

## Imunofluorescência para neuropeptídeos na mucosa nasal humana: avaliação de técnica para peptídeo intestinal vasoativo (VIP)

Jeferson Cedaro de Mendonça<sup>1</sup>,  
José Eduardo Lutaif Dolci<sup>2</sup>

## Human nasal immunofluorescence for neuropeptides: a technical evaluation for vasoactive intestinal peptide

Palavras-chave: peptídeo intestinal vasoativo, neuropeptídeos, mucosa nasal, imunofluorescência.  
Key words: vasoactive intestinal peptide, neuropeptides, nasal mucosa, immunofluorescence.

### Resumo / Summary

Os neuropeptídeos são neurotransmissores relevantes na fisiologia nasal e o conhecimento crescente acerca de seu papel na fisiopatologia de doenças nasais abre novas perspectivas. A sua investigação na mucosa nasal humana baseia-se em grande parte em marcação imunológica, método complexo e sujeito a inúmeros fatores de erro. Com o intuito de viabilizar este tipo de pesquisa em nosso meio, um método de imunofluorescência para peptídeo intestinal vasoativo (VIP) na mucosa nasal humana é proposto e avaliado. **Forma de estudo:** Coorte transversal. **Material e Método:** Oito pacientes submetidos a cirurgia funcional do nariz têm um fragmento de mucosa coletado da concha inferior. O tecido foi fixado em solução de Zamboni (paraformaldeído 4% tamponado e ácido pícrico 0,4%), congelado em nitrogênio líquido e armazenado. Cortes de 14 µm foram realizados e submetidos à reação de imunofluorescência para VIP (Península Laboratories). As imagens microscópicas foram documentadas em fotografia convencional. A especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade de execução foram avaliadas. A reprodutibilidade de interpretação de resultados foi avaliada através da comparação de graus de marcação (0 a 4) atribuídos às fotos por seis observadores. **Resultados:** Os resultados mostraram ser o método suficientemente específico, sensível, além de reprodutível em sua execução. A interpretação de resultados mostrou depender do perfeito esclarecimento do observador no julgamento das imagens de imunofluorescência, mas mostrou uniformidade. **Conclusão:** O método proposto foi considerado útil na pesquisa de neuropeptídeos na mucosa nasal humana.

Neuropeptides are important neurotransmitters in nasal physiology and the increasing knowledge of their role in the nasal diseases brings new therapeutic perspectives. The investigation of human nasal mucosa neuropeptides is based mostly on immunocytochemistry, a complex approach whose resulting factors may be variable. Aiming to make this kind of research available, an immunofluorescence approach for vasoactive intestinal peptide (VIP) in human nasal mucosa is proposed and evaluated. **Study design:** Transversal cohort. **Material and Method:** Human inferior turbinate samples were obtained at time of nasal surgery from eight patients. The samples were fixed in Zamboni's solution (4% phosphate-buffered paraformaldehyde and 0,4% picric acid), snap-frozen and stored at -70°C. 14 µm cuts were then obtained. Immunofluorescence staining for VIP (Peninsula Laboratories) was performed and its images documented by conventional photography. The method's specificity, sensibility and reproducibility of execution were evaluated. Additionally, the reproducibility of interpretation of results was evaluated through the comparison of staining scores (0 to 4) attributed to the images by six observers. **Results:** The results show the approach to be very specific and sensible, besides being reproducible in its execution. The interpretation of results may depend on the observer's accuracy in judging immunofluorescence images, but it showed uniformity. **Conclusion:** The proposed method was highly useful for the research in neuropeptides in human nasal mucosa.

<sup>1</sup> Otorrinolaringologista, Mestre e Doutor pela Santa Casa - SP

<sup>2</sup> Professor Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da FMSCSP.  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Artigo recebido em 11 de março de 2005. Artigo aceito em 28 de março de 2005.

---

## INTRODUÇÃO

---

O papel do nariz na proteção das vias aéreas, através de suas clássicas funções de filtração, aquecimento e umidificação do ar inspirado, é efetivado graças à anatomia peculiar das cavidades nasais e por aspectos funcionais de sua mucosa de revestimento. A capacidade de variar amplamente seu volume, modificando a resistência aérea por meio da congestão de plexos venosos, assim como apresentar grandes variações da secreção glandular de acordo com estímulos exógenos e fatores endógenos, são fenômenos intrigantes da fisiologia nasal continuamente estudados<sup>1</sup>. O papel da abundante inervação simpática, parassimpática e sensitiva no controle desses fenômenos é muito importante<sup>2</sup>.

O equilíbrio dos neurotransmissores clássicos, acetilcolina e noradrenalina, presentes na inervação simpática e parassimpática - e às vezes seu desequilíbrio - predominaram nas explicações dos fenômenos fisiológicos e patológicos nasais até então, do ponto de vista da inervação nasal, assim como nortearam princípios terapêuticos de condições patológicas nasais. Juntamente com a inervação simpática e parassimpática, a inervação sensitiva tem papel fisiológico significativo no que diz respeito aos reflexos de proteção das vias aéreas, regulando o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a resistência aérea nasal, a secreção glandular, e também mediando respostas inflamatórias e alérgicas<sup>2,3</sup>.

A descoberta e o estudo de novos neurotransmissores, os neuropeptídeos, em diversos tecidos de animais e também do homem trouxe novos conceitos para a fisiologia da inervação de vários órgãos. São dezenas de neuropeptídeos já descobertos em estudo, sendo o sistema respiratório bastante pesquisado<sup>4</sup>.

Os neuropeptídeos coexistem com neurotransmissores clássicos, exercendo função de modulação sobre eles. Genericamente, a ação dos neuropeptídeos é mais sutil, porém mais duradoura, além de estes interagirem com células e mediadores alérgicos e inflamatórios, tendo, portanto, uma função mais complexa quando comparados aos neurotransmissores clássicos, trazendo impacto no estudo da fisiologia e fisiopatologia nasais. Dentre os neuropeptídeos, a substância P (SP), neurokinina A e B (NKA e NKB), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), peptídeo liberador de gastrina (GRP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo histidina metionina (PHM) e neuropeptídeo Y (NPY) têm sido pesquisados no sistema respiratório<sup>5</sup>.

A demonstração, portanto, desses neuropeptídeos na mucosa nasal humana quanto à sua presença, distribuição no epitélio e estruturas da lâmina própria, além de diferenças entre condições normais e patológicas, têm sido objeto de pesquisa e trazido colaborações no entendimento mais profundo da fisiologia e fisiopatologia nasais<sup>2,6</sup>. A evolução

desse conhecimento pode, em um futuro próximo, apontar novos caminhos no tratamento das doenças nasais, mediante o desenvolvimento de antagonistas, sendo que já há resultados no sistema nervoso central<sup>7</sup>. Entretanto, para que isto se concretize, há necessidade de que conceitos e conclusões sejam baseados em estudos com grande casuística e, de preferência, provenientes de diferentes centros de pesquisa universalmente distribuídos. Somente assim poder-se-ia definir fatos acerca das ações dos neuropeptídeos na mucosa nasal humana que realmente pudessem refletir em aplicações na prática clínica. A metodologia utilizada no estudo desses neurotransmissores quanto à sua presença e distribuição nos tecidos normalmente baseia-se na marcação imunológica, sendo de técnica complexa, dotada de variações e relativamente cara. A identificação de neuropeptídeos acrescenta especial dificuldade técnica devido à fragilidade de sua estrutura molecular e sua fácil degranulação e eliminação das fibras nervosas, sofrendo ação de enzimas proteolíticas, exigindo que a técnica seja minuciosa, desde a coleta do tecido a ser pesquisado até seu processamento<sup>8</sup>. Todos os neuropeptídeos citados localizam-se no interior de fibras nervosas que se distribuem na mucosa nasal humana, de maneira que, ao serem identificados pela marcação imunológica, delineiam a fibra que o contém<sup>9</sup>. O fato de os neuropeptídeos pertencerem a uma determinada classe molecular e partilharem similaridade fisiológica permite que seja utilizada técnica comum em sua identificação no tocante a aspectos da manipulação do tecido, reação de marcação imunológica e observação de resultados, variando exclusivamente o anticorpo específico ao neuropeptídeo em questão (anticorpo primário), que é fornecido pelos kits de reação. Neste trabalho será realizada reação de imunofluorescência para VIP, um dos importantes neuropeptídeos citados, presente em fibras nervosas que se distribuem na lâmina própria da mucosa nasal humana<sup>6,10</sup>. Não há estudos sobre marcação imunológica de neuropeptídeos na mucosa nasal humana publicados em nosso meio. Deste modo, observa-se justificado o objetivo deste trabalho na busca do domínio e padronização de uma técnica de imunofluorescência para neuropeptídeos na mucosa nasal humana, tornando disponível um valioso instrumento de pesquisa que possa ser reproduzido e interpretado uniformemente, e enfim, auxilie na produção de conhecimento que venha colaborar no entendimento pleno da fisiologia e fisiopatologia nasais.

---

## REVISÃO DE LITERATURA

---

### *Os Neuropeptídeos*

Os neuropeptídeos são neurotransmissores presentes em neurônios e fibras nervosas espalhadas por todo o organismo humano, sendo encontrados também em animais de experimentação. São peptídeos, ou seja, seqüência de aminoácidos sintetizados nos corpos celulares e transporta-

dos para as terminações dos axônios. Quando comparados aos neurotransmissores clássicos, demonstram algumas diferenças: são liberados em regiões não exclusivamente sinápticas; sofrem degradação enzimática após sua liberação, não sendo reutilizados por recaptção; sua renovação ocorre exclusivamente por nova síntese no corpo celular; sendo, portanto, um processo mais lento quando comparado aos neurotransmissores clássicos, que podem ser recapturados na fenda sináptica e imediatamente reutilizados<sup>4</sup>.

Na mucosa nasal, a SP, juntamente com NKA, NKB e CGRP, consistem no grupo dos neuropeptídeos sensoriais, sendo abundantemente encontrados nos corpos celulares do gânglio trigeminal e na mucosa nasal de animais e do homem, distribuindo-se desde o epitélio a glândulas e vasos<sup>11</sup>. São vasodilatadores, sendo a SP mais potente e o CGRP com efeito mais duradouro<sup>12</sup>.

A SP promove aumento da permeabilidade vascular, levando a um aumento de concentração de proteínas nas secreções nasais<sup>13</sup>. Esse efeito é exacerbado em pacientes com rinite alérgica sazonal e não foi diminuído com tratamento prévio com anti-histamínicos, levando os autores a concluir que os efeitos da SP seriam independentes da liberação de histamina<sup>14</sup>. Em cultura de células de mucosa nasal humana, no entanto, outros autores constataram a liberação de histamina pela estimulação com SP<sup>15</sup>.

A SP pode ter efeito quimiotático sobre neutrófilos e eosinófilos em indivíduos com rinite alérgica, pois se constata o aumento de migração dessas células e de sua fagocitose na mucosa nasal após administração de SP em períodos de polinização<sup>5</sup>.

Outra ação significativa da SP e NKA no sistema respiratório é a broncoconstrição não-colinérgica. Em humanos, a inalação de SP e NKA provoca broncoconstrição somente em indivíduos asmáticos, sendo abolida por cromoglicato de sódio<sup>16</sup>.

O GRP é um peptídeo encontrado em fibras nervosas com distribuição na mucosa nasal semelhante a SP, NKA e CGRP, provavelmente em fibras sensitivas, sendo então citado em conjunto com esses neuropeptídeos, mas sua localização não está definida. Sua ação parece estar relacionada a aumento de secreção e não a fenômenos vasculares<sup>10</sup>.

A inervação parassimpática tem como principal neuropeptídeo o VIP, sendo encontrado no gânglio esfenopalatino de ratos e nas fibras parassimpáticas que se distribuem na mucosa nasal de animais e do homem, coexistindo com a acetilcolina<sup>5,17</sup>. O VIP tem ação vasodilatadora observada em experimentos *in vivo* na mucosa nasal de animais. No homem, há experimentos *in vitro* que demonstram sua ação vasodilatadora no tecido pulmonar<sup>17</sup>.

Sua presença em fibras nervosas em torno de glândulas, principalmente, remete a papel na fisiologia da secreção. Em cultura de células de mucosa nasal humana, observou-se aumento de secreção das células serosas após

administração de VIP, além de evidências de potencialização do efeito da estimulação colinérgica<sup>18</sup>, mas há estudos que mostram ação inibitória da secreção<sup>10</sup>.

Foi observado aumento da concentração do VIP (além da SP e CGRP) nas secreções nasais de indivíduos alérgicos sensibilizados após provocação nasal. Os mesmos autores também constataram o aumento do VIP após administração de histamina<sup>19</sup>. Foi constatada maior densidade de fibras imunoreativas ao VIP em pacientes com rinite alérgica quando comparados a indivíduos normais ou com rinite hipertrófica<sup>3</sup>.

O NPY está presente nas terminações nervosas simpáticas que se distribuem no sistema respiratório, incluindo a mucosa nasal do homem, coexistindo com a noradrenalina, com grande densidade em vasos com paredes mais espessas. O NPY é um potente vasoconstritor, sua ação tem maior latência de início, porém é mais duradoura que a noradrenalina. Esses achados sugerem importante papel no controle do fluxo sanguíneo nasal e do ciclo nasal<sup>10</sup>.

### **Marcação Imunológica de Neuropeptídeos**

Marcação imunológica, imunocitoquímica ou imunohistoquímica é o método de localização de um antígeno constituinte celular ou tecidual, utilizando anticorpos marcados, baseado na alta afinidade e especificidade que caracteriza a reação antígeno-anticorpo<sup>8</sup>. Conforme o tipo de marcador ligado ao anticorpo, o método ganha nomenclatura específica, por exemplo: marcadores fluorescentes - imunofluorescência; marcadores enzimáticos como a peroxidase - imunoperoxidase.

Os marcadores fluorescentes, como a fluoresceína isotiocianato (FITC), foram os primeiros a serem utilizados; para sua visualização há necessidade de microscópio de campo escuro com filtros adequados. No caso da FITC, quando excitada por comprimento de onda de 490 nm, emite fluorescência verde clara<sup>20</sup>. Uma das utilizações da imunofluorescência é a localização de neuropeptídeos em fibras nervosas, que, em cortes espessos, com fixação adequada, permite observar o trajeto sinuoso das fibras pelo tecido estudado<sup>9</sup>.

Uma desvantagem da imunofluorescência é que a marcação não é permanente, pois a maioria dos marcadores tende a perder sua fluorescência com o tempo, principalmente sob a ação de luz<sup>8</sup>.

Tecidos fixados em formalina tendem a ser autofluorescentes, e, quando contêm catecolaminas, podem ser induzidos a emitir fluorescência específica de cor aproximada à emitida pela fluoresceína<sup>21</sup>.

Os neuropeptídeos podem sofrer degranulação e eliminação das fibras por estímulos químicos e mecânicos. A técnica de coleta do fragmento poderia, portanto, influenciar a presença dos neuropeptídeos pela utilização de medição tópica (anestésicos e vasoconstritores) e pela manipulação mecânica, influenciando os resultados de imunofluorescência<sup>5</sup>. A coleta de mucosa nasal da concha inferior ou média é citada sem detalhes técnicos<sup>2,3,6,22</sup>.

O método de fixação do tecido a ser investigado é de crucial importância para o sucesso da marcação imunológica. Não existe um método ideal, pois tanto o antígeno quanto o tecido em questão vão requerer um tipo específico de fixação. A boa preservação da arquitetura do tecido permite que o antígeno seja localizado em seu contexto biológico, sendo esta uma das características que reveste o método de marcação imunológica de relevância<sup>8</sup>.

Há dois tipos de soluções fixadoras empregadas mais freqüentemente no preparo de lâminas de histologia, os aldeídos, que apesar de promoverem boa preservação do tecido podem afetar a antigenicidade dos peptídeos para imunofluorescência; e os precipitantes, que afetam menos a estrutura antigênica dos peptídeos mas podem não evitar sua dispersão<sup>23</sup>.

Para imunofluorescência, os fixadores mistos, como a solução de Zamboni (ácido pícrico e paraformaldeído tamponado), são indicados por equilibrarem estes aspectos<sup>24</sup>.

O pH, tempo de fixação e temperatura também influenciam o grau de fixação do tecido e podem comprometer a antigenicidade dos peptídeos<sup>25</sup> e grande variação destes aspectos técnicos é encontrada na literatura<sup>2,3,6,22</sup>.

O tecido pode ser congelado fresco, ou seja, sem processo de fixação para a realização de imunofluorescência, mas sua estrutura não fica tão bem preservada quando comparada ao material fixado. Por outro lado, os problemas apresentados pelos fixadores são eliminados.

Entretanto, a manipulação de tecido não previamente fixado requer mais cuidados, pois suas proteínas constituintes têm maior chance de se difundirem<sup>8</sup>. De qualquer maneira, a imediata fixação ou congelamento do tecido antes que este tenha suas proteínas solubilizadas durante o processo de decomposição, é fundamental para os objetivos da marcação imunológica<sup>23</sup>.

A armazenagem ideal para imunofluorescência é o congelamento, pois a inclusão em parafina constitui barreira para a penetração dos anticorpos<sup>26</sup>. A técnica de congelamento, temperatura de armazenagem e espessura de corte no criostato variam nos trabalhos que descrevem imunofluorescência para neuropeptídeos na mucosa nasal humana<sup>2,3,6,22</sup>.

O espécime congelado, se excessivamente seco, pode dificultar o corte em criostato, sendo que o cuidado em sua armazenagem em eliminar o ar das circunvizinhanças do tecido pode ser realizado<sup>25</sup>.

O preparo de lâminas requer cuidado quanto à aderência do corte. Existem preparados comercialmente disponíveis para este fim, assim como lâminas previamente preparadas. Para imunofluorescência, isto é importante devido à reação longa e exposição a lavagens<sup>8</sup>.

A documentação de lâminas através de fotografia microscópica apresenta dificuldades quanto à instabilidade de fluorescência<sup>8</sup>.

A imunofluorescência presta-se a informações qualitativas, principalmente. Contudo alguns autores desenvolveram métodos para sua quantificação, automatizada ou não, que permitissem comparações<sup>3,6,22</sup>.

Uma vez verificada a importância dos neuropeptídeos na mucosa nasal humana e a complexidade e variabilidade de técnicas de imunofluorescência em sua pesquisa, o objetivo deste trabalho é submeter uma técnica de imunofluorescência para VIP à avaliação, a fim de que seja considerada sua utilidade na pesquisa acerca deste assunto.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram coletados fragmentos da mucosa nasal de oito pacientes submetidos a cirurgias nasais para obstrução nasal: septoplastias, turbinectomias e rinosseptoplastias. O presente estudo teve aprovação pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá.

A autorização para a coleta de material foi feita pelo paciente ou responsável, mediante assinatura do termo de consentimento.

Foram excluídos pacientes com riscos cirúrgico ou anestésico elevados.

Não houve idade mínima ou máxima para a inclusão.

Os pacientes foram orientados a suspender a medicação antiinflamatória, hormonal ou não, que porventura estivessem utilizando, além de anti-histamínicos, sistêmicos ou tópicos, ou outra medicação ou substância que pudesse influenciar os resultados por pelo menos uma semana antes da coleta, desde que não houvesse contra-indicação para a suspensão. Após a coleta, seguiu-se o procedimento cirúrgico, cuja técnica e curativo não diferiram do procedimento de rotina.

O acompanhamento pós-operatório, seus cuidados e medicação não diferiram da rotina habitual para esse tipo de cirurgia.

Os fragmentos foram coletados sem infiltração da mucosa nasal, porém com vasoconstrição tópica com adrenalina 1: 10.000, por cinco minutos, com os pacientes em anestesia geral, com o cuidado de não se utilizar indução inalatória. Do mesmo modo, houve cuidado em evitar-se manipulação excessiva no ato da coleta, o que foi facilitado pela vasoconstrição tópica e minimização do sangramento. Foi coletado um fragmento da concha nasal inferior de cada paciente, a partir de em torno de 1,0cm de sua extremidade anterior, de 1,0 a 2,0cm de comprimento por 0,3 a 1,0cm de largura e espessura variável do lado que apresentou acesso mais fácil.

A seguir descrevem-se os procedimentos de fixação e armazenagem:

Fixação imediata em solução de Zamboni (paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0,4% em tampão fosfato), por 6 horas a 4°C; lavagens repetidas com tampão fosfato salino

0,1 M pH 7,4 (PBS), por 12 horas; crioproteção em solução de sacarose 18% em PBS 0,1M, por 24 horas; congelamento em nitrogênio líquido, após terem sido envolvidos em meio de embebição para tecidos congelados (O.C.T. 4583 compound - Tissue-Tek); armazenagem em freezer de -70°C. Posteriormente, foram feitos cortes seriados de 14µm em criostato e dispostos em lâminas previamente preparadas com o adesivo organocilano 2% em acetona e armazenadas a -1°C. Com o intuito de observar a estrutura histológica da mucosa nasal e a preservação do tecido através do método de fixação empregado, a cada quatro cortes para reação de imunofluorescência foram coletados dois cortes para coloração hematoxilina-eosina (HE). Para cada fragmento de mucosa nasal foram obtidos, ao final, oito cortes para imunofluorescência e quatro para HE. Os cortes para imunofluorescência foram dispostos em duas lâminas, totalizando 16 ao final.

□

### **Reação de Imunofluorescência**

Para realização da técnica, foi adquirido kit para imunofluorescência para VIP: Immunofluorescence kit for VIP (human, porcine, rat) Peninsula Laboratories, código PENI-IFK7161.

As reações foram realizadas em duas sessões, com quatro casos cada, em semanas diferentes. A seguir, os passos da reação são descritos.

#### **1º dia:**

As lâminas foram trazidas à temperatura ambiente e lavadas por três vezes, durante dez minutos cada, com tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, e escorridas; aplicaram-se 200µl de soro de cabra (1: 10) sobre as lâminas, sendo então incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida; as lâminas foram escorridas; aplicaram-se 200µl de anticorpo primário (1: 200) ou controle negativo e incubaram-se as lâminas a 4°C por 24 horas na mesma câmara.

#### **2º dia:**

Realizaram-se três lavagens de dez minutos cada com PBS 0,1M; as lâminas foram escorridas e o excesso enxugado com papel absorvente; aplicaram-se 200 µl de anticorpo secundário (1: 100), as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos na mesma câmara; foram efetuadas três lavagens de dez minutos com PBS 0,1M; as lâminas foram escorridas e o excesso enxugado com papel absorvente; as lâminas foram montadas com lamínula e glicerina em PBS (9: 1).

Em todos os passos, teve-se o cuidado de não permitir que as lâminas secassem e de não tocar no tecido.

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio de campo escuro com epi-iluminação (Zeiss axioscan) com filtro de 490nm de comprimento de onda, acoplado à câmara de fotografia convencional. Foi realizada documentação fotográfica de campos que apresentavam diferentes graus de

marcação (veja a seguir), em aumentos de 20 e 40 vezes, com tempo de exposição de 30 ou 60 segundos, conforme a intensidade de luz do campo. Utilizou-se o filme Pro-Image 100 da Kodak. Na revelação, as fotos foram levemente escurecidas para que as imagens ficassem mais próximas das visualizadas no microscópio; entretanto, isto não foi condição para que as fotos pudessem ser adequadamente avaliadas.

### **Avaliação da Técnica**

Quanto à especificidade: uma lâmina extra de um dos casos foi utilizada como controle negativo, através da omissão do anticorpo primário.

A lâmina foi avaliada às cegas pelo autor e outro observador, conjuntamente com as demais lâminas de mais três casos quanto à presença ou não de marcação.

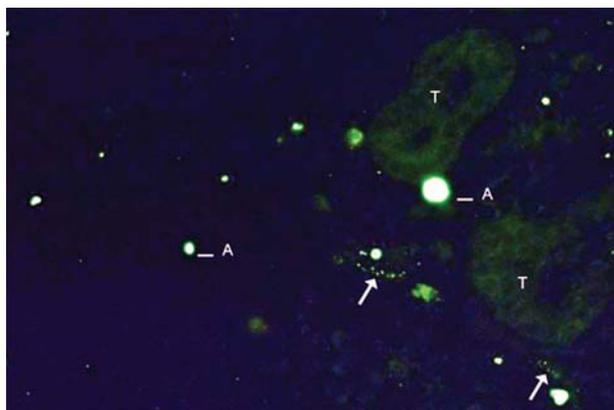
Quanto à sensibilidade: a reação foi aplicada a intestino de rato em preparado total, tecido com conhecida presença de fibras e corpos celulares contendo VIP, com o intuito de testar a sensibilidade do anticorpo. A seqüência de aminoácidos do VIP é comum entre humanos, ratos e porcos, podendo o kit ser aplicado a qualquer uma dessas espécies. As lâminas foram avaliadas por um observador familiarizado com esse tecido quanto à presença de marcação.

Quanto à reprodutibilidade de execução: seguiu-se a mesma técnica desde a coleta e manipulação do tecido para os oito casos (16 lâminas). Definiram-se dois parâmetros: com marcação e sem marcação. Foi avaliado, portanto, o número de lâminas que apresentou marcação, do total de lâminas realizadas, para que se concluísse a reprodutibilidade de execução da técnica.

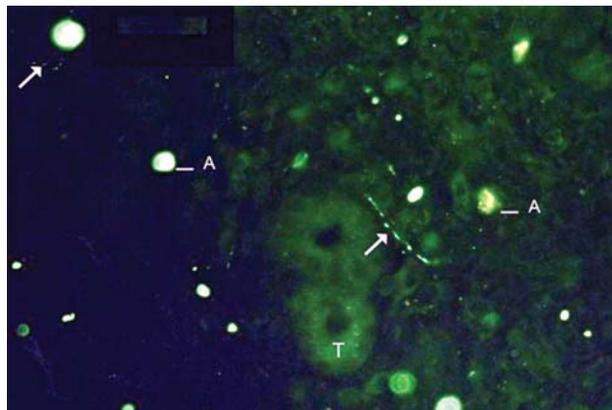
Quanto à reprodutibilidade da interpretação de resultados: definiram-se padrões de graus de marcação quanto ao número de fibras marcadas da seguinte maneira: grau zero: nenhuma fibra no campo; grau um: raras fibras; grau dois: esparsas ou pouco numerosas; grau três: numerosas; e finalmente, grau quatro: muito numerosas. Para cada grau associaram-se exemplos com fotografias de campos que ilustrassem essa classificação (Figuras 1 a 4).

A documentação produziu fotografias de campos microscópios aleatórios que ilustrassem os cinco graus de marcação. O número total de fotos foi de 171 distribuídas pelos sete casos que apresentaram marcação. As fotos do caso que não houve marcação não foram incluídas para análise.

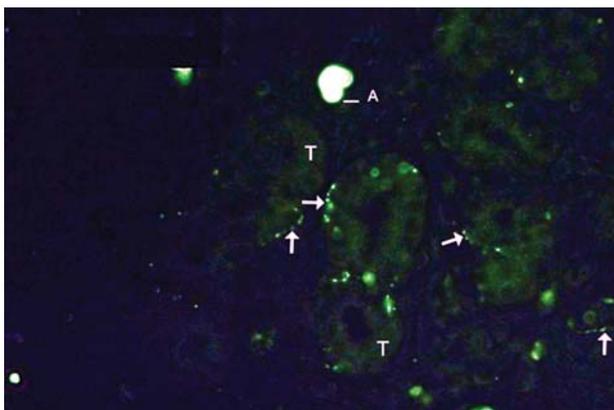
Cinco observadores, "A" a "E", foram apresentados aos exemplos que ilustravam os graus de marcação, orientados quanto ao seu significado e solicitados a classificarem as fotos de modo independente. Três observadores são Professores Doutores do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM com experiência em imunofluorescência em tecidos de animais e dois são alunos de pós-graduação em ciências farmacêuticas sem experiência no assunto. O autor foi o sexto observador: "F".



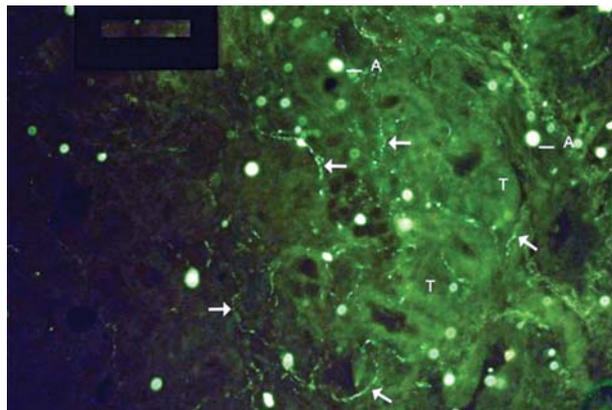
**Figura 1.** Exemplo de marcação grau 1. Raras fibras identificadas (setas). Artefato (A) e autofluorescência do tecido (T).



**Figura 2.** Exemplo de marcação grau 2. Fibras esparsas (setas). Autofluorescência do tecido (T) e artefatos (A).



**Figura 3.** Exemplo de marcação grau 3. Fibras numerosas (setas). Autofluorescência do tecido (T) e artefatos (A).



**Figura 4.** Exemplos de marcação grau 4. Fibras muito numerosas (setas), sendo possível acompanhar seus trajetos entremeeando estruturas glandulares. Autofluorescência do tecido (T) mais intensa e artefatos (A).

Os graus de marcação atribuídos pelos seis observadores foram comparados entre si quanto à coincidência ou disparidade na interpretação dos resultados, por meio do teste de Kruskal-Wallis para variáveis não-dependentes.

## RESULTADOS

Quanto à especificidade: o controle negativo não mostrou marcação após avaliação às cegas por dois observadores.

Quanto à sensibilidade: o método mostrou marcação ao ser aplicado em preparado total de intestino de rato, mostrando-se sensível ao VIP.

Quanto à reprodutibilidade de execução: das 16 lâminas confeccionadas, 14 mostraram-se com marcação ao VIP (87,5%).

Quanto à reprodutibilidade de interpretação dos resultados: as notas atribuídas às fotos pelos seis observadores foram comparadas entre si através do teste de Kruskal-Wallis, o qual mostrou existir diferença entre as interpretações dos observadores ( $p < 0,05$ ). O observador "E" diferiu de "A", "B" e "D" mas não de "C" e "F" (Tabela 1). Considerando os outros cinco observadores, há uma uniformidade na interpretação dos resultados.

A distribuição das notas atribuídas a cada foto pelos observadores pode ser avaliada no Gráfico 1.

## DISCUSSÃO

A revisão aqui apresentada mostra a inquestionável importância dos neuropeptídeos na mucosa nasal humana quanto à sua fisiologia e também fisiopatologia em doenças.

A inervação nasal participa profundamente dos fenômenos fisiológicos relacionados aos reflexos de defesa das vias aéreas. Além dos neurotransmissores clássicos, muito se têm estudado acerca dos neuropeptídeos. Algumas de suas características gerais os diferenciam bastante dos neurotransmissores clássicos, dentre elas o fato de sua renovação ocorrer por nova síntese em nível do corpo celular e não por recaptura na fenda sináptica, de tal modo que seus efeitos são menos dramáticos<sup>5</sup>. Desta maneira, são alvos de pesquisas com fins terapêuticos, pois antagonistas de neurotransmissores com essas características tendem a ter menos efeitos colaterais<sup>4</sup>.

Tanto a inervação sensorial quanto a simpática e a parassimpática contêm neuropeptídeos na mucosa nasal cujas ações têm sido investigadas.

Uma vez constatada a importância dos neuropeptídeos na fisiologia e fisiopatologia nasais, é de interesse que esse conhecimento cresça e conceitos sejam solidificados. Portanto, quanto maior o número de pesquisas sobre esse assunto, mais rapidamente o conhecimento sobre neuro-

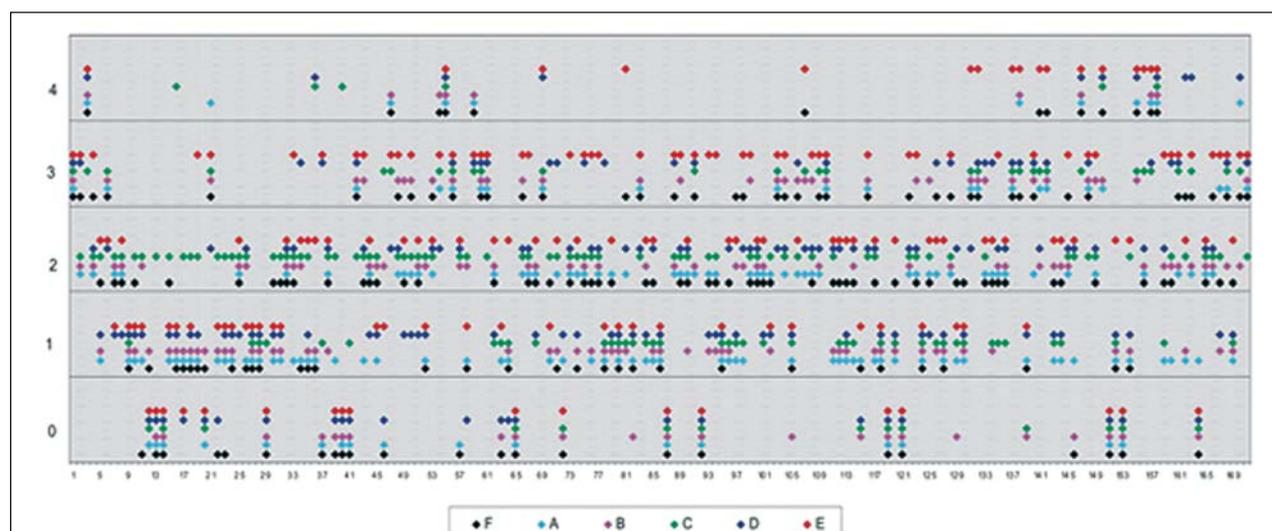
peptídeos na mucosa nasal humana poderia apontar perspectivas de utilidade clínica.

As ações dos neuropeptídeos no sistema respiratório, especificamente na mucosa nasal, têm sido estudadas através de experimentos in vivo e in vitro, tanto em animais como no homem, como exemplificado nos trabalhos citados.

A presença dos neuropeptídeos nas fibras nervosas com fidelidade morfológica somente é realizada por meio de técnicas de marcação imunológica. Métodos quantitativos furtam-se de informações morfológicas. Por sua vez, a marcação imunológica é de difícil quantificação, reservando-se a fornecer informações qualitativas principalmente. A investigação de neuropeptídeos na mucosa nasal, tanto quantitativa como qualitativa, traz informações a respeito da fisiologia e fisiopatologia nasais. Comparações entre indivíduos normais e portadores de rinite alérgica através dessas técnicas têm sido realizadas e muito acrescentado ao conhecimento desse assunto<sup>3</sup>. Na intenção de proceder estudo nesse campo, deparou-se com uma barreira considerável do ponto de vista técnico, que caracteriza a reação de marcação imunológica. A literatura aplicada à rinologia mostra a metodologia de forma simplista, omitindo aspectos que se percebeu posteriormente serem relevantes, além do que há muitas variações nos detalhes técnicos entre os trabalhos levantados. Desde a coleta da mucosa nasal já se verifica a carência de informações na literatura aplicada. São raros os autores que descrevem a técnica, citando simplesmente “coleta”<sup>1-3,15,22</sup>. Aspectos quanto à vasoconstrição tópica, infiltração, luxação da concha e material não são descritos, via de regra. Por ser a mucosa nasal um tecido extremamente reativo a estímulos, o que leva à liberação dos neuropeptídeos de suas fibras, atenção especial foi dada ao procedi-

**Tabela 1.** Resultado do teste de Kruskal-Wallis demonstrando diferença entre a interpretação de “E” e as interpretações de “A”, “B” e “D” ( $p < 0,05$ ).

	A	B	C	D	E	F
A		1,0000	1,0000	1,0000	0,0043	0,1507
B	1,0000		1,0000	1,0000	0,0459	0,8431
C	1,0000	1,0000		1,0000	0,5085	1,0000
D	1,0000	1,0000	1,0000		0,0204	0,4746
E	0,00433	0,0459	0,5085	0,0204		1,0000
F	0,1507	0,8431	1,0000	0,4746	1,0000	



**Gráfico 1.** Distribuição das notas (eixo Y) atribuídas às fotos (eixo X) por cada observador (pontos coloridos).

mento de coleta durante a cirurgia nasal, pois poderia influenciar os resultados. Desde o estímulo químico, que em teoria pode levar à degranulação e eliminação dos neuropeptídeos, observou-se o cuidado de se evitar o uso de gases anestésicos na máscara durante a indução da anestesia geral<sup>5</sup>. Após tentativas de coletar fragmentos da mucosa nasal sem vasoconstrição, na intenção de se minimizar o estímulo, observou-se que o procedimento era dificultado pelo prejuízo da visão do campo operatório, dado o sangramento, o que poderia resultar em excessiva manipulação mecânica e fragmentação do tecido, não desejável para a técnica em questão. Chegou-se então à conclusão de se aplicar vasoconstrição, além de luxação medial da concha. A coleta foi realizada no início da cirurgia, e não depois, pois manipulação excessiva já teria ocorrido, assim como a necessidade de infiltração.

Os métodos de fixação empregados, assim como o tempo, também variam na literatura, sendo as soluções fixadoras mistas mais empregadas<sup>8,24</sup>. Atenção especial foi dirigida ao tempo de fixação, já que quanto mais longo, apesar da melhor preservação do tecido, o risco de perda de antigenicidade, por sua vez, também aumenta<sup>25</sup>. Os procedimentos de fixação foram seguidos conforme trabalho publicado<sup>6</sup> com algumas adaptações: maior tempo (seis horas) para permitir penetração completa da solução fixadora e manutenção a 4°C para limitar a fixação excessiva com risco de perda de antigenicidade. Uma vez obtida boa fixação do tecido, constatada pela observação das lâminas coradas com HE e presença de marcação pela imunofluorescência, o método de fixação foi considerado adequado.

O fato de o tecido apresentar autofluorescência com a solução fixadora empregada<sup>21</sup> permitiu identificação de componentes da mucosa nasal, como glândulas e vasos, constituindo uma vantagem.

A armazenagem ideal para marcação imunológica é o congelamento<sup>23</sup>. Observaram-se também diferentes técnicas, apesar de não detalhadas, e temperaturas de armazenagem na literatura aplicada<sup>3,22</sup>. A temperatura de armazenagem de -70°C foi escolhida no intuito de melhor preservação do tecido, considerando-se a fragilidade dos neuropeptídeos.

Observou-se também que o congelamento com o espécime já envolto em meio para embebição para corte em criostato facilitava este procedimento, por vezes dificultado pelo ressecamento do tecido, quando não se tomava este cuidado.

Diferentes espessuras são citadas com referência ao estudo de fibras por imunofluorescência. Maiores espessuras de corte, a partir de 10µm, permitem o acompanhamento das fibras por um trajeto mais longo, facilitando sua identificação e tornando o resultado mais elucidativo e rico.

A documentação foto-microscópica de imunofluorescência de fibras nervosas exige grande sensibilidade e resolução. A fotografia convencional preencheu perfeitamente

estes requisitos. Equipamentos de captura digital de imagem com estas características são excessivamente caros.

Percebeu-se neste trajeto a enorme distância entre a visão aplicada, e por vezes restrita do otorrinolaringologista, e a visão de pesquisador, levando aos caminhos tortuosos descritos, os quais, depois de percorridos, levaram a uma metodologia aparentemente satisfatória. Para confirmar essa impressão, foi proposta uma avaliação do método quanto a sua especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade de execução e de interpretação de resultados.

Os resultados mostraram ser o método específico, uma vez que o controle negativo não apresentou marcação. A marcação imunológica, por excelência, é um método específico, pois se baseia na reação antígeno-anticorpo. Entretanto, são necessários conhecimento e familiaridade quanto à morfologia do tecido em questão ao se interpretar imagens de imunofluorescência de fibras nervosas. Foi observada muita fluorescência de fundo e artefatos por restos de fluoresceína, sendo que um observador pouco envolvido pode levar a resultados excessivamente falso-positivos.

A sensibilidade do aparato laboratorial foi testada em controle positivo em intestino de rato, tecido rico em VIP, inclusive em corpos celulares. Uma vez confirmada a eficiência do método naquele tecido, é razoável admitir que ele é suficientemente sensível ao serem interpretados resultados na mucosa nasal humana. Não se pode, contudo, afirmar que todo o VIP presente no tecido *in vivo* foi demonstrado pelo método, pois todas as etapas, desde obtenção, fixação e armazenagem, incluem fatores que podem levar à diminuição de sua presença (degranulação e degradação enzimática) ou à perda de antigenicidade. Não há um padrão-ouro a ser comparado.

A reprodutibilidade da execução foi considerada satisfatória e o detalhamento técnico apresentado pode colaborar com novos experimentos que usufruam desses conhecimentos.

A diferença significativa entre as notas atribuídas às fotos pelos observadores revela a necessidade do conhecimento morfológico de como as fibras se apresentam pela imunofluorescência. Somente um dos observadores destoou dos demais, sendo ele um aluno de pós-graduação. Apesar disto, a rigor, nenhum dos observadores tinha experiência na interpretação específica em mucosa nasal humana. Eram eles três pesquisadores que trabalham com marcação imunológica de neuropeptídeos em tecidos de animais que em geral, contêm, além de nervos, gânglios e corpos celulares, apresentando, portanto, marcação com padrão diferente. Os outros dois eram alunos de pós-graduação, incluindo o que diferiu dos demais na interpretação dos resultados. A interpretação do observador "F", ou seja, do autor, foi dotada de mais informação, visto que, além das fotos, observou as lâminas no microscópio, que sem dúvida apresenta as imagens com mais detalhes, além de constituir uma análise dinâmica. Além disso, o autor foi o observador mais envolvi-

do com o assunto e com melhores condições teóricas de interpretar as imagens. Individualmente, nenhum dos outros cinco observadores diferiram do autor.

Considerando esses aspectos, deduz-se que o método é reprodutível em sua interpretação de resultados desde que haja familiaridade com o aspecto que as fibras marcadas se apresentam na mucosa nasal.

---

### CONCLUSÃO

---

O método proposto de imunofluorescência para VIP na mucosa nasal humana é suficientemente específico, sensível e reprodutível, sendo considerado útil em pesquisa sobre neuropeptídeos na mucosa nasal humana.

---

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Riederer A, Fisher A, Knipping S, Unger J, Lange W, Kastenbauer E. Basic innervation pattern and distribution of classic autonomic neurotransmitters in human Nasal mucosa vasculature. *Laryngoscope* 1996; 106: 286-91.
2. Stjärne P, Lundblad L, Ånggard A, Hökfelt T, Lundberg JM. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide: co-existence in sensory nerves of the nasal mucosa and Effects on blood flow. *Cell Tissue Res* 1989; 256: 439-46.
3. Fang SY, Shen, CL. Neuropeptidergic innervation of human nasal mucosa in various pathological conditions. *Proc Natl Sci Council Repub China B* 1997; 21 (1): 8-12.
4. Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQD, Segeyev V, Ubink R, Diez M. Neuropeptides - an overview. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1337-56.
5. Solway J, Leff AR. Sensory neuropeptides and airway function. *J Appl Physiol* 1991; 71 (6): 2077-87.
6. Heppt W, Peiser C, Cryer A, Dinh QT, Zweng M, Witt C. Innervation of human nasal Mucosa in environmentally triggered hyperreflectoric rhinitis. *J Occup Environ Med* 2002; 44 (10): 924-9.
7. Kramer NS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance p receptors. *Science* 1998; 281: 1640-5.
8. Polak JM, Van Noorden, S. Requirements. In: Polak JM, Van Noorden, S. *Introduction to Immunocytochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag Inc; 1997. p.11-31.
9. Bishop AE, Polak JM, Bloom SR, Pearse AGE. A new Universal technique for the immunocytochemical localization of peptidergic innervation. *J Endocrinol* 1978; 77: 25-26. Ferret trachea. *Exp Lung Res* 1987; 12: 21-36.
10. Baraniuk JN, Kaliner MA. Neuropeptides and nasal secretion. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 620-7.
11. Hunter DD, Dey RD. Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium. *Neuroscience* 1998; 83 (2): 591-9.
12. Salonen RO, Webber SE, Widdicombe JG. Effects of neuropeptides and capsaicin on the canine tracheal vasculature in vivo. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 1262-70.
13. Braustein G, Fajac I, Lacronique J, Frossard N. Clinical and inflammatory responses to exogenous tachykinins allergic rhinitis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 630-5.
14. Braustein G, Buvry A, Lacronique J, Desjardins N, Frossard N. Do nasal mast cells release histamine on stimulation with substance P in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1994; 24 (10): 922-9.
15. Hanf G, Schierhorn K, Brunnée T, Noga, O, Verges D, Kunkel G. Substance P induced histamine release from nasal mucosa of subjects with and without allergic rhinitis. *Inflamm Res* 2000; 49: 520-3.
16. Joos GF, Pawels RA, Van Der Straeten. The effect of nedocromil sodium on the bronchoconstrictor effect of neurokinin A in subjects with asthma. *J Allerg Clin Immunol* 1989; 83: 663-8.
17. Fajac I, Frossard N. Neuropeptides de l'innervation nasale et rhinite allergique. *Rev Mal Respir* 1994; 11(4): 357-67.
18. Baraniuk JN, Lundgren J, Goff J. Gastrin releasing peptide (GRP) in human nasal mucosa. *J Clin Invest* 1990; 85: 998-1005.
19. Mosimann BL, White MV, Hohman RJ, Goldrich MS, Kaulbach HC, Kaliner MA. Substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide increase in nasal secretion after allergen challenge in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 95-104.
20. Riggs JL, Seiwald RJ, Burkhalter JH, Downs CM, Metcalf T. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am J Pathol* 1958; 34: 1081-97.
21. Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 1962; 10: 348-54.
22. Figueroa JM, Mnsilla E, Suburo AM. Innervation of nasal turbinate blood vessels in rhinitic and nonrhinitic children. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1959-66.
23. Pogue KM, Johnston CF. Sample preparation for peptide immunocytochemistry. In Irvine GB, Williams CH. *Methods in molecular biology, neuropeptides protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 1997. 277-82.
24. Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron Microscopy. *Nature (London)* 1967; 216: 173-4.
25. Pearse AGE, Polak M. Bifunctional reagents as vapour and liquid phase fixatives for immunocytochemistry. *Histochem J* 1975; 7: 179-86.
26. Sampuram SR, Vani K, Messana E, Bogen AS. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am Clin J Pathol* 2004; 121: 190-9.