figura 4). Com o mesmo intuito de cultivo celular foram obtidas células viáveis em região de septo nasal durante cirurgia com pinça etmoidal Takahashi e neuroendoscópio (Miedzybrodzki et al. 2006).

Biópsias coletadas de concha média e septo superior posterior tiveram resultados semelhantes para obtenção de células progenitoras neurais para cultivo, sendo atingido esse objetivo em 98,8% dos casos. Todos os pacientes foram submetidos a uma biópsia ambulatorial após endoscopia nasal, para averiguar anormalidades anatômicas e qual cavidade nasal era mais acessível. Usou-se spray de lidocaína 1% + oximetazolina 0,05%, depois algodão embebido nessa solução foi colocado na área de septo e concha média. Após 5 minutos, injetou-se epinefrina 1:100.000 na mucosa. Usou-se pinça em concha de 2 mm. Os autores do trabalho indicam o uso da concha média pela maior praticidade de acesso, podendo ser mais facilmente realizada em ambulatório (Wrobel et al. 2013).

**Figura 4.** Pinça de perfuração (A) e pinça do tipo girafa (B).



**Fonte:** Winstead et al, 2005

Em biópsias realizadas em cadáveres com endoscópio se obteve epitélio olfatório em 82,9% em amostras da porção posterior da concha superior e em 17,1% em concha média, mas o estudo desse epitélio por imunohistoquímica foi dificultado pela pouca reatividade dos marcadores com o epitélio pela retirada post-mortem do material (de 2 a 12 horas) (De Rezende Pinna et al. 2013).

Holbrook e colaboradores obtiveram epitélio olfatório em 80% de suas amostras de septo nasal anterior utilizando anestesia local (algodão com mistura de lidocaína (2%) com oximetazolina (0,025%)), por causa da esfoliação passou a fazer a aplicação com angiocatéter flexível), endoscópio de 0 grau rígido, pinça pediátrica Blakesley ou pinça de biópsia em concha de 3 mm, preferindo esta última pelo seu tamanho e capacidade de encaixar dentro da fenda olfativa (Holbrook et al. 2016).

Não foi demonstrada perda na função olfatória total de pacientes com a realização da biópsia em testes de identificação do olfato antes e 6 semanas ou 3 meses após o procedimento (Lanza et al. 1994; Winstead et al. 2005). Comparando-se os resultados obtidos em dois grupos de pacientes com rinosinusite, um deles submetido a biópsia e o outro não, não houve diferença significativa na capacidade olfatória (Andrews et al. 2016). Apesar dos estudos já realizados para verificação da segurança da realização da biópsia de epitélio olfatório, a mesma não foi avaliada quanto à manutenção da capacidade olfativa para odores específicos.

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE PRESENÇA DE EPITÉLIO OLFATÓRIO

### 2.4.1 Marcadores Imunohistoquímicos

O uso de anticorpos específicos para diferenciar tecidos é muito útil no estudo do epitélio olfatório (Kern 2000; Yee et al. 2010; Holbrook et al. 2016) podendo ser utilizados diversos alvos para identificá-lo, tais como componentes das células basais, de sustentação ou dos neurônios olfatórios presentes nesse tecido.

Um importante anticorpo utilizado 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 et al. 2016). Essa proteína está presente em 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) e na regulação dessa transmissão, através do controle dos níveis de cAMP (monofosfato de adenosina cíclico) (Dibattista & Reisert 2016). Ela está presente nos corpos celulares, dendritos e axônios dos neurônios maduros no epitélio olfatório humano (Holbrook et al. 2011).

Outro marcador imunohistoquímico neuronal para o epitélio olfatório é a beta-tubulina III e o anticorpo monoclonal para essa proteína (Tuj-1) 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 et al. 2016). O produto gênico proteico (PGP 9.5) também é usado como marcador de neurônios maduros e imaturos (Witt et al. 2009; Holbrook et al. 2011; Holbrook et al. 2016). Já um outro isotipo desta proteína, a beta-tubulina IV, pode ser utilizada para marcação imunohistoquímica dos cílios de células respiratórias (Holbrook et al. 2016) podendo também ser usada para distinção entre os dois epitélios.

As proteínas S100 constituem uma família multigênica de proteínas que exercem atividade reguladora intracelular e extracelular (Donato 2003). Elas promovem aumento de cálcio intracelular, estimulam a diferenciação neuronal (Barger & Van Eldik 1992) e modulam atividade enzimática da adenilato ciclase entre outras enzimas (Schäfer & Heizmann 1996). Essas proteínas também podem ser utilizadas para marcação de neurônios e células basais do epitélio olfatório (De Rezende Pinna et al. 2013; Holbrook et al. 2016).

O anticorpo contra o p75 NGFr (nerve growth factor receptor) ou receptor para fator de crescimento neuronal marca fibroblastos perineurais (forma halo em volta dos feixes nervosos) e células basais (Witt et al. 2009; Holbrook et al. 2016). Outro anticorpo utilizado para identificar o epitélio olfatório é o anti-proteína associada à microtúbulo-5

(Féron et al. 1998; De Rezende Pinna et al. 2013) que marca as células de sustentação (Trojanowski et al. 1991) e basais do epitélio (Lee et al. 2000).

#### 2.4.2 Análise Morfológica

Alguns critérios morfológicos têm sido utilizados para distinguir epitélio olfatório do epitélio respiratório na mucosa nasal. Nesses estudos, (Kern 2000; De Rezende Pinna et al. 2013) a presença de epitélio olfatório foi considerada quando 4 ou mais dos 7 critérios eram positivos: presença de feixes nervosos na lâmina própria, ausência de células caliciformes, presença de cílios irregulares, lâmina própria celular, membrana basal fina, epitélio estratificado e imunohistoquímica positiva. Ao contrário do epitélio olfatório, o epitélio respiratório apresenta grande quantidade de células caliciformes, maior quantidade de vasos na lâmina própria, membrana basal espessada e epitélio pseudoestratificado. A análise dos critérios morfológicos foi realizada por 2 patologistas, bem como a graduação da distribuição do neuroepitélio na mucosa, entretanto, a acurácia da análise morfológica sem a imunohistoquímica para detectar a presença de epitélio olfatório não foi avaliada (De Rezende Pinna et al. 2013).

A análise morfológica do epitélio olfatório não é comumente realizada de forma padronizada e está geralmente associada a outro método de confirmação da presença de epitélio, mas a padronização e experiência na avaliação morfológica do tecido podem auxiliar o avaliador na escolha da região da mucosa para análise e a identificar possíveis erros e artefatos de marcação na imunohistoquímica por exemplo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Determinar a eficácia de biópsias de face medial de concha nasal superior na obtenção de epitélio olfatório e avaliar sua segurança em relação à função olfatória total e específica dos pacientes.

#### **3.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO**

Verificar a acurácia da avaliação morfológica padronizada isoladamente na confirmação de presença de epitélio olfatório e no estabelecimento de critérios de sua identificação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

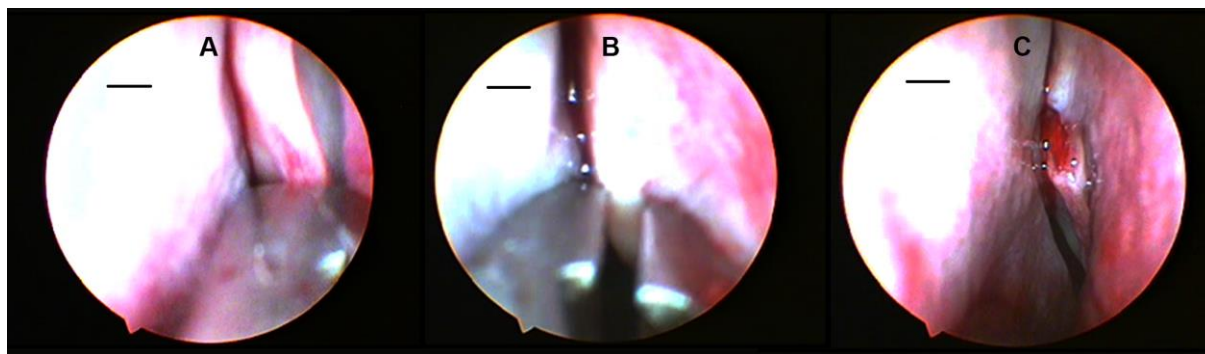
### 4.1 SUJEITOS

A biópsia de epitélio olfatório foi realizada em vinte e três pacientes sem queixas olfatórias, submetidos à septoplastia e turbinectomia inferior bilateral no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina e Hospital particular entre setembro de 2015 e outubro de 2016. Desses, 16 eram homens (média: 29.4 anos; SD: 12.5) e 7 mulheres (média: 30,6; SD: 16.1). Para verificação da conservação da função olfatória após a biópsia, todos os participantes foram submetidos ao Teste de Identificação do olfato da Universidade da Pensilvânia (*University of Pennsylvania Smell Identification Test - UPSIT*) antes e um mês após o procedimento cirúrgico (Fornazieri et al. 2015). Todos os pacientes preencheram um questionário com os dados demográficos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (número do parecer: 1.024.603) e cada participante assinou o termo de consentimento após ser adequadamente orientado sobre os métodos e fins do estudo.

### 4.2 COLETA DE EPITÉLIO OLFATÓRIO

A coleta do epitélio olfatório foi realizada por médico otorrinolaringologista experiente em centro cirúrgico sob anestesia geral. A vasoconstrição foi obtida topicamente com três gotas de oximetazolina em cada cavidade nasal e não foram utilizados cotonóides sobre a região do epitélio olfatório para evitar sua escarificação. Após boa visualização da concha superior, espécime de mucosa olfatória foi coletada com pinça tipo Takahashi na região medial-superior (Figura 5).

**Figura 5.** Técnica de biópsia de mucosa olfatória.



Visão da concha superior esquerda (A), punção da superfície medial com pinça de Takahashi (B) e estado após o procedimento (C). Ótica de 0°, barra de escala de 3 mm.

**Fonte:** próprio autor

**Figura 6.** Pinça tipo Takahashi reta.



**Fonte:** <http://catalogohospitalar.com.br>

#### 4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para análise histológica as biópsias foram fixadas por 24 horas em formol 10% e desidratadas em soluções crescentes de álcool (80%, 95% e álcool absoluto). Foram feitos 4 banhos de xilol e 4 banhos de parafina de 30 minutos cada e as amostras foram incluídas em blocos de parafina. Cortes seriados de 3  $\mu$ m de espessura foram obtidos e colocados em lâminas. Essas lâminas seguiram para coloração com hematoxilina e eosina (HE) e imunohistoquímica.

Para coloração com hematoxilina e eosina as lâminas passaram por banhos de xilol, álcool e água, hematoxilina, água, eosina e novos banhos de álcool e xilol e colocação da lamínula com bálsamo do Canadá. A presença de epitélio olfatório na biópsia avaliada por critérios morfológicos em coloração com hematoxilina e eosina sem imunohistoquímica foi confirmada quando 4 dos seis critérios estavam presentes: presença de epitélio estratificado, ausência de células calciformes, membrana basal fina, cílios irregulares, lâmina própria celular (sem muitos vasos), presença de feixes nervosos (Kern 2000). Os critérios morfológicos foram avaliados por patologista experiente de forma cega.

Para imunohistoquímica 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. Foi feito 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 biotinilado 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 µm<sup>2</sup> (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).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis contínuas, como idade e pontuação do UPSIT, foram expressas como média ± desvio padrão (SD). O Teste-T foi usado para comparar as médias da pontuação do UPSIT depois de verificada a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Foi considerado significativo  $p < 0.05$ . Para comparação dos acertos por odor antes e após o procedimento foi considerado intervalo de confiança de 95%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo submetido à revista Plos One

# Olfactory epithelium biopsy from the superior turbinate: technique, rate of efficacy, method for confirmation of its presence and safety

Ellen C. D. Garcia <sup>1¶</sup>, Ana C. Rossaneis <sup>1¶</sup>, Alexandre S. Pipino <sup>2&</sup>, Gustavo V. Gomes <sup>2&</sup>, Waldiceu A. Verri, Jr <sup>1¶</sup>, Marco A. Fornazieri <sup>3¶</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology, Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy and Cancer, Londrina State University (UEL), Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup> Department of Clinical Surgery, UEL Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup> Department of Clinical Surgery, Otolaryngology Division, UEL, Londrina, PR, Brazil

\*Corresponding authors

E-mail: marcofornazieri@gmail.com (MAF), waldiceujr@yahoo.com.br (WAV)

## Abstract

Olfactory epithelium (OE) sampling has been shown to be a promising procedure for obtaining stem cells, and studying nasal and neurodegenerative diseases. However, in addition to the difficulty of its access at the narrow roof of each nasal cavity, confirming the presence of OE and avoiding compromising ability to smell any specific odorant are challenging. The aims of this study were to determine the efficacy of obtaining olfactory epithelium from the medial surface of the superior turbinate, evaluate safety of this procedure for maintaining the capacity to smell the forty odorants included in the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT), and calculate accuracy of morphologic criteria without immunohistochemistry (IHC) to aid in OE identification. Twenty-three individuals without olfactory complaints underwent biopsy of the olfactory epithelium during septoplasty. Olfactory function was assessed before and one month after the biopsy. Samples were analyzed with hematoxylin and eosin (HE) stained slices and IHC using the anti- Olfactory Marker Protein (anti-OMP). Olfactory epithelium was obtained in 77% of the patients in the medial surface of the superior turbinate. There was no deterioration of total and specific olfactory performance with this technique. Accuracy of morphological criteria without IHC was 72.7%. Thus, biopsies of the medial surface of the superior turbinate are absolutely safe with a satisfactory efficacy for obtaining olfactory epithelium. However, it is not recommended to use only morphological evaluation to analyze the presence of olfactory epithelium.

**Key words:** smell, histology, immunohistochemistry, biopsy, olfactory epithelium.

## Introduction

It has been recently appreciated the great potential of olfactory epithelium (OE) biopsy in understanding the pathophysiology, diagnosis and treatment of various diseases. OE biopsy has been useful for a) the study of normal and pathological morphology in fetuses and adults (Douek et al. 1975; Polyzonis et al. 1979; Moran et al. 1982; Jafek 1983; Nakashima et al. 1984; Hasegawa et al. 1986; Yamagishi et al. 1988; Paik et al. 1992; Moran et al. 1992); b) acquisition of stem cells (Winstead et al. 2005; Miedzybrodzki et al. 2006; Lindsay et al. 2013; Feron et al. 2013); c) better comprehension of systemic diseases such as encephalitis by Herpes Simplex, Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease (Twomey et al. 1979; Hummel et al. 2009; Arnold et al. 2010); and, d) epithelial changes caused by nasal diseases such as post-viral olfactory loss and chronic rhinosinusitis (Seiden 2004; Yee et al. 2010).

Despite the great potential of this procedure, a gold-standard technique for obtaining OE is not established (Féron et al. 1998; Wrobel et al. 2013; Holbrook 2016). The distribution of the OE is irregular, its access is not straightforward, and it can be degenerated by viral and bacterial infections along life and aging (Lovell et al. 1982; Nakashima et al. 1984; Paik et al. 1992; Leopold et al. 2000; Holbrook et al. 2011; Doty & Kamath 2014). Success rates range from 14% to 82,9%, varying accordingly to the technique used and the aimed region: 47% - 80% from the superior septum (Moran et al. 1992; Féron et al. 1998; Holbrook et al. 2016; Leopold et al. 2000), 61% - 82,9% from the posterior superior turbinate (Féron et al. 1998; De Rezende Pinna et al. 2013) and 14%-42% in middle turbinate (De Rezende Pinna et al. 2013; Leopold et al. 2000; Witt et al. 2009) as detailed in Table 1. Reports using endoscopy to obtain the specimen do not show a decrease in olfactory capacity after biopsy (Lanza et al. 1994; Winstead et al. 2005; Doty 1989) but its safety in the maintenance of a specific odor is unclear. For instance, a patient did not have significant loss of olfactory function after the biopsy but lost the ability to smell a specific odorant such as strawberry.

**Table 1. Methods for confirming the presence of olfactory epithelium (OE) and efficacy of obtaining this tissue according to the region.**

Author	Year	Method for OE presence confirmation	Region
Lee (Lee et al. 2000)	2000	Anti- microtubule associated protein-5	61% superior turbinate and nasal septum
Leopold (Leopold et al. 2000)	2000	Anti-olfactory marker protein, anti-neurotubulin	42% anterior region of the middle turbinate 47% anterior region of the nasal septum
Miedzybrodzki, et al (Miedzybrodzki et al. 2006)	2006	Anti-p75 nerve growth factor receptor, anti- protein S100	Posterior superior septum
Witt (Witt et al. 2009)	2009	Anti-olfactory marker protein, anti-protein gene product 9.5, anti-beta tubulin III, anti- p75 nerve growth factor receptor	14% in superior and middle turbinate
Pinna (De Rezende Pinna et al. 2013)	2013	Anti-neuron-specific beta-III tubulin, anti-microtubule-associated protein 5, anti-neu-n, antichromogranin, anti-synaptophysin, and anti-S-100 protein	82,9% in superior turbinate 17,1% in middle turbinate
Holbrook (Holbrook et al. 2016)	2016	Anti- protein gene product 9.5, Anti-p75 nerve growth factor receptor, anti- protein S100, anti-olfactory marker protein, anti-beta tubulin III and IV	80% in anterior septum
Féron (Féron et al. 1998)	1998	Anti-olfactory marker protein, anti-microtubule-associated protein 5, anti- beta tubulin III	76% in posterior superior septum 73% in posterior superior turbinate
Moran (Moran et al. 1992)	1992	Electron microscopy	59,5% in superior septum

One question that remains is if it is possible to differentiate respiratory from OE with morphologic analysis alone. Some criteria were suggested for this assessment (Ash JE 1956), but its accuracy was not explored (Kern 2000; De Rezende Pinna et al. 2013). The ability to distinguish OE through morphological analysis would bring convenience and speed in the evaluation of tissue characteristics in each disease and facilitate broader implementation in clinical and research practice.

Thus, the present study determined the efficacy of obtaining OE from the medial face of superior turbinate; assessed morphological characteristics in HE stained slices in comparison with IHC staining for anti-Olfactory Marker Protein (anti-OMP); a specific marker for mature olfactory neurons that accurately confirms the presence of olfactory mucosa; established the criteria that actually assist in identifying it; and verified through a validated olfactory test the safety of this procedure in maintaining total and specific olfactory function.

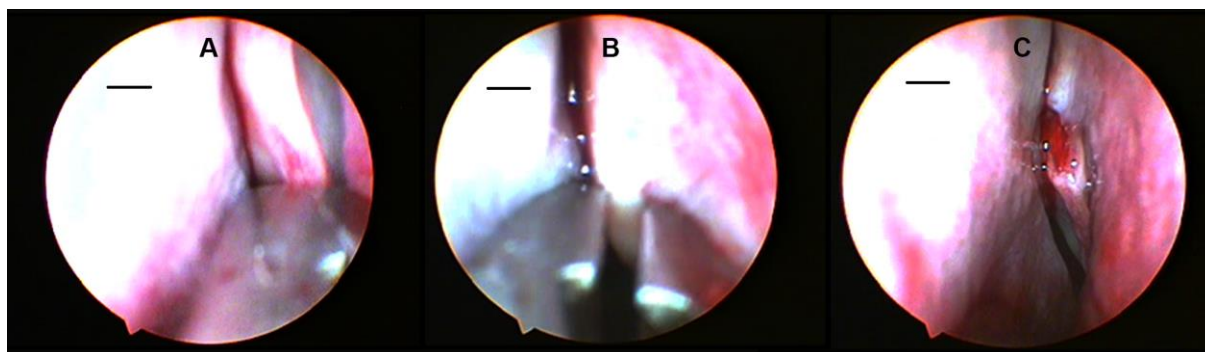
## Materials and Methods

### Subjects

OE biopsies were performed in twenty-three patients without olfactory complaints submitted to septoplasty and inferior turbinectomy. Sixteen were men (mean age: 29.4 years; SD: 12.5) and 7 women (mean: 30.6; SD: 16.1). The preservation of olfactory function after biopsy was assessed in all participants applying the University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT) before and one month after surgery (Fornazieri et al. 2015). All patients completed a questionnaire with demographic data. The local ethics committee approved the study and each participant signed the consent form after being properly informed on the methods and purposes of the study.

### Olfactory Epithelium collection

OE sampling was performed in the operating room under general anesthesia. Vasoconstriction was obtained topically with three drops of oxymetazoline in each nasal cavity without adrenaline soaked pledgets over the OE region to prevent scarification. After good superior turbinate visualization, olfactory mucosa was collected with Takahashi forceps (Fig 1).



**Fig 1. Olfactory mucosa biopsy technique.** Left superior turbinate view (A), medial surface punch with Takahashi forceps (B) and status post-procedure (C). Optics of 0°, scale bar of 3 mm.

## Biopsies Preparation

Specimens were fixed for 24 hours in 10% formalin, dehydrated and processed in paraffin. Serial sections of 3 mm thick were obtained from each biopsy and placed on slides. Staining was done with hematoxylin eosin (HE) and IHC with anti-OMP.

The presence of OE based on morphological criteria by staining by HE stain without anti-OMP marker was confirmed when four of the following six criteria were present: stratified epithelium, no goblet cells, thin basement membrane, irregular cilia, cellular lamina propria (without many vases), numerous and large nerve bundles (Kern 2000; Ash JE 1956).

For IHC samples were deparaffinized and the slides placed in commercial food steamer with EDTA buffer (ethylenediaminetetraacetic acid) for 3 minutes for antigen retrieval, followed by heat shock in cold water for 10 minutes. Peroxidase blocking was made, rinsed with PBS (phosphate buffered saline) and incubated in a humid chamber with anti-OMP antibody (rabbit polyclonal antibody anti-olfactory marker protein, 1: 100, Abcam, USA) diluted in solution of PBS with BSA (bovine serum albumin) and protein blocking to confirm the presence of olfactory epithelium. Incubation with secondary antibody biotinylated (Bio SB, USA) was taken for 10 minutes, rinsed with PBS and incubated with streptavidin conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Bio SB, USA) for more 10 minutes, rinsed with PBS, PBS bath for 5 minutes, applying the DAB (diaminobenzidine 3.3 ) (50 uL of DAB chromogen diluted in 1 ml of DAB buffer) for 10 minutes and rinsed with PBS. Slides were counterstained with hematoxylin. Marked cell count was made in the Image J software with pictures of blades 400x magnification in an area of 237  $\mu\text{m}^2$  stardardized for all samples (average value of OE area). The presence of OE was considered positive when the number of counted cells exceeded 20 cells, otherwise, it was considered marking artifacts. This value of 20 cells was determined in standardizing experiments from 5 samples of inferior turbinate (IT) - mucous tissue in which there are no reports of the presence of olfactory cells.

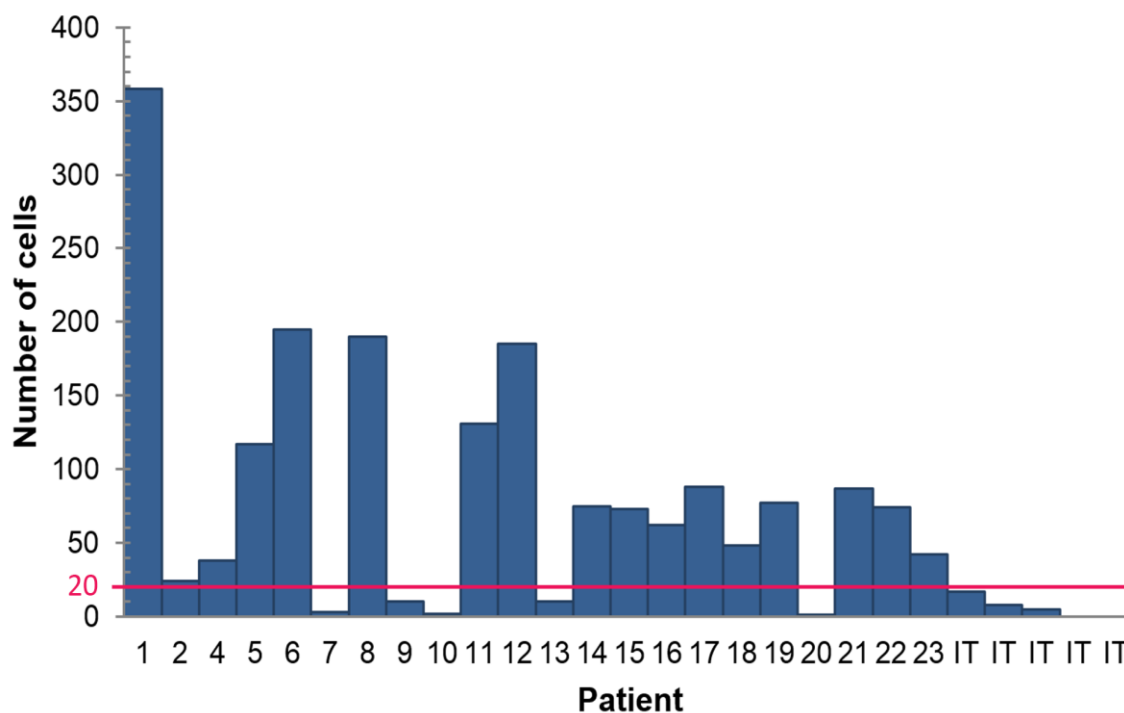
In the row of 23 samples, the quantity of mucosa collected from one patient was insufficient to carry out the histological analysis. However, safety analysis was performed in this case.

## Statistical analysis

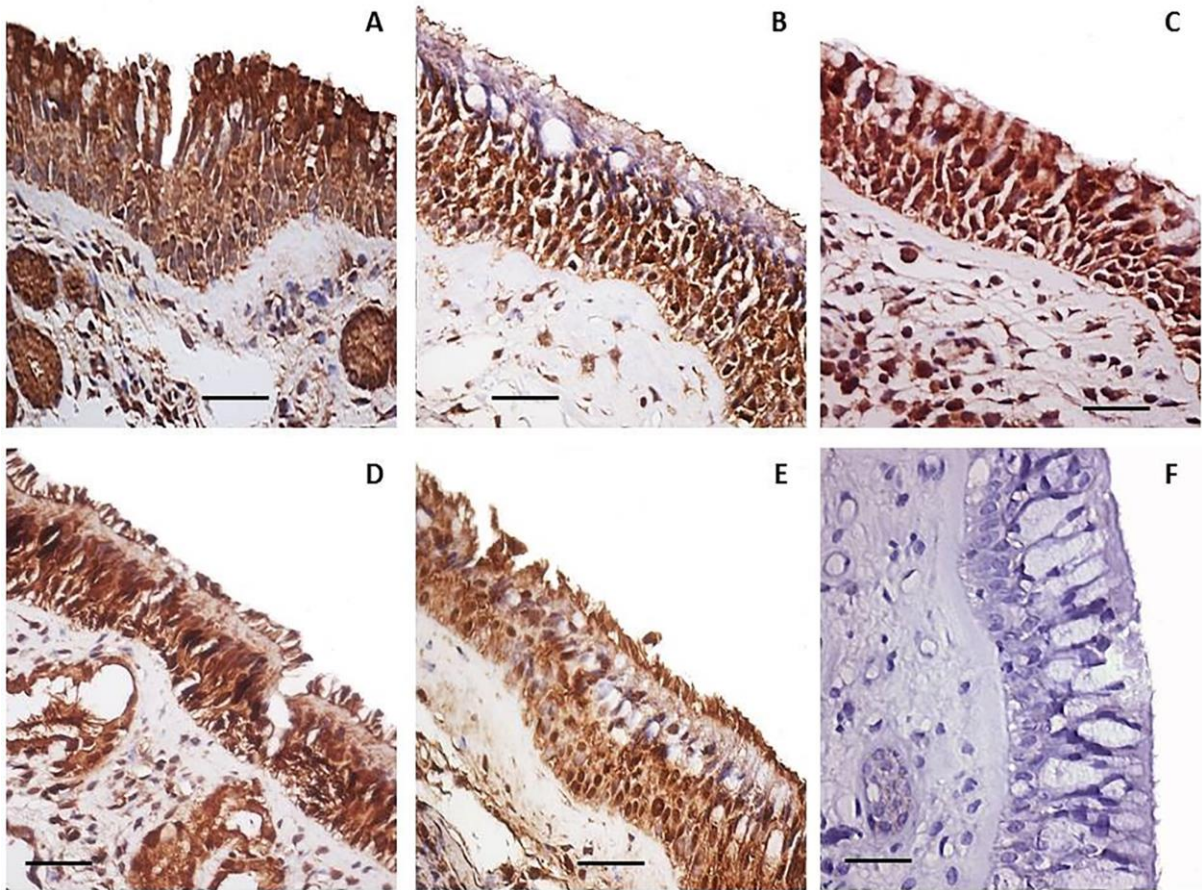
Continuous variables, such as age and UPSIT score, were expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD). After verification of normality by Shapiro-Wilk test, the means of UPSIT scores were compared by t test. It was used two tailed p value, and the cut-off statistical significance was  $p < 0.05$ . Comparison of correct answers in UPSIT pre and post-procedure was done with the respective 95% confidence intervals.

## Results

Seventeen of the twenty two samples collected on the medial surface of the superior turbinate had the presence of OE confirmed by anti-OMP immunohistochemistry (77% efficacy, Fig 2 and 3).

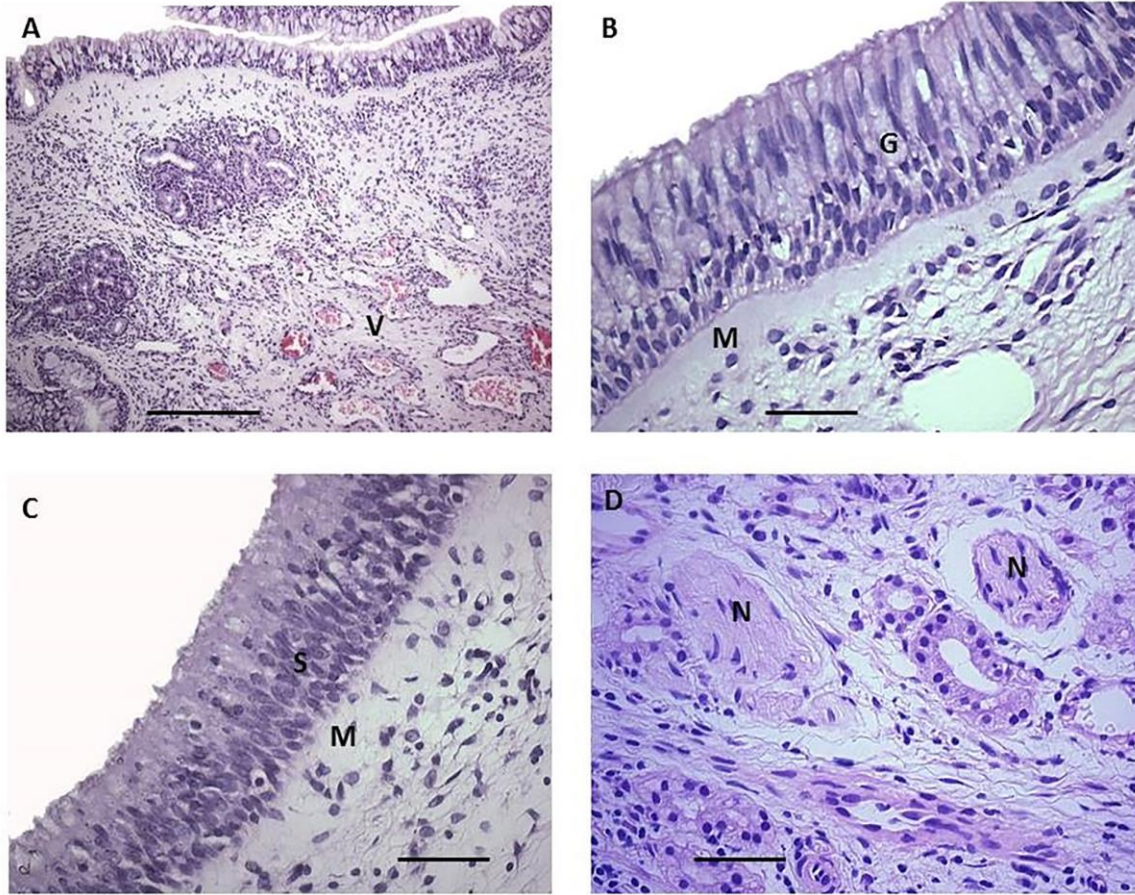


**Fig 2. Number of cells expressing Olfactory Marker Protein (OMP).** Cells counted in an area of  $237 \mu\text{m}^2$ , from superior turbinates biopsies and negative controls (inferior turbinates, IT), positive for the presence of olfactory epithelium when cell number  $> 20$ . Mean of cells counted = 86.



**Fig 3. Immunohistochemistry staining for OMP.** Representative olfactory epithelium from five patients with positive staining for OMP (A, B, C, D and E) and a respiratory epithelium without OMP marking (F). 400x magnification, scale bar 50 micrometers.

The sensitivity, specificity, negative predictive value, positive predictive value and accuracy of the confirmation of the presence of OE by assessing morphological characteristics (Fig 4) were respectively 88.2%, 20%, 33.3%, 78.9% and 72.7% (Table 2).



**Fig 4. Differences between respiratory (A and B) and olfactory epithelia (C and D), stained with hematoxylin-eosin.** It is possible to observe respiratory epithelium in the lamina propria vessels (V), the presence of goblet cells (G) and a thickened basement membrane (M). It is noteworthy in olfactory epithelium its stratification (S), the thin basement membrane (M) and the presence of nerve bundles in the lamina propria (N). **A** 100x magnification with 250 μm scale bar; **B, C e D** 400x magnification, with 50 μm scale bar.

**Table 2. Evaluation of the presence of olfactory epithelium given the morphological criteria.**

Patient	Nerve bundles	Stratified epithelium	No goblet cells	Thin basement mebrane	Celullar lamina propria	Irregular cilia	Presence of Olfactory Epithelium
1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
6	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	No	Yes	No	No	No	No	No
9	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No
12	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
13	No	No	Yes	No	No	Yes	No
14	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
15	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
16	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
18	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
IT	No	Yes	No	No	No	Yes	No
IT	No	No	No	No	No	Yes	No
IT	No	No	No	No	No	No	No
IT	No	No	No	No	No	No	No
IT	No	Yes	No	No	No	No	No

IT: inferior turbinate samples

There was no change in olfactory function pre and post biopsy of the OE: UPSIT pre biopsy (mean = 28.9, SD = 5.0) versus UPSIT post biopsy (mean = 30.6, SD = 3.8) ( $p = 0.22$ ). There was also no change by biopsy in the identification of any of the 40 odors tested (Table 3).

**Table 3. Percentage of correct answers for odor before and after biopsy.**

<b>Odor</b>	<b>Before (% of correct answers, CI 95%)</b>	<b>After (% of correct answers, CI 95%)</b>
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)

## Discussion

The present study evaluated the collection of samples of OE using the Takahashi forceps, the identification of OE using morphological characteristic in comparison with immunohistochemistry staining for OMP, a marker of OE as well as whether this procedure affected the olfactory function of the patients. The technique employed to collect the biopsy using Takahashi forceps and the region of the medial surface of the superior turbinate was effective in sampling OE, which was found in 77% of specimens. This result was approximated to that found in biopsies obtained from superior turbinate of cadavers (82.9%) (De Rezende Pinna et al. 2013), nasal septum with local anesthesia and cupped biopsy forceps (80%) (Holbrook et al. 2016) and in superior turbinate with etmoide forceps (73%) (Féron et al. 1998). The rate obtained in the present study using Takahashi forceps was superior to that obtained in the superior turbinate and septum with Blakesley forceps (61%) (Lee et al. 2000) and in middle turbinate using different techniques (14%, 17% e 42%) (Witt et al. 2009; De Rezende Pinna et al. 2013; Leopold et al. 2000). The use of forceps can collect biopsy without damaging the tissue and prevents bleeding from the biopsied site and the endoscope allows a good visualization of the region for collection, but the biopsy should be reduced in size, which makes it difficult to analyze the tissue.

The technique also proved to be safe, with no change in total olfactory function before and after biopsy and as well as patients maintained the capacity of identifying all odorants in the UPSIT test. This result is compatible with the results found by Lanza, Wintead and Andrews in which the olfactory function of the patients was not affected by the biopsy (Lanza et al. 1994; Winstead et al. 2005; Andrews et al. 2016). Confidence intervals found by the proportion of odor for correct answers before and after the biopsy shows that despite the specificity of the olfactory receptors (Malnic et al. 1999) and its regional distribution (Mombaerts et al. 1996), the withdrawal of the biopsied area in the superior turbinate did not affect pleasant and unpleasant odorants, food or different types of materials demonstrating the possibility of using biopsy to study olfactory epithelium and related diseases with minor side effects to the patients.

Three of the five samples collected from inferior turbinate showed low level of staining with anti-OMP, which was considered non-specific marking, thus, the highest number of positive cells (20 cells) in this non-olfactory tissue was established as the cutoff for positivity OE in the present study. Nevertheless, it is noteworthy to mention that there is a lack of studies proving the absence of OE in the region.

Sensibility for anti-OMP marking in samples 7, 9, and 13 could be caused by the damage in epithelium along preparation procedure for IHC. Patient number 20 had allergic rhinitis and its epithelium showed the presence of some metaplastic goblet cells and morphological changes that could explain the lack of marking for OMP. This type of alteration was found in patients with chronic rhinosinusitis (Yee et al. 2010), but until now it has not been reported that patients with rhinitis have alterations in the olfactory epithelium or decrease in their extension in the nasal cavity. In the case of the sample 10, age (65 years, age limit for inclusion in the study) may have contributed for the absence of mature olfactory neurons (Paik et al. 1992) and, then, negativity for OMP.

The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy found show that the morphological evaluation by HE consistently allows detecting the OE when it is present but may present positivity even when the

epithelium is absent. Kern and Pinna used these criteria to differentiate the olfactory epithelium from the respiratory in its samples by placing the positive IHC as the seventh criterion (Kern 2000; De Rezende Pinna et al. 2013). In our work we separated the morphological evaluation of the IHC to evaluate the efficacy of the criteria solely for the identification of the presence of olfactory epithelium.

Some criteria are difficult to analyze such as the cilia since it is, not kept fully intact in both respiratory and OE after slide preparation, as they are present in the two tissues, it becomes difficult to analyze. The presence of the nerve bundles were difficult to identify, which were found in only 5 of the samples analyzed, probably because the size of the sample collected does not reach deeper regions of the mucosa, but it is a structure that is not found in respiratory epithelium. The differentiation between low and high concentration of vessels in the lamina propria is not straightforward because the vessels may also be present in the olfactory epithelium. We consider that the main criteria that aid in the identification of OE were the lack of goblet cells which are characteristic of respiratory epithelium and easy to visualize and the thin basement membrane that is thickened in the case of respiratory epithelium.

Therefore, it is not recommended to use only the analysis of morphological criteria to identify and differentiate OE in the nasal mucosa tissue. IHC is mandatory for confirmation of OE presence (Kern 2000; De Rezende Pinna et al. 2013).

## Conclusion

Superior turbinate biopsy is a safe and efficient procedure to obtain olfactory epithelium. IHC marking of OMP aids specificity to the conventional morphological analysis in HE stained slices to confirm the presence of OE in patient samples.

## References

- Alt, J.A. et al., 2014. Predictors of olfactory dysfunction in rhinosinusitis using the brief smell identification test. *The Laryngoscope*, 124(7), pp.E259-66.
- 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.
- Arnold, S.E. et al., 2010. Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Annals of neurology*, 67(4), pp.462–469.
- Ash JE, R.M., 1956. *An Atlas of Otolaryngic Pathology*, Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology.
- Barger, S.W. & Van Eldik, L.J., 1992. S100 stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), pp.9689–9694.
- Buck, L. & Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), pp.175–187. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840504><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749190418X>.
- 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.
- 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*, 157(9), pp.1399–1405.

- Dibattista, M. & Reisert, J., 2016. The odorant receptor-dependent role of olfactory marker protein in olfactory receptor neurons. *Journal of Neuroscience*, 36(10), pp.2995–3006. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4209-15.2016>.
- Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research and technique*, 60(6), pp.540–551.
- Doty, R.L., 1989. Influence of age and age-related diseases on olfactory function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 561, pp.76–86.
- Doty, R.L. & Kamath, V., 2014. The influences of age on olfaction: A review. *Frontiers in Psychology*, 5(FEB), pp.1–20.
- Doty, R.L. & Mishra, a, 2001. Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 111(3), pp.409–423.
- Douek, E., Bannister, L.H. & Dodson, H.C., 1975. Recent advances in the pathology of olfaction. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 68(8), pp.467–470.
- Feron, F. et al., 2013. Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1059, pp.107–114.
- 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.
- Fornazieri, M.A. et al., 2015. Development of normative data for the Brazilian adaptation of the University of Pennsylvania Smell Identification Test. *Chemical senses*, 40(2), pp.141–149.
- Freitag, J. et al., 1998. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 183(5), pp.635–650.
- Hasegawa, S., Yamagishi, M. & Nakano, Y., 1986. Microscopic studies of human olfactory epithelia following traumatic anosmia. *Arch Otorhinolaryngol*, 243(2), pp.112–116. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3718322](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3718322).
- Holbrook, E.H. et al., 2011. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *The Laryngoscope*, 121(8), pp.1687–1701.
- Holbrook, E.H., Rebeiz, L. & Schwob, J.E., 2016. Office-based olfactory mucosa biopsies. *International Forum of Allergy and Rhinology*, 6(6), pp.646–653.
- 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*, 400(4), pp.469–486.
- Hummel, T. et al., 2009. Effects of olfactory Training in patients with olfactory loss. *Laryngoscope*, 119(3), pp.496–499.
- Jafek, B.W. et al., 2002. Biopsies of human olfactory epithelium. *Chemical senses*, 27(7), pp.623–628.
- Jafek, B.W. et al., 1990. Postviral Olfactory Dysfunction. *American Journal of Rhinology*, 4(3), pp.91–100. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/ocean/ajr/1990/00000004/00000003/art00004>.
- Jafek, B.W., 1983. Ultrastructure of human nasal mucosa. *The Laryngoscope*, 93(12), pp.1576–1599.
- Kern, R., 2000. Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope*, 110(7), pp.1071–7.
- Lane, A.P. et al., 2010. NIH Public Access. , 30(6), pp.2324–2329.
- Lanza, D.C. et al., 1993. Endoscopic human olfactory biopsy technique: a preliminary report. *The Laryngoscope*, 103(7), pp.815–819.
- Lanza, D.C. et al., 1994. The effect of human olfactory biopsy on olfaction - a preliminary-report. *Laryngoscope*, 104(7), pp.837–840.
- Lee, S.H. et al., 2000. Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, 109(8 I), pp.720–725.
- Leopold, D.A. et al., 2000. Anterior distribution of human olfactory epithelium. *The Laryngoscope*, 110(3 Pt 1), pp.417–421.
- Lindsay, S.L. et al., 2013. Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia*, 61(3), pp.368–382.
- Lovell, M.A. et al., 1982. Biopsy of human olfactory mucosa. An instrument and a technique. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)*, 108(4), pp.247–249.
- Malaty, J. & Malaty, I.A.C., 2013. Smell and Taste Disorders in Primary Care.
- Malnic, B. et al., 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell*, 96(5), pp.713–723.
- Miedzybrodzki, R. et al., 2006. The olfactory bulb and olfactory mucosa obtained from human cadaver donors as a source of olfactory ensheathing cells. *Glia*, 54(6), pp.557–565.
- 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*, 25(14),

- pp.3586–3592.
- Mombaerts, P., 2001. How smell develops. *Nature neuroscience*, 4 Suppl(november), pp.1192–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687829>.
- 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.
- Mombaerts, P. et al., 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), pp.675–686.
- Moran, D.T. et al., 1992. Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction. *Microscopy Research and Technique*, 23(2), pp.103–110.
- Moran, D.T., Rowley 3rd, J.C. & 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.
- Nakashima, T. et al., 1984. Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol*, 110(10), pp.641–646. Available at: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=611781>.
- Paik, S.I. et al., 1992. Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 118(7), pp.731–738.
- 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.
- Polyzonis, B.M. et al., 1979. An electron microscopic study of human olfactory mucosa. *Journal of anatomy*, 128(Pt 1), pp.77–83.
- Raviv, J.R. & Kern, R.C., 2004. Chronic sinusitis and olfactory dysfunction. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6 SPEC.ISS.), pp.1143–1157.
- 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*, 132(3), pp.265–269.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L. & Buck, L.B., 1993. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, 73(3), pp.597–609.
- 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.
- Rimmer, J. et al., 2014. Surgical versus medical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, p.CD006991. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25437000>.
- Schäfer, B.W. & Heizmann, C.W., 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(4), pp.134–140.
- 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. Available at: <http://www.pnas.org/content/112/36/E5068.long>.
- Schwob, J.E. & Ph, D., 2012. Tissue. , 121(8), pp.1687–1701.
- Seiden, A.M., 2004. Postviral olfactory loss. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6 SPEC.ISS.), pp.1159–1166.
- Sohrabi, H.R. et al., 2012. Olfactory discrimination predicts cognitive decline among community-dwelling older adults. *Translational Psychiatry*, 2(5), pp.e118-7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2012.43>.
- Sullivan, S.L. et al., 1995. Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium. *Neuron*, 15(4), pp.779–789.
- 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/>.
- Trojanowski, J.Q. et al., 1991. Human olfactory epithelium in normal aging, Alzheimer's disease, and other neurodegenerative disorders. *The Journal of comparative neurology*, 310(3), pp.365–376.
- 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*, 23(6), pp.1436–1444.
- 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*, 24(3), pp.192–196.
- 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/>.
- Vassar, R. et al., 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*,

- 79(6), pp.981–991.
- Vassar, R., Ngai, J. & Axel, R., 1993. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 74(2), pp.309–318.
- Verbeurgt, C. et al., 2014. Profiling of olfactory receptor gene expression in whole human olfactory mucosa. *PLoS ONE*, 9(5), pp.21–26.
- Winstead, W. et al., 2005. Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells. *American journal of rhinology*, 19(1), pp.83–90.
- Witt, M. et al., 2009. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 24(6), pp.906–914.
- 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.
- Yamagishi, M., Hasegawa, S. & Nakano, Y., 1988. Examination and classification of human olfactory mucosa in patients with clinical olfactory disturbances. *Archives of oto-rhino-laryngology*, 245(5), pp.316–320.
- 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.
- 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.
- 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>.
- Zou, D.-J., Chesler, A. & Firestein, S., 2009. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(8), pp.611–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584894>.

## **6 CONCLUSÕES**

A biópsia utilizando-se pinça de Takahashi na face medial da concha nasal superior é segura e indicada para se encontrar epitélio olfatório. A avaliação morfológica sem imunohistoquímica não é suficiente para confirmação de presença de epitélio olfatório em biópsias de pacientes.

## REFERÊNCIAS

- Alt, J.A. et al., 2014. Predictors of olfactory dysfunction in rhinosinusitis using the brief smell identification test. *The Laryngoscope*, 124(7), pp.E259-66.
- 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.
- Arnold, S.E. et al., 2010. Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Annals of neurology*, 67(4), pp.462–469.
- Ash JE, R.M., 1956. *An Atlas of Otolaryngic Pathology*, Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology.
- Barger, S.W. & Van Eldik, L.J., 1992. S100 stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), pp.9689–9694.
- Buck, L. & Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), pp.175–187. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840504><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749190418X>.
- 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.
- 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*, 157(9), pp.1399–1405.
- Dibattista, M. & Reisert, J., 2016. The odorant receptor-dependent role of olfactory marker protein in olfactory receptor neurons. *Journal of Neuroscience*, 36(10), pp.2995–3006. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4209-15.2016>.
- Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research and technique*, 60(6), pp.540–551.
- Doty, R.L., 1989. Influence of age and age-related diseases on olfactory function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 561, pp.76–86.
- Doty, R.L. & Kamath, V., 2014. The influences of age on olfaction: A review. *Frontiers in Psychology*, 5(FEB), pp.1–20.
- Doty, R.L. & Mishra, a, 2001. Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 111(3), pp.409–423.
- Douek, E., Bannister, L.H. & Dodson, H.C., 1975. Recent advances in the pathology of

- olfaction. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 68(8), pp.467–470.
- Feron, F. et al., 2013. Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1059, pp.107–114.
- 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.
- Fornazieri, M.A. et al., 2015. Development of normative data for the Brazilian adaptation of the University of Pennsylvania Smell Identification Test. *Chemical senses*, 40(2), pp.141–149.
- Freitag, J. et al., 1998. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 183(5), pp.635–650.
- Hasegawa, S., Yamagishi, M. & Nakano, Y., 1986. Microscopic studies of human olfactory epithelia following traumatic anosmia. *Arch Otorhinolaryngol*, 243(2), pp.112–116.  
Available at:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3718322](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3718322).
- Holbrook, E.H. et al., 2011. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *The Laryngoscope*, 121(8), pp.1687–1701.
- Holbrook, E.H., Rebeiz, L. & Schwob, J.E., 2016. Office-based olfactory mucosa biopsies. *International Forum of Allergy and Rhinology*, 6(6), pp.646–653.
- 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*, 400(4), pp.469–486.
- Hummel, T. et al., 2009. Effects of olfactory Training in patients with olfactory loss. *Laryngoscope*, 119(3), pp.496–499.
- Jafek, B.W. et al., 2002. Biopsies of human olfactory epithelium. *Chemical senses*, 27(7), pp.623–628.
- Jafek, B.W. et al., 1990. Postviral Olfactory Dysfunction. *American Journal of Rhinology*, 4(3), pp.91–100. Available at:  
<http://www.ingentaconnect.com/content/ocean/ajr/1990/00000004/00000003/art00004>.
- Jafek, B.W., 1983. Ultrastructure of human nasal mucosa. *The Laryngoscope*, 93(12), pp.1576–1599.
- Kern, R., 2000. Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope*, 110(7), pp.1071–7.
- Lane, A.P. et al., 2010. NIH Public Access. , 30(6), pp.2324–2329.
- Lanza, D.C. et al., 1993. Endoscopic human olfactory biopsy technique: a preliminary report. *The Laryngoscope*, 103(7), pp.815–819.

- Lanza, D.C. et al., 1994. The effect of human olfactory biopsy on olfaction - a preliminary report. *Laryngoscope*, 104(7), pp.837–840.
- Lee, S.H. et al., 2000. Olfactory mucosal findings in patients with persistent anosmia after endoscopic sinus surgery. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, 109(8 I), pp.720–725.
- Leopold, D.A. et al., 2000. Anterior distribution of human olfactory epithelium. *The Laryngoscope*, 110(3 Pt 1), pp.417–421.
- Lindsay, S.L. et al., 2013. Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia*, 61(3), pp.368–382.
- Lovell, M.A. et al., 1982. Biopsy of human olfactory mucosa. An instrument and a technique. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)*, 108(4), pp.247–249.
- Malaty, J. & Malaty, I.A.C., 2013. Smell and Taste Disorders in Primary Care.
- Malnic, B. et al., 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell*, 96(5), pp.713–723.
- Miedzybrodzki, R. et al., 2006. The olfactory bulb and olfactory mucosa obtained from human cadaver donors as a source of olfactory ensheathing cells. *Glia*, 54(6), pp.557–565.
- 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*, 25(14), pp.3586–3592.
- Mombaerts, P., 2001. How smell develops. *Nature neuroscience*, 4 Suppl(november), pp.1192–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687829>.
- 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.
- Mombaerts, P. et al., 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), pp.675–686.
- Moran, D.T. et al., 1992. Ultrastructural histopathology of human olfactory dysfunction. *Microscopy Research and Technique*, 23(2), pp.103–110.
- Moran, D.T., Rowley 3rd, J.C. & 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.
- Nakashima, T. et al., 1984. Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol*, 110(10), pp.641–646. Available at: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=611781>.
- Paik, S.I. et al., 1992. Human olfactory biopsy. The influence of age and receptor distribution. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 118(7), pp.731–738.
- 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.
- Polyzonis, B.M. et al., 1979. An electron microscopic study of human olfactory mucosa.

- Journal of anatomy*, 128(Pt 1), pp.77–83.
- Raviv, J.R. & Kern, R.C., 2004. Chronic sinusitis and olfactory dysfunction. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6 SPEC.ISS.), pp.1143–1157.
- 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*, 132(3), pp.265–269.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L. & Buck, L.B., 1993. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, 73(3), pp.597–609.
- 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.
- Rimmer, J. et al., 2014. Surgical versus medical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, p.CD006991. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25437000>.
- Schäfer, B.W. & Heizmann, C.W., 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(4), pp.134–140.
- 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. Available at: <http://www.pnas.org/content/112/36/E5068.long>.
- Schwob, J.E. & Ph, D., 2012. *Tissue*, 121(8), pp.1687–1701.
- Seiden, A.M., 2004. Postviral olfactory loss. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 37(6 SPEC.ISS.), pp.1159–1166.
- Sohrabi, H.R. et al., 2012. Olfactory discrimination predicts cognitive decline among community-dwelling older adults. *Translational Psychiatry*, 2(5), pp.e118-7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2012.43>.
- Sullivan, S.L. et al., 1995. Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium. *Neuron*, 15(4), pp.779–789.
- 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/>.
- Trojanowski, J.Q. et al., 1991. Human olfactory epithelium in normal aging, Alzheimer's disease, and other neurodegenerative disorders. *The Journal of comparative neurology*, 310(3), pp.365–376.
- 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*, 23(6), pp.1436–1444.

- 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*, 24(3), pp.192–196.
- 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/>.
- Vassar, R. et al., 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, 79(6), pp.981–991.
- Vassar, R., Ngai, J. & Axel, R., 1993. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 74(2), pp.309–318.
- Verbeurgt, C. et al., 2014. Profiling of olfactory receptor gene expression in whole human olfactory mucosa. *PLoS ONE*, 9(5), pp.21–26.
- Winstead, W. et al., 2005. Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells. *American journal of rhinology*, 19(1), pp.83–90.
- Witt, M. et al., 2009. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 24(6), pp.906–914.
- 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.
- Yamagishi, M., Hasegawa, S. & Nakano, Y., 1988. Examination and classification of human olfactory mucosa in patients with clinical olfactory disturbances. *Archives of oto-rhinolaryngology*, 245(5), pp.316–320.
- 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.
- 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.
- 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>.
- Zou, D.-J., Chesler, A. & Firestein, S., 2009. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(8), pp.611–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584894>.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Ellen Cristine Duarte Garcia, Waldiceu Aparecido Verri Júnior e Marco Aurélio Fornazieri, responsáveis pela pesquisa intitulada “Análise imuno-histoquímica e por microscopia eletrônica de varredura do epitélio olfatório de pacientes com Rinossinusite Crônica pré e pós ciclo de corticoide sistêmico”, 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](mailto: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 após uso de corticóide oral. Esse objetivo será alcançado através das seguintes etapas:

- biópsia do epitélio olfatório sob anestesia local (esse procedimento é realizado para maior precisão do diagnóstico de sua doença e não compromete a função olfatória, pois uma pequena região é excisada e ocorre posterior regeneração) (- aplicação de questionário, teste da sua capacidade de sentir cheiros, um ciclo de corticóide oral durante 10 dias,- nova biópsia, realizada durante a cirurgia ao se retirar os tecidos doentes - um novo teste do olfato) 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.

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 riscos 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

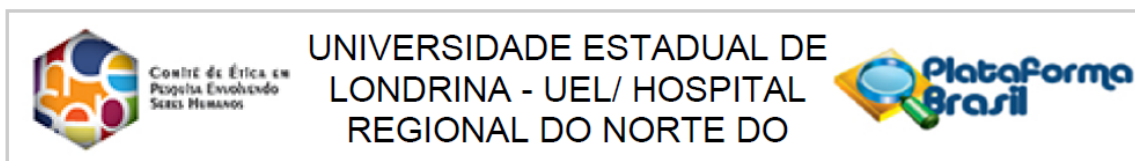
\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

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](mailto:marcofornazieri@gmail.com)

**ANEXOS**

**ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE PACIENTES COM RINOSSINUSITE CRÔNICA PRÉ E PÓS CICLO DE CORTICÓIDE SISTÊMICO.

**Pesquisador:** Marco Aurélio Fornazieri

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 41491014.1.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Clínica Cirúrgica

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.024.603

**Data da Relatoria:** 31/03/2015

**Apresentação do Projeto:**

Projeto de pesquisa intitulado ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO EPITÉLIO OLFATÓRIO DE PACIENTES COM RINOSSINUSITE CRÔNICA PRÉ E PÓS CICLO DE CORTICÓIDE SISTÊMICO, sob responsabilidade do pesquisador Marco Aurélio Fornazieri, vinculado ao Departamento de Clínica Cirúrgica - CCS / UEL.

Trata-se de pesquisa exploratória, na qual serão analisados 40 indivíduos com diagnóstico de Rinossinusite Crônica (RSC) com e sem polipose nasossinusal acompanhados no Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário da Universidade de Londrina (UEL). A biópsia nasal e a mensuração da função olfatória pelo Teste de Identificação do Olfato da Universidade da Pensilvânia (UPSIT) serão realizadas em dois momentos, com intervalo de 1 mês. Como controles, será realizado biópsia do epitélio olfatório somente uma vez em 10 indivíduos com função olfatória normal pelo UPSIT que forem submetidos a septoplastia.

Os pacientes com RSC com indicação de cirurgia e com queixa de hiposmia ou anosmia serão submetidos ao UPSIT 30 dias antes da cirurgia. Aqueles com sua perda confirmada pelo teste farão a biópsia do epitélio olfatório e receberão corticóide oral (prednisolona 40mg dia) por 10 dias antes de sua cirurgia. O uso de corticoides pré-operatório é uma conduta comum entre os

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

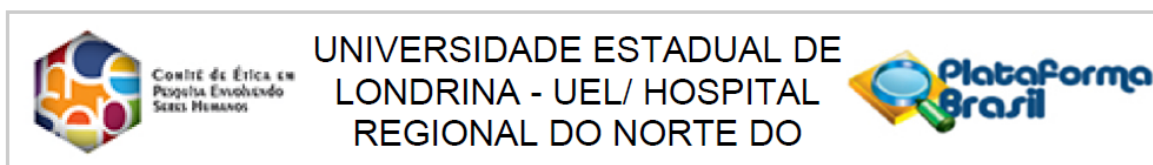
**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR **Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.024.603

otorrinolaringologistas para diminuição do sangramento intra-operatório. A biópsia será realizada de forma segura e padronizada, já descrita na literatura (7,8). Após o ciclo e imediatamente antes da cirurgia um novo UPSIT será realizado e a segunda biópsia feita em centro cirúrgico sob anestesia geral durante a avaliação do distúrbio do olfato será realizada através da aplicação do Teste Olfatório 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.

Serão incluídos indivíduos com idade entre 18 e 60 anos; que assinarem o TCLE; que preencherem o protocolo clínico com informações relacionadas à história pregressa e atual, antecedentes pessoais, entre outras informações constantes no questionário; com diagnóstico confirmado de RSC segundo critérios do EPOS 2012 e com indicação cirúrgica; que apresentarem queixa de alteração no olfato. Serão excluídos indivíduos com idade inferior a 18 anos por tratar-se de outro perfil de pacientes; Pacientes com idade superior a 60 anos para evitar os efeitos da idade na morfologia do epitélio olfatório; História de cirurgia nasal prévia; História de traumatismo crânioencefálico; Discinesia ciliar conhecida; Em uso de alguma medicação tópica nasal nos últimos 30 dias; Pacientes hipertensos ou diabéticos pelo risco do uso de corticoide durante estudo; Rinossinusite de causa odontogênica.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral da pesquisa é comparar os níveis de marcadores imuno-histoquímicos neuronais, não neuronais, de maturidade e inflamação no epitélio olfatório de pacientes com RSC através de biópsia in vivo pré e pós-ciclo de corticóide oral através de análise histológica, imuno-histoquímica, microscopia de luz (HE) e microscopia eletrônica de varredura.

Objetivo Secundário:

- Mensurar fração de positividade de epitélio olfatório em biópsias da face medial superior da concha média.
- Avaliar a correlação entre as alterações encontradas com o escore obtido no teste UPSIT.
- Comparar quantidade de cílios no epitélio olfatório entre pacientes com RSC e voluntários hígidos.

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

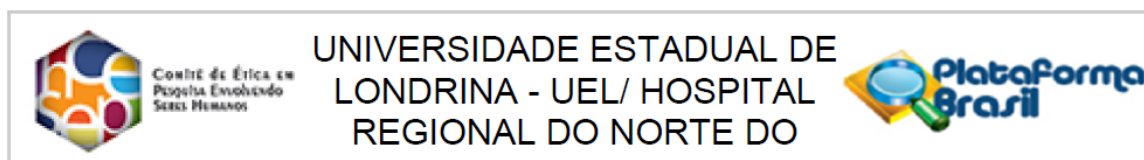
**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.024.603

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os pesquisadores afirmam que 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 riscos de perda adicional do olfato pela biópsia, pois o epitélio olfatório possui capacidade de regeneração e afirmam ainda que somente ao final do estudo, poderemos concluir se há algum benefício direto para o participante, contudo espera-se entender melhor os efeitos dos corticóides e observar as mudanças no epitélio olfatório que colaboram com a melhora da função olfativa.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Em relação ao orçamento o pesquisador afirma que o laboratório já dispõe de grande parte do material que será utilizado, não sendo necessário a compra. Para o restante será angariado financiamento, sendo que enquanto não houver o mesmo, os custos serão por financiamento próprio.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores apresentaram:

- TCLE que está adequado em forma de convite aos participantes, redigido de forma clara contendo todas as informações acerca do projeto.
- Folha de rosto devidamente assinada e carimbada pelo chefe do Dpto de Clínica Cirúrgica.
- Autorização da diretoria de superintendência do HU e do setor de otorrinolaringologia da UEL.
- Termo assinado pelo professor Waldiceu Verri Junior que se compromete com as realizações das técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica de varredura.

#### **Recomendações:**

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR **Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Centro de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



Continuação do Parecer: 1.024.603

LONDRINA, 15 de Abril de 2015

---

**Assinado por:**

**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli  
(Coordenador)**

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br

## ANEXO B – Questionário

<b>ENTREVISTADOR:</b> _____		<b>DATA:</b> ____/____/____	
<b>Nome:</b> _____			
<b>Data de Nascimento:</b> ____/____/____		Idade: ____ anos	
<b>Sexo:</b>		1 - Masculino	2 - Feminino
<b>Endereço atual:</b>			
Rua/Av/Al: _____ N° _____		CEP: _____ - _____	
Compl. _____		Região: _____	
<b>Bairro:</b> _____			
<b>Telefone para contato:</b>			
Fixo: (____) _____ - _____		(____) _____ - _____	
Celular: (____) _____ - _____		(____) _____ - _____	
<b>Município e Estado de Nascimento:</b> _____ / _____			
<b>1</b>	<b>Qual seu grupo étnico?</b>	1. branco	2. negro
		3. pardo	4. amarelo
		5. índio	9. NS/NR
<b>2</b>	<b>Qual a renda mensal da família:</b>	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	
<b>3a</b>	<b>Você fuma?</b>	1 - Sim	2 – Não ( <i>pule para 3e</i> )
			9 – NS/NR ( <i>pule para 3e</i> )
<b>3b</b>	Quantos cigarros ou outros/dia? _____		
<b>3c</b>	<b>Você traga?</b>	1 - Sim	2 – Não
			9 – NS/NR
<b>3d</b>	Com que idade começou a fumar? _____ anos ( <i>pular para 4</i> )		
<b>3e</b>	<b>Você já fumou alguma vez?</b>	1 - Sim	2 – Não ( <i>pule para 4</i> )
			9 – NS/NR ( <i>pule para 4</i> )
<b>3f</b>	Se sim, com que idade começou? _____ anos		
<b>3g</b>	Com que idade parou de fumar? _____ anos		
<b>3h</b>	Quantos cigarros fumava por dia? _____		
<b>3i</b>	<b>Sua habilidade de sentir odores mudou após parar?</b>	1 - Sim	2 – Não
			9 – NS/NR
<b>3j</b>	Quanto mudou (1-nada- a 10-muito)? _____		
<b>4</b>	<b>Qual seu grau de Instrução?</b>	1. ensino fundamental incompleto	3. ensino médio incompleto
		2. ensino fundamental completo	4. ensino médio completo
		5. ensino superior incompleto	6. ensino superior completo
	<b>Quantos anos de estudo?</b> _____ anos		
	<b>Qual a sua ocupação?</b>		
<b>5</b>	<b>Atualmente, você está utilizando algum tipo de medicação (incluindo anticoncepcional)?</b>	1 - Sim	2 – Não ( <i>pule para 9</i> )
			9 – NS/NR ( <i>pule para 9</i> )
	Se sim, qual/quais?		
<b>6</b>	<b>Atualmente você tem alguma doença nasal?</b>	1 - Sim	2 – Não ( <i>pule para 10</i> )
			9 – NS/NR ( <i>pule para 10</i> )
	Se sim, qual/quais?		
<b>7</b>	<b>Atualmente você tem alguma outra doença?</b>	1 - Sim	2 – Não
			9 – NS/NR
	Se sim, qual/quais?		

**Critérios para Inclusão no estudo** – Todas as questões devem ser respondidas, mas não poderá participar do estudo se alguma resposta obtida estiver em destaque.

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