

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**ESTUDO DA APOPTOSE EM CULTURA
DE PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS
SUBMETIDOS AO EFEITO DA MITOMICINA C**

CLÁUDIA PENA GALVÃO DOS ANJOS

Belo Horizonte
2010

CLÁUDIA PENA GALVÃO DOS ANJOS

**ESTUDO DA APOPTOSE EM CULTURA
DE PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS
SUBMETIDOS AO EFEITO DA MITOMICINA C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia.

Linha de Pesquisa: Alterações morfológicas, resposta inflamatória e repercussões sistêmicas nas rinosinusites.

Orientador: Prof. Livre Docente Roberto Eustáquio Santos Guimarães.

Coorientadores: Prof. Doutor Anilton César Vasconcelos.

Prof. Doutor Paulo Fernando Tormin Borges Crosara.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof. Marcelo Dias Sanches

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof^a. Ivana Duval de Araújo

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Marcelo Eller Miranda

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia

Prof. Edson Samesima Tatsuo

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

Juliano Alves Figueiredo (Disc.Titular)

Aos meus pais, Walter e Lêda,
pelo apoio incondicional.

Ao meu marido, Gustavo,
pelo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante presença.

Ao Prof. Roberto Eustáquio S. Guimarães, por estar presente na minha formação científica desde a graduação, pelo incentivo e exemplo de dedicação profissional.

Ao Prof. Anilton César Vasconcelos, pela dedicação, orientação e oportunidade de aprendizado.

Ao Prof. Paulo Fernando T. B. Crosara, pela oportunidade de aprendizado, por compartilhar sua experiência e orientação.

A todos os colegas do Laboratório de Apoptose, especialmente Núbia, Soraia e Bárbara, pela paciência, disponibilidade e apoio na execução das técnicas de laboratório.

À Grazielle Alves Ferreira, aluna do curso de mestrado em Estatística, pelo interesse, orientação na análise estatística e disponibilidade.

À Professora Emília Sakurai, do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, pela colaboração.

Aos Professores do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da UFMG, pela participação fundamental na minha formação profissional.

À minha família, pelo amor e apoio incondicional.

A Hamilton e Maria José, pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.

RESUMO

A etiopatogênese da polipose nasal ainda não foi esclarecida. Os eosinófilos constituem as principais células do infiltrado inflamatório e estão relacionados com a perpetuação do processo inflamatório na rinossinusite crônica com pólipos nasais. Atualmente, o tratamento dos pólipos nasais enfoca a resolução do processo inflamatório a partir da indução de apoptose. A mitomicina C (MMC) é um agente quimioterápico e tem sido usada na Otorrinolaringologia para evitar a formação de sinéquias e estenose após cirurgias endonasais. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da MMC no índice apoptótico (IA) de pólipos nasais de pacientes portadores de polipose nasal eosinofílica. Este é um estudo experimental com amostra de biópsia de 15 pacientes com polipose nasal eosinofílica com infiltrado inflamatório igual ou superior a 40%. Cada fragmento foi dividido em dois grupos. No grupo experimental aplicou-se MMC por cinco minutos, na dosagem de 400 µg/mL. Após a aplicação da droga, as culturas foram lavadas com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI). O grupo-controle foi submetido ao mesmo processo, mas utilizando-se somente meio de cultura RPMI. Os fragmentos contidos nos dois primeiros compartimentos, controle e experimento, foram imediatamente submetidos ao preparo para histopatologia. O outro par de amostra, contendo controle e experimento, foi incubado em meio RPMI por 12 horas em estufa a 37⁰C e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Ao final de 12 horas, os fragmentos foram retirado para exame histopatológico. O índice apoptótico foi determinado pela morfometria na coloração hematoxilina-eosina (HE) e pela reação de *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL). A comparação dos dois grupos, controle e experimento, demonstrou diferença estatisticamente significativa (p< 0,001) no índice apoptótico das culturas incubadas por 12 horas. Houve correlação entre o IA avaliado pela morfometria e o IA avaliado pela reação de TUNEL. Concluiu-se que a MMC atua sobre os pólipos nasais eosinofílicos aumentando o índice apoptótico em eosinófilos *in vitro*.

Palavras-chave: Pólipos nasais. Eosinófilos. Apoptose. Mitomicina C.

ABSTRACT

The etiopathogenesis of nasal polyps still is to be clarified. Eosinophils are possibly the most important inflammatory cells in the pathogenesis of rhinosinusitis with nasal polyposis. The treatment of nasal polyps involves an important role for apoptosis in the removal of inflammatory cells and resolution of inflammatory processes. Mitomycin C(MMC) is a chemotherapeutic agent and has been used in otorhinolaryngology to reduce stenosis and scar formation after surgery. The aim of this study was to evaluate the MMC action in apoptotic index (AI) in nasal polyps from eosinophilic nasal polyposis patients. This is a comparative and auto-matched experimental study with 15 in vitro fragment biopsies cultures from nasal polyps with eosinophilic infiltration percentage equal or superior to 40%. Each fragment was divided in two groups. The polyps fragments from the two groups were cultured at 37⁰ C in 5% CO₂ was stored for study at zero and twelve hours. The culture from the group test was treated with 400 µg/ml MMC concentration for 5 minutes. The AI was determined by histopathology by staining each cultured specimen with hematoxylin and eosin(HE) and by analysis of apoptotic DNA fragmentation (nick end labeling technic).Comparing the two groups, with and without MMC treatment, there was a statistic significance difference (p<0,001) at 12 hours in AI after MMC treatment. MMC was able to induce apoptosis in eosinophilic nasal polyps. There was no difference between the AI result in histopathology and by analysis of DNA fragmentation.This study showed that mitomycin C acts in nasal polyps by inducing eosinophils apoptosis.

Key-words: Nasal polyps. Eosinophils. Apoptosis. Mitomycin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCL-2	<i>B-cell lymphoma protein-2</i>
CD	<i>Compact disc</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Coeficiente de variação
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócito macrófago
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-eosina
IA	Índice apoptótico
IAP	Proteína inibidora da apoptose
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LTB	Leucotrieno B4
MCP	Proteína quimiotrópica de monócitos
MMC	Mitomicina C
PAF	Fator de ativação plaquetário
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PNSE	Polipose nasossinusal eosinofílica
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TdT	Transferase terminal de deoxinucleotídeos
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento endotelial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Fluxograma da reação de TUNEL.....	29
FIGURA 2 Microfotografia de pólipos nasais eosinofílicos tratados com mitomicina C e incubados por 12 horas.....	32
FIGURA 3 Microfotografia de pólipos nasais eosinofílicos não tratados com mitomicina C e incubados por 12 horas.....	32
FIGURA 4 Microfotografia de pólipos nasais eosinofílicos não tratados com mitomicina C, incubados por 12 horas, com eosinófilos em apoptose com coloração acastanhada.....	37
FIGURA 5 Microfotografia de pólipos nasais eosinofílicos tratados com mitomicina C, incubados por 12 horas.....	37

Gráficos

GRÁFICO 1 Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre controle zero hora e experimento zero hora.....	31
GRÁFICO 2 Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre controle 12 horas e experimento 12 horas.....	33
GRÁFICO 3 Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre controle zero hora e controle 12 horas.....	34
GRÁFICO 4 Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre experimento zero hora e experimento 12 horas.....	34
GRÁFICO 5 Índice apoptótico pela morfometria (n=15 pacientes).....	35
GRÁFICO 6 - Índice apoptótico (n=6 pacientes) avaliado pela reação de TUNEL.....	36
GRÁFICO 7 Índice apoptótico (n=6 pacientes) individual no controle zero hora, controle 12 horas e experimento 12 horas.....	38

GRÁFICO 8 Índice apoptótico (n=6 pacientes) individual pela reação de TUNEL no controle zero hora, controle 12 horas e experimento 12 horas..... 39

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 Aspectos clínicos.....	15
3.2 Histopatologia de pólipos nasais.....	15
3.3 Apoptose e pólipos nasais eosinofílicos.....	17
3.4 Mitomicina C.....	21
4 MÉTODOS.....	24
4.1 Seleção da amostra.....	24
4.2 Delineamento geral do estudo.....	25
4.3 Coleta do material.....	26
4.3.1 Biópsia do pólipo nasal para caracterização de eosinofilia.....	26
4.3.2 Biópsia de pólipo nasal para cultura.....	26
4.3.3 Meio de cultura utilizado.....	26
4.4 Análise morfométrica do índice apoptótico.....	27
4.5 Análise do índice apoptótico pelo TUNEL.....	28
4.5.1 Protocolo da reação de TUNEL.....	28
4.5 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Índice apoptótico pela coloração HE.....	31
5.2 Índice apoptótico pela reação de TUNEL.....	35
5.3 Correlação entre o índice apoptótico pela morfometria e reação TUNEL	38

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO E APÊNDICES.....	50

1 INTRODUÇÃO

Polipose nasossinusal eosinofílica (PNSE) é afecção inflamatória crônica proliferativa que acomete a mucosa nasal e os seios paranasais. Causa diferentes graus de obstrução da via aérea superior, com significativo impacto na qualidade de vida dos pacientes^{1,2}.

O mecanismo de desenvolvimento da PNSE não foi completamente esclarecido. Sabe-se que a resposta inflamatória está envolvida na sua formação. Supõe-se que os pólipos nasais sejam o estágio final de um complexo processo inflamatório, resultado de uma multiplicidade de etiologias.

Atualmente, os corticosteroides constituem a principal terapêutica clínica na PNSE, em decorrência de sua ação na diminuição do curso inflamatório. Todavia, as recidivas dos pólipos nasais ainda são frequentes. A busca por outras opções terapêuticas levou ao estudo de medicações que possam atuar no controle do processo inflamatório. Sabe-se que os eosinófilos desempenham importante papel na manutenção dessa evolução. A mitomicina C é droga antineoplásica e antibiótica extraída do *Streptomyces caespitosus* e tem sido usada como agente antiproliferativo³. Em Otorrinolaringologia, os trabalhos em humanos têm se concentrado principalmente na ação da mitomicina C na redução de sinéquias em cirurgias nasais endoscópicas⁴ e laríngeas⁵. Os trabalhos em animais e humanos corroboram a segurança do uso tópico da mitomicina C⁶.

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da mitomicina C no índice apoptótico dos eosinófilos em cultura de pólipos nasais eosinofílicos, por meio da morfometria e pela reação de *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação da mitomicina C *in vitro* nos eosinófilos dos pólipos nasais eosinofílicos.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar a ocorrência de apoptose em eosinófilos no infiltrado inflamatório de pólipos nasais eosinofílicos tratados *in vitro* com mitomicina C.
- Confirmar os resultados do índice apoptótico obtido pela morfometria com os resultados obtidos pela reação de TUNEL.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos clínicos

A polipose nasossinusal eosinofílica (PNSE) é afecção inflamatória crônica proliferativa da mucosa nasal e dos seios paranasais. Os pólipos nasais acometem principalmente a região do meato médio e causam diferentes graus de obstrução nasal^{1,2}. A incidência da PNSE é semelhante em pacientes atópicos e na população em geral^{2,7}. A polipose nasal é considerada um subgrupo da rinosinusite crônica, uma vez que é impossível diferenciar claramente as duas entidades⁸.

Geralmente, a polipose nasal é bilateral, tem mais incidência na quarta década de vida e acomete 2,7% da população, com predomínio de 2,2/1 no sexo masculino. Em cadáveres essa incidência varia de 26 a 42%, dependendo do método utilizado para investigação, rinoscopia anterior ou endoscopia nasal, respectivamente. A PNSE associa-se a: asma, rinite eosinofílica não-alérgica, intolerância à aspirina, sinusite fúngica eosinofílica e síndrome de Churg-Strauss. Sua frequência aumenta com a concomitante presença de asma brônquica⁹. Pacientes portadores de polipose nasossinusal eosinofílica e intolerância à aspirina tendem a apresentar acometimento paranasal de acentuada gravidade e mais chance de recidiva após tratamento cirúrgico¹⁰.

3.2 Histopatologia de pólipos nasais

Os pólipos nasais são constituídos por epitélio e estroma. Descreveram-se vários tipos de epitélio com predomínio do epitélio colunar pseudoestratificado ciliado com células caliciformes. Outros epitélios descritos são do tipo transicional e escamoso estratificado não-queratinizado¹.

As principais alterações morfológicas descritas em pólipos nasais são: espessamento da membrana basal com extensão para a submucosa, irregularidade de distribuição glandular, metaplasia escamosa da superfície do

epitélio e edema. As glândulas são esparsas e não apresentam inervação. O edema é proveniente do extravasamento de plasma através do endotélio dos capilares. O tecido polipoide é essencialmente livre de terminações nervosas. O componente celular é composto de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, plasmócitos e linfócitos¹.

A PNSE caracteriza-se histologicamente pela infiltração de granulócitos eosinófilos e é responsável por 86% dos casos de polipose nasal^{1,9,11}. Segundo Ingels, a caracterização da eosinofilia requer a presença de no mínimo quatro eosinófilos em quatro campos avaliados por microscopia ótica (aumento de 400 vezes, coloração hematoxilina-eosina)¹².

Os eosinófilos humanos apresentam diâmetro de 8 μm , com núcleo bilobulado e grânulos citoplasmáticos com intensa coloração pela eosina. Estão presentes no sangue e caracteristicamente nos tecidos com interface com o meio ambiente. Constituem 1 a 3% do total de células sanguíneas, cerca de 350 a 400 cels/mm³. Os eosinófilos podem expressar receptores para várias moléculas, incluindo imunoglobulinas (IgG, IgE, IgA), complemento (C1q, C3b/C4b, iC3b, C5a), quimiocinas (eotaxina, eotaxina-2, *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted* - RANTES, proteína quimiotrópica de monócitos - MCP-3, MCP-4), citocinas (interleucinas - IL-3, IL-5 e fator estimulante de colônia de granulócito macrófago - GM-CSF), mediadores lipídicos (fator de ativação plaquetário - PAF e leucotrieno B₄ - LTB₄) e esteroides. A interação dessas células é mediada por esses receptores. Os eosinófilos podem secretar grande quantidade de substâncias capazes de provocar intenso dano celular e tecidual. Entre essas substâncias têm-se proteínas catiônicas, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e radicais livres derivados do oxigênio¹³.

Alguns trabalhos foram conduzidos com o objetivo de correlacionar alterações histopatológicas com indicadores de qualidade de vida e gravidade da rinosinusite crônica avaliada por critérios tomográficos. Em um deles, a presença de eosinofilia tecidual (cinco eosinófilos por campo) foi o único achado histopatológico que se correlacionou com piores índices na avaliação endoscópica e tomográfica de pacientes com rinosinusite crônica. Entretanto, ao analisar o subgrupo de pacientes com PNSE, não houve correlação entre eosinofilia tecidual e os parâmetros analisados¹⁴. Em outro, conduzido pelos mesmos autores, a eosinofilia tecidual no pré-operatório de pacientes com

rinossinusite crônica correlacionou-se com pior evolução no pós-operatório em relação à melhora dos sintomas quando comparado com pacientes sem infiltração eosinofílica. O grau de infiltração eosinofílica que apresentou a melhor correlação com o prognóstico no pós-operatório foi de 10 eosinófilos por campo (aumento 400 vezes). A análise do subgrupo de pacientes com PNSE também não apresentou correlação entre eosinofilia e melhora ou piora dos indicadores de qualidade de vida no pós operatório¹⁵.

3.3 Apoptose e pólipos nasais eosinofílicos

O termo apoptose refere-se ao processo de morte celular dependente de ácido ribonucleico (RNA) e síntese proteica. Apoptose tem papel fundamental no desenvolvimento normal dos mamíferos e, especialmente, no desenvolvimento do sistema nervoso central e imune. Deficiências genéticas de genes apoptóticos podem resultar em anormalidades significativas. A apoptose envolve a ativação sequencial de caspases, da família das *Cys proteases*, e é regulada pela família de genes BCL-2 (*B-cell lymphoma protein-2*), composta de genes pró-apoptóticos e antiapoptóticos. O desenvolvimento evolutivo da apoptose é caracterizado por redundância, especialização funcional e mecanismos compensatórios de regulação a partir da duplicidade de genes. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido conduzidos com o objetivo de desvendar os inúmeros eventos envolvidos na cascata da apoptose¹⁶.

A célula em apoptose pode ser caracterizada morfológicamente pela fragmentação nuclear, formação de projeções digitiformes na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos. Ocorrida a apoptose, os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos, o que evita a liberação de constituintes internos da célula e a ativação de mediadores da inflamação - diferentemente do processo da necrose, em que ocorre permeabilização precoce da membrana plasmática. À microscopia óptica, as células em apoptose apresentam-se retraídas, tipicamente circundadas por um halo claro e possuem citoplasma acidófilo^{17,18}.

A evidenciação da fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico ocorre precocemente na apoptose e pode ser avaliada por meio da

reação de TUNEL¹⁹. Uma das etapas dessa reação histoquímica consiste na incorporação de nucleotídeos nas terminações 3-OH resultantes da fragmentação do DNA pela ação da endonuclease. Utiliza-se um anticorpo antidigoxigenina conjugado com peroxidase. Os núcleos das células em apoptose assumem coloração acastanhada escura, resultante da reação da peroxidase com o seu substrato, a diaminobenzidina. A fragmentação do DNA ocorre precocemente no evoluir da apoptose. Com o objetivo de melhorar a especificidade desse método, os critérios do TUNEL são associados aos critérios morfológicos¹⁷.

A apoptose é de vital importância na regulação do sistema imune e na resposta inflamatória. Na ausência de um processo inflamatório, a remoção dos granulócitos ocorre por apoptose após um ou dois dias. A sobrevivência dos granulócitos pode ser prolongada a partir do estímulo de citocinas. Apoptose de eosinófilos pode ser postergada pela ação de interleucina-3 (IL-3), interleucina-5 (IL-5) e fator estimulante de colônia de granulócito macrófago (GM-CSF)²⁰.

A remoção dos eosinófilos se dá por meio de apoptose, com subsequente fagocitose pelos macrófagos; o que pode ser postergado pela ação de IL-5¹⁸.

Apesar do mecanismo de desenvolvimento da PNSE não ser completamente esclarecido, sabe-se que a resposta inflamatória está envolvida na sua formação. Os eosinófilos e as células estruturais dos pólipos secretam citocinas que mantêm o processo contínuo de inflamação e o recrutamento de novos eosinófilos. Citocinas como IL5 e GM-CSF aumentam a sobrevivência dos eosinófilos e prolongam sua presença no tecido polipoide, diminuindo o índice de apoptose dessas células²¹.

A utilização de anticorpo antiIL-5 em pólipos nasais eosinofílicos *in vitro* demonstrou o papel desta citocina na manutenção do processo inflamatório. O bloqueio de IL-5 induziu o aumento do índice apoptótico e a diminuição da eosinofilia tecidual em pólipos nasais eosinofílicos²².

A remoção dos eosinófilos nos pólipos nasais ocorre por apoptose e consequente fagocitose por macrófagos. Os eosinófilos teciduais sinalizam a evolução da apoptose, atraindo macrófagos pela eversão para a superfície da célula da proteína fosfatidilserina²³. Nesse estudo, a apoptose foi avaliada pela reação de TUNEL. Os pacientes incluídos no trabalho haviam recebido tratamento prévio com corticosteroides, o que justificaria, ao menos em parte, o elevado número de eosinófilos em apoptose encontrados no resultado²³.

Estudo comparou o número de eosinófilos em apoptose, por meio da reação de TUNEL, entre pacientes com pólipos nasais e intolerância à aspirina e pacientes com polipose nasal sem intolerância à aspirina. Os autores encontraram número significativamente inferior de eosinófilos em apoptose nos pacientes com polipose nasal e intolerância à aspirina. Concluíram que o baixo índice de apoptose faria parte do mecanismo fisiopatológico da doença²⁴.

Buscando comparar apoptose e a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular entre pólipos nasais e mucosa nasal normal, foi utilizado método imunistoquímico e a reação de TUNEL²⁵. Observou-se maior expressão de Ki-67, marcador de proliferação celular, em pólipos nasais quando comparada ao controle. Também foi apurada maior expressão de p53, proteína reguladora do ciclo celular relacionada à indução de apoptose. Entretanto, apesar de a maior expressão dessa proteína ter sido registrada nos pólipos nasais, não houve aumento correspondente da transcrição de p21. O aumento da expressão de p53 pode estar relacionado a uma mutação que não estimula a transcrição de p21. A expressão de Bcl-2 nos pólipos nasais também foi maior quando comparada ao controle. O estudo sugere que as características hiperplásicas dos pólipos nasais estão relacionadas a essas alterações moleculares²⁵.

A expressão de survivina foi comparada entre tecido polipoide e mucosa nasal normal adjacente do mesmo paciente. A survivina é uma proteína inibidora da apoptose e estudada principalmente nas neoplasias malignas. Constatou-se diferença significativa na expressão de survivina, tanto da proteína como do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm). A conclusão foi de que a expressão de survivina pode estar relacionada ao desenvolvimento dos pólipos nasais e poderia, também, alterar os mecanismos apoptóticos da célula²⁶.

Para avaliar a expressão de p53, Bcl-2 e Ki-67 em pólipos nasais e sua correlação com alterações morfológicas e alterações nucleares, subdividiu-se o grupo de estudo em hiperplasia simples ou pronunciada e metaplasia escamosa²⁷. A expressão de Ki-67 e p53 foi referida nos casos de hiperplasia simples e pronunciada e negativa nos controles e nos casos de metaplasia escamosa. A expressão de Bcl-2 foi detectada nos casos de hiperplasia

simples (30%), hiperplasia pronunciada (40%) e em todos os episódios de metaplasia escamosa (100%). A distribuição espacial do DNA alterada foi verificada em três casos que eram positivos para Ki-67 e p53 e negativos para Bcl-2. Os autores sugerem o possível papel de p53 na patogênese da polipose nasal. A detecção de p53 geralmente refere-se à mutação do gene que se relaciona com a atividade de proliferação celular. O resultado da expressão de Bcl-2 propõe o papel desta proteína no desenvolvimento de metaplasia em pólipos nasais. A desorganização do DNA foi relacionada ao aumento da proliferação celular e à redução da apoptose nos casos de hiperplasia pronunciada²⁷.

Com o objetivo de entender a fisiopatologia dos pólipos nasais, avaliou-se a expressão e distribuição das proteínas inibidoras da apoptose (IAP) e da caspase-3 em pólipos nasais e na mucosa nasal normal²⁸. O mecanismo de apoptose é desencadeado pelas caspases. As IAPs (cIAP1, cIAP2, XIAP) suprimem a ativação das caspases. Da família das caspases, a caspase-3 participa do estágio final da apoptose, especificamente na proteólise das proteínas citoplasmáticas. Nesse estudo, a expressão de cIAP2, XIAP e caspase-3 foi semelhante entre o grupo-controle e o de estudo. A expressão de cIAP1 foi encontrada apenas no tecido normal, sugerindo a ausência desta proteína como um possível fator na fisiopatologia dos pólipos nasais. As várias facetas das funções das IAPs podem estar relacionadas a fatores celulares específicos. A diminuição de cIAP1 também foi demonstrada no carcinoma cervical e no câncer de colon²⁸.

A análise da ação do fator de crescimento endotelial (VEGF) na proliferação celular e na indução de apoptose na polipose nasal demonstrou que os níveis de VEGF encontrados no lavado nasal estão correlacionados com o fenótipo, estando presentes apenas nos caso de sinusite crônica com pólipos nasais. O VEGF, além de induzir a proliferação celular, inibe a apoptose das células epiteliais. O bloqueio do receptor de VEGF, NP1, levou à reversão desse processo²⁹.

As metalotioneínas são proteínas relacionadas à modulação da apoptose e à manutenção dos níveis intracelulares de Zinco, importante na regulação da atividade da caspase-3. Sua expressão em pólipos nasais foi comparada em relação ao tipo de infiltrado inflamatório, eosinofílico ou

linfocítico, apresentando-se significativamente maior no grupo composto de pólipos nasais eosinofílicos. Além disso, demonstrou-se ser fator de proteção antiapoptose nos pólipos nasais eosinofílicos³⁰.

A apoptose pode ser modulada por diversos estímulos externos. A ação dos glicocorticoides no controle da polipose nasal é bastante conhecida. Verificou-se aumento da sobrevivência média de eosinófilos de pólipos nasais *in vitro* quando comparado com mucosa normal. O tempo de sobrevivência dos eosinófilos foi reduzido após bloqueio de GM-CSF por anticorpos. O mesmo efeito foi percebido após uso da dexametasona. O GM-CSF seria produzido em maiores quantidades em pólipos eosinofílicos e seria responsável pelo aumento da sobrevivência dos eosinófilos³¹. O índice apoptótico aumentou em cultura de pólipos nasais submetidos ao tratamento com dexametasona³². Um dos mecanismos de ação dos glicocorticoides seria a indução de apoptose nos fibroblastos dos pólipos nasais³³. Em outro estudo, a administração de esteroides tópicos *in vivo* aumentou o índice de apoptose de eosinófilos e linfócitos T em pólipos nasais³⁴.

Com o objetivo de conhecer se o aumento da expressão do gene Bax em fibroblastos de pólipos nasais influenciaria a sensibilidade destas células ao tratamento com esteroides *in vitro*, elevou-se a expressão do gene por meio da terapia gênica. O gene Bax constitui uma das proteínas pró-apoptóticas que se contrapõem à ação de Bcl-2, proteína intracelular antiapoptótica. Nesse estudo, a terapia gênica aumentou o índice de apoptose induzido pelo tratamento com glicocorticoides. A pesquisa sugere que a terapia gênica poderá ser empregada no tratamento da polipose nasal³⁵.

3.4 Mitomicina C

A mitomicina C é uma droga antineoplásica e antibiótica extraída do *Streptomyces caespitosus* e que tem sido usada como agente antiproliferativo. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição seletiva da síntese de DNA³⁶.

A mitomicina C é utilizada usualmente como agente quimioterápico em tumores sólidos. Sua ação em cultura de fibroblastos foi demonstrada em

estudo *in vitro*, que evidenciou que a aplicação de mitomicina C a 0,4 mg/mL por cinco minutos é capaz de inibir a proliferação de fibroblastos por 35 dias³⁷. Nesse mesmo trabalho foi ressaltado que a ação antiproliferativa da mitomicina C se restringe à área de aplicação da mesma. Posteriormente, detectou-se a ação da mitomicina C na indução de apoptose em fibroblastos humanos, concluindo-se que seu efeito seria decorrente de sua ação antiproliferativa e de indução de apoptose³⁸.

Em Otorrinolaringologia, a aplicação tópica da mitomicina C foi estudada para manutenção da patência de antróstomias maxilares em coelhos. Houve diferença significativa entre controle e experimento em relação ao tempo em que as antróstomias mantiveram-se pérvias. A concentração de mitomicina C utilizada com resultado significativo foi de 1 mg/mL. Não se destacou alteração permanente do movimento ciliar à microscopia eletrônica³⁹. A mitomicina C também foi empregada para tratamento adjuvante de estenoses traqueais em modelos animais⁴⁰, no tratamento de estenoses laringotraqueais⁴¹ e na manutenção da patência de miringotomias⁴². Nesses estudos, a aplicação tópica da mitomicina C não foi associada à toxicidade sistêmica.

Estudo retrospectivo investigou as complicações decorrentes do uso tópico da mitomicina C na via aérea superior para tratamento adjuvante de estenoses laringotraqueais. Obtiveram-se como resultado 4,7% de obstrução respiratória alta no pós-operatório, com necessidade de reintervenção cirúrgica de emergência. Essa complicação foi atribuída à formação de excesso de debris de fibrina no sítio cirúrgico. Sugeriu-se que o excesso de fibrina seria secundário à diminuição da atividade enzimática mediada por fibroblastos. A dose de mitomicina C variou de 0,4 a 10 mg/mL e não foi constatada diferença significativa entre a dose utilizada e a incidência de complicação⁵.

Estudo de metanálise sobre a aplicação tópica da mitomicina C na via aérea superior baseou-se em publicações de 1998 a 2006. No total foram incluídas 12 pesquisas em animais e oito em humanos. Apesar da heterogeneidade dos estudos clínicos, individualmente eles sugerem a melhor evolução no pós-operatório com o uso da mitomicina C. Recomenda-se a realização de mais estudos clínicos randomizados da aplicação tópica da

mitomicina C na via aérea superior. Não se relataram reações adversas com o uso tópico da mitomicina C⁶.

Na redução de sinéquia na região do meato médio em pós-operatório de cirurgias nasais endoscópicas a mitomicina C foi utilizada por aplicação tópica na concentração de 0,5 mg/mL por cinco minutos⁴. Foram feitas duas aplicações: ao final do procedimento cirúrgico e 30 dias após o mesmo. Foram avaliados 30 pacientes autopareados e não foram descritas reações adversas em decorrência do uso tópico da mitomicina C. Concluiu-se que a mitomicina C é segura e efetiva na prevenção de aderências cirúrgicas e estenoses de antrostomias quando aplicada no transoperatório e no pós-operatório de cirurgias nasais endoscópicas⁴.

Na manutenção da patência de antrostomias após meatotomia inferior para tratamento de mucocela maxilar pós-operatória, a mitomicina C foi utilizada na concentração de 0,4 mg/mL por cinco minutos. Após três meses de acompanhamento, obteve-se efeito favorável dessa droga na patência das antrostomias na comparação com o grupo-controle. Não foi constatado qualquer evento adverso nesse estudo³.

A mitomicina C foi avaliada na PNSE em trabalhos anteriores. Sua ação *in vitro* foi investigada na síntese de GM-CSF e IL-5 de pólipos nasais eosinofílicos e na indução de apoptose de eosinófilos^{43,44}. Foi estudada a indução de apoptose em nove pacientes por critérios morfológicos, concluindo-se a ação da mitomicina na apoptose de eosinófilos⁴⁴. A ação dessa droga foi demonstrada *in vivo* na diminuição dos níveis de IL-5 e GM-CSF, citocinas importantes no mecanismo de manutenção da eosinofilia na PNSE⁴⁵.

4 MÉTODOS

Este estudo é parte integrante de uma linha de pesquisa que visa a traçar o perfil imunocito-histológico da polipose nasossinusal eosinofílica. Foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com aprovação nº ETIC 484/08 (ANEXO A). O material estudado foi coletado, processado e armazenado em estudo prévio aprovado pelo mesmo Comitê (parecer nº 109/02). Os pacientes foram esclarecidos a respeito dos objetivos do estudo e foi-lhes solicitada a assinatura no termo de consentimento pós-informado (APÊNDICE A).

4.1 Seleção da amostra

A amostra foi constituída por 15 pacientes portadores de polipose nasossinusal eosinofílica, na faixa etária entre 16 e 60 anos, encaminhados pelo Sistema Único de Saúde para realização de tratamento cirúrgico. Eles foram triados no ambulatório de Rinologia no Hospital São Geraldo, anexo do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). No procedimento de triagem, foram submetidos aos exames otorrinolaringológico e de fibronasolaringoscopia. Utilizou-se fibroscópio MACHIDA ENT IIIP, com diâmetro de 3,2 mm.

Na seleção dos pacientes, foram adotados os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão: pacientes portadores de polipose nasossinusal eosinofílica com porcentagem de eosinófilos igual ou superior a 40%^{7,12,46}.
- Critérios de exclusão: pacientes portadores de poliposes não-eosinofílicas como fibrose cística, síndrome de Kartagener, pólipos antrocoanal, polipose nasossinusal eosinofílica em vigência de infecção e os pacientes que fizeram uso de corticosteroides ou anti-histamínicos nos 60 dias que antecederam o estudo.

4.2 Delineamento geral do estudo

Trata-se de estudo comparativo experimental autopareado com 15 amostras de pólipos nasais eosinofílicos. O grupo de estudo foi composto de culturas de fragmentos dos pólipos nasais com aplicação de mitomicina C *in vitro*. Para o grupo-controle seguiu-se o mesmo padrão do grupo de estudo, mas sem aplicação de mitomicina C.

A pesquisa iniciou-se pela avaliação otorrinolaringológica e biópsia dos pacientes para a confirmação diagnóstica de polipose nasal eosinofílica. Confirmado o diagnóstico, os pacientes foram esclarecidos e solicitados a assinar o termo de consentimento pós-informado.

Após avaliação dos critérios de inclusão, realizou-se nova biópsia com retirada de fragmentos dos pólipos nasais que foram encaminhados à cultura. Os fragmentos foram seccionados em quatro porções, utilizando-se placa de Petri e bisturi lâmina nº 15. Em seguida, esses fragmentos foram semeados numa placa de quatro orifícios, cada qual contendo 250 µL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI). Desses quatro compartimentos, dois formaram o grupo-controle e dois o grupo experimental. No grupo experimental aplicou-se mitomicina C por cinco minutos, na dosagem de 400 µg/mL³⁷. Após a aplicação da droga, as culturas foram lavadas com meio RPMI. O grupo-controle sofreu as mesmas manipulações, mas utilizando-se somente meio RPMI. Os fragmentos contidos nos dois primeiros compartimentos, controle e experimento, foram imediatamente submetidos ao preparo para histopatologia, sendo denominados controle zero hora e experimento zero hora. O outro par de amostra contendo controle e experimento foi incubado por 12 horas em estufa a 37°C e 0,5% de CO₂. Ao final de 12 horas, os fragmentos foram retirados da cultura e preparados para exame histopatológico, sendo denominados, respectivamente, de controle 12 horas e experimento 12 horas⁴⁷.

A amostra do experimento de 15 pacientes foi submetida à coloração de hematoxilina-eosina para avaliação do índice apoptótico pela morfometria.

Uma subamostra do experimento de seis pacientes foi submetida à técnica de *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) para confirmação dos resultados da morfometria.

4.3 Coleta do material

4.3.1 Biópsia do pólipos nasal para caracterização de eosinofilia

Os pacientes foram submetidos à biópsia dos pólipos no ambulatório de Otorrinolaringologia do HC-UFMG. Após anestesia da fossa nasal com algodão embebido em neotutocaína a 2%, foi retirado fragmento do pólipo de cada paciente com pinça de biópsia nasal de marca EXPLORENT[®], evitando-se a maceração dos tecidos.

O fragmento de biópsia foi imediatamente fixado em formol a 10% e encaminhado ao Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG para exame histopatológico com coloração pela hematoxilina-eosina (HE). Considerou-se eosinofílico o encontro de pelo menos 40% de eosinófilos entre as células inflamatórias presentes na mucosa e pelo menos quatro eosinófilos após avaliação de quatro campos microscópicos em aumento de 400x¹².

4.3.2 Biópsia de pólipo nasal para cultura

A biópsia dos pólipos nasais foi realizada no próprio ambulatório de Otorrinolaringologia do HC-UFMG. Após anestesia tópica com neotutocaína a 2%, retirou-se fragmento de pólipo com microtesoura e micropinça, que foi imediatamente acondicionado em meio de cultura à temperatura ambiente. Durante a coleta foram usados dois tubos FALCON[®]. O primeiro recebeu a amostra por um a dois minutos, sendo levemente agitado e, então, feita a transferência para o segundo tubo. Esse procedimento visou a diminuir o índice de contaminação das culturas.

4.3.3 Meio de cultura utilizado

Os fragmentos foram cultivados a 37°C, contendo 5% de CO₂ em 250 µL, meio de RPMI 1640 com 5% de soro humano AB, 2 µM de mercaptoethanol, 1

mM L-glutamina, 2mM piruvato de sódio, 10 µgr/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 5 mg/mL de fungisona, meio completo comercializado por Gibco UK^{47,48}.

O fragmento de cada amostra, após retirado do sobrenadante, foi transferido para um recipiente contendo formol a 10% e encaminhado para procedimento histopatológico rotineiro, com impregnação em parafina.

4.4 Análise morfométrica do índice apoptótico

Os blocos de parafina, com amostra do experimento de 15 pacientes, foram cortados em segmentos de 5 µm e corados pela HE.

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico, sendo as imagens dos campos, com infiltrado eosinofílico, digitalizadas e armazenadas em *compact disc* (CD). Posteriormente, essas imagens foram analisadas por dois observadores em programa de morfometria (Kontron KS 300, versão 2.0) no Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral da UFMG, sob supervisão do coordenador do Laboratório de Apoptose.

O número mínimo representativo de campos microscópicos por amostra para a quantificação da apoptose foi determinado a partir de uma única lâmina, na qual foram analisados e registrados os índices apoptóticos em cada campo. Desses, formaram-se oito subamostras com número crescente de campos (cinco, 10, 15... até 40), retirados aleatoriamente com reposição. De cada grupo, calcularam-se a média aritmética e respectivos coeficientes de variação (CV) para cada tamanho amostral. À medida que o tamanho amostral aumentava, os coeficientes de variação diminuía. Assim, o tamanho da amostra considerada mínima representativa foi definido quando o incremento do número de campos não resultava em redução considerável no valor do coeficiente de variação, determinando-se, portanto, o número mínimo de representativos campos⁴⁹. A estabilização do coeficiente de variação ocorreu após a contagem de 25 campos. Foram capturados e analisados 1.214 campos com objetiva de 1.000x em óleo de imersão. O IA foi calculado dividindo-se a soma de eosinófilos em apoptose pela soma total dos eosinófilos contados¹⁷.

Para caracterização de um eosinófilo em apoptose, foram consideradas: anoiquia (retração celular com perda da adesão com as células adjacentes); condensação citoplasmática; condensação nuclear (condensação da cromatina nuclear, às vezes compactação da cromatina contra a carioteca, exibindo figuras de “crescentes”); fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos^{17,18,50}.

4.5 Análise do índice apoptótico pelo TUNEL

Para realização da reação de TUNEL foi utilizado um *kit* comercial para a detecção *in situ* da fragmentação do genoma (*Klenow FragEI DNA fragmentation. Detection Kit* - No Catálogo QIA21; *Calbiochem /Oncogene*).

A subamostra do experimento de seis pacientes foi submetida à reação de TUNEL. Essa subamostra foi escolhida de forma aleatória. Foram capturados e analisados em microscópio óptico 645 campos com objetiva de 400x.

Para a caracterização da apoptose, foi considerada a coloração acastanhada do núcleo associada aos critérios morfológicos.

4.5.1 Protocolo da reação de TUNEL

Os blocos de parafina foram cortados em segmentos de 5 μm e desparafinados para serem submetidos à reação de TUNEL. Foram necessárias várias reações para a padronização do método no presente estudo. Para a obtenção do tempo de proteinase K, várias secções do tecido foram submetidas à enzima na concentração de 20 g/mL, em diferentes tempos: 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Foi padronizado o tempo de proteinase K em 20 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada. A peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio a 3%, por cinco minutos. As lâminas foram lavadas em *phosphate buffer saline* (PBS) e imersas em solução tampão de equilíbrio. Os cortes foram cobertos com a enzima transferase terminal de deoxinucleotídeos (TdT) e desoxinucleotídeos (marcados e não marcados) e incubados sob atmosfera úmida a 37°C por duas horas. Em seguida, lavadas com *tris buffered saline* (TBS) uma vez, cobertas com tampão de parada (ácido

etilenodiaminotetracético EDTA 0.5 M, ph=8) por cinco minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS uma vez e cobertas com o tampão de bloqueio por 10 minutos. Foram tratadas com o conjugado de peroxidase de estreptavidina diluída em tampão de bloqueio e incubadas em câmara umidificada a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS uma vez e tratadas com diaminobenzidina (DAB) por três minutos, lavadas com água destilada, contracoradas com hematoxilina e montadas.

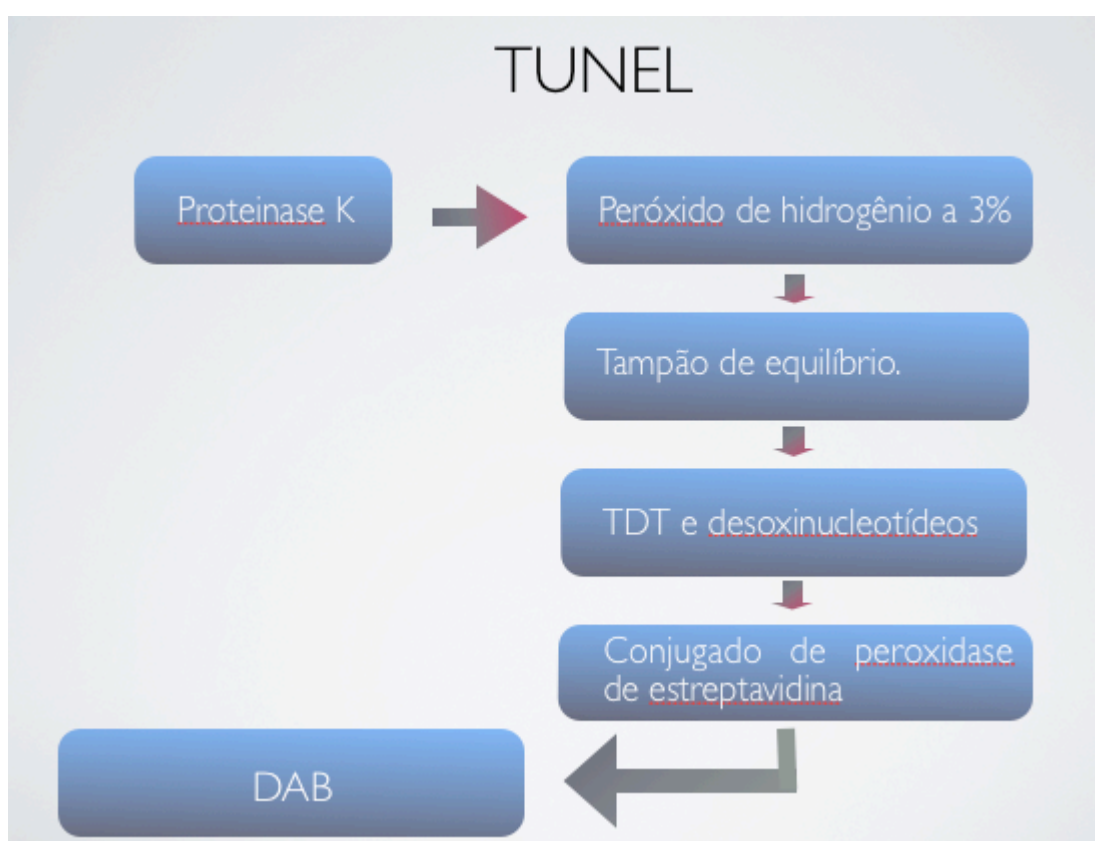


FIGURA 1 - Fluxograma da reação de TUNEL.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.6 Análise estatística

Para realizar a análise estatística utilizou-se o programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 17.0 (SPSS. Inc, Chicago, IL, EUA), e o programa *The R Project for Statistical Computing* (GNU General Public License), versão 2.9.1.

Os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnoff e Shapiro-Wilk para verificação da normalidade (curva gaussiana).

Os dados analisados foram examinados pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação dos índices apoptóticos, seguido do pós-teste Wilcoxon com correção de Bonferroni. Considerou-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Índice apoptótico pela coloração HE

As culturas dos pólipos nasais apresentavam as mesmas condições ao iniciar o experimento. Não houve diferença significativa ($p=0,1724$) entre controle zero hora e experimento zero hora (GRAF. 1).

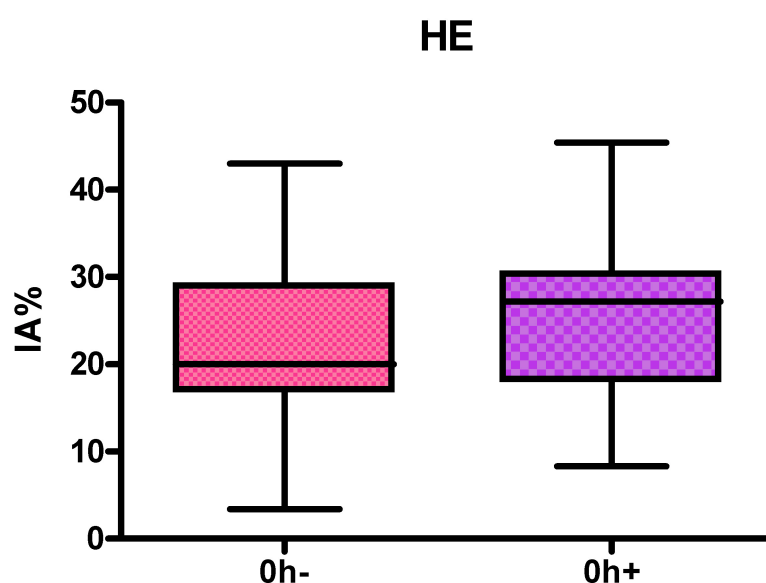


GRÁFICO 1 - Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre controle zero hora e experimento zero hora.

$p=0,1724$.
Coloração HE. Aumento 1.000x.

A coloração HE permitiu a identificação dos eosinófilos e a caracterização das alterações morfológicas do processo de apoptose. Em todos os experimentos avaliados foram identificadas células em processo de apoptose caracterizadas pela retração citoplasmática, condensação nuclear, contração do citoplasma e formação dos corpos apoptóticos (FIG. 2 e 3) As lâminas do grupo experimento 12 horas exibiam também nítida desorganização do tecido conjuntivo (FIG. 2).

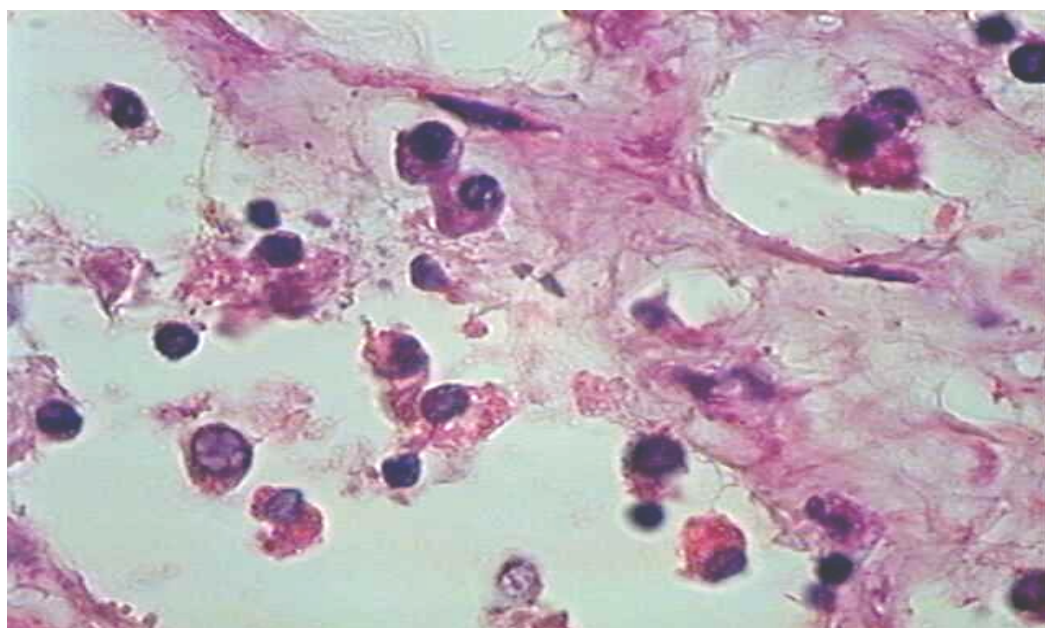


FIGURA 2 - Microfotografia de pólipo nasal eosinofílico tratado com mitomicina C e incubado por 12 horas.

Coloração HE, 1.000x. Verificar células com morfologia sugestiva de apoptose (aniquia, condensação nuclear e citoplasmática).

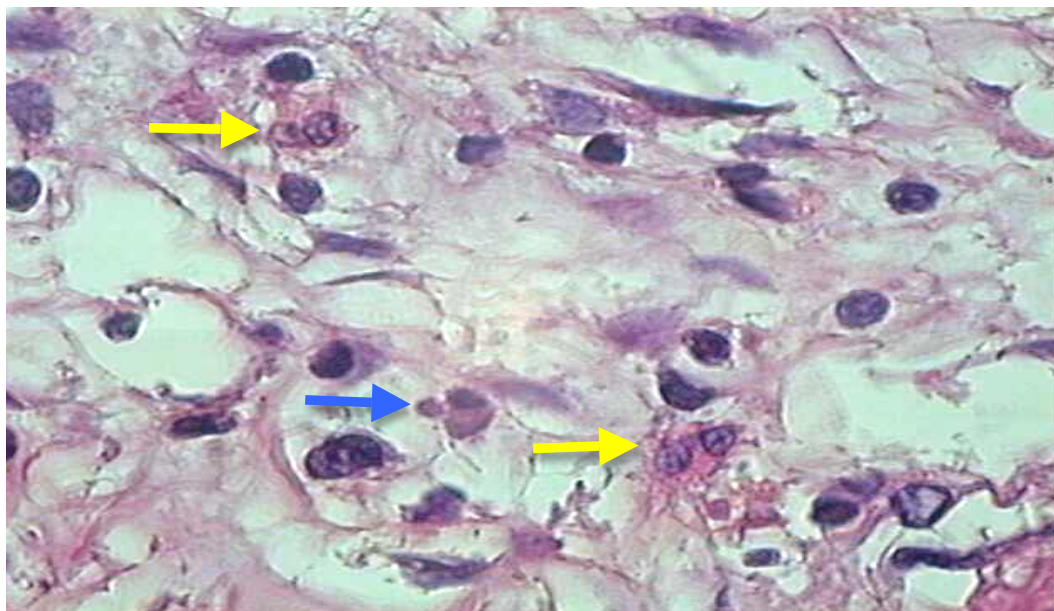


FIGURA 3 - Microfotografia de pólipo nasal eosinofílico não tratado com mitomicina C e incubado por 12 horas.

Coloração HE, 1.000x. Verificar eosinófilo com morfologia sugestiva de apoptose (seta azul) entre eosinófilos com morfologia usual (setas amarelas).

Observou-se diferença muito significativa ($p < 0,001$) na comparação entre controle 12 horas e experimento 12 horas (GRAF. 2).

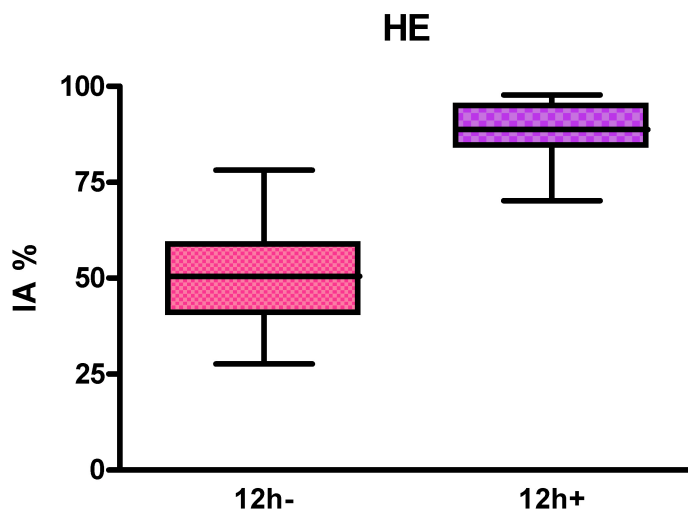


GRÁFICO 2 - Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre controle 12 horas e experimento 12 horas.

Coloração HE. Aumento 1.000x.

A comparação do índice apoptótico no mesmo grupo em relação aos diferentes tempos de incubação (zero hora e 12 horas) salientou diferença significativa tanto no grupo-controle como no grupo experimental (GRAF. 3 e 4).

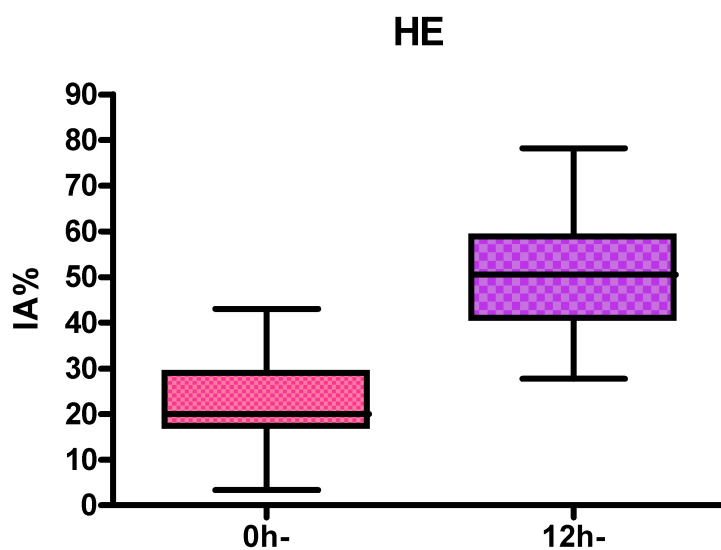


GRÁFICO 3 - Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre controle zero hora e controle 12 horas.

Coloração HE. Aumento 1.000x.

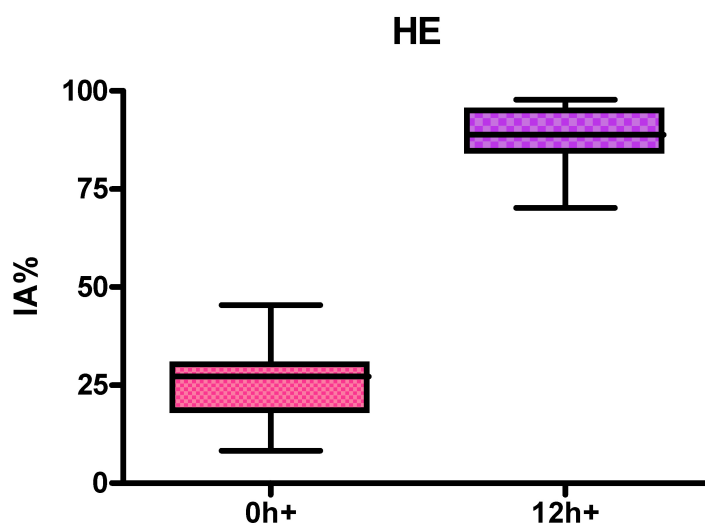


GRÁFICO 4 - Comparação do índice apoptótico (n=15 pacientes) determinado pela morfometria entre experimento zero hora e experimento 12 horas.

Coloração HE. Aumento 1.000x.

O índice apoptótico individual de cada paciente nos diferentes experimentos pode ser avaliado no GRAF. 5. Nota-se variabilidade individual dos índices apoptóticos entre os pacientes.

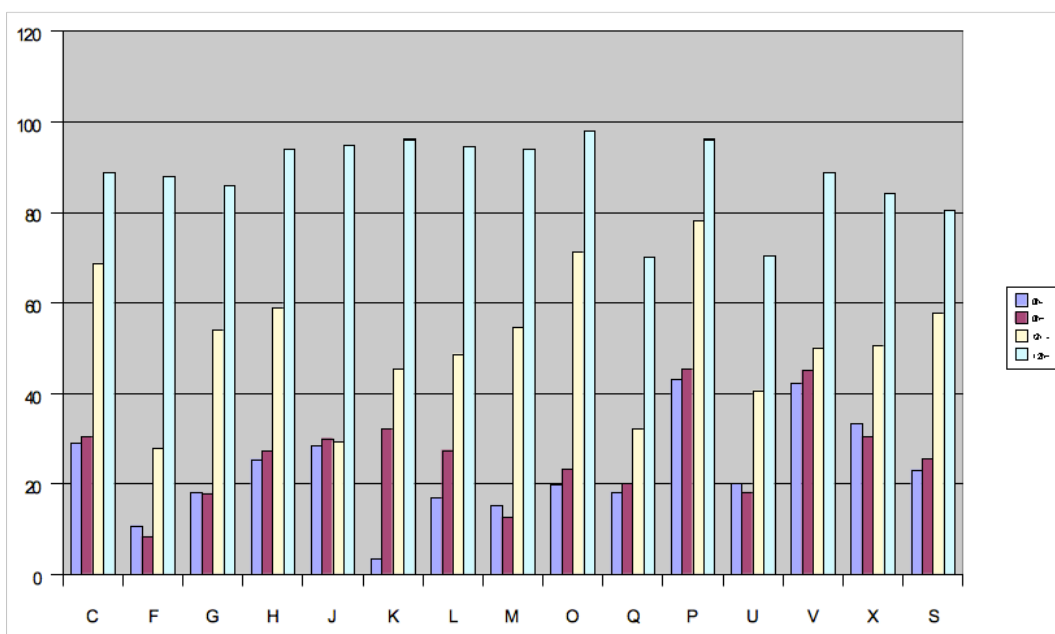


GRÁFICO 5 - Índice apoptótico pela morfometria (n=15 pacientes).

Controle zero hora e 12 horas e experimento zero hora e 12 horas.

5.2 Índice apoptótico pela reação de TUNEL

Optou-se pela comparação do índice apoptótico entre controle zero hora, controle 12 horas e experimento 12 horas. Verificou-se diferença muito significativa do índice apoptótico em todos os pacientes e em todas as comparações ($p < 0,001$) (GRAF. 6).

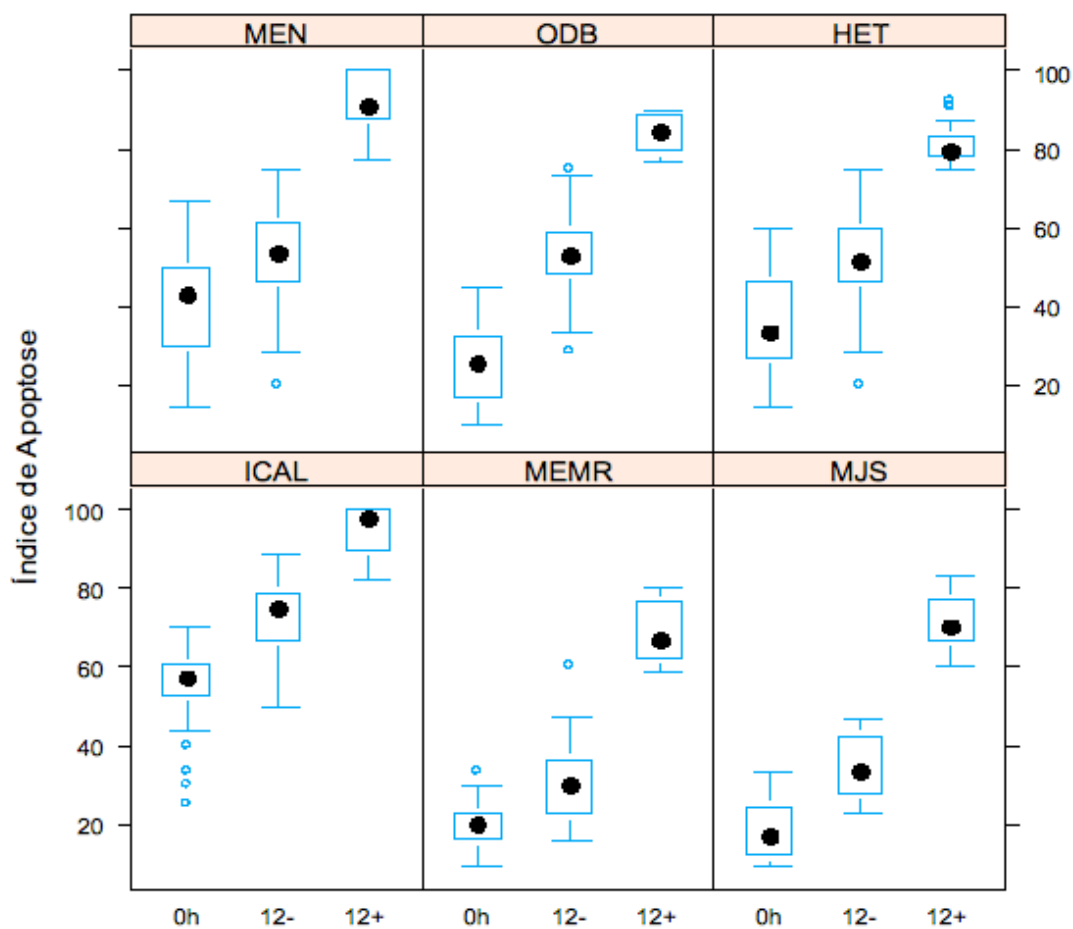


GRÁFICO 6 - Índice apoptótico (n=6 pacientes) avaliado pela reação de TUNEL.

Teste de Kruskal Wallis: $p < 0,001$ em todos os pacientes. Pós-teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni: $p < 0,001$ em todos os pacientes/comparações.

0 h corresponde ao controle zero hora, 12- ao controle 12 horas e 12+ ao experimento 12 horas.

A reação de TUNEL positiva foi ressaltada em todos os grupos. O núcleo das células em apoptose foi nitidamente marcado pela coloração acastanhada. No grupo-controle 12 horas, poucas células apresentaram coloração acastanhada do núcleo (FIG. 4).

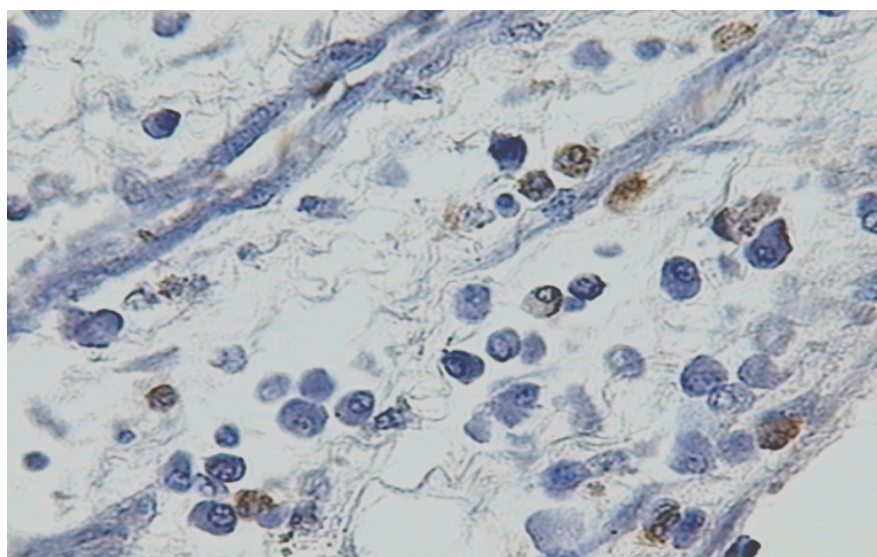


FIGURA 4 - Microfotografia de pólipos nasal eosinofílico não tratado com mitomicina C, incubado por 12 horas, com eosinófilos em apoptose com coloração acastanhada.

Predominam as células sem marcação acastanhada (aumento de 400x).

Constatou-se também reação de TUNEL positiva em outras células do infiltrado inflamatório dos pólipos nasais eosinofílicos (FIG. 5). Várias células do infiltrado inflamatório com marcação positiva podem ser observadas no grupo experimento 12 horas (FIG. 5).

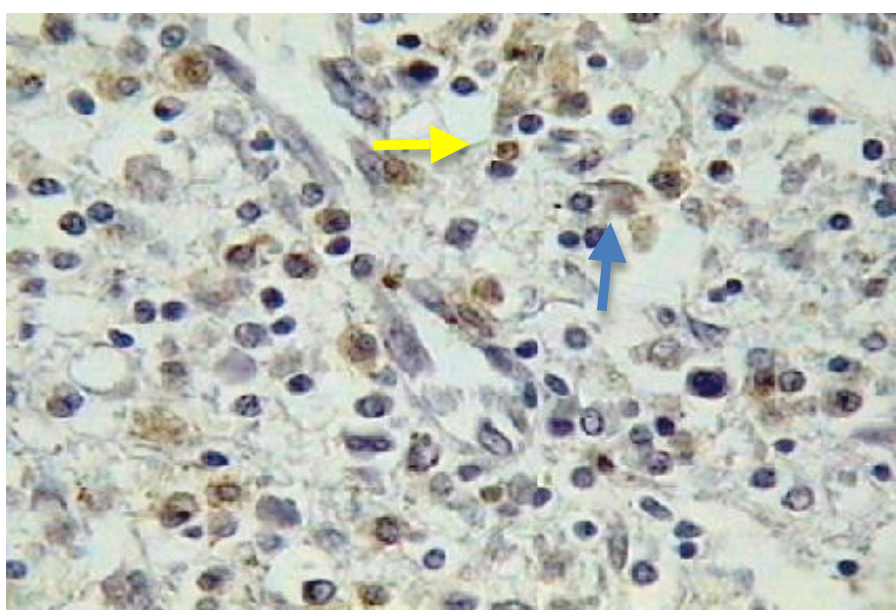


FIGURA 5 - Microfotografia de pólipos nasal eosinofílico tratado com mitomicina C, incubado por 12 horas.

Observam-se várias células com núcleo marcado pela coloração, eosinófilos, macrófagos (seta azul) e linfócitos (seta amarela) (Aumento 400x).

5.3 Correlação entre o índice apoptótico pela morfometria e reação TUNEL

A avaliação de apoptose pela morfometria foi confirmada pela reação de TUNEL. Apurou-se que houve correspondência entre o índice apoptótico avaliado pela morfometria e pela reação de TUNEL na subamostra aleatória dos experimentos que foi submetida aos dois métodos (GRAF. 7 e 8).

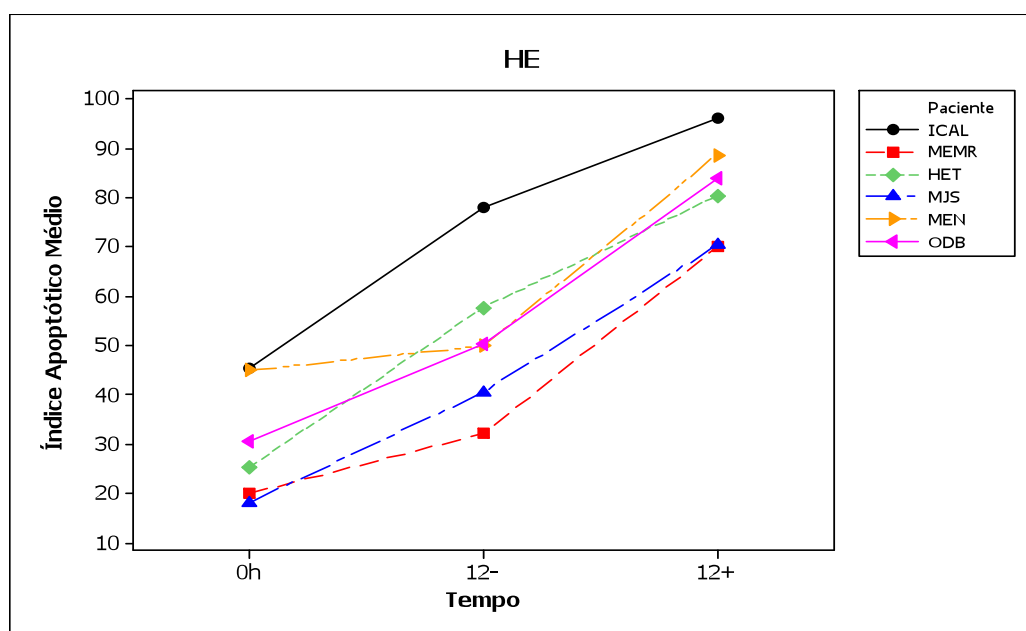


GRAFICO 7 - Índice apoptótico (n=6 pacientes) individual no controle zero hora, controle 12 horas e experimento 12 horas.

Coloração HE. Aumento 1.000x.

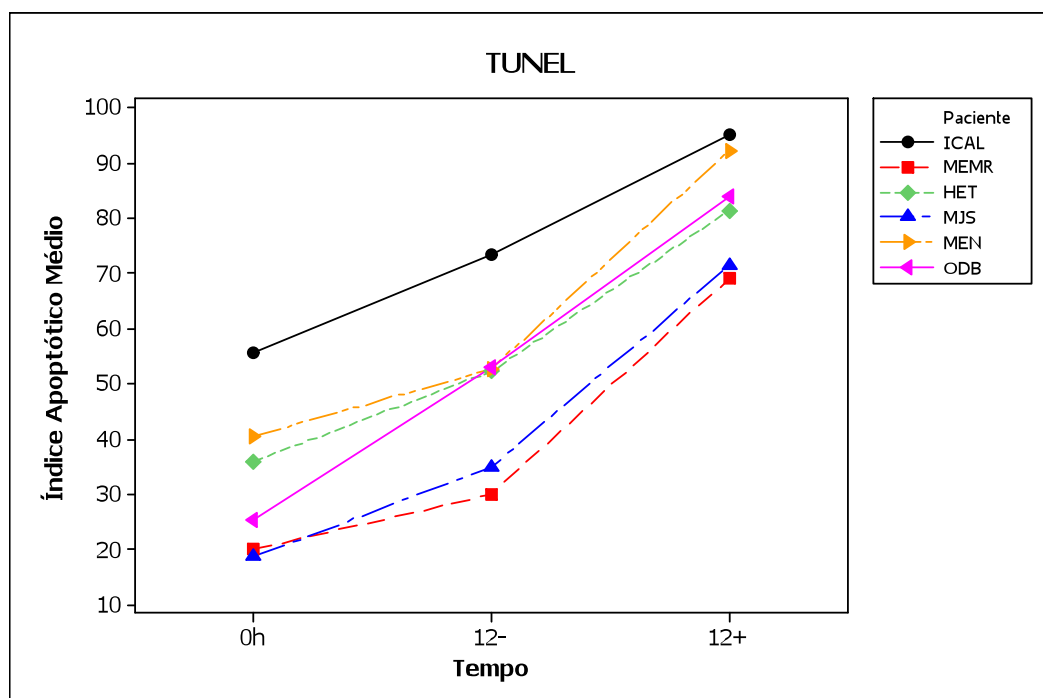


GRÁFICO 8 - Índice apoptótico (n=6 pacientes) individual pela reação de TUNEL no controle zero hora, controle 12 horas e experimento 12 horas.

Aumento 400x.

6 DISCUSSÃO

A caracterização da eosinofilia na polipose nasossinusal eosinofílica é baseada no exame histopatológico. Na literatura, infiltrado eosinofílico é descrito superior a 20%^{12,46} e superior a 25%⁷ para o diagnóstico de polipose nasossinusal eosinofílica. No presente estudo, optou-se pela inclusão de pacientes com infiltração de eosinófilos superior a 40%. Com isto, procurou-se assegurar número suficiente de eosinófilos ainda viáveis após a utilização das técnicas de cultura. Excluíram-se os pacientes com comorbidades, tornando-se a amostra mais homogênea. Sabe-se que os pacientes portadores de polipose nasossinusal eosinofílica e intolerância à aspirina tendem a apresentar mais gravidade em relação ao acometimento dos seios paranasais e mais chance de recidiva após o tratamento cirúrgico¹⁰.

A padronização na obtenção e manipulação das amostras e a imediata fixação do tecido após a remoção do meio de cultura minimiza o efeito de variáveis intervenientes no índice apoptótico dos pólipos nasais eosinofílicos. As biópsias foram realizadas pelo mesmo profissional, utilizando-se a mesma técnica e o mesmo instrumental. Foram excluídos os pacientes que utilizavam corticosteroides e anti-histamínicos nos 60 dias que antecederam a biópsia.

A manutenção da viabilidade da cultura de pólipos nasais eosinofílicos foi demonstrada em estudo prévio. As culturas mantiveram-se viáveis após 48 horas de incubação⁴⁷. Entretanto, em estudo com aplicação de mitomicina C em cultura de células, verificou-se alto índice de apoptose nas culturas tratadas ou não com mitomicina C após 24 horas de incubação⁴⁴. Os autores atribuíram esse achado à ausência de fatores de estimulação⁴⁴. Considerando-se estes resultados, optou-se pela avaliação do índice apoptótico em culturas de pólipos nasais eosinofílicos incubadas por apenas 12 horas.

O foco deste trabalho foi a avaliação dos eosinófilos. Essas células desempenham papel fundamental na perpetuação do processo inflamatório na PNSE. Sabe-se que os eosinófilos apresentam aumento da sobrevivência no infiltrado inflamatório de pacientes com PNSE e que a remoção dos mesmos

do tecido polipoide ocorre por meio de apoptose^{23,31}. O número de eosinófilos em apoptose no infiltrado inflamatório de pacientes com PNSE é inferior ao encontrado no tecido normal²⁴. Essas células também são responsáveis pela secreção de citocinas relacionadas à manutenção do curso inflamatório e ao dano tecidual^{21,49}.

Neste estudo buscou-se a estimativa de um evento biológico, que é a apoptose. Empregaram-se dois métodos diferentes: histopatologia de rotina (coloração HE) e reação imunoistoquímica (reação de TUNEL). A reação de TUNEL é um método bem estabelecido para a avaliação da apoptose. Este método permite evidenciar a fragmentação do DNA genômico que ocorre precocemente na apoptose. Trata-se de etapa decisória desse evento, uma vez que, a partir desse ponto, o processo desencadeado torna-se irreversível. A marcação do DNA fragmentado pode ser detectada por um período substancial no desenrolar da apoptose, ao contrário de outras técnicas que detectam eventos de curta duração. Foi necessário padronizar a técnica para o tecido em estudo. O tempo de proteinase K padronizada foi de 20 minutos. Em todas as reações foi utilizado controle positivo e negativo de acordo com as recomendações do fabricante. As células em apoptose adquiriram forte marcação pela coloração acastanhada, que foi muito evidenciada, principalmente no grupo experimento 12 horas.

A morfometria permitiu a identificação das células em apoptose. Evidenciaram-se as alterações compatíveis com a evolução de apoptose: condensação citoplasmática, condensação nuclear, perda de contato celular e formação de corpos apoptóticos. A comparação entre controle e experimento nos diferentes tempos de incubação permite atribuir a diferença do índice apoptótico ao efeito da mitomicina C. As culturas dos pólipos nasais eosinofílicos apresentavam as mesmas condições ao se iniciar a pesquisa. A mitomicina C foi a única variável na manipulação dos grupos controle e experimento. Ao compararem-se os grupos controle 12 horas e experimento 12 horas, percebeu-se que o aumento do índice apoptótico nesses grupos pode ser atribuído, em parte, ao tempo de incubação das culturas. Esses resultados corroboram os achados da literatura em relação à ação da mitomicina C na indução de apoptose de eosinófilos de pólipos nasais eosinofílicos⁴⁴.

A subamostra dos pacientes que foi submetida à reação de TUNEL foi determinada de forma aleatória. Optou-se por excluir na avaliação por este método os grupos de zero hora (controle e experimento). Consideraram-se os resultados dessa comparação (zero hora) – não-significativos – obtidos pela morfometria. Todos os pacientes apresentaram diferença muito significativa em todas as comparações (controle zero hora, controle 12 horas e experimento 12 horas). Todavia, visualizando-se os resultados de paciente a paciente, constataram-se variações no índice apoptótico que foram consideradas aqui como individuais, constatáveis nos três experimentos. Essas variações podem ser reflexo de diferenças moleculares e genéticas entre os pacientes. Algumas alterações moleculares foram correlacionadas à expressão do fenótipo em estudo prévio²⁷. O autopareamento das amostras na avaliação dos experimentos permite destacar a mitomicina C como variável determinante na indução de apoptose dos eosinófilos.

A análise das amostras pela reação de TUNEL também destacou fibroblastos, macrófagos e principalmente linfócitos em processo de apoptose. A marcação acastanhada dessas células foi mais evidente no grupo experimento 12 horas. Supõe-se que a mitomicina C atue também nas demais células do infiltrado inflamatório e do estroma dos pólipos nasais. Estudos futuros poderão contemplar a ação da mitomicina C nas demais células dos pólipos nasais eosinofílicos.

Os resultados obtidos nos dois métodos sustentam a conclusão desta investigação. A avaliação da apoptose dos eosinófilos na PNSE por meio da morfometria é satisfatória. Considerando-se a diferença de custo entre os métodos e as dificuldades técnicas, a morfometria é uma opção prática e efetiva.

De acordo com a literatura, um dos prováveis mecanismos de ação da mitomicina C no índice apoptótico dos eosinófilos consiste na redução de citocinas, IL-5 e GM-CSF, responsáveis pelo aumento da sobrevivência dessas células. O GM-CSF atua sobre diferentes linhagens de célula, enquanto a IL-5 age especificamente na maturação, ativação e sobrevivência dos eosinófilos²². A ação da mitomicina C *in vitro* e *in vivo* nos níveis de IL-5 e GM-CSF de pólipos nasais eosinofílicos foi demonstrada em trabalhos anteriores^{43,45}. Há relato de redução significativa nos níveis de GM-CSF e muito significativa nos níveis de IL-5 em pólipos nasais eosinofílicos após aplicação tópica da mitomicina C⁴⁵. A redução dessas citocinas sugere mecanismo indireto da mitomicina C na indução de

apoptose em pólipos nasais eosinofílicos⁴⁵. Portanto, a indução de apoptose por meio da ação da mitomicina C poderia interromper a perpetuação do processo inflamatório e do dano tecidual.

A mitomicina C foi descoberta em 1956 e atua a partir da inibição da síntese de DNA. Sua ação foi avaliada em diversos trabalhos, em função de seu efeito antiproliferativo. Em Otorrinolaringologia, pesquisas em humanos têm se concentrado principalmente na ação da mitomicina C na redução de sinéquias em cirurgias nasais endoscópicas^{3,4} e cirurgias laríngeas⁵. A maioria dos autores utiliza a dose de 0,4 mg/mL. A comparação retrospectiva entre as doses de 0,4 e 10 mg/mL não mostrou diferença significativa em relação à incidência de complicações⁵. Os trabalhos em animais e humanos corroboram a segurança do uso tópico da mitomicina C.

Atualmente, a opção terapêutica para a PNSE recai sobre os corticosteroides. Vários estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a ação dos corticosteroides sobre a população de eosinófilos nos pólipos nasais³²⁻³⁵. A recidiva da PNSE ainda constitui um dos principais desafios dessa doença. A mitomicina C pode ser uma opção terapêutica no controle dessa doença por meio da suspensão dos mecanismos antiapoptóticos na PNSE.

7 CONCLUSÃO

- Nossos dados permitem concluir que a mitomicina C atua sobre os pólipos nasais eosinofílicos induzindo o aumento do índice apoptótico em eosinófilos *in vitro*.
- Os resultados do índice apoptótico obtidos pela morfometria foram confirmados pela avaliação imunohistoquímica.

REFERÊNCIAS

1. Settipane GA. Nasal polyps and systemic diseases. *In*: Schatz M, Zeiger RS, Settipane GA. Nasal manifestations of systemic diseases. Providence: Oceanside Publ. 1991: 43-51.
2. Settipane GA. Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment. Providence: Ocean Side Publications 1997: 137.
3. Kim JW, Kim SK, Song IH, KIM IT. Mitomycin C-induced apoptosis in cultured human Tenon's capsule fibroblasts. *Korean J Ophthalmol* 1999; 13:7-15.
4. Konstantinidis I, Tsakiropoulou E, Vital I, Triaridis S, Vital V, Constantinidis J. Intra-and postoperative application of Mitomycin C in the middle meatus reduces adhesions and antrostomy stenosis after FESS. *Rhinology* 2008;46(2):107-11.
5. Hueman EM, Simpson CB. Airway complications from topical mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 133(6):831-5.
6. Warner D, Britzse SE. Mitomycin C and airway surgery: how well does it work? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 138:708-9.
7. Mullarkey MF, Hill JS, Webb DR. Allergic and nonallergic rhinitis: their characterization with attention to the meaning of nasal eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 65(2):122-6.
8. Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinol SUPPL.* 2007;(20):1-136.
9. Tos M, Larsen PL, Larsen K, Thomasen PC. Nasal polyps. *In*: Stamm AC, Draf W. Micro-endoscopic surgery of the paranasal sinuses and the skull base. Heidelberg: Springer 2000, cap. 8:103-25.
10. Ryan MW. Diseases associated with chronic rhinosinusitis: what is the significance? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 16:231-236.
11. Pawankar R. Nasal polyposis: an update. *Curr Opin Allergy Immunol* 2003; (3):1-6.
12. Ingels K, Durdurez JP, Cuvelier C, Cauwenberge PV. Nasal biopsy is superior to nasal smear for finding eosinophils in nonallergic rhinitis. *Allergy* 1997; 52(3):338-41.
13. Cara DC, Negrão-Correa D, Teixeira MM. Mechanism underlying eosinophil trafficking and their relevance *in vivo*. *Histol Histopathol* 2000; 15: 899-919.

14. Soler ZM, Sauer DA, Mace J, Smith TL. Relationship between clinical measures and histopathologic finds in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009 Oct; 141(4):454-61.2009.
15. Soler ZM, Sauer D, Mace J, Smith TL. Impact of eosinophilia and nasal poliposis on quakity-of-life outcomes after sinus surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010 Jan; 142(1):64-71.
16. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:378-90.
17. Wooley KL, Gibson PG, Carty K, Wilson AJ, Twaddell SH, Wooley MJ. Eosinophils apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:237-43.
18. Stern M, Meagher L, Savill J, Haslett C. Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and its modulated by IL5. *J Immunol* 1992; 148:3543-49.
19. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Basson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.
20. Simon HU. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis: Similaties and differences. *Immunology* 2001; 179:156-62.
21. Shin SH, Lee SH, Jeong SH, Kita H. The effect of nasal polyp epithelial cell in eosinophil activation. *Laryngoscopy* 2003; 113:1374-7.
22. Simon HU, Yossefi S, Schranz C, Schapowal A, Barchet C, Blaser K. Direct demnstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997; 158(8):3902-8.
23. Davidsson A, Anderson T, Hellquist HB. Apoptosis and phagocytosis of tissue-dwelling eosinophils in sinonasal polyps. *Laryngoscope* 2000; 110(1):111-6.
24. Kowalski ML, Grzegorzczak J, Pawliczak R, Kornatowski T, Wagrowoska-Danilewicz M, Danielwicz M. Decrease apoptosis and distinct profile of infiltrating cells in the nasal polyps of patients with aspirin hypersensitivity. *Allergy* 2002; 57:493-500.
25. Garavello W, Viganó P, Romagnoli M, Sordo L, Berti E, Tredici G, *et al.* Expression of cell cycle regulatory proteins and analysis of apoptosis en normal nasal mucosa and in nasal polyps. *Am J Rhinol* 2005; 19(6):549-53.
26. Qiu ZF, Han DM, Zhang L, Zhang W, Fan EZ, Cui SJ, *et al.* Expression of survivin and enhanced polypogenesis in nasal polyps. *Am J Rhinol* 2008; 22(2):106-10.

27. Chalastras T, Athanassiadou P, Patsouris E, Eleftheriadou A, Kandiloros D, Papaxoinis K, *et al.* Differential rates of proliferation and apoptosis in nasal polyps correspond to alterations in DNA spatial distribution and nuclear polarization as observed by confocal microscopy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 29.
28. Cho SH, Lee SH, Kim KR. Expression and distributional Patterns of the inhibitor of apoptosis protein family and Caspase 3 in nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134(3):316-321.
29. Lee HS, Myers A, Kim J. Vascular endothelial growth factor drives autocrine epithelial cell proliferation and survival in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(11):1056-67.
30. Dutsch-Wicherek M, Tomaszewska R, Lazar A, Strek P, Wicherek L, Piekutowski K. *et al.* The evaluation of Metallothionein expression in nasal polyps with respect to immune cell presence and activity. *BMC Immunology* 2010; 11:10.
31. Xaubet A, Mullol J, Lopez E, Roca-Ferrer J, Rozman M, Carrion T, *et al.* Comparison of the role of nasal polyp and normal nasal mucosal epithelial cells on in vitro eosinophil survival. Mediation by GM-CSF and inhibition by dexamethasone. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(4):307-17.
32. Saunders MW, Wheatley AH, George SJ, Lai T, Birchall MA. Do corticosteroids induce apoptosis in nasal polyp inflammatory cells? *In vivo* and *in vitro* studies. *Laryngoscope* 1999; 109(5):785-90.
33. Hirano S, Asano K, Namba M, Kanai K, Hisamitsu T, Suzuki H. Induction of apoptosis in nasal polyp fibroblasts by glucocorticoids in vitro. *Acta Otolaryngol* 2003; 123:1075-1079.
34. Watanabe K, Shirasaki H, Kanaizumi E, Himi T. Effects of glucocorticoids on infiltrating cells and epithelial cells of nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004; 113:465-473.
35. Kimura Y, Sugimoto C, Takabayashi T, Tanaka T, Kojima A, Narita N, *et al.* Bax-gene transfer enhances apoptosis by steroid treatment in human nasal fibroblasts. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267:61-66.
36. Carrano AV, Thompson LH, Stretka DG, Minkler JL, Frong S. DNA crosslinking sister chromatid exchange and specific locus mutation. *Mutat Res* 1979; 63:175-88.
37. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Grierson H, Shultz G, Megorray S. Prolonged localized tissue effects from 5 minutes exposures fluoracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993; 72:155-61.

38. Kim HY, Dhong HJ, Min JY, Jung YG, Park SH, Chung SK. Postoperative maxillary sinus mucocele: risk factors for restenosis after surgery and preventive effects of mitomycin-C. *Rhinology* 2009; 47(1):79-84.
39. Ingrams DR, Volk MS, Biesman BS, Pankratov MM. Sinus Surgery: Does Mitomycin C Reduce Stenosis? *Laryngoscope* 1998; 108:883-886.
40. Correa AJ, Reinish L, Sanders DL, Huang S, Deriso W, Duncavage JA. Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin c in the canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108(1):1053-60.
41. Rahbar R, Valdez TA, Shapshay SM. Preliminary results of intraoperative mitomycin-C in the treatment and prevention of glottic and subglottic stenosis. *J Voice* 2000; 14(2):282-6.
42. Stream SA, Vanlewen RN. Use of mitomycin C for maintenance of myringotomy patency. *Otolaryngol Head and Neck* 2000; 122:8-10.
43. Crosara PF, Vasconcelos AC, Guimarães RE, Becker HM, Becker CG, Crosara SL, *et al.* Efeito da mitomicina C na secreção de fator estimulador de granulócitos macrófagos e interleucina-5 em cultura de estroma de pólipos nasais eosinofílicos. *Rev Bras Otorlaringol* 2005; 71(4):459-63.
44. Crosara PFTB, Nascimento E, Sobrinho SC, Vasconcelos AC, Guimarães RES, Becker HMG, *et al.* Efeito da mitomicina C em cultura de estroma de pólipos nasais eosinofílicos: indução de apoptose em eosinófilos. *Rev Bras Otorlaringol* 2004; 70:658-63.
45. De Castro MC, Assunção E, De Castro MM, Araujo RA, Guimarães RE, Nunes FB. Efeito da mitomicina C em polipose nasal eosinofílica *in vivo*: dosagem de IL-5 e Gm-CSF, RT-PCR. *Rev Bras Otorlaringol* 2006; 72:38-42.
46. Moneret-Vautrin DA, Jankowisk R, Wayoff M. Clinical and pathogenic aspects of NARES (nonallergic rhinitis with eosinophilic syndrome). *Rev Laryngol Otol Rhinol* 1991; 112(1):41-4.
47. Teram LM, Park HS, Djukanovic R, Roberts K, Holgate S. Cultured nasal polyps from nonatopic and atopic patients release RANTES spontaneously and after stimulation with phytohemagglutinin. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(4):499-504.
48. Park HS, Jung KS, Shute J, Roberts K, Holgate ST, Djukanovic R. Allergen-induced release of GM-CSF and IL-8 in vitro by nasal polyp tissue from atopic subjects prolongs eosinophil survival. *Eur Respir J* 1997; 10(7):1.476-82.
49. Moro L, Vasconcelos AC, Santos FGA, Alves CM, Nunes IBM. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2004; 56:408-410.

50. Walsh GM, Dewson G, Wardlaw AJ, Lebi-Shaffer F, Moqbel R. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Meth* 1998; 217:153-63.

ANEXO E APÊNDICES

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 484/08

Interessado(a): Prof. Roberto Eustáquio Santos Guimarães
Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 05 de novembro de 2008, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo morfométrico de pólipos nasais eosinofílicos submetidos ao efeito da mitomicina C**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Apêndice A - Consentimento livre e esclarecido para a participação em pesquisa

Eu,, portador de polipose nasossinusal, autorizo a equipe de Rinologia do Serviço de Otorrinolaringologia, HC-UFMG, a enviar parte de minha biópsia nasal para o desenvolvimento de experimento em laboratório, visando tornar mais eficaz as formas de tratamento de minha doença. Estou ciente de que essa biópsia faz parte de meu tratamento, devendo ser realizada em todos os casos, normalmente em regime ambulatorial, sem necessidade de qualquer preparo especial, com duração de alguns minutos e não me impossibilitando para minhas funções normais imediatamente e após o procedimento.

Estou ciente de que esta pesquisa não envolverá qualquer risco à minha saúde e que meu tratamento seguirá seu curso normal dentro dos parâmetros atuais.

ASSINATURAS:

Eu pessoalmente expliquei ao paciente o propósito deste estudo científico, bem como seus detalhes, os procedimentos a serem realizados e os termos do consentimento.

..... Belo Horizonte, / /

Investigador responsável:

Cláudia Pena Galvão

Endereço: Av. Alfredo Balena, s/n

Santa Efigênia / Hosp São Geraldo, fone: 32489582

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP):

Av. Antônio Carlos, 6.627, Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2.005

Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil.

telefax 31-3409.4592.

Eu confirmo que entendi os termos do consentimento abaixo e do qual recebo cópia. Perguntei e fui esclarecido sobre todos os detalhes da pesquisa. Portanto, eu, voluntariamente, dou meu consentimento para minha inclusão neste estudo.

.....

Belo Horizonte, / /

Assinatura do paciente

Anexo B - Pacientes incluídos na pesquisa

Paciente	Sexo	Idade	% Eosinófilos	Experimento
HR	F	40	45%	C
SAB	F	23	85%	F
RFS	M	60	90%	G
AG	M	42	50%	H
MC	F	38	70%	J
LRCV	F	28	70%	K
MOO	M	53	90%	L
AMR	F	45	90%	M
DSS	M	40	90%	O
ICAL	F	39	90%	P
MEMR	F	34	80%	Q
HET	M	35	90%	S
MJS	M	16	70%	U
MEN	F	28	60%	V
ODB	M	45	50%	X