

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
IL-5, GM-CSF, TGF- β 1, EOTAXINA NA POLIPOSE
NASOSSINUSAL EOSINOFÍLICA PÓS-CIRURGIA
ENDOSCÓPICA E EFEITO DA MITOMICINA C TÓPICA**

MÍRIAN CABRAL MOREIRA DE CASTRO

Belo Horizonte
2010

MÍRIAN CABRAL MOREIRA DE CASTRO

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
IL-5, GM-CSF, TGF- β 1, EOTAXINA NA POLIPOSE
NASOSSINUSAL EOSINOFÍLICA PÓS-CIRURGIA
ENDOSCÓPICA E EFEITO DA MITOMICINA C TÓPICA**

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

Área de concentração: Resposta inflamatória à agressão tecidual.

Linha de pesquisa: Alterações morfológicas, resposta inflamatória e repercussões sistêmicas nas rinosinusopatias.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Eustáquio Santos Guimarães.

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

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

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Edson Samesima Tatsuo

Prof^a. Ivana Duval de Araújo

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Juliano Alves Figueiredo (Disc. Titular)

Ao meu marido,
grande figura, uma mistura de filosofia,
paciência, raciocínio lógico, poesia, bondade
e um silêncio impenetrável.

A liberdade de me manter profundamente presa à Medicina,
que meu marido e filhos me permitiram sem deixar de me amar
e, sobretudo, me mostrar o verdadeiro valor da vida:
Marco Antonio, Mariana, KK e Marco.

À Virgínia, que me mostrou a felicidade simples do viver.

À minha família,
que após meus frequentes períodos de ausência,
me alegra e fortalece para continuar o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Roberto Eustáquio Santos Guimarães, pelo estímulo à pesquisa e sua importância na projeção da especialidade do nosso estado.

Ao Professor Doutor Tarcizo Anfonso Nunes, por todo apoio, incentivo e simplicidade de ser no auxílio desta tese, ao participar da banca de pré defesa.

Ao Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

À Subunidade de PCR em Tempo Real – RPT09D do Centro de Pesquisas René Rachou/PDTIS-FIOCRUZ e ao *Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ*.

Ao Dr. Olindo Martins-Filho, Chefe do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas RENÉ RACHOU/FIOCRUZ, pelo consentimento à realização da pesquisa sem ressalvas.

Às Dr^{as}. Andréia Teixeira de Carvalho e Luciana Inácio Gomes, pesquisadoras do Centro de Pesquisas René Rachou, pela acolhida e espírito científico.

À Fabiana Rocha, técnica do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico pela seriedade, competência e disponibilidade na realização das análises.

À minha filha médica Mariana, pelos momentos dedicados ao auxílio deste trabalho.

Aos residentes, que nos desafiam e estimulam; juntos crescemos em busca de um caminho melhor.

Ao Hospital das Clínicas, que me deu a oportunidade do crescimento acadêmico.

À Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, que me ensinou a ser médica.

Aos amigos, palavras são desnecessárias.

RESUMO

A polipose nasossinusal (PNSE) é uma degeneração da mucosa do nariz e seios paranasais, com participação de várias citocinas inflamatórias. **Objetivo:** comparar as diferenças de expressão de genes inflamatórios na PNSE pré e pós-aplicação tópica de mitomicina C nos seios maxilares e relacioná-las com a expressão dos tecidos normais. **Casuística e métodos:** foram selecionados 20 pacientes com PNSE e seis com adenoma de hipófise submetidos a tratamento cirúrgico endoscópico. A mucosa dos seios maxilares foi biopsiada no transoperatório; e no seio maxilar esquerdo foram aplicados 3 mL de mitomicina C tópica 0,5 mg/mL durante cinco minutos. No 21º dia pós-operatório, nova biópsia foi colhida nos seios maxilares. Nos seis pacientes submetidos à cirurgia transesfenoidal para exérese de tumor de hipófise, realizou-se biópsia da mucosa normal do seio esfenoidal. As amostras foram analisadas por RT-qPCR para expressão de IL5, eotaxina, fator estimulador de colônia granulócito macrófago e fator transformador de crescimento beta-1. **Resultados:** observou-se, na mucosa doente, distribuição assimétrica para os valores das citocinas. Os valores de eotaxina diminuíram após o tratamento. No seio maxilar esquerdo, a expressão de IL5 foi maior no transoperatório (pré-aplicação de mitomicina C) em relação ao tecido normal e em relação ao 21º dia após a aplicação do medicamento. **Conclusão:** houve indicação da ação da mitomicina C na subexpressão da IL5. Verificou-se indicação do benefício da cirurgia e corticoide para eotaxina. As expressões das citocinas mostraram valores assimétricos e aumentados em relação ao tecido normal, exceto para o fator de crescimento beta-1.

Palavras-chave: Polipose nasossinusal. RT-qPCR. Mitomicina C. Citocinas.

ABSTRACT

Nasosinusal polyposis is a degeneration of the mucosa of the nose and paranasal sinuses with the participation of several inflammatory cytokines. Objective: To compare the differences in the expression of inflammatory genes in eosinophilic nasosinusal polyposis prior and after the topical application of Mitomycin C in the maxillary sinus, and to relate it to their expression in normal tissue. Casuistic and Method: twenty patients with nasosinusal polyposis and six patients with pituitary adenoma were selected and underwent endoscopic surgical treatment. Maxillary sinus mucosa was biopsied at surgery and the left maxillary sinus was submitted to topical application of 3 ml of Mitomycin C 0.5 mg/ml for 5 minutes. In the 21st day after surgery a new biopsy was collected from the maxillary sinuses. In the six patients who underwent transsphenoidal surgery for removal of pituitary tumors a biopsy of the normal mucosa of the sphenoid sinus was carried out. The samples were analyzed through RT-qPCR for the expression of IL5, eotaxin, granulocyte macrophage colony stimulating factor and that also transforming growth factor beta-1. Results: It was observed, in the diseased mucosa, an asymmetric distribution for the values of the cytokines. The values of eotaxin diminished after treatment. In the left maxillary sinus, the expression of IL5 was greater in the trans-operative period (prior to the application of Mitomycin C) compared to normal tissue and to the 21st day after the application of the medication. Conclusion: There was indication of the action of Mitomycin C in the subexpression of IL5. It was also observed the recommendation of the benefit of surgery and corticoid for eotaxin. The expression of cytokines had asymmetrical values, and increased in relation to normal tissue except for beta-1 growth factor.

Key words: nasal polyposis. RT-qPCR. Mitomycin C. Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta-actina
ANOVA	Análise de variância
BCL	<i>B cell lymphoma</i>
BCLX	<i>BCL associated protein X (BAX)</i>
CCL24	Eotaxina 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CSF 2	Fator estimulador de colônia granulócito macrófago
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
DEPC	<i>Diethylene pyrocarbonate</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DP	Desvio-padrão
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN	<i>Eosinophil-derived neurotoxin</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FAS	Gene da superfamília TNF
FW	<i>Forward</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito macrófago
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICAM-1	<i>Inter-cellular adhesion molecule</i>
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LPS	Lipossacáride
MBP	<i>Major basic protein</i>
MgCl	Cloreto de magnésio
MMC	Mitomicina C
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

NARES	Rinite eosinofílica não alérgica
NGF	Fator de crescimento neural
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i>
PNS	Polipose nasossinusal
PNSE	Polipose nasossinusal eosinofílica
Q	Quartil
RNasin	Inibidor de ribonuclease
RSC	<i>Steroid receptor coactivator</i>
RT	Transcrição reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real-quantitativo
RV	<i>Reverse</i>
TGF- β 1	Fator transformador de crescimento beta-1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	Molécula 1 de adesão da célula vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Delineamento do estudo.....	40
FIGURA 2 Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo evidenciando três amostras de RNA total extraídos no estudo e com integridade preservada pela análise da relação favorável entre as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.....	42
FIGURA 2 Gráfico de comparação da média dos níveis de ciclo <i>threshold</i> (Ct) pela análise de variância (ANOVA) $P=0,1125$, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey $P>0,05$	45
FIGURA 4 Resultado das comparações.....	66
FIGURA 5 Resultados das comparações entre os momentos.....	67

Gráficos

GRÁFICO 1 <i>Box-plot</i> da eotaxina por grupo.....	50
GRÁFICO 2 <i>Box-plot</i> do Gm-CSF (CSF2) por grupo.....	52
GRÁFICO 3 <i>Box-plot</i> da IL5 por grupo.....	53
GRÁFICO 4 <i>Box-plot</i> da TGF- β 1 por grupo, desconsiderando-se os valores dos <i>outliers</i>	55
GRÁFICO 5 Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos de tecido normal.....	59
GRÁFICO 6 Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os espécimes de mucosa com PNSE do lado direito no momento zero.....	60
GRÁFICO 7 Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos do tecido doente no lado direito no momento 21.....	62
GRÁFICO 8 Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento zero.....	63
GRÁFICO 9 Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento 21.....	65
GRÁFICO 10 Dispersão por citocina e lado e momento.....	68
GRÁFICO 11 <i>Box-plot</i> por citocina e grupo.....	69

Quadro

QUADRO 1 Sequência de iniciadores *forward* (FW) e *reverse* (RV) referente aos genes avaliados, número de acesso das sequências no GenBank, tamanho do fragmento gerado e eficiência relativa da amplificação por qPCR avaliada a partir dos valores do *slope*..... 45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Descrição do número de medidas realizadas.....	48
TABELA 2 Análise descritiva da eotaxina em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	49
TABELA 3 Comparações para eotaxina entre os grupos em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	50
TABELA 4 Análise descritiva de GM-CSF em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	51
TABELA 5 Comparações para GM-CSF entre os grupos em 6 espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos 0 e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	52
TABELA 6 Análise descritiva de IL5 em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	53
TABELA 7 Comparações para IL5 entre os grupos em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos 0 e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	54
TABELA 8 Análise descritiva de TGF- β 1 em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	55

TABELA 9	Comparações para a TGF- β 1 entre os grupos em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo.....	56
TABELA 10	Resumo das comparações entre as citocinas e os grupos em mucosa de 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C em no seio maxilar esquerdo e em seis do grupo normal.....	57
TABELA 11	Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p entre as quatro citocinas considerando os casos de tecido normal.....	58
TABELA 12	Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p entre as quatro citocinas considerando-se os casos do tecido doente no lado direito no momento inicial.....	60
TABELA 13	Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p entre as quatro citocinas considerando-se os casos do tecido doente no lado direito no momento 21.....	61
TABELA 14	Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p entre as quatro citocinas considerando-se os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento zero.....	63
TABELA 15	Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p entre as quatro citocinas considerando os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento 21.....	64
TABELA 16	Resumo das correlações com significância estatística entre as citocinas.....	66

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.1 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Conceito e apresentação clínica da polipose nasossinusal eosinofílica..	20
2.2 Incidência e prevalência.....	20
2.3 Hereditariedade.....	21
2.4 Histologia.....	22
2.5 Eosinófilos e citocinas.....	22
2.6 Fisiopatologia.....	24
2.6.1 Alergia e PNSE.....	24
2.6.2 Polipose nasossinusal eosinofílica e <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.6.3 Polipose nasossinusal eosinofílica e CD4, CD8 e células HLA-DR+....	26
2.6.4 Fatores estimuladores de colônia, células estruturais e teoria autócrina.....	27
2.6.5 Fatores de crescimento, moléculas de adesão e citocinas.....	28
2.7 Apoptose.....	32
2.8 Mitomicina C.....	33
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
3.1 Pacientes.....	38
3.1.1 Critérios diagnósticos.....	38
3.1.2 Critérios de inclusão.....	39
3.1.3 Critérios de exclusão.....	39
3.2 Metodologia.....	39
3.2.1 Delineamento do estudo.....	40
3.2.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	41
3.2.2.1 Extração de RNA total.....	41

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas e enquadrado nas normas da ABNT segundo FRANÇA *et al.* Manual para normalização de publicações técnico-científicas. Belo Horizonte: UFMG, 8. ed., 2007. 242 p.

3.2.2.2 Síntese de cDNA.....	42
3.2.2.3 Escolha dos iniciadores.....	43
3.2.3 Reação de qPCR.....	44
3.2.3.1 Avaliação da uniformidade dos níveis de expressão do controle endógeno.....	44
3.2.3.2 Validação da eficiência de amplificação dos genes alvo e controle endógeno.....	45
3.2.3.3 Detecção dos níveis de expressão gênica por qPCR.....	46
3.2.4 Variáveis estudadas e métodos estatísticos.....	47
3.2.4.1 Comparação entre os grupos em cada citocina.....	47
3.2.4.2 Correlação entre as citocinas.....	47
3.2.4.3 Análise descritiva.....	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Comparações de cada citocina com os grupos (tecidos, lados e momentos).....	49
4.1.2 Consolidado.....	56
4.2 Correlação entre as citocinas.....	57
4.2.1 Tecido normal.....	57
4.2.2 Lado direito (momento zero).....	59
4.2.3 Lado direito (momento 21).....	61
4.2.4 Lado esquerdo (momento zero).....	62
4.2.5 Lado esquerdo (momento 21).....	64
4.2.6 Consolidado.....	65
4.3 Gráficos complementares.....	67
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÃO.....	74
7 PROPOSIÇÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICES E ANEXO.....	88

1 INTRODUÇÃO

A polipose nasossinusal eosinofílica (PNSE) é a manifestação de uma doença inflamatória crônica na mucosa do nariz e seios paranasais, caracterizada por infiltração de granulócitos eosinófilos, cujo mecanismo patogênico não é totalmente conhecido e representa um desafio para o otorrinolaringologista. O tratamento clínico está limitado ao emprego de corticosteroide tópico, sistêmico ou outros medicamentos que possam diminuir a liberação e ação das citocinas TH2/TH1 e a eosinofilia tecidual. Várias pesquisas com o objetivo de compreender e minimizar a polarização do padrão inflamatório abordam o papel do *S. aureus* e da alergia. O avanço na área da Biologia Molecular tem mostrado conectividade e diferenças de expressão gênica na mucosa nasal de pacientes com PNSE.

O acúmulo de eosinófilos, juntamente com células estruturais, secretam fatores inflamatórios. A citocina interleucina 5 (IL5) e o fator estimulador de colônia granulócito macrófago (GM-CSF) são os mediadores mais envolvidos na manutenção da eosinofilia tecidual, pois diminuem o índice de apoptose dessas células. O TGF β 1 (fator transformador de crescimento beta 1), responsável pela formação estrutural dos pólipos, é essencial nas interações celulares que levam a proliferação tecidual. Quimiocinas como as eotaxinas têm papel importante na migração de linfócitos e eosinófilos e na manutenção da cascata inflamatória.

A análise dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da PNSE apresenta resultados conflitantes devido a vários fatores, desde coleta e armazenamento de material até qualidade de *primers* e métodos usados para os estudos.

Dos tratamentos propostos com benefício terapêutico para PNSE, o emprego de antibacterianos sistêmicos mostrou efeito na diminuição dos pólipos. Pacientes tratados com anti-IL5 (endovenosa) apresentam redução dos receptores alfa solúvel para interleucina-5 (IL5), no entanto somente 50% respondem ao tratamento. A diferença entre pacientes responsivos e não responsivos foi relacionada com o nível de IL5 acima de 40 pg/mL¹.

A diminuição das células e mediadores inflamatórios foi acentuada em análise de lavados de secreções nasais, realizados em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico e uso tópico de corticosteroide durante um ano². Seu uso sistêmico pode diminuir os níveis de citocinas em até 10 vezes nos pólipos nasais e quatro vezes o número de eosinófilos³.

O corticoide tópico reduz a ativação dos eosinófilos, sendo a terapia mais usada para controle da inflamação e crescimento da PNSE. Entretanto, muitos pacientes não melhoram com a utilização tópica isolada e necessitam de doses adicionais de prednisona⁴. A falta de adesão ao tratamento, as poliposes extensas e a resistência ao medicamento por mecanismos celulares são fatores relacionados ao insucesso terapêutico⁵. Entre os mecanismos de resistência incluem-se os fatores de transcrição e a relação de isoformas de receptores. Pacientes insensíveis ao glicocorticoide possuem alta percentagem de células com receptores GR β , que não se ligam à medicação; além disso, concentrações diferentes de, esse medicamento estimulam receptores diferentes⁴.

Os glicocorticoides provocam apoptose dos eosinófilos, diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como IL5, eotaxina, GM-CSF e aumentam moléculas como TGF- β 1⁶.

A mitomicina C (MMC), produzida por *Streptomyces caespitosus*, é agente antineoplásico que inibe a síntese de DNA e RNA. Usado como antiproliferativo em fibroblastos, diminui a formação de tecido cicatricial. Exposição transoperatória à MMC tem revelado melhores resultados cirúrgicos em animais e seres humanos, sem efeitos colaterais.

Em estudo anterior realizado pelo autor da presente pesquisa, a utilização tópica de MMC em pólipos de pacientes, *in vivo*, mostrou redução com significância de IL5 e GM-CSF em biópsias realizadas 24 horas após a aplicação. Em cultura de pólipos evidenciou eficácia em provocar apoptose de eosinófilos. Portanto, a MMC demonstrou efeito antiinflamatório.

A relevância desta análise foi pesquisar a eficiência da mitomicina C como auxiliar no tratamento dessa afecção frente às alternativas atuais de tratamento.

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da MMC tópica na expressão das citocinas inflamatórias: IL-5, GM-CSF, TGF- β 1 e eotaxina na mucosa de pacientes com PNSE.

1.1.1 Objetivos específicos

- Comparar a expressão das citocinas IL5, GM-CSF, eotaxina e TGF- β 1 pré e 21 dias após a utilização da MMC tópica na mucosa dos seios maxilares de pacientes com PNSE.
- Comparar a expressão das citocinas IL5, GM-CSF, eotaxina e TGF- β 1 na mucosa dos seios maxilares de pacientes com PNSE e na mucosa considerada normal dos seios esfenoidais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Conceito e apresentação clínica da polipose nasossinusal eosinofílica

A PNSE é uma das diferentes afecções que fazem parte do grupo heterogêneo das rinosinusites crônicas nas quais sinais e sintomas se sobrepõem. Mediadores inflamatórios e características celulares diferentes, além de tempo semelhante de desenvolvimento da doença em relação a outras afecções sinusais, indicam ser essa uma entidade distinta no grupo das doenças crônicas dos seios paranasais⁷. Na PNSE encontram-se resposta imune T mediada e predomínio de linfócito T ativado. O estudo dos mediadores inflamatórios torna mais evidente a classificação dessa entidade.

Os pacientes com PNSE apresentam sintomas como: obstrução nasal progressiva (100% dos casos), rinorreia (69%), anosmia (61%), dor facial (60%), cefaleia (43%)⁸, gotejamento pós-nasal, hiper-reatividade nasal e brônquica e rinosinusites de repetição. Os pólipos apresentam-se com coloração rósea acinzentada e translúcida, de consistência mole e aspecto brilhante e geralmente são bilaterais, indolores e não sangram à manipulação^{9,10}.

Eosinofilia é considerada significativa na presença de eosinófilos em quantidade igual ou superior a 25% das células inflamatórias do esfregaço da secreção nasal¹¹ ou superiores a 20% do total de leucócitos¹². Pesquisas realçam que os eosinófilos são mais facilmente observados na biópsia da mucosa nasal do que em esfregaços, definindo como polipose eosinofílica quando se verificam mais de quatro eosinófilos em quatro campos microscópicos de elevado aumento (400 vezes) ou quando o percentual de eosinófilos é superior a 20% das células inflamatórias¹³.

2.2 Incidência e prevalência

A PNSE representa cerca de 80 a 90% das poliposes¹⁴. A incidência é variável, sobretudo na população geral e em pacientes atópicos, nos quais a frequência é semelhante, variando entre 0,5 e 2,8%¹⁵⁻¹⁸, sendo encontrados pólipos em somente 0,5% dos exames consecutivos em 3.000 pacientes atópicos¹⁹. É mais frequente em portadores de rinite e asma em indivíduos não atópicos^{20,21}. Em estudos de larga série de pacientes, a asma foi diagnosticada entre 20 e 50% dos casos²².

Em acompanhamento a 6.000 pacientes com asma ou rinite, relatou-se alta prevalência de polipose nasossinusal (PNS) em asmáticos não alérgicos maiores de 40 anos¹⁶. Em pacientes com asma extrínseca, a PNS estava presente em 5% e em 13% do grupo de não alérgicos. A associação de pacientes com asma e seu tipo de tratamento não apresenta relação com a frequência de recorrência da PNSE²³. Essa característica importante da PNSE encontra-se aumentada em pacientes atópicos e intolerantes à aspirina.

2.3 Hereditariedade

Em 1992, foi descrita PNS em gêmeos idênticos e sugerida a existência de predisposição genética²⁴. Em 50 pacientes com pólipos registrou-se história positiva de hereditariedade em 14% e em 30 pacientes do grupo-controle não foi confirmada a existência de pólipos em outros membros da família²⁵. A associação do genótipo IL1A com PNS em asmático foi demonstrada em avaliação no ano de 2003²⁶.

A predisposição genética existe, mas o conhecimento desses fatores é reduzido. A correlação foi significativa entre PNS e alelos *human leukocyte antigen* (HLA)²⁷, que são marcadores genéticos essenciais na regulação da resposta imune, pela apresentação de antígenos aos linfócitos T e compatibilidade tecidual²⁸.

Pacientes com pólipos nasal e asma e HLA Ar/B8 positivo desenvolvem um tipo mais grave de PNS. Esse genótipo tem sido associado a doenças autoimunes como lúpus, diabetes juvenil e doença de Graves, sugerindo envolvimento de

genes do complexo HLA e que anormalidades da resposta imune estão associadas às duas condições. A recorrência dos pólipos parece estar sob controle genético²⁹⁻³¹.

A contribuição genética evidencia-se: na PNSE isolada com o antígeno HLA-A74; na expressão aumentada de HLA-DR e moléculas de *inter-cellular adhesion molecule 1* (ICAM-1); e na tríade de Widal associada a HLA- DRB1 *07-DQA1 * 0201-DQB1 *0201, que estão ausentes em pacientes de outros grupos de PNS. Os alelos HLA-DQA1*0201 e DQB1*0202 aumentam 5,53 vezes o risco de ocorrência de PNSE^{14,32,33}. A presença do alelo TNF2 na posição 308 é fator contribuinte para o desenvolvimento da PNSE³⁴.

Esse polimorfismo genético pode participar na regulação e produção de citocinas pró-inflamatórias, gerando inflamação crônica.

2.4 Histologia

A PNSE caracteriza-se por infiltração subepitelial de células inflamatórias com intensa eosinofilia e proliferação tecidual. Eosinófilos ativados são sua característica proeminente. Apresenta alterações estruturais como edema do estroma, formação pseudocística, hiperplasia glandular, espessamento da membrana basal e fibrose focal^{31,35-37}.

O pólipo nasal exibe epitélio colunar pseudoestratificado com células caliciformes e ciliares e, em determinadas áreas, epitélio de transição e escamoso não queratinizado. As células inflamatórias usualmente consistem de mistura de linfócitos, células plasmáticas e eosinófilos, além das células constitutivas, que são fibroblastos, células epiteliais e endoteliais^{38,39}. Alguns pólipos têm estroma fibrótico com reduzido número de vasos e glândulas, sem estrutura neural⁴⁰.

2.5 Eosinófilos e citocinas

Os eosinófilos são capazes de modular respostas imunes pela liberação de fatores de crescimento, interleucinas e quimioatraentes. Citocinas como a IL5 são

proteínas de baixo peso molecular, que regulam a proliferação e ativação de várias células, ampliando a resposta imune local.

O fator estimulador de colônia granulócito macrófago (GM-CSF) é uma citocina com potente efeito biológico, incluindo ativação de granulócitos e diferenciação de células hematopoéticas. Encontra-se ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para GM-CSF no pólipo nasal e na mucosa de pacientes com rinite alérgica, mas não em indivíduos normais. Macrófagos e linfócitos são as fontes primárias de GM-CSF, além de fibroblastos, células epiteliais e endoteliais⁴¹⁻⁴³.

In vitro, a IL5 promove a liberação de grânulos de proteínas dos eosinófilos quando adicionada à cultura de tecido polipoide. O GM-CSF tem efeito coestimulador na indução da degranulação, que é regulada por múltiplos outros componentes. IL5, GM-CSF e interleucina 3 (IL3) são os maiores responsáveis pela sobrevivência, diferenciação e ativação dos eosinófilos, diminuindo a apoptose e intensificando, assim, a resposta inflamatória mediada por essas células⁴⁴. Os eosinófilos expressam IL5 em todas as PNSEs. A chave para o desenvolvimento da eosinofilia tecidual é, portanto, a inibição da apoptose⁴⁵⁻⁴⁸. O *clearance* eficiente dos eosinófilos teciduais é um dos mecanismos que limitam o potencial tóxico dessas células⁴⁹.

As três citocinas (IL3, IL5, GM-CSF) agem de forma autócrina e parácrina. GM-CSF e IL3 têm a função primária de estimular células pluripotentes do sistema hematopoético. Embora essas citocinas tenham ação de quimiotaxia, a IL5 é o mais específico e potente fator quimiotático *in vitro*. GM-CSF e IL5 estão elevados em pólipos de atópicos e não atópicos^{50,51}.

Experimentos demonstraram diferentes efeitos de anti-IL5 na contagem de eosinófilos em diferentes compartimentos do corpo. Após o uso de uma dose de reslizumab, obteve-se redução de proteína catiônica eosinofílica (ECP) e eosinófilos por mais oito semanas no soro e na secreção nasal; os pólipos reduziram-se em apenas 50% dos pacientes por quatro semanas. Outros autores constataram redução de eosinófilos em 100% da corrente sanguínea, 52% da medula óssea e 55% da mucosa brônquica. A possível razão para esses achados pode ser uma diferente penetração de anti-IL5 nos tecidos ou a variação de sensibilidade de IL5 causada por expressão diferente de IL-5R α (receptor alfa) no

corpo. A concentração local de IL5 foi o fator determinante na resposta aumentada à medicação⁵².

Eosinófilos ativados secretam outros potentes efetores inflamatórios importantes na degranulação e quimiotaxia do próprio eosinófilo, na ativação dos neutrófilos, macrófagos e no aumento da permeabilidade vascular⁵³. Dividem sua superfície com elementos mielopoéticos e sua função efetora é mediada por um mecanismo ainda não completamente compreendido⁴¹.

2.6 Fisiopatologia

De etiologia ainda não esclarecida, existem vários fatores envolvidos na fisiopatologia da PNSE. Os pólipos nasais não se constituem afecção *per se*, mas uma manifestação de um processo inflamatório na parede lateral do nariz. Várias teorias foram propostas para explicá-los: disfunção do sistema nervoso autônomo do nariz, desequilíbrio vasomotor, alergia, processo inflamatório vicioso a partir de uma infecção, doenças metabólicas, hereditárias e, finalmente, um processo inflamatório resultado de mediadores como interleucinas, moléculas de adesão e contrarreceptores endoteliais³⁹.

2.6.1 Alergia e PNSE

O afastamento da alergia como fator causal da PNSE é corroborado pelo envolvimento de reações não imunoglobulina E (IgE) mediadas, a maior incidência de PNSE em pacientes não atópicos comparados com os atópicos, além de processos inflamatórios e imunológicos locais.

As células plasmáticas do pólipo são principalmente imunoglobulina A (IgA) secretoras. A baixa incidência de células secretoras de IgE - na maioria das amostras de culturas de pólipos de pacientes com rinite eosinofílica não alérgica (NARES), intolerância aspirínica e asma brônquica - sugere que a reação tipo 1 de hipersensibilidade não é essencial para o desenvolvimento do pólipo⁵⁴. A presença difusa de células plasmáticas e a formação de IgE policlonal nos pacientes com PNSE propõem síntese local de IgE na mucosa do pólipo⁵⁵.

Os mastócitos dos pólipos nasais não são IgE dependentes³⁸ e estão localizados na região profunda do estroma, sinalizando que eles não são ativados por alérgenos inalantes. Os mastócitos expressam uma variedade de citocinas no pólipo nasal, que são capazes de estimular a liberação de outros mediadores, auxiliando na manutenção tecidual dos eosinófilos. Acredita-se que os mastócitos possam contribuir para o aumento da recorrência em atópicos⁵⁶.

Apesar da existência de IgE em tecido homogeneizado de atópicos, não há evidência de que o mecanismo alérgico mediado seja responsável pela eosinofilia em pacientes não atópicos^{57,58}. Em atópicos, o nível de IgE específica no pólipo é mais alto do que no soro dos pacientes, indicando produção local dessa imunoglobulina. Em não atópicos existe significativa correlação entre IgE e IL5 tecidual, que não é encontrada em pólipos de atópicos⁵⁹. A IgE relaciona-se com a inflamação eosinofílica⁶⁰.

Com base em resultados de cultura de pólipos diante de estímulo por *Dermatophagoides pteronyssimus* e por *Phytohaemagglutinin* (PHA) de indivíduos atópicos e não atópicos, detectou-se que, com estímulos nos indivíduos sensibilizados, o alérgico pode contribuir com a eosinofilia, via produção de GM-CSF e IL8 e aumento de sobrevivência de eosinófilos maduros via IL3, IL5, GM-CSF⁶¹.

2.6.2 Polipose nasossinusal eosinofílica e *Staphylococcus aureus*

Estudos associam superantígenos do *Staphylococcus aureus* à produção local de IgE, induzindo ou provocando a PNSE.

Em relação ao grupo-controle, observou-se aumento de até 10 vezes de IgE específica para enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* em 30 a 50% dos pacientes com PNSE e em 60 a 80% se ocorresse associação à asma.

A colonização do meato médio por *Staphylococcus aureus* é maior em PNSE (63,6%) quando comparada à da rinossinusite crônica (27,3%) e está relacionada com a prevalência de anticorpos para enterotoxina. Se, além de asma, ocorrer hipersensibilidade à aspirina, a taxa de colonização é de 87,5%, com IgE antienterotoxinas em 80% dos casos. A enterotoxina do *Staphylococcus aureus* por meio da ligação ao receptor da célula T estimula a produção de IL4 e

IL5 em duas vezes, com ativação direta dos eosinófilos e das células epiteliais. Assim, leva à liberação de citocinas, além de ativar as células apresentadoras de antígeno, polarizando a inflamação para o padrão TH2. Apresenta, também, potente efeito estimulador sobre as células T CD4+ e CD8+, células B e macrófagos, resultando em aumento de IL5, ECP e IgE multiclonal. A enterotoxina age pelo menos modificando a PNSE^{1,62}. Comporta-se como um superantígeno no tecido polipoide, recrutando células inflamatórias e modificando a sensibilidade de células mononucleares ao corticoide. O aumento de IgE específica contra a enterotoxina relaciona-se com a elevação do número de receptor β dos linfócitos para *S. aureus*.

Em outra análise utilizando cultura bacteriana, reação em cadeia da polimerase (PCR), fluorescência para detecção de *S. aureus* e transcrição genética de biópsias nasais para IL5, IgE, GM-CSF, eotaxina, ECP de pacientes com rinossinusite crônica com e sem polipose, os resultados obtidos foram diferentes: não se observou aumento de prevalência de *S. aureus* entre os grupos doentes e não foram sustentados os resultados descritos anteriormente⁶³.

2.6.3 Polipose nasossinusal eosinofílica e CD4, CD8 e células HLA-DR+

Mudanças locais no número de células T possivelmente resultam em alteração na defesa celular imunomediada e participam na patogênese da PNSE⁶⁴. A inflamação eosinofílica é orquestrada pelas células T, representada por uma mistura de CD4+ e CD8+.

Também células não linfoides, como as HLA-DR+ (como os macrófagos), são abundantes no estroma dos pólipos e regiões epiteliais da concha média. Células epiteliais dos pólipos têm expressão aumentada de HLA-DR, mostrando o papel ativo na PNSE e reação inflamatória intensa. Por outro lado, essas células HLA-DR+ podem ativar o linfócito CD8+ e suprimir a resposta inflamatória^{65,66}.

O papel do CD4 e CD8 na PNSE continua controverso. Avaliando a expressão dos marcadores de superfície e secreção de citocinas, constatou-se que as células T representam 85% dos linfócitos do pólipo nasal, com predomínio de CD8 sobre CD4^{67,68}. Confirmou-se que os linfócitos T são mais prevalentes do que os linfócitos B. Encontram-se agregados ao redor de macrófagos, em

agrupamentos subepiteliais e paraglandulares, com predomínio de linfócito T supressor/citotóxico sobre *helper/inducer*⁶⁹.

Outras pesquisas mostram baixa de CD4 na concha inferior e no pólipo nasal. Trabalhos realizados após cirurgia endoscópica, com análise de CD4 e CD8, apuraram aumento de CD4 nos seis primeiros meses que se seguiram à cirurgia, com nova queda um ano após a intervenção⁷⁰. A ocorrência de PNSE está, portanto, provavelmente associada a distúrbios relacionados ao linfócito T⁷¹. Nenhuma correlação foi encontrada entre CD4 e taxa de recorrência da PNSE, o que evidencia patogênese mais complexa⁷².

Comparando trabalhos anteriores, investigou-se a origem desses linfócitos. Foram encontrados linfócitos no pólipo nasal em porcentagens significativamente diferentes das encontradas no sangue periférico. Com base nessa diferença da distribuição de linfócito T no pólipo, os autores sugeriram que a origem do linfócito pode ser outra além do sangue periférico e que a existência de produção local pode resultar de irritantes externos como fungos, bactérias ou outras ainda desconhecidas⁶⁴. Não houve diferença significativa na subpopulação de linfócito de indivíduos atópicos e não atópicos e, por isso, a subpopulação de linfócitos do pólipo nasal pode ser derivada do sistema imune local, assim como da migração dos linfócitos periféricos, secundários às moléculas de adesão e quimiocinas presentes nos pólipos.

2.6.4 Fatores estimuladores de colônia, células estruturais e teoria autócrina

Os fatores estimuladores de colônia (CSF) influenciam a proliferação e diferenciação de granulócitos e são liberados por células do estroma como monócitos ativados, linfócitos e eosinófilos. Esses são definidos de acordo com o tipo de granulócito em que atuam, como, por exemplo, GM-CSF. Essa citocina é principalmente produzida por eosinófilos. Nos pólipos, cerca de 30% dos eosinófilos apresentam expressão genética para GM-CSF. Existem evidências de efeito autócrino do GM-CSF, derivado do eosinófilo, no aumento da sobrevivência dessas células, migração e viabilização de sua função prolongada, com liberação de *major basic protein* (MBP), ECP, *eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) - neurotoxina derivada do eosinófilo - e mediadores lipídicos (teoria autócrina).

Portanto, essa célula está sob efeito do GM-CSF e também se torna um produtor desse fator^{73,74}.

Em meios de cultura os eosinófilos do pólipos nasal produzem GM-CSF e permanecem viáveis por mais tempo que os eosinófilos originários do sangue periférico⁷⁵.

Foi demonstrada, em 1991, a capacidade dos fibroblastos das vias aéreas superiores em liberar GM-CSF *in vitro*⁷⁶. Fibroblastos derivados de pólipos nasais liberam GM-CSF em grande quantidade quando comparados com fibroblastos de mucosa normal e, talvez, exista um fenótipo diferente para o fibroblasto associado à PNS. Esses estudos sugerem que um desajuste na função efetora das células estruturais possa ser importante fator no processo inflamatório crônico⁷⁷⁻⁷⁹.

Revisando a teoria microambiental do acúmulo de eosinófilos com base na habilidade de indução de meios de cultura de células epiteliais em diferenciar células progenitoras hematopoéticas da leucemia mieloide *in vitro*, concluiu-se que células epiteliais de pólipos são muito mais capazes de induzir essa diferenciação monocítica quando comparadas com culturas de células epiteliais de mucosa normal e alérgica. Nos meios de cultura de epitélio polipoide também foi detectado GM-CSF em alta concentração⁷⁴.

A interleucina 5 aumentou a sobrevivência de eosinófilos isolados do sangue periférico de pacientes com pólipos nasal. A IL3, IL5 e GM-CSF apresentam efeitos sinérgicos, com sobrevivência significativamente maior⁸⁰.

Utilizando células epiteliais de pólipos nasais, constatou-se redução de GM-CSF após uso de corticoide. Sugeriu-se que a diminuição da eosinofilia tecidual com tratamento clínico pode ser devida, em parte, à diminuição de produção de GM-CSF entre outras citocinas⁸¹.

Portanto, fibroblastos e células epiteliais promovem reação inflamatória contínua nos pólipos, regulando a sobrevivência, proliferação e ativação de granulócitos, bem como diferenciação de células hematopoéticas^{76,77}.

2.6.5 Fatores de crescimento, moléculas de adesão e citocinas

Na inflamação crônica dos pólipos, há interação entre células e moléculas, incluindo neuropeptídeos, citocinas, fatores de crescimento e moléculas de

adesão. Independentemente do que possa levar ao desenvolvimento da PNSE, as reações locais no pólo conduzem ao acúmulo de eosinófilos, com a participação importante de fibroblastos, células endoteliais, mastócitos, macrófagos. Existem várias citocinas, entre elas o fator transformador de crescimento beta-1 (TGF- β 1), com forte impacto no comportamento das células estruturais como os fibroblastos. Essa é uma proteína multifuncional, que modula a expressão genética do colágeno, inibe enzimas como colagenase e tem grande distribuição no tecido polipoide, sendo expressa por 50% dos eosinófilos da PNSE. O TGF- β 1 é uma importante citocina fibrogênica, que estimula a formação da matriz extracelular, age como quimioatratante de fibroblastos e inibe a síntese de IL5. No pólo é encontrada em sua forma inativa^{62,82}. Ocorre em baixa concentração na PNSE, principalmente em não alérgicos, associado a aumento de IL5^{83,84}.

O TGF- β 1 é produzido por linfócitos, macrófagos, eosinófilos e fibroblastos. Estimula a apoptose dos eosinófilos⁸⁵ e tem importante papel na regeneração celular. Pode agir como pró-fibrótico e anti-inflamatório na PNSE, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como eotaxina. *In vitro*, a estimulação de fibroblastos de pólipos nasais leva à formação de áreas de fibrose nas regiões de maior concentração de TGF- β 1. E nos locais associados a edema e pseudocisto ocorre relativa ausência de TGF- β 1 e fibrose. Tem efeito antagônico à IL5 e na regulação da resposta inflamatória TH2. Sua baixa concentração na PNSE se dá por meio de mecanismos específicos ainda não definidos^{14,36,86}.

O TGF- β 1 é capaz de anular o efeito prolongado de IL5, IL3 e GM-CSF na sobrevivência do eosinófilo e na apoptose, o que explicaria a associação de sua baixa expressão em doença eosinofílica como a PNSE⁸⁷. Pacientes com PNSE não tratados, comparados ao grupo-controle, apresentam altas concentrações de IL5, eotaxina e ECP e baixa concentração de TGF- β 1. Após tratamento, verifica-se redução de IL5, ECP e albumina e aumento de TGF- β 1⁵⁹.

Além da ação de regular a produção de proteínas extracelulares, apresenta efeitos de inibição nos linfócitos, macrófagos e neutrófilos. O TGF- β 1 pode induzir sua produção autócrina pelo fibroblasto⁸⁸⁻⁹².

A utilização de antiTGF- β 1 para tratamento de feridas diminui as cicatrizes e células inflamatórias por mais de 45 dias; o pico TGF- β 1 é registrado cinco a sete dias após o trauma⁸⁵.

A regulação do TGF- β 1 se dá principalmente em nível pós-transcrição. É secretada como pequenos complexos latentes que não se ligam a seus receptores. Existe, portanto, uma reserva extracelular. Juntamente com o TGF- β 1, a IL10 se encontra em locais de inflamação e ambos cooperam na resolução da inflamação. O TGF- β 1 pode induzir a produção de IL10 e esta facilitar a atividade do TGF- β 1. Essa coincidência sugere um defeito de regulação pelas células T reguladoras na resposta inflamatória e sua cronicidade⁹³.

Pacientes com PNSE apresentam aumento de transcrição de TGF- β 1 em resposta ao tratamento com IL4, sugerindo um mecanismo mediador da IL4⁹⁴. A análise da ação do TGF- β 1 na produção de eotaxina demonstrou que seu efeito é dependente da IL4.

A importância da quimiocina eotaxina na atração de eosinófilos já está demonstrada e sua expressão evidenciada na PNSE, na qual tem importante papel no acúmulo de eosinófilos, induzindo a migração dessas células para fora do vaso sanguíneo^{89,90}.

O recrutamento de eosinófilos envolve várias etapas: a adesão e migração ao endotélio vascular - que dependem de moléculas de adesão - e posterior migração na matriz extracelular - que depende de citocina quimiotática -, através de receptores transmembranosos (CCR3). A eotaxina (quimiocina C-C) dirige a migração de células circulantes ao seu destino local e exerce também atividade quimiotática para basófilos e linfócitos TH2. Vários estudos em pólipos de pacientes com PNSE demonstram a expressão mRNA e proteínas de eotaxina 1 e 2 em atópicos e não atópicos. Essas possuem funções semelhantes em tempos diferentes de um processo inflamatório, portanto, podem perpetuar o mesmo. São fontes dessas quimiocinas os macrófagos, eosinófilos, fibroblastos, células T e células epiteliais³¹.

Em seres humanos, o mRNA para eotaxina é encontrado em lesões inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa e doença de Crohn, na mucosa das vias aéreas de pacientes com asma e rinite alérgica. A eotaxina coincide com a existência de eosinófilos e está presente em algumas células do endotélio

vascular e em células da lamina própria de pólipos. A positividade no eosinófilo é encontrada principalmente em indivíduos com PNSE associada à asma⁹⁵.

Existe ação sinérgica de IL4 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na indução de produção de eotaxina pelos fibroblastos. Essas células constituem uma família heterogênea, expressando diferentes fenótipos e características funcionais conforme o tecido de origem ou estado do mesmo, se doente ou sadio. O TNF- α tem efeito sinérgico também com IL13 na produção de eotaxina^{90,96}.

IL4 e lipossacáride (LPS) - abundante na membrana da maioria das bactérias Gram-negativas - têm efeito na indução de altas concentrações de eotaxina após 24 horas em cultura contendo fibroblastos nasais⁹⁷. Esse efeito sinérgico induz também a expressão da molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1), que tem papel-chave na facilitação de infiltração de eosinófilos em inflamações eosinofílicas crônicas. O modo de ação é desconhecido, mas a IL4 e o LPS devem agir separada e cooperativamente⁹⁸. A condição do nariz como receptor de estímulos potencialmente danosos faz com que se torne sede frequente de processos inflamatórios como a PNSE. Antagonistas de CCR3 podem ser efetivos na PNSE. Trabalhos com antagonistas desses receptores demonstraram bloqueio da atividade eosinofílica⁹⁹.

Eotaxina juntamente com IL5 tem papel-chave na atração de eosinófilos, como foi comprovado em estudo em 950 pólipos, sugerindo que a infiltração eosinofílica está relacionada ao aumento da expressão genética de eotaxina^{62,55}.

A IL5, *in vitro*, desempenha papel de quimioativação, migração transendotelial, liberação de proteína catiônica citotóxica e aumento da sobrevivência dos eosinófilos. Em estudo imuno-histoquímico de tecido polipoide foi enfatizada a diferença de concentração de IL5 em relação ao grupo-controle¹⁰⁰. Elevado aumento de ácido ribonucleico (RNA) para IL5 pode ser detectado no pólipo e tem expressão semelhante em alérgico e não alérgico¹⁰¹.

O estudo da IL5 e seus receptores é importante para o tratamento das doenças associadas à eosinofilia. Células humanas que expressam receptores para IL5 são principalmente eosinófilos, basófilos e seus precursores e músculo liso dos brônquios. A concentração dos receptores solúveis é importante para acompanhamento da PNSE. O padrão de expressão do receptor alfa secretado da IL5 de pacientes com PNSE revelou concentração significativamente aumentada. Os receptores podem aumentar até 1.200 vezes e podem distinguir

os pacientes responsivos dos não responsivos ao tratamento clínico^{100,101}. Porém o estudo do bloqueio de IL5 é muito mais difícil *in vivo* do que *in vitro*.

A patogênese de formação dos pólipos nasais pode ser multifatorial, com importante participação de IL5 e perda seletiva local de TGF- β 1⁵⁹.

2.7 Apoptose

A inibição da apoptose celular dos eosinófilos que permanecem ativados determinando eosinofilia e danos teciduais é fator primordial na PNSE¹⁰². O aumento de expressão da IL5 parece ser fundamental para a diminuição da apoptose dos eosinófilos em processos alérgicos e o aumento de GM-CSF em processos inflamatórios⁴⁹. Pouco se sabe sobre os reguladores da apoptose dos granulócitos.

A mitocôndria libera fatores pró-apoptóticos, por mecanismo ainda não conhecido. A vida curta dos granulócitos pode ser prolongada por citocinas com propriedades antiapoptóticas. O bloqueio de IL5 e GM-CSF é uma forma terapêutica para tratamento da PNSE. Glicocorticoides e antiCD4 reduzem a produção de IL5 pelas células T¹⁰³. O glicocorticoide atua alterando os receptores de superfície para moléculas reguladoras, agindo de maneira oposta em eosinófilos e neutrófilos. Enquanto diminui o número de eosinófilos, leva à neutrofilia.

Em relação aos reguladores da apoptose, têm importância conhecida os receptores Fas e membros da família TNF/NGF (fator de crescimento neural). Os eosinófilos expressam receptores Fas. Interação entre Fas ligante/Fas receptor é importante para indução da ativação da morte celular e redução da resposta imune. A ativação de eosinófilos de indivíduos normais leva rapidamente à apoptose dessas células, o que não ocorre em indivíduos eosinofílicos, mesmo com expressão normal do receptor, sugerindo que a apoptose passa por outros sistemas de regulação¹⁰⁴.

No tocante à família de receptores *B cell lymphoma* (Bcl), somente *BCL associated protein X* (Bcl-xl), antiapoptótico, e Bax (indutor da apoptose) são importantes no mecanismo de morte celular. O GM-CSF e a IL5 aumentam os níveis de mRNA para Bcl-xl, diminuindo a apoptose. Bax não se altera com a

ação do GM-CSF¹⁰³. A dexametasona é capaz de inibir o efeito antiapoptótico de GM-CSF em eosinófilos¹⁰⁵.

Estudo histopatológico concluiu que a MMC é eficaz na indução de apoptose de eosinófilos presentes em estroma de pólipos nasais eosinofílicos tratados com MMC 400 mcg/mL durante cinco minutos¹⁰⁵.

2.8 Mitomicina C

A MMC é produzida por *Streptomyces caespitosus*. Inicialmente usada como antibiótico, mostrou, posteriormente, ter atividade antitumoral, impedindo a síntese de DNA e RNA. Inibe a mitose quando utilizada em altas concentrações^{106,107}. Em 1990 foi reconhecida como agente antiproliferativo e detentor do crescimento de fibroblastos^{32,85}.

Ao diminuir a proliferação de fibroblastos, a MMC inibe a formação de colágeno e tecido de granulação. Exibiu também efeito seletivo, inibindo genes induzidos¹⁰⁸. Exposição transoperatória à MMC tem revelado melhores resultados cirúrgicos em animais e seres humanos, sem efeitos colaterais. As doses tópicas utilizadas variam de 0,001 mg/mL, dose mínima antiproliferativa, a 1,0 mg/mL. As altas doses são citotóxicas para os fibroblastos e baixas doses têm efeitos antiproliferativos. O tempo varia de três a cinco minutos do uso tópico em superfícies usando-se cotonoides. Alguns autores acentuam que os fibroblastos começam a recuperar-se em duas a três semanas após a aplicação de MMC, enquanto outros preconizam efeito mensurável na proliferação celular durante 36 a 48 dias, *in vitro*. A dose tópica mais utilizada é de 0,4 mg/ml durante cinco minutos^{109,32}. Quando usada por meio tópico, tem efeito dependente do tempo e da concentração da exposição. Quanto mais longo o tempo e maior a concentração, mais forte o efeito biológico.

A MMC tem largo espectro de ação na inibição da proliferação de muitas linhagens celulares. Foi investigada como agente antiproliferativo em cultura de fibroblastos humanos, utilizada na concentração de 0,4 mg/mL. Na concentração de 1 mg/mL foi citotóxica para fibroblastos cultivados. O mecanismo para essa redução é o bloqueio da síntese de DNA, das mitoses e da síntese proteica, sendo ativa independentemente da fase do ciclo celular¹¹⁰.

Em oftalmologia, tem sido usada para dacriocistorrinostomia¹⁰⁷, trabeculectomia e pterígio³², entre outros procedimentos. Tecido subconjuntival e esclera de coelhos tratados durante cinco minutos com MMC foram avaliados quanto à proliferação de fibroblastos pós-cirurgia. Evidenciou-se prolongada e significativa diminuição da população celular¹¹¹.

A ação da MMC na contagem de células endoteliais em pacientes operados de pterígio e sob ação de MMC 0,02% mostrou efeito deletério no endotélio da córnea um mês após a cirurgia, diferente dos achados de outros estudos. Isso pode ser explicado pelo tipo de cirurgia, diferença de concentração e tempo de aplicação da MMC³².

Altas doses podem provocar glaucoma grave, edema e perfuração da córnea, irite, catarata e calcificação da esclera. A MMC tem sido usada trans, pré e pós-operatória. Em aplicação tópica, tem eficácia, prevenindo recorrências em pterígios, com poucas complicações em doses de 0,04% como terapia coadjuvante¹¹².

O efeito da MMC em queimaduras cutâneas em porcos não produziu diferenças histológicas e clínicas entre o grupo-alvo e o grupo-controle, nem melhora na cicatrização e na contratatura, talvez por induzir diferentes respostas em epitélio queratinizado em relação ao não queratinizado e pelo modo de aplicação. Em porcos não ocorreu reversibilidade do depósito fibroproliferativo presente em ferida cirúrgica¹¹³.

A avaliação dos efeitos antiadesivos da MMC e da estreptopectidase por meio de visão macroscópica e pelo nível de hidroxiprolina em ratos submetidos à cirurgia abdominal não confirmou diferença significativa. Ambos mostraram redução de aderências pós-operatória em relação ao grupo-controle¹⁰⁷.

A MMC reduziu cicatrizes em estenose subglótica, atresia de coana, antrostomia maxilar, miringotomias, mas seu mecanismo ainda não está totalmente conhecido. O retardo na formação de tecido cicatricial favorece a epitelização de aberturas induzidas na antrostomia maxilar¹⁰⁹.

Outra teoria defende que a MMC exerce sua atividade antifibrótica, suprimindo a migração e proliferação celular e, em altas concentrações, a síntese de proteína e RNA¹¹². Após realização de fístula na esclera por *laser*, os autores observaram não ocorrer neossíntese nem repolimerização do colágeno destruído pelo *laser* na presença de MMC.

Demonstrou-se, por meio de análise pela PCR após aplicação de MMC na pele de ratos, que genes envolvidos na cicatrização são mais afetados do que outros, preferencialmente os que estão sendo induzidos e, principalmente, se for aplicada antes da indução¹⁰⁸.

Após aplicação por cinco minutos, induziu, *in vitro*, a apoptose de fibroblastos humanos cultivados da cápsula de Tenon. A população de células apoptóticas aumentou no quarto dia e se manteve por uma semana. A MMC teria efeito nos fibroblastos não só pela ação antiproliferativa, mas também pelo grau de apoptose induzida¹¹⁴.

Em seres humanos, a MMC foi aplicada na reconstrução traqueal, no enxerto autólogo da conjuntiva para tratamento de pterígeo recorrente¹¹³; na abordagem de glaucomas de difícil controle¹¹⁵; na descompressão do saco endolinfático¹¹⁶; nas estenoses subglóticas¹¹⁷; na membrana timpânica em pacientes portadores de otite serosa¹¹⁸.

Em cavidades de mastóide de porcos na concentração de 0,04 mg/mL, induziu-se significativa diminuição de formação de tecido de granulação, fibrose e vascularização¹¹⁹.

Comprovou-se a capacidade da MMC em diminuir o número de receptores para TGF- β e fator de crescimento epidermal e diminuição do colágeno tipo 1 e produção de fibronectina¹²⁰. Estudos mostraram inibição da viabilidade de fibroblastos da mucosa nasal humana, cultivados e tratados com MMC 0,1-0,4 mg/mL durante um e cinco minutos. A taxa de inibição foi mais baixa com a dose de 0,1 mg e de 31% com a concentração de 0,4 mg/mL¹²¹.

Analisou-se o efeito da MMC tópica aplicada após antrostomia maxilar de 10 coelhos e sua relação com o risco de estenose e processo cicatricial da mucosa nasal. As antrostomias foram avaliadas por três semanas após a cirurgia, com medidas precisas. Das 10 aberturas do grupo-controle, sete estavam fechadas e somente uma do grupo tratado com MMC. O processo de reepitelização não foi afetado. Portanto, permitiu antrostomias maiores, sem efeitos colaterais¹²².

Em 55 pacientes, foi aplicado cotonoide com 1 mL (0,4 mg/mL) de MMC no meato médio durante procedimentos cirúrgicos endoscópicos nasais para avaliação quanto à sinéquia e às alterações mucosas: 29% apresentavam sinéquias - bilaterais em 10,9% e unilaterais em 18%. Em pacientes tratados com

MMC, 3,6% apresentaram sinéquias unilaterais e 14,5% no grupo-controle, portanto, com redução significativa de sinéquias¹²³. Enquanto após aplicação de MMC, 0,5 mg/mL no meato médio durante cinco minutos, a avaliação de presença de sinéquias em uma série de cirurgias endoscópicas durante três meses não mostrou efeitos adversos e o resultado de 31% de sinéquias e estenoses não destacou diferença significativa¹²⁰.

A análise da formação de sinéquia e manutenção da antróstomia em pacientes submetidos à cirurgia alargada endoscópica mostrou redução significativa durante curto período no pós-operatório, mas os resultados foram semelhantes aos do grupo-controle em longo prazo. Outros autores não notaram diferença significativa na extensão da antróstomia pós-meses de uso de MMC¹²⁴. No seio frontal, a aplicação em pós-operatório na dose de 0,5 mg/mL não reduziu a estenose do recesso frontal¹²⁵.

Na atresia de coana, investigou-se o efeito da MMC na redução da reestenose, utilizando MMC 0,4 mg/mL aplicados na coana durante três minutos. Obteve-se significativa diminuição da necessidade de *stent* e abertura coanal pós-operatória¹²⁶.

Em estenose laringotraqueal, a MMC aplicada topicamente em pacientes submetidos à laserterapia para tratamento de granuloma recorrente traqueal mostrou ser efetiva como coadjuvante com uma única dose de 0,1-0,2 mg/mL. Mas existem muitas controvérsias e trabalhos sem grupo-controle. Em outro estudo que resultou em estenose traqueal após aplicação de altas doses de MMC, postulou-se como possível explicação a inibição, além de fibroblastos, de outros processos reparadores de lesão - como o suprimento vascular - e que, o processo antiproliferativo favorece a necrose sem prevenção do processo inflamatório e acúmulo de debris¹²⁵.

A MMC tem efeito benéfico, mas não previne completamente a estenose laringotraqueal. Um antiTGF- β seria um possível tratamento para estenose. Na literatura, o TGF- β tem significativo papel no desenvolvimento da estenose subglótica que ocorre após intubação prolongada, traqueostomia ou trauma. E o tratamento inclui aplicação de MMC e laserterapia⁸⁵.

Várias concentrações foram utilizadas, variando de 0,02 a 0,04 mg/mL em conjuntivas pós-operadas¹¹³; 0,5 mg/mL por cinco minutos via transconjuntival em coelhos¹¹²; 0,1 mg/mL tópico por dois minutos na mucosa traqueal, em

humanos¹²⁷ 0,1 mg/mL durante cinco minutos na subglote de cães, seguidas de endoscopias semanais¹²⁸.

O valor da aplicação tópica da MMC foi ressaltado na manutenção da antrostomia, que permaneceu alargada durante um mes¹²⁴. O tempo e a concentração continuam em debate. As respostas ao tratamento com MMC são diferentes conforme as afecções e dosagens. Na dacriocistorrinostomia, tem sucesso entre 94 e 100%, também com resultado na cirurgia a *laser* para estenose de traqueia. Histologicamente, leva à formação de vacúolos citoplasmáticos e perda de tecido subepitelial, conduzindo à inibição da granulação. O epitélio volta ao normal em duas semanas, em experiência com coelhos. A MMC não leva à lesão irreversível da mucosa.

A toxicidade sistêmica da MMC em uso tópico não foi observada em humanos, conforme publicações anteriores. É considerada segura, não provoca sangramento nasal, necrose ou infecção quando usada em dacriocistorrinostomia externa¹²⁹.

Por meio de microscopia eletrônica constatou-se ausência de lesão ciliar permanente usando MMC tópica na concentração de até 1 mg/mL em mucosa sinusal sadia. A função ciliar inicialmente bloqueada normalizou-se em uma semana, sem apresentar, portanto, dano permanente aos cílios¹⁰⁹.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de estudo comparativo, transversal, com controle pareado, sendo que a intervenção foi o uso da mitomicina C (variável independente) sobre a expressão de citocinas inflamatórias (variáveis dependentes) relacionadas à PNSE.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, COEP=076 (ANEXO A), e faz parte de uma linha de pesquisa de mitomicina C em seres humanos em continuação de análise anterior aprovada como tese de mestrado. Todos os participantes foram informados sobre o risco e benefício da participação neste estudo e deram o consentimento de participação por escrito. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) está descrito no APÊNDICE A.

3.1 Pacientes

A casuística foi composta de 26 pacientes, sendo 14 do gênero feminino e 12 do masculino. A idade variou entre 34 e 72 anos (média 51); 20 pacientes com diagnóstico polipose nasossinusal eosinofílica e seis com diagnóstico de adenoma de hipófise não produtores de hormônio, atendidos no ambulatório de Otorrinolaringologia do Hospital São Geraldo, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.1.1 Critérios de diagnóstico

Pacientes com sintomas de obstrução nasal, secreção ou congestão nasal, hiposmia e dor ou pressão facial com duração de mais de 12 semanas.

Ao exame físico, constatação de pólipos ocluindo total ou parcialmente as cavidades nasais e biópsia com eosinofilia acima de 30%.

Tomografia computadorizada da face apresentando imagens de densidade de partes moles nos seios maxilares e etmoidais e presença ou não de doença nos seios esfenoidais e frontais.

Pacientes com diagnóstico de adenoma de hipófise e mucosa do seio esfenoidal normal à tomografia computadorizada.

3.1.2 Critérios de inclusão

- Pacientes maiores de 18 anos que assinaram o TCLE.
- Pacientes com diagnóstico definido de PNSE ou de adenoma de hipófise.
- Pacientes com indicação cirúrgica da PNSE e para o adenoma de hipófise via transesfenoidal.

3.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com diagnóstico de polipose e doenças mucociliares, intolerância aspirínica, sinusite fúngica alérgica, imunocomprometidos e que apresentaram mucina alérgica no transoperatório.

3.2 Metodologia

Os pacientes selecionados seguiram o tratamento pré e pós-cirúrgico de rotina do serviço. Receberam 40 mg de corticoide oral (prednisona) três dias antes e cinco dias após a cirurgia endoscópica, associado à amoxicilina durante três dias antes e 11 dias após o tratamento cirúrgico, além de limpezas com solução salina 0,9%. O início do corticoide tópico (budesonida) foi no 10º dia pós-cirúrgico. Todas as cirurgias foram realizadas pelo autor desta pesquisa em trabalho de equipe utilizando a mesma técnica.

O seio maxilar foi o escolhido para uso tópico da MMC, por apresentar mucosa com probabilidade de conservação e acesso mais fácil para segunda biópsia.

3.2.1 Delineamento do estudo

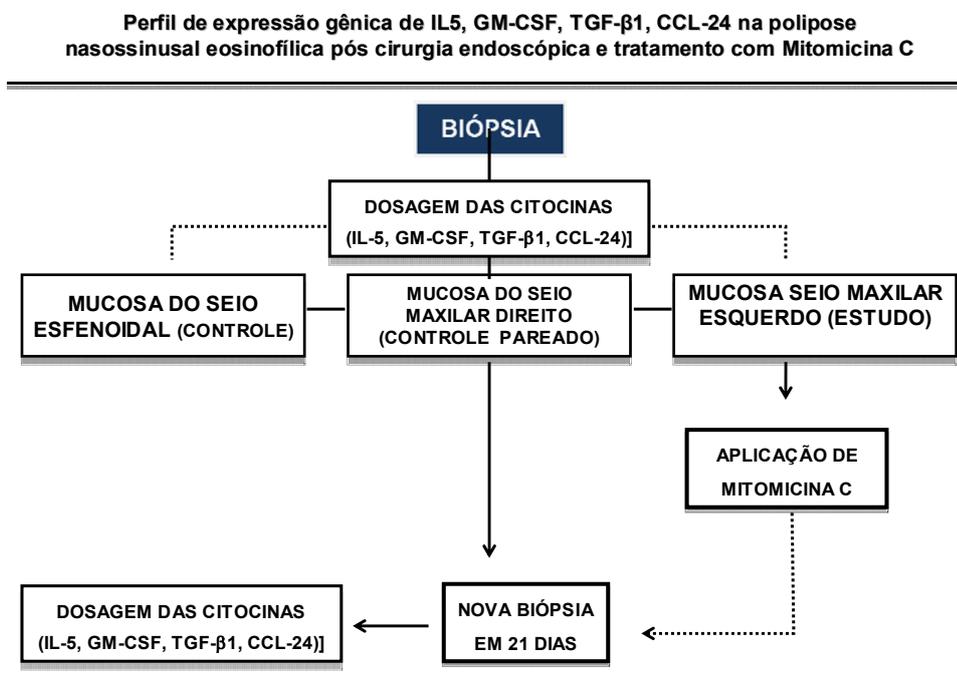


FIGURA 1 – Delineamento do estudo.

A coleta do material para análise foi realizada ao final da cirurgia, após controle do sangramento, aspiração dentro dos seios maxilares e limpeza com solução salina, utilizando a pinça Blakesley[®]. Padronizou-se a parede posterior dos seios maxilares direito e esquerdo como local da biópsia.

Os espécimes de mucosa foram enviados ao laboratório a fresco, acondicionados em ambiente estéril, onde foi resfriado a menos 80°C até a análise da expressão das citocinas.

A mucosa do seio maxilar esquerdo dos pacientes com PNSE foi definida como aquela que seria tratada com mitomicina C. A mucosa do seio maxilar direito (controle pareado) dos pacientes com PNSE e do seio esfenoidal (controle) dos pacientes com adenoma de hipófise não sofreu qualquer intervenção.

A mitomicina C foi aplicada com um cotonoide embebido com 3 mL da medicação na concentração de 0,5mg/mL.

Esta foi colocada na parede posterior do seio maxilar esquerdo durante cinco minutos.

No 21º dia, os pacientes foram submetidos à nova biópsia nos seios maxilares para nova análise de citocinas em âmbito ambulatorial, com utilização de pinças semelhantes, luvas e tubos de *ependorf* estéreis e também acondicionados à temperatura de -80 graus centígrados.

Todas as análises foram efetuadas no Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração de Belo-Horizonte.

3.2.2 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

3.2.2.1 Extração de RNA total

A extração do RNA total das amostras de mucosa do seio maxilar direito e esquerdo bem como da mucosa do seio esfenoidal foi realizada com o *kit RNeasy Mini* (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos da América - EUA), segundo o protocolo sugerido pelo fabricante para a extração de RNA total de tecidos. A concentração foi determinada por leitura da absorbância a 260 e 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop^R ND-1000 (*Thermo Fischer Scientific*, Massachusetts, EUA). Para avaliar a qualidade do RNA total extraído, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose sob condições desnaturantes. Aproximadamente 1 µg do RNA total foi misturado com tampão contendo 7 M de ureia, 30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol, 0,6% de SDS, 60 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e aquecido a 65°C por 10 minutos, resfriado em gelo por dois minutos e fracionado em gel de agarose 1% em TAE 1X (0,04 M de TRIS acetato e 1 mM de EDTA) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A análise da integridade do RNA foi feita avaliando-se a relação entre as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S. Nas amostras em que a proporção dos transcritos ribossomais 28S/18S foi superior a um, a integridade na população de RNA mensageiros estava também preservada (FIG. 2).

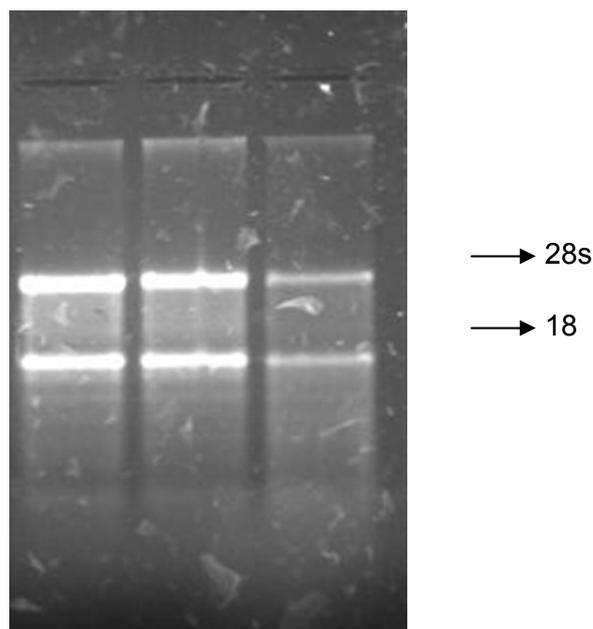


FIGURA 2 - Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo evidenciando três amostras de RNA total extraídos no estudo e com integridade preservada pela análise da relação favorável entre as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

3.2.2.2 Síntese de cDNA

A transcrição reversa (RT) foi realizada com o *kit* ImProm II™ *Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Resumidamente, 50 ng de RNA total extraído, 1,0 µL do oligo randomizado hexâmero a 0,5 µg/µL e água tratada com *diethylene pyrocarbonate* (DEPC) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), totalizando 11,1 µL de reação, foram aquecidos a 70°C por 10 minutos e resfriados em banho de gelo por cinco minutos. A transcrição reversa randômica foi realizada com adição de 4,0 µL de ImProm-II™ *5X Buffer*, 2,4 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 25,0 mM; 1,0 µL de desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) *Mix* a 10 mM, 0,5 µL de inibidor de ribonuclease (RNasin) a 40 U/µL e 1,0 µL de ImProm-II™ *reverse transcriptase*. A mistura foi incubada a 25°C por cinco minutos e 42°C por uma hora. Para inativação da enzima a reação foi incubada a 70°C por 15 minutos e

armazenada à temperatura de -20°C até o momento da amplificação por PCR em tempo real.

3.2.2.3 Escolha dos iniciadores

Os iniciadores para o genes *IL5*, *CCL24*(eotaxina), *GM-CSF*, *TGF-β1* e *beta-actina* (*ACTB*) foram selecionados com base em levantamento bibliográfico, obedecendo aos seguintes critérios de validação:

- Conteúdo de C+G entre 50-60%;
- tamanho de 18-22 bases;
- temperatura de fusão (T_m) entre 58-60°C;
- evitou-se utilizar iniciadores com mais de quatro bases em sequência de C e/ou G e com mais de 2 C ou G nas cinco últimas bases da extremidade 3`;
- variação do tamanho dos *amplicons* de 50 a 150 pares de bases (pb);
- sequências que estavam entre junções de exons e introns.

As concentrações dos iniciadores senso e antissenso foram estabelecidas a partir da construção de um matriz de iniciadores em uma reação de RT-qPCR com ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) proveniente de amostra da mucosa do seio esfenoidal ou grupo-controle. Foi usado o reagente SYBR[®] *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Warrington, Reino Unido) e condições de ciclagem universal: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por um minuto no aparelho *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). Para cada reação com os iniciadores e ao final de 40 ciclos foi realizada a análise da curva de dissociação com a finalidade de determinar a ocorrência de amplificações inespecíficas. A análise foi realizada pelo *software 7000 System SDS* (*Applied Biosystems*).

As concentrações estabelecidas foram de 0,6 μM para os iniciadores correspondentes ao gene *TGF-β1*; 1,2 μM para iniciadores correspondentes ao gene *CCL24*, todos utilizando 1 μL de cDNA e 3,0 μM para iniciadores correspondentes aos genes *IL5* e *CSF2*, utilizando 2,0 μL de cDNA. Para os iniciadores correspondentes ao gene *ACTB* ficou estabelecida a concentração de

0,15 μ M usando 1,0 ou 2,0 μ L de cDNA, conforme a padronização para os demais genes.

3.2.3 Reação de qPCR

3.2.3.1 Avaliação da uniformidade dos níveis de expressão do controle endógeno

Para uso como controle endógeno, foi escolhido o gene ACTB. A uniformidade de expressão deste gene candidato foi avaliada por RT-qPCR em amostra de cDNA proveniente da mucosa do seio esfenoidal ou grupo-controle; 10 amostras de mucosa do seio maxilar direito no tempo zero da realização da cirurgia (cinco amostras) e 21 dias após a cirurgia (cinco amostras); e, ainda, 10 amostras de mucosa do seio maxilar esquerdo no tempo zero da realização da cirurgia e tratamento com mitomicina C (cinco amostras) e 21 após a cirurgia e tratamento com mitomicina C (cinco amostras). As condições da reação e ciclagem foram estabelecidas na etapa de escolha dos iniciadores e otimização do ensaio descrita anteriormente e uso de 1,0 μ L de cDNA.

A análise da uniformidade de expressão do controle endógeno ACTB nos diferentes grupos de amostras descritos foi realizada por comparação da média dos níveis de ciclo *threshold* (Ct) pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados observados evidenciaram que não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias dos níveis de Ct nos diferentes grupos de amostras do estudo e uniformidade dos níveis de expressão do gene ACTB, escolhido como controle endógeno (FIG. 3).

Expressão do Gene Endógeno

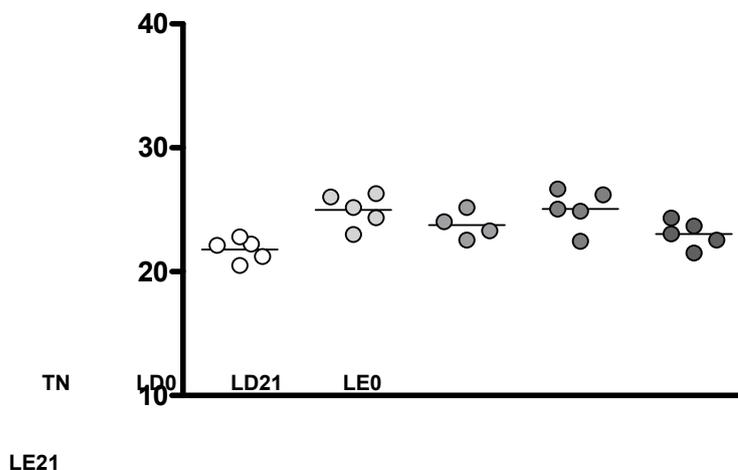


FIGURA 3 - Gráfico de comparação da média dos níveis de ciclo *threshold* (Ct) pela análise de variância (ANOVA) $P=0,1125$, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey $P>0,05$.

3.2.3.2 Validação da eficiência de amplificação dos genes alvo e controle endógeno

Para determinar se as reações de amplificação (qPCR) dos genes alvo [IL5, CCL24(eotaxina), CSF2(GM-CSF), TGF- β 1] e controle endógeno (ACTB) apresentam a mesma eficiência, foi avaliado como o Δ Ct (Ct alvo – Ct controle endógeno) varia com a diluição do *template* em uma curva-padrão construída para uma amostra de RNA total extraído da mucosa do seio esfenoidal ou grupo-controle (variação da concentração de RNA total: 100 a 0,001 ng). A síntese de cDNA bem como a reação de qPCR foram realizadas conforme protocolo otimizado e descrito anteriormente. A avaliação das eficiências relativas da amplificação foi feita pela análise do *slope* de uma equação de regressão linear resultante de gráficos em que os valores de Δ Ct foram comparados ao log da diluição do *template* (100 a 0,001 ng). Se a eficiência dos genes alvo e controle endógeno estiverem semelhantes, o valor do *slope* deverá ser entre -0,1 e 0.1. Os valores do *slope* obtidos para cada equação de regressão linear no estudo das

eficiências relativas da amplificação entre os genes alvo e controle endógeno do estudo estão sumarizados no QUADRO 1.

QUADRO 1

Sequência de iniciadores *forward* (FW) e *reverse* (RV) referente aos genes avaliados, número de acesso das sequências no GenBank, tamanho do fragmento gerado e eficiência relativa da amplificação por qPCR avaliada a partir dos valores do *slope*

Gene	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	Número de acesso GenBank	Tamanho fragmen- to (PB)	Fonte	<i>Slope</i>	Concentra- ção usada na reação qPCR	Volume cDNA usado reação qPCR
IL 5	FW:CTCTGAGGATTCCTGTTCTGT RV:CAGTACCCCCTTGACAGTT	X12705.1	105	Vernal <i>et al.</i> (2008)	2,3339	3,0 µM	2,0 µL
CCL24	FW:GCAGGAGCACATGCCTCAA RV: GCGTCCAGGTTCTTCATGTA	AJ223461.1	113	Cheadle (2007)	1,5192	1,2 µM	1,0 µL
CSF2	FW: CAGCCTCACCAAGCTCAAG RV: TGACAAGCAGAAAGTCCTTCA	AF510855.1	146	Valera (2008)	-2,2705	3,0 µM	2,0 µL
TGF-β1	FW:CAGCAACAATTCTGGCGATA RV:AAGGCGAAAGCCCTCAATTT	AK307742.1	136	Overbergh <i>et al.</i> (2003)	0,0083	0,6 µM	1,0 µL
ACTB	FW: ACCTCATGAAGATCCTCACC RV: CCATCTCTTGCTCGAAGTCC	M10277.1	120	Musso <i>et al.</i> (1996)	-	0,15 µM	1,0 ou 2,0 µL

3.2.3.3 Detecção dos níveis de expressão gênica por qPCR

Os ensaios para avaliar a expressão gênica nas amostras de mucosa do seio maxilar direito e esquerdo e mucosa do seio esfenoidal ou grupo-controle foram realizados utilizando-se 12,5 µL de SYBR™ *Green* (Applied Biosystems), concentrações previamente determinadas para iniciadores correspondentes ao grupo de genes do estudo, bem como o volume de cDNA padronizado (QUADRO 1), perfazendo o volume final de 25 µL de reação. Os ensaios foram feitos em duplicata para todos os genes, com o gene ACTB ou controle endógeno presente na mesma placa que os genes avaliados. Os valores de *baseline* e *threshold* empregados foram ajustados para cada ensaio. Os resultados foram expressos pelo método $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ ACTB})}^{130}$, uma vez que os valores da

eficiência de amplificação dos genes alvo e controle não foram equivalentes ($\text{Slope} \leq -0,1$ e $\geq 0,1$) (QUADRO 1). Em relação à expressão gênica, os valores obtidos pelo método $2^{-\Delta Ct}$ foram multiplicados por 1.000 para melhor representação gráfica¹³¹⁻¹³⁷.

3.2.4 Variáveis estudadas e métodos estatísticos

3.2.4.1 Comparação entre os grupos em cada citocina

A comparação de cada uma das citocinas entre a mucosa do seio esfenoidal e a mucosa do seio maxilar (ambos os seios) nos momentos zero e 21 dias (seio maxilar) foi feita pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

As comparações de cada uma das citocinas entre o lado direito e esquerdo nos momento zero e momento 21 dias foram realizadas pelo teste pareado de Wilcoxon.

3.2.4.2 Correlação entre as citocinas

O grau de associação entre as citocinas em cada um dos grupos analisados (tecido normal, lados direito e esquerdo nos momentos zero e 21) foi observado a partir da análise do coeficiente de correlação de Spearman. Esse coeficiente varia de -1 a +1. Assim, valores próximos de +1 indicam correlação positiva forte e de -1 indicam correlação negativa forte. Já valores de correlação próximos de zero indicam falta de associação entre as citocinas.

3.2.4.3 Análise descritiva

As quatro citocinas dosadas a partir de RNA foram avaliadas em seis pacientes para o tecido normal e em 20 pacientes nos lados direito e esquerdo (em ambos os momentos) em pacientes com PNSE. Cabe ressaltar que os mesmos 20 pacientes foram avaliados nos dois lados e nos dois momentos. A

descrição do número de medidas realizadas está apresentada na TAB. 1.

TABELA 1

Descrição do número de medidas realizadas

Características	Frequência
Tecido normal	6
Lado direito	
Momento 0	20
Momento 21	20
Lado esquerdo	
Momento 0	20
Momento 21	20

4 RESULTADOS

4.1 Comparações de cada citocina com os grupos (tecidos, lados e momentos)

Nesta seção foram realizadas as comparações para cada uma das quatro citocinas estudadas entre os grupos avaliados (tecido normal, lado direito e esquerdo, momentos zero e 21).

▪ Eotaxina (CCL24)

Para o tecido normal observa-se mediana de 0,09, para o tecido doente no lado direito no momento zero mediana de 1,08 e no momento 21 mediana de 0,53. Para o lado esquerdo, mediana igual a 0,75 no momento zero e 0,27 no momento 21, (TAB. 2). O gráfico 1 desconsiderou os valores dos *outliers*.

TABELA 2

Análise descritiva da eotaxina em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	1º Q	Mediana	3º Q	Máximo
Tecido normal	6	0,12	0,1	0,02	0,04	0,09	0,18	0,33
Lado direito momento 0	20	8,71	20,7	0,04	0,28	1,08	4,03	76,95
Lado direito momento 21	20	0,69	0,9	0,01	0,10	0,53	0,70	3,83
Lado esquerdo momento 0	20	2,41	5,1	0,01	0,05	0,75	2,53	22,56
Lado esquerdo momento 21	20	7,59	31,2	0,02	0,05	0,27	0,83	140,15

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; 1º Q: 1º Quartil; 3º Q: 3º Quartil.

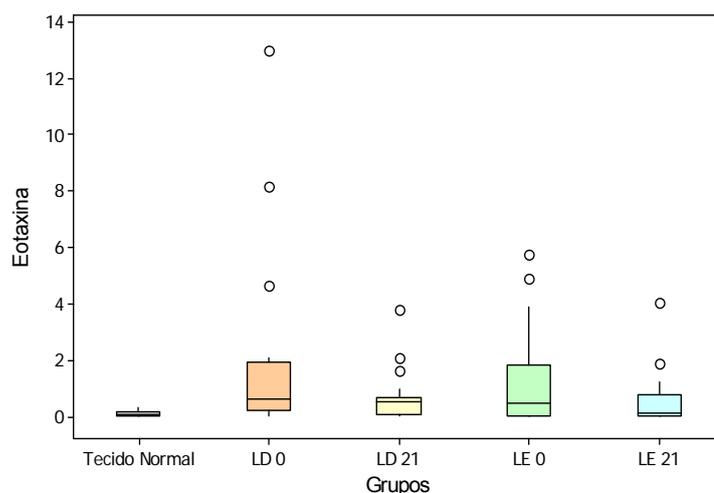


GRÁFICO 1 - *Box-plot* da eotaxina (CCL24) por grupo desconsiderando-se a influência dos valores dos *outliers*

As comparações para eotaxina mostram valores significativamente altos no tecido doente no lado direito no momento zero em relação ao tecido normal ($p=0,006$) e para o momento zero na comparação entre cada um dos lados ($p=0,006$ para lado direito e $p=0,019$ para lado esquerdo). Nas demais comparações não houve diferença significativa (TAB. 3).

TABELA 3

Comparações para eotaxina entre os grupos em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

Não pareados		Pareados	
Comparação	Valor-p	Comparação	Valor-p
TN x LD 0	0,006 ¹	LD0 x LD21	0,006 ²
TN x LD 21	0,063 ¹	LE0 x LE 21	0,019 ²
TN x LE 0	0,153 ¹	LD0 x LE0	0,334 ²
TN x LE 21	0,212 ¹	LD21 x LE21	0,601 ²

1: Mann-Whitney; 2: Wilcoxon.

▪ **GM-CSF (CSF2)**

Na descrição da citocina GM-CSF pelos grupos em estudo foi encontrado para o tecido normal mediana de 0,39, para o tecido doente no lado direito 1,18 no momento zero e 1,94 no momento 21. Para o lado esquerdo as medianas: 5,37 no momento zero e 0,73 no momento 21 (TAB. 4).

TABELA 4

Análise descritiva de GM-CSF em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

Grupos	N	Média	DP	Mínimo	1° Q	Mediana	3° Q	Máximo
Tecido normal	6	1,04	1,3	0,07	0,16	0,39	2,16	3,48
Lado direito momento 0	20	1,44	1,1	0,25	0,60	1,18	2,29	4,38
Lado direito momento 21	20	5,41	6,7	0,11	0,78	1,94	10,83	19,57
Lado esquerdo momento 0	20	8,02	8,1	0,10	1,14	5,37	14,80	25,83
Lado esquerdo momento 21	20	26,60	93,2	0,09	0,20	0,73	3,26	414,7

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; 1° Q: 1° Quartil; 3° Q: 3° Quartil.

O *box-plot* apresentado no GRAF. 2 ilustra o comportamento da citocina GM-CSF por grupo em estudo, desconsiderando-se os valores dos *outliers*.

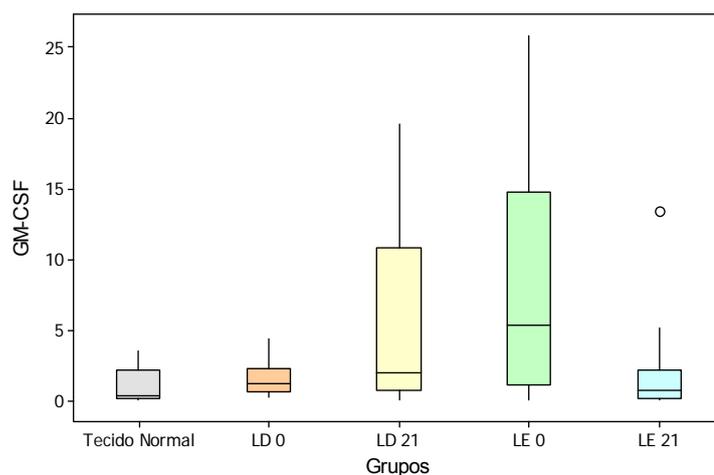


GRÁFICO 2 - *Box-plot* do GM-CSF (CSF2) por grupo

As comparações entre os grupos para a citocina GM-CSF mostraram que houve significância somente quando se comparou o tecido doente do lado esquerdo no momento zero em relação ao tecido doente do lado direito no momento zero ($p=0,007$) (TAB. 5).

TABELA 5

Comparações para GM-CSF entre os grupos em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

Não pareados		Pareados	
Comparação	Valor-p	Comparação	Valor-p
TN x LD 0	0,191 ¹	LD0 x LD21	0,117 ²
TN x LD 21	0,784 ¹	LE0 x LE 21	0,079 ²
TN x LE 0	0,879 ¹	LD0 x LE0	0,007²
TN x LE 21	0,484 ¹	LD21 x LE21	0,332 ²

1: Mann-Whitney; 2: Wilcoxon.

▪ IL5

Na descrição da citocina IL5 por grupos, observa-se no tecido normal a mediana de 0,82, para o tecido doente no lado direito momento zero mediana de

1,33 e para o momento 21 mediana de 0,78; já para o lado esquerdo verificam-se medianas iguais a 4,77 no momento zero e 0,83 no momento 21 (TAB. 6).

TABELA 6

Análise descritiva de IL5 em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	1° Q	Mediana	3° Q	Máximo
Tecido normal	6	0,92	0,8	0,03	0,12	0,82	1,64	2,27
Lado direito momento 0	20	2,79	3,8	0,15	0,60	1,33	2,86	16,46
Lado direito momento 21	20	2,23	2,9	0,00	0,26	0,78	3,35	9,42
Lado esquerdo momento 0	20	6,39	6,4	0,17	1,90	4,77	9,68	28,46
Lado esquerdo momento 21	20	2,01	3,1	0,05	0,36	0,83	1,93	11,92

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; 1° Q: 1° Quartil; 3° Q: 3° Quartil.

No *box-plot* da citocina IL5 por grupo em estudo, desconsiderando-se os valores dos *outliers*, constatam-se valores extremos para todos os grupos, exceto para o tecido normal (GRAF. 3).

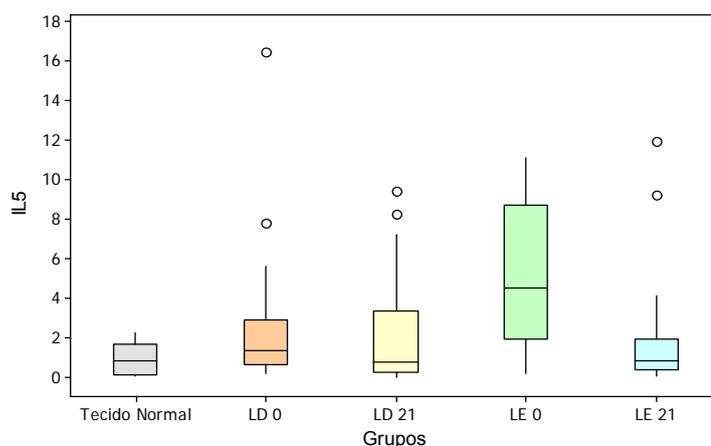


GRÁFICO 3 - *Box-plot* da IL5 por grupo desconsiderando-se a influência dos valores dos *outliers*

Os valores de IL5 para o tecido doente no lado esquerdo no momento zero foram mais altos que os valores do tecido normal ($p=0,006$), mais altos que os valores do lado esquerdo momento 21 ($p=0,009$) e ainda mais altos que os valores do lado direito no momento zero ($p=0,044$) (TAB. 7).

TABELA 7

Comparações para IL5 entre os grupos em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

Não-pareados		Pareados	
Comparação	Valor-p	Comparação	Valor-p
TN x LD 0	0,136 ¹	LD0 x LD21	0,502 ²
TN x LD 21	0,543 ¹	LE0 x LE 21	0,009²
TN x LE 0	0,006¹	LD0 x LE0	0,044²
TN x LE 21	0,605 ¹	LD21 x LE21	0,852 ²

1: Mann-Whitney; 2: Wilcoxon.

▪ TGF- β 1

A descrição da citocina TGF- β 1 pelos grupos em estudo apresentou para o tecido normal a mediana 2,38; para o tecido doente no lado direito no momento zero mediana de 0,67, e no momento 21 mediana de 0,78. Para o lado esquerdo as medianas foram iguais a 0,36 no momento zero e 0,53 no momento 21, (TAB. 8). O gráfico 4 desconsiderou os valores dos *outliers*.

TABELA 8

Análise descritiva de TGF- β 1 em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

lgrupos	n	Média	DP	Mínimo	1° Q	Mediana	3° Q	Máximo
Tecido normal	6	1,99	1,0	0,06	1,47	2,38	2,58	2,60
Lado direito momento 0	20	1,99	4,2	0,06	0,25	0,67	1,99	19,44
Lado direito momento 21	20	2,30	4,2	0,02	0,21	0,78	2,53	17,52
Lado esquerdo momento 0	20	0,78	0,8	0,04	0,12	0,36	1,59	3,01
Lado esquerdo momento 21	20	180,00	800,0	0,01	0,23	0,53	1,24	3.580,00

n: número de observações; DP: Desvio-padrão; 1° Q: 1° Quartil; 3° Q: 3° Quartil.

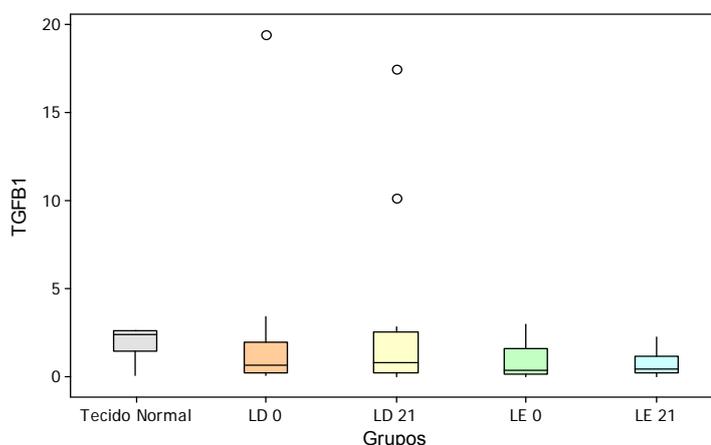


GRÁFICO 4 - *Box-plot* da TGF- β 1 por grupo desconsiderando-se os valores dos *outliers*

Nas comparações entre os grupos para a citocina TGF- β 1 constata-se valores da citocina TGF- β 1 mais altos no tecido normal em relação ao tecido doente no lado esquerdo em ambos os momentos ($p=0,031$) e ainda mais altos para tecido doente no lado direito no momento zero em relação ao lado esquerdo também no momento zero ($p=0,023$) (TAB.9).

TABELA 9

Comparações para a TGF- β 1 entre os grupos em seis espécimes de mucosa normal do seio esfenoidal e em 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C no seio maxilar esquerdo

Não pareados		Pareados	
Comparação	Valor-p	Comparação	Valor-p
TN x LD 0	0,171 ¹	LD0 x LD21	0,852 ²
TN x LD 21	0,411 ¹	LE0 x LE 21	0,478 ²
TN x LE 0	0,031¹	LD0 x LE0	0,023²
TN x LE 21	0,031¹	LD21 x LE21	0,526 ²

1: Mann-Whitney; 2: Wilcoxon.

4.1.2 Consolidado

O resumo das comparações com significância entre as citocinas e os grupos revelou diferença entre os valores do tecido normal e o tecido doente do lado direito no momento inicial apenas para CCL24(eotaxina); entre o tecido normal e o tecido doente do lado esquerdo no momento inicial para as citocinas IL5 e TGF- β 1; entre o tecido normal e o tecido doente do lado esquerdo no momento 21 apenas para TGF- β 1; para o tecido doente do lado direito entre os dois momentos para eotaxina; para o tecido doente do lado esquerdo entre os dois momentos para eotaxina e IL5; entre o tecido doente do lado direito e do lado esquerdo ambos no momento inicial para GM-CSF, IL5 e TGF- β 1 (TAB. 10).

TABELA 10

Resumo das comparações entre as citocinas e os grupos em mucosa de 20 espécimes de seios maxilares com PNSE nos momentos zero e 21 dias após aplicação de mitomicina C em no seio maxilar esquerdo e em seis do grupo normal

Citocinas	EOTAXINA	GM-CSF	IL5	TGF-β1
TN x LD 0	0,006	X	X	X
TN x LD 21	X	X	X	X
TN x LE 0	X	X	0,006	0,031
TN x LE 21	X	X	X	0,031
LD0 x LD21	0,006	X	X	X
LE0 x LE 21	0,019	X	0,009	X
LD0 x LE0	X	0,007	0,044	0,023
LD21 x LE21	X	X	X	X

X: Sem significância estatística.

4.2 Correlação entre as citocinas

Nesta seção são apresentados os resultados dos testes de correlação entre as citocinas em cada um dos grupos em estudo.

4.2.1 Tecido normal

Os coeficientes de correlação de Spearman (r) seguidos dos valores- p , entre parênteses, das quatro citocinas entre si considerando-se apenas os seis casos de tecido normal estão representados na TAB. 11. Observam-se correlação positiva (coeficiente positivo) e significância ($p=0,019$) apenas entre CSF2(GM-CSF) e IL5, indicando que quanto mais alto o valor do IL5, mais alto o valor do CSF2 ou, ainda, quanto mais baixo o valor do IL5, mais baixo o valor do CSF2 ($r=0,886$). Vale destacar que esta conclusão deve ser extraída e interpretada com o devido cuidado, uma vez que a amostra em questão tem tamanho igual a seis,

ou seja, o teste tem pouco poder para detectar diferenças com amostra tão pequena.

TABELA 11
Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p
entre as quatro citocinas considerando os casos de tecido normal

Citocinas	CCL24 (EOTAXINA)	CSF2 (GM-CSF)	IL5
CSF2 (GM-CSF)	0,771 (0,072)		
IL5	0,771 (0,072)	0,886 (0,019)	
TGF- β 1	0,143 (0,787)	0,314 (0,544)	0,200 (0,704)

A dispersão com a reta de regressão linear entre as citocinas, considerando-se apenas os casos de tecido normal, encontra-se no GRAF. 5. Ressalta-se que quanto mais inclinada a reta, mais chance de haver associação entre as citocinas. Entretanto, é importante mencionar que o coeficiente de correlação de Spearman avalia a associação levando-se em conta a colocação dos valores após a ordenação ascendente e, desta forma, desconsiderando-se a influência dos *outliers*. Já a reta do GRAF. 6 é afetada por esses valores extremos. Essas considerações são válidas para as demais seções.

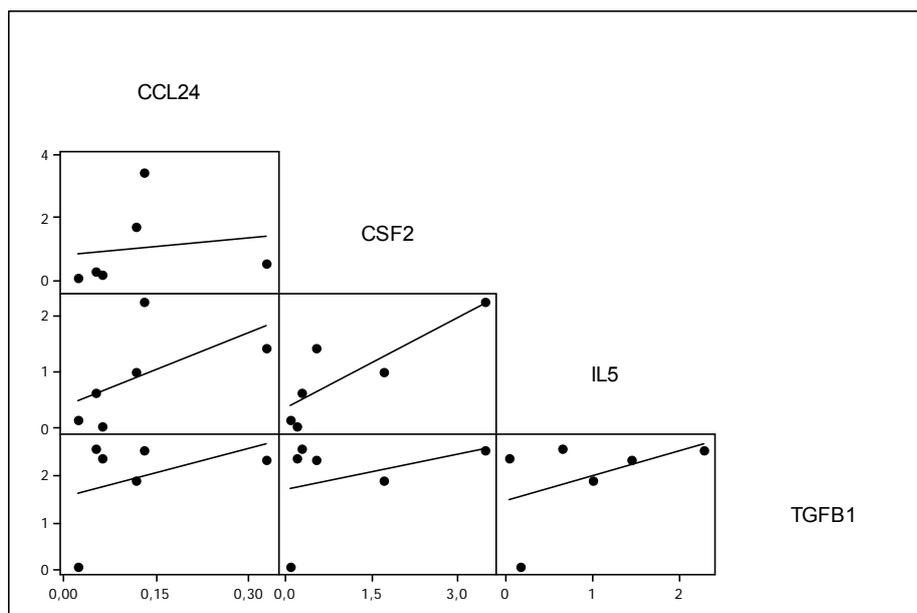


GRÁFICO 5 - Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos de tecido normal

4.2.2 Lado direito (momento zero)

Os coeficientes de correlação de Spearman (r) seguidos dos valores- p , entre parênteses, das quatro citocinas entre si considerando-se apenas o tecido doente do lado direito no momento inicial (tempo zero) encontram-se na TAB. 12. Notam-se correlação negativa (coeficiente negativo) e significância ($p = 0,005$) apenas entre CSF2(GM-CSF) e TGF- β 1, indicando que quanto mais baixo o valor de GM-CSF, mais alto o valor do TGF- β 1 ou, ainda, que quanto mais baixo o TGF- β 1 mais alto o GM-CSF ($r = -0,600$).

TABELA 12

Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p entre as quatro citocinas considerando-se os casos do tecido doente no lado direito no momento inicial

Citocinas	CCL24 (EOTAXINA)	GM-CSF	IL 5
GM-CSF	-0,155 (0,514)		
IL5	-0,188 (0,427)	0,343 (0,139)	
TGF-β1	0,347 (0,133)	-0,600 (0,005)	-0,003 (0,990)

A dispersão com a reta de regressão linear entre as citocinas considerando-se apenas os casos de tecido doente no lado direito no momento zero está demonstrada no GRAF. 6.

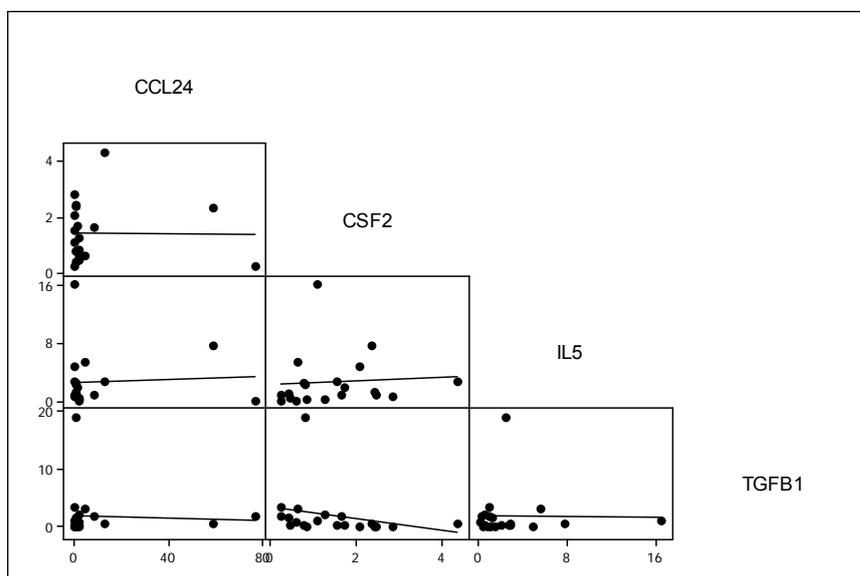


GRÁFICO 6 - Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os espécimes de mucosa com PNSE do lado direito no momento zero.

4.2.3 Lado direito (momento 21)

Os coeficientes de correlação de Spearman (r) seguidos dos valores- p , entre parênteses, das quatro citocinas entre si considerando-se apenas o tecido doente no lado direito no momento 21 são apresentados na TAB. 13. Registraram-se correlação positiva (coeficiente positivo) e significância ($p = 0,011$) apenas entre (CSF2)GM-CSF e IL5, indicando que quanto mais alto o valor do GM-CSF, mais alto o valor do IL5 ou, ainda, que quanto mais baixo o valor do GM-CSF, mais baixo o valor do IL5 ($r = 0,556$).

TABELA 13

Coeficientes de correlação de Spearman e valores- p entre as quatro citocinas considerando-se os casos do tecido doente no lado direito no momento 21

Citocinas	CCL24 (EOTAXINA)	GM-CSF	IL5
GM-CSF	-0,179 (0,450)		
IL5	0,247 (0,295)	0,556 (0,011)	
TGF- β 1	0,441 (0,052)	-0,414 (0,070)	0,009 (0,970)

A dispersão com a reta de regressão linear entre as citocinas, considerando-se apenas os casos de tecido doente no lado direito no momento 21, está representada no GRAF. 7.

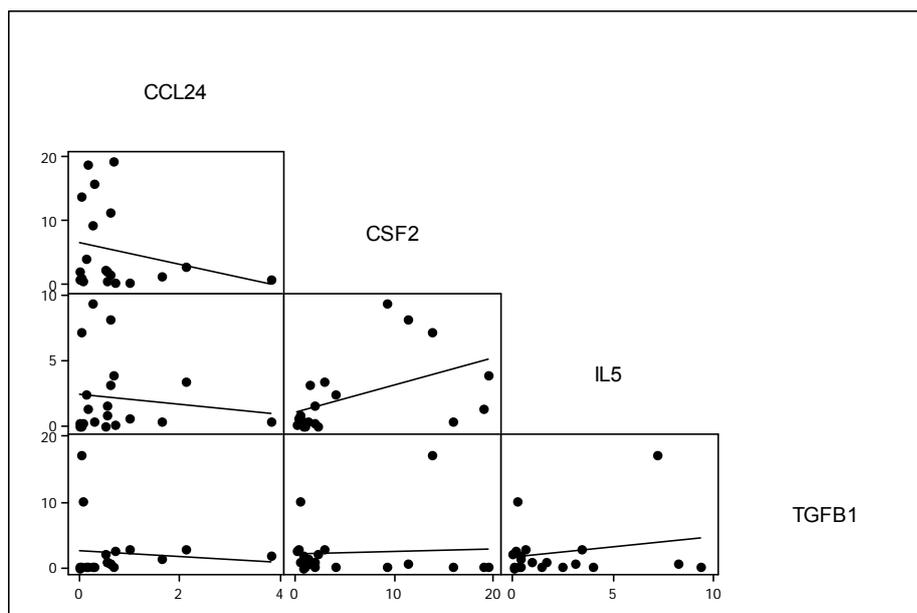


GRÁFICO 7 - Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos do tecido doente no lado direito no momento 21.

4.2.4 Lado esquerdo (momento zero)

Os coeficientes de correlação de Spearman (r) seguidos dos valores- p , entre parênteses, das quatro citocinas entre si considerando-se apenas o tecido doente no lado esquerdo no momento zero são apresentados na TAB. 14. Detectaram-se correlação positiva (coeficiente positivo) e significância ($p=0,037$) apenas entre as citocinas CSF2(GM-CSF) e IL5, indicando que quanto mais alto o valor do GM-CSF, mais alto o valor do IL5 ou, ainda, que quanto mais baixo o valor do GM-CSF, mais baixo o valor do IL5 ($r=0,449$).

TABELA 14

Coeficientes de correlação de Spearman e valores-p entre as quatro citocinas considerando-se os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento zero

Citocinas	CCL24 (EOTAXINA)	GM-CSF	IL5
GM-CSF	-0,356 (0,123)		
IL5	0,099 (0,677)	0,449 (0,047)	
TGF-β1	-0,235 (0,319)	0,089 (0,710)	-0,111 (0,640)

1: Correlação de Spearman.

A dispersão com a reta de regressão linear entre as citocinas, considerando-se apenas os casos de tecido doente no lado esquerdo no momento zero está demonstrada no GRAF. 8. As mesmas considerações apresentadas para o tecido normal servem para esta situação.

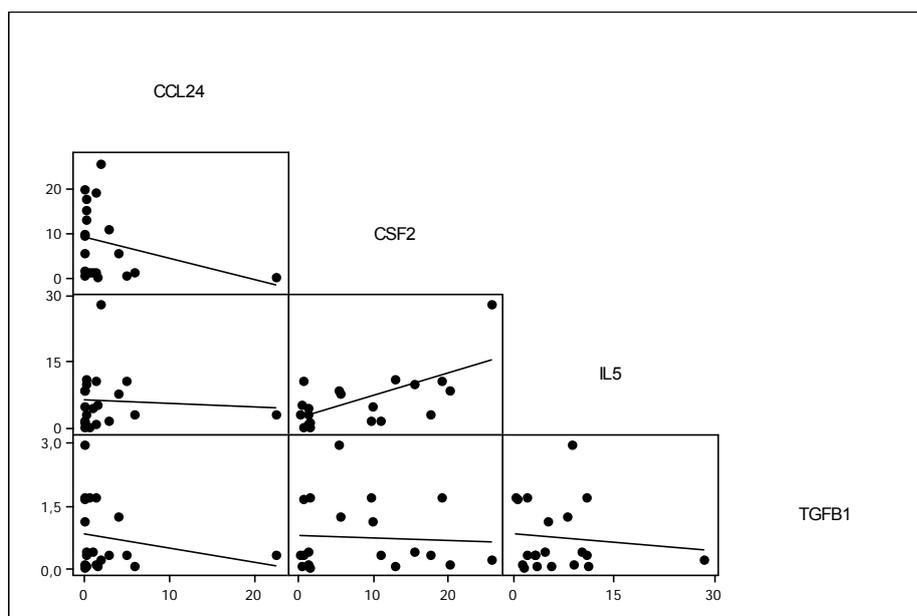


GRÁFICO 8 - Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento zero.

4.2.5 Lado esquerdo (momento 21)

Na TAB. 15 percebem-se os coeficientes de correlação de Spearman (r) seguidos dos valores- p , entre parênteses, das quatro citocinas entre si, considerando-se apenas o tecido doente no lado esquerdo no momento 21. Houve correlação positiva (coeficiente positivo) e significância ($p=0,023$) apenas entre CSF2(GM-CSF) e IL5, indicando que quanto mais alto o valor do GM-CSF, mais alto o valor do IL5 ou, ainda, que quanto mais baixo o valor do GM-CSF, mais baixo o valor do IL5 ($r=0,505$).

Nota-se, ainda, correlação negativa (coeficiente negativo) com significância ($p \leq 0,05$) entre GM-CSF e TGF- β 1 e IL5 e TGF- β 1, indicando, por exemplo, que quanto mais baixo o valor de GM-CSF, mais alto o valor do TGF- β 1 ou, ainda, que quanto mais alto o GM-CSF, mais baixo o valor de TGF- β 1 ($r= -0,462$, valor- $p = 0,040$).

TABELA 15

Coeficientes de correlação de Spearman e valores- p entre as quatro citocinas considerando-se os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento 21

Citocinas	CCL24 (EOTAXINA)	GM-CSF	IL5
GM-CSF	0,114 (0,631)		
IL5	-0,060 (0,801)	0,505 (0,023)	
TGF- β 1	0,215 (0,363)	-0,462 (0,040)	-0,465 (0,039)

A dispersão com a reta de regressão linear entre as citocinas, considerando-se apenas os casos de tecido doente no lado esquerdo no momento 21, é demonstrada no GRAF. 9.

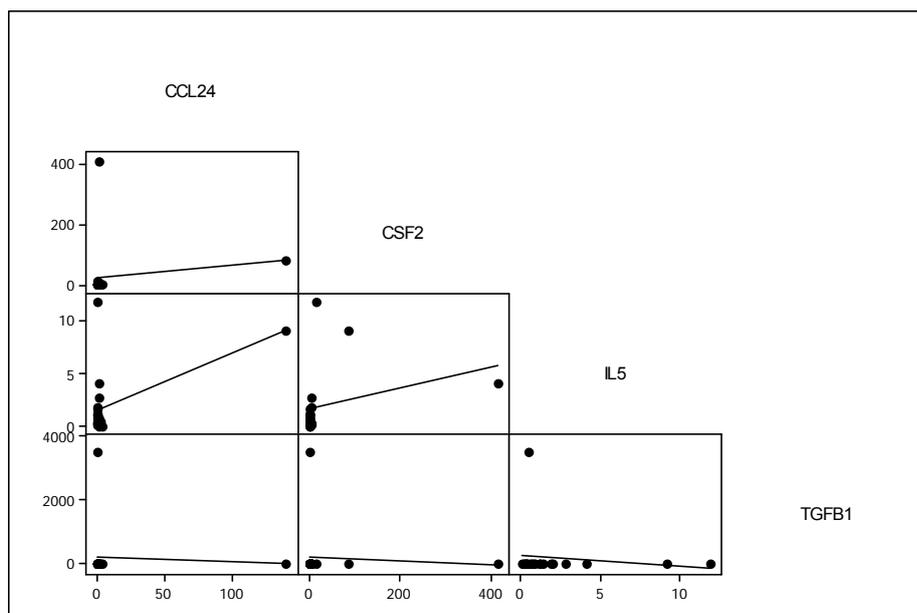


GRÁFICO 9 - Dispersão entre as citocinas considerando-se apenas os casos do tecido doente no lado esquerdo no momento 21.

4.2.6 Consolidado

As correlações com significância entre as citocinas estratificadas por grupo são apresentadas na TAB. 16. Realça-se que os códigos a, b, c, d, e correspondem aos casos de correlação positiva e as indicações a(-), b(-), c(-), d(-), e(-) são para casos de correlação negativa.

A correlação positiva é observada entre as citocinas GM-CSF e IL5, considerando-se as medidas do tecido normal (indicado pela letra a), do tecido doente no lado direito no momento 21 (indicado por c) e lado esquerdo no momento zero (indicado por d) e no momento 21 (indicado por e). Observa-se, ainda, correlação negativa entre as citocinas GM-CSF e TGF- β 1 considerando-se tecido doente no lado direito do momento inicial [(indicado por b(-))] e o lado esquerdo no momento 21 [(indicado por e(-))].

TABELA 16
Resumo das correlações com
significância estatística entre as citocinas

Citocinas	CCL24 (eotaxina)	GM-CSF	IL5
GM-CSF	X		
IL5	X	a,c,d,e	
TGF- β 1	X	B(-),e(-)	e(-)

a=Tecido normal, b=Lado direito t=0, c=Lado direito t=21, d=Lado esquerdo t=0, e=Lado esquerdo t=21, x: sem correlação.

Os resultados obtidos após a comparação entre os grupos para cada uma das citocinas estão sintetizados nas FIG. 4 e 5.

No momento inicial (tempo zero) os valores de CCL24 foram mais altos no tecido doente do lado direito do que no tecido normal (indicado pela letra a) e os valores do TGF- β 1 no tecido doente do lado direito foram mais altos do que do lado esquerdo (indicado pela letra c). Nota-se, ainda, que IL5 teve valores mais altos no tecido doente do lado esquerdo do que no tecido normal e que o TGF- β 1 teve valor mais baixo no lado esquerdo do que no tecido normal (indicado pela letra a). Destaca-se, também, que os valores do IL5 e GM-CSF foram mais altos no tecido doente do lado esquerdo do que no lado direito (indicado pela letra b). E os valores do TGF- β 1 foram mais baixos no tecido doente do lado esquerdo do que no tecido normal.

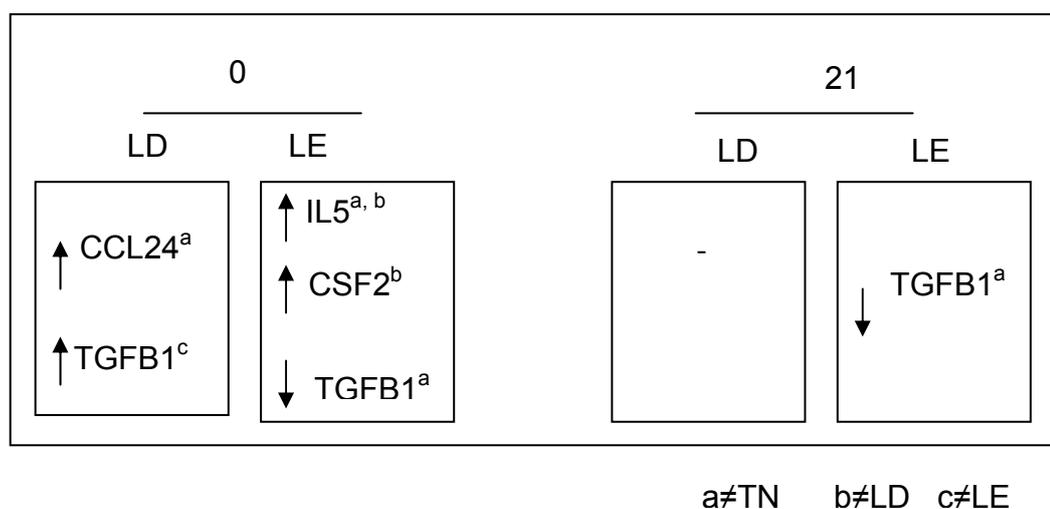


FIGURA 4 – Resultado das comparações.

Comparando o tecido doente do lado direito no tempo zero em relação ao tempo 21, conclui-se que os valores de CCL24 diminuíram com o passar do tempo. Para o lado esquerdo em relação aos valores de CCL24 e IL5

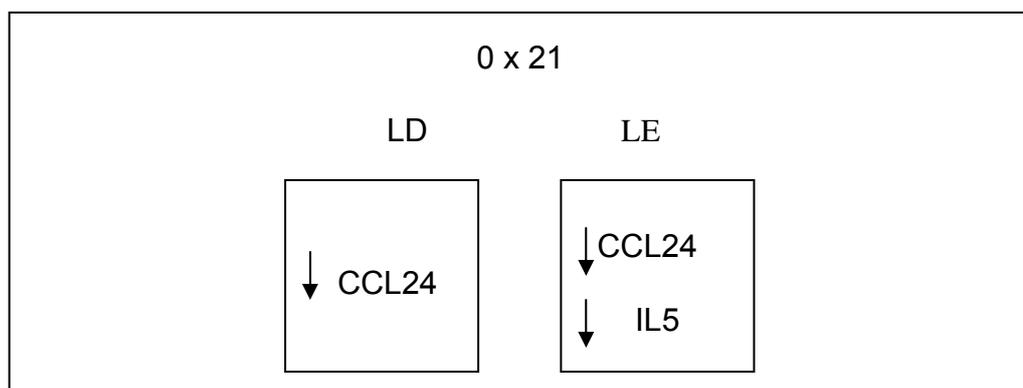


FIGURA 5 – Resultado das comparações entre os momentos.

4.3 Gráficos complementares

O GRAF. 10 representa a evolução das medidas de cada paciente, considerando-se separadamente cada citocina e cada lado do tecido doente. Nesses gráficos é possível, principalmente, avaliar a evolução dos *outliers* e ressaltar o quanto seu comportamento difere do comportamento dos demais dados.

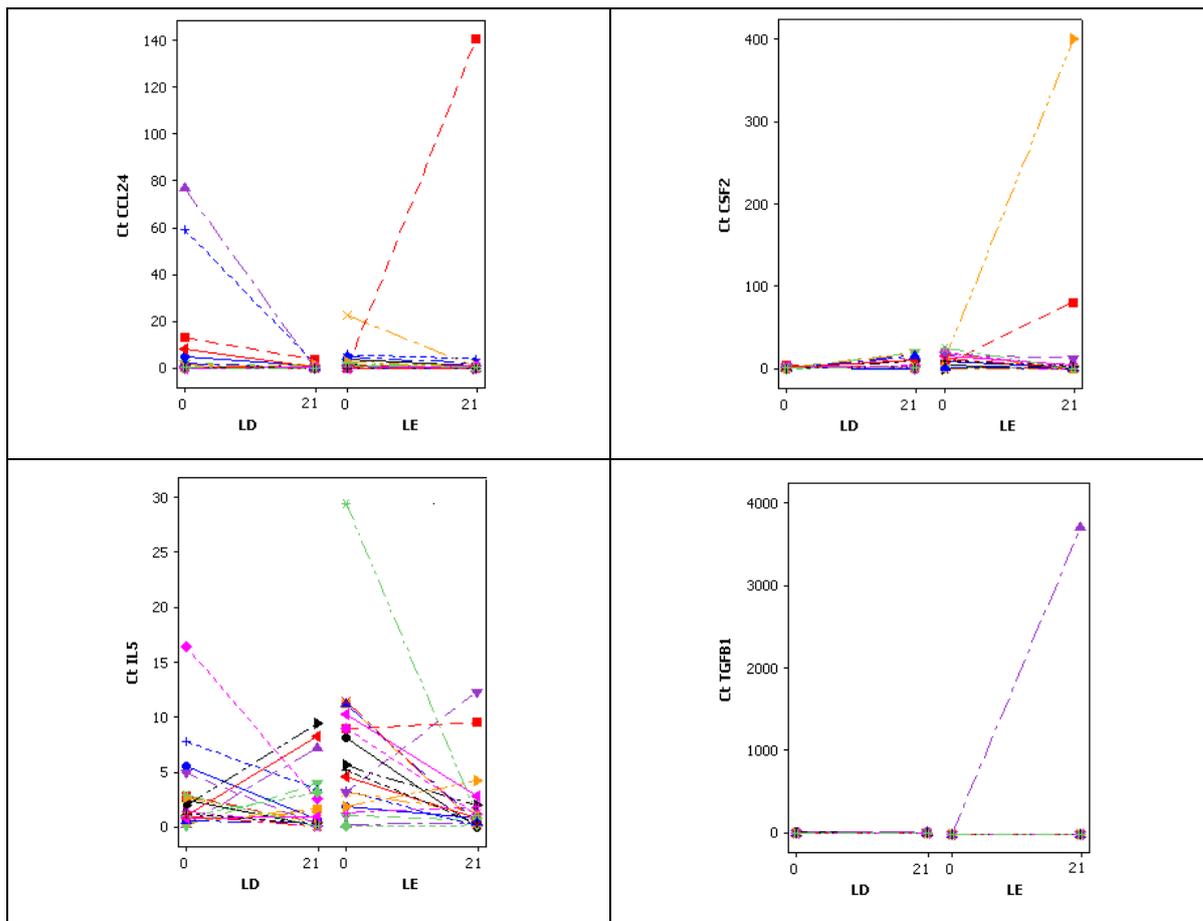


GRÁFICO 10 - Dispersão por citocina e lado e momento.

Todos os *box-plots* considerando-se cada uma das quatro citocinas em estudo e os cinco grupos apresentados foram agrupados no GRAF. 11. Nesses gráficos os asteriscos indicam as médias e os círculos *outliers*.

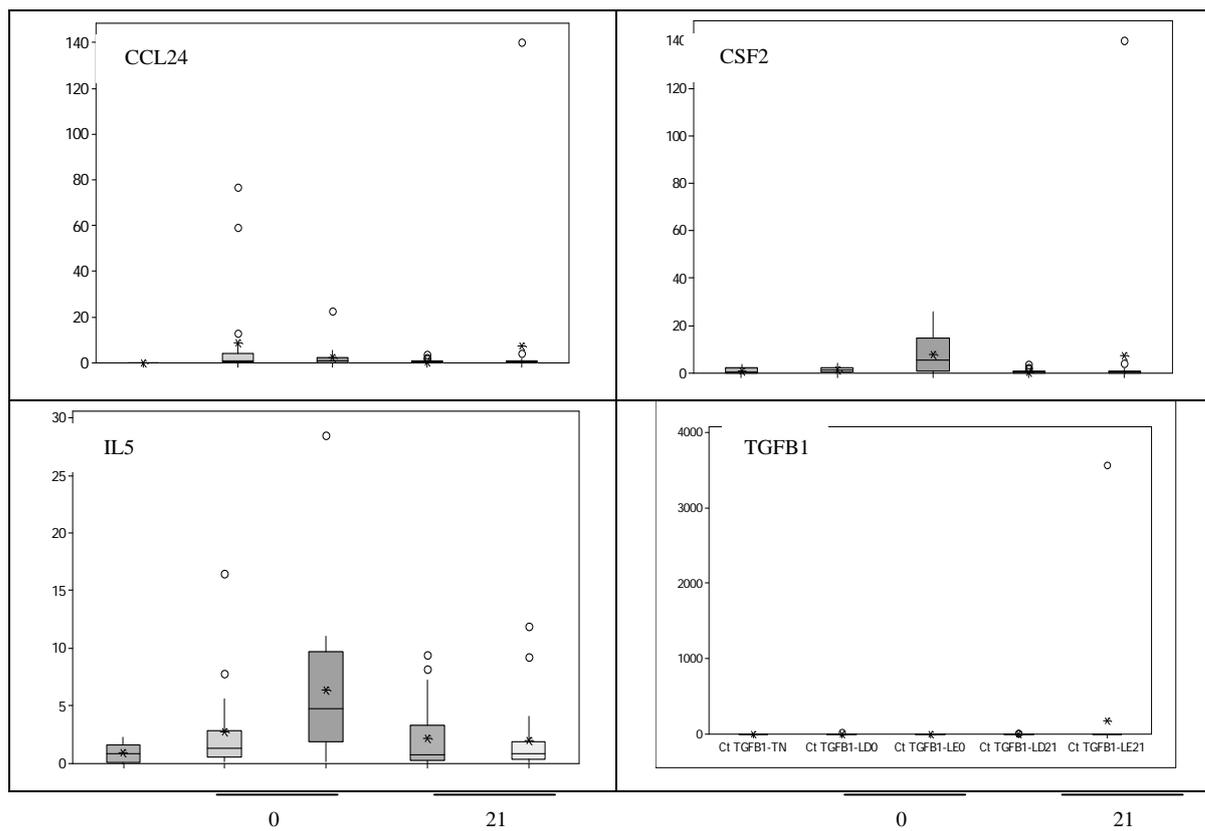


GRÁFICO 11 - *Box-plot* por citocina e grupo.

5 DISCUSSÃO

Publicações sobre expressão genética na PNSE após o uso de MMC no transoperatório não foram encontradas. No presente estudo foi utilizada a MMC 0,5 mg/mL, 3 mL, durante cinco minutos, associada ao tratamento cirúrgico para comparar a mucosa dos pacientes com PNSE e avaliar a ação da MMC quando usada no transoperatório em aplicação única. O método escolhido foi RT-qPCR, considerado padrão-ouro pela acurácia e sensibilidade quantitativa no estudo da sequência do ácido nucleico^{138,139}.

A comparação dos resultados encontrados ressaltou distribuição assimétrica para os valores das citocinas, que pode estar relacionada à heterogenicidade de infiltração eosinofílica apresentada nos portadores de PNSE, às diferentes respostas ao tratamento clínico no pré e pós-operatório ou às diferenças de acometimento inflamatório no local da biópsia e fase de atividade da doença. A expressão de genes anti-inflamatórios ou inflamatórios ainda não descobertos ou avaliados deve ser considerada frente à complexidade dessa afecção.

Na análise da participação das quimiocinas no balanço pró e anti-inflamatório avaliou-se a expressão de eotaxina, citocina que tem habilidade de induzir o movimento e direção dos eosinófilos e também agir sobre outras citocinas. É um potente quimioatraente de eosinófilos¹⁴⁰. Estudos anteriores salientaram elevação de 100 vezes da eotaxina em pólipos em relação ao grupo-controle e diminuição em 10 vezes após tratamento com corticoide. Sua especificidade na atração e importância no acúmulo de eosinófilos já está bem demonstrada em pesquisas anteriores e sua expressão bem evidenciada na PNSE, como reforçou o presente estudo.

Na descrição comparativa da quimiocina eotaxina, todos os valores estão elevados no grupo doente, com significância no lado direito no tempo zero em relação ao tecido normal. No estudo pareado ocorreu diminuição da expressão no tempo 21 no maxilar esquerdo e no direito onde não foi aplicada a MMC. Deve-se considerar a existência de ação sinérgica de outras citocinas como IL4, TNF α e IL13 na indução da produção da eotaxina, além do efeito da MMC nessas

citocinas. Apesar da diferença significativa com a utilização da MMC no momento 21, não há indicação de sua influência na diminuição da expressão da eotaxina em relação ao lado não tratado. Considerando-se o tecido normal e lado direito, não houve diferença significativa no momento 21 dias. Os dados apresentados em relação à eotaxina confirmaram o benefício da cirurgia e o uso do corticoide associados. Embora tenha ocorrido diferença de valores, não se pode inferir o benefício da MMC, pois a eotaxina exibiu valores mais altos no lado direito no momento zero em relação ao lado esquerdo e não se registrou diferença significativa entre os dois lados no momento 21.

Os fatores estimuladores de colônia juntamente com IL5 são importantes na sobrevivência dos eosinófilos.

O GM-CSF (CSF2) está superexpresso em pólipos de atópicos; e em não atópicos, em 30% dos eosinófilos. A redução dessa citocina foi demonstrada após uso de corticoide e a ocorrência da apoptose dos eosinófilos pode ser devida, em parte, à diminuição do GM-CSF produzido pelas células epiteliais⁸¹. Estes resultados não foram encontrados em outras pesquisas¹⁴¹.

Em análise comparativa anterior, a MMC tópica após utilização de 3 mL, 0,5 mg/mL durante cinco minutos, em pólipos de pacientes, *in vivo*, houve redução com significância de IL5 e GM-CSF em biópsias realizadas 24 horas após a aplicação¹⁴². Em cultura de pólipos evidenciou-se eficácia em provocar apoptose de eosinófilos¹⁰². No presente trabalho, a expressão de GM-CSF da mucosa dos seios paranasais mostrou-se aumentada no transoperatório e no 21º dia pós-operatório em relação ao grupo-controle. A MMC não modificou a expressão da mucosa do maxilar esquerdo (tratado) no tempo 21 em relação ao tempo zero e não apresentou diferença significativa em comparação ao seio maxilar direito no tempo 21. A superexpressão dessa citocina está de acordo com a literatura. Como esperado, o GM-CSF manifestou-se superexpresso tanto na mucosa do seio maxilar esquerdo quanto direito no momento zero antes do tratamento com MMC (TAB. 4) e também superexpresso no maxilar esquerdo em relação ao direito no momento zero antes do tratamento com MMC. Este dado permite inferir somente a presença de processo inflamatório de magnitude diferente da PNSE em maxilares diferentes. Essa diferença é comum mesmo em um mesmo seio paranasal, no qual se podem encontrar graus diferentes de inflamação em áreas distintas. A superexpressão em todos os momentos de

avaliação evidenciou também ausência de efetividade importante, nos valores de GM-CSF, de cirurgia e corticoide associados, que, durante o tempo do estudo (21 dias), não mostraram diferença significativa.

Em relação à IL5, após aplicação de MMC no seio maxilar esquerdo, obteve-se diferença de expressão de IL5 significativa entre os dois momentos. Essa diferença não foi verificada no lado direito (controle pareado). Também a expressão de IL5 entre os seios direito e esquerdo no momento zero apresentou diferença significativa. Com base nos resultados da análise comparativa dos maxilares em relação à IL5, pode-se apurar que houve indicação da influência da MMC na expressão de IL5. A subexpressão analisada no 21º dia no maxilar esquerdo demonstra o benefício da MMC no tratamento da PNSE. O envolvimento de vários fatores deve ser devidamente correlacionado para análise da contribuição desse medicamento.

A MMC em 1990 foi reconhecida como agente antiproliferativo e detentor do crescimento de fibroblastos^{32,85}. Ao diminuir a proliferação de fibroblastos, inibe-se a formação de colágeno e tecido de granulação. O TGF- β é responsável pela formação estrutural dos pólipos, proliferação celular, angiogênese, hiperplasia glandular, espessamento da membrana basal e estroma fibroso. É citocina-chave nas interações celulares que levam à proliferação tecidual⁹⁴.

Estudos sobre a ação do TGF- β 1 em pacientes portadores de PNSE não tratados apresentaram altas concentrações de IL5 e eotaxina e baixa concentração de TGF- β 1. Após tratamento, ocorre redução de IL5 e aumento de TGF- β 1⁵⁹.

O TGF- β 1 tem ação dupla: é capaz de anular o efeito prolongado de IL5, IL3 e GM-CSF na sobrevida do eosinófilo e induzir a apoptose, o que explicaria a associação de sua baixa expressão em doença eosinofílica como PNSE^{62,82,87,143}. Sua expressão é mais representativa em pólipos em relação à mucosa normal e aumenta com o uso de corticoide. A forma inativa do TGF- β 1 é 100 vezes maior na matriz extracelular em relação à ativa, o que favorece a ação da IL5^{141,142}.

O TGF- β 1 neste estudo evidenciou valores mais altos em tecido normal (seio esfenoidal) em relação ao lado esquerdo nos dois tempos, com significância.

A subexpressão do TGF- β 1 pode relacionar-se à acentuada atividade da doença quando essa citocina se apresenta em níveis muito baixos e contribui como um dos importantes fatores no complexo inflamatório.

A distribuição assimétrica das citocinas é demonstrada na diferença significativa no tempo zero entre os dois seios. O maxilar esquerdo tratado não apresentou diferença nos tempos zero e 21. Portanto, na avaliação do TGF- β 1 como marcador da evolução da doença pós-tratamento cirúrgico e uso da MMC, não foi encontrada diferença; o medicamento não mostrou benefício. Os valores encontrados confirmaram a subexpressão dessa citocina no processo inflamatório da PNSE.

Ainda conforme a literatura, a correlação positiva com significância estatística entre IL5 e GM-CSF ocorreu em todos os momentos, exceto no lado direito no tempo zero. Correlação negativa entre TGF- β 1 e GM-CSF e IL5 indica os baixos valores de TGF- β 1 e elevados de IL5 e GM-CSF esperados na PNSE.

Esse resultado leva a considerações como: o tempo de uso da MMC na mucosa dos seios foi suficiente? A concentração foi adequada para influenciar o padrão TH2 da mucosa do seio maxilar no 21º dia? Apesar da medicação agir até 32 dias, o tempo para avaliação foi muito longo no estudo da PNSE? A secreção habitualmente presente nas cavidades paranasais nos primeiros dias pós-cirurgia seria um fator para diluição da droga e diminuição de sua efetividade? Qual seria o efeito biológico da MMC, que tem ação comprovada em genes induzidos em tecidos com padrão inflamatório intenso? A ação se mantém em longo prazo ou seriam necessárias aplicações seriadas? A associação da cirurgia ao corticoide no tratamento da PNSE já induz a importante subexpressão de IL5¹⁴⁵. Portanto, como avaliar adequadamente o efeito da MMC como anti-inflamatório ou antiapoptótico? No pós-operatório, as alterações devidas à abertura ampla dos seios e à mucosa doente e despreparada para nova corrente aérea seriam fatores significativos de interferência nessa análise? Porém a mesma cirurgia foi realizada nos dois lados.

Outros estudos são necessários para considerar a mitomicina C alternativa viável ou um tratamento coadjuvante no tratamento da polipose nasossinusal, antes considerada afecção estritamente cirúrgica.

6 CONCLUSÃO

Com base nesta pesquisa, pode-se afirmar que:

- O uso tópico da mitomicina C na polipose nasossinusal eosinofílica atuou nas citocinas inflamatórias:
 - ✓ Reduzindo a expressão de IL5.
 - ✓ Com tendência de redução da expressão de GM-CSF
 - ✓ Sem evidência de redução significativa para TGF- β 1 e eotaxina.
- As citocinas apresentaram valores assimétricos entre seios maxilares direito e esquerdo e entre o tecido normal e a mucosa dos maxilares.
- Ocorreu correlação negativa entre TGF- β 1 e GM-CSF e IL5 e correlação positiva entre GM-CSF e IL5.

7 PROPOSIÇÃO

A mitomicina C foi efetivamente capaz de reduzir a expressão da IL5 que está altamente associada à inflamação da PNSE. Como questionamento, pergunta-se: esta droga seria capaz de reduzir as recidivas? Para esta questão, seria necessário acompanhamento dos pacientes e considerar novas aplicações em tempos a serem analisados.

REFERÊNCIAS

- 1 Bachert C, Zang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8:34-38.
- 2 Bradford AW, Kusumam J, Allen P, Rodney JS. Alterations in eotaxin, monocyte chemoattractant protein-4, interleukin-5, e interleukin-13 after systemic steroid treatment for nasal polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131(5):585-589.
- 3 Jankowski R, Bouchoua F, Coffinet L, Vignaud JM. Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps. *Rhinology* 2002; 40: 173-178.
- 4 Hamilos DL, Leung DYM, Muro S, Kahn AM, Hamilos SS, Thawlew SE, *et al.* GR β expression in nasal polyp inflammatory cells and its relationship to the anti-inflammatory effects of intranasal fluticasone. *J Investigat Allergol Clin Immunol* 2001; 108(1):59-8.
- 5 Fernandes AM, Valera FCP, Anselmo-Lima WT. Mecanismos de ação dos corticosteroides na polipose rinossinusal. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008; 74(2):279-283.
- 6 Ebbens FA, Maldonado M, Groot EJJ, Alobid I, van Drunen CM, Picado C, *et al.* Topical glucocorticoids downregulate COX-1 positive cells in nasal polyps. *Allergy* 2009; 64:96-103.
- 7 Rudack C, Sachse F, Albery J. Chronic rhinosinusitis: need for further classification? *Inflammation Res* 2004; 53:111-117.
- 8 Drutman J, Babel RW, Harnsberger HR, Sonkens JW, Braby D. Sinonasal Polyposis. *Sem Ultrasound CT MR* 1991; 12(6):561-74.
- 9 Settupane GA. Nasal polyps and systemic diseases. In: Schatz M, Zeiger RS. *Nasal manifestations of systemic diseases*. Providence: Oceanside Publ.; p. 43-51, 1991.
- 10 Mygind N, Dahl R, Bachert C. Nasal polyposis, eosinophil dominated inflammation, and allergy. *Thorax* 2000; 55(Suppl. 2):S79-83.
- 11 Mullarkey MF. Eosinophilic nonallergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82(5 pt.2):941-9.
- 12 Rouvier P, Mondain M, Elkhoury J. Secretory eosinophilia and obstructive rhinitis. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1992; 109(5):264-71.

- 13 Ingels V, 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.
- 14 Chen YS, Langhammer T, Westhofen M, Lorenzen J. Relationship between matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 and IL-5, IL-8 in nasal polyps. *Allergy* 2007; 62: 66-72.
- 15 Probst L, Stoney P, Jeney E, Hawke M. Nasal polyps, bronchial asthma and aspirin sensitivity. *J Otolaryngol* 1992; 21(1):60-5.
- 16 Settupane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 1996; 17(5):231-6.
- 17 Braun JJ, Haas F, Conraux C. Polyposis of the nasal sinuses: epidemiology and clinical aspects of 350 cases, treatment and results with a follow-up over 5 years on 93 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1992; 109(4):189-99.
- 18 Jamal A, Marant AGD. Atopy and nasal polyposis. *J Laryngol Otol* 1987; 101(4):355-8.
- 19 Caplin I, Haynes JT, Spahn J. Are nasal polyps an allergic phenomenon? *Ann Allergy* 1971; 29(12):631-4.
- 20 Castro FFM. *Rinite alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão*. São Paulo: Lemos; 1997.
- 21 Pawankar R. Nasal polyposis: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3(1):1-6.
- 22 Tscopoulos A, Shimbara A, Nadai P, Aldewachil O, Lamblin C, Lassalle P, *et al*. Involvement of IL-9 in the bronchial phenotype of patients with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 113(3):462-9.
- 23 Van Bruaene N, Pérez-Novo CA, Basinski TM, Van Zele T, Holtappels G, De Ruyck N, *et al*. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(6):1435–1441.
- 24 Drake-Lee A. Nasal polyps in identical twins. *J Laryngol Otol* 1992; 106(12):1084-5.
- 25 Greisner WA^{3rd}, Settupane GA. Hereditary factor for nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 1996; 17(5):283-6.
- 26 Karjalainen J, Joki-Erkkilä VP, Hulkkonen J, Pessi T, Nieminen MM, Aromaa A, *et al*. The IL1A genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults. *Allergy* 2003; 58(5):393-6.
- 27 Moloney JR, Oliver RTD. HLA antigens, nasal polyps and asthma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1980; 5(3):183-9.

- 28 Robinson MA, Kindt TJ. Major histocompatibility complex antigens and genes. *In*: Paul WE. Fundamental immunology. New York: Raven Press; p. 489-539, 1989.
- 29 Schaller JG, Omenn GS. The histocompatibility system and human disease. *J Pediatr* 1976; 88(6):913-25.
- 30 Stoop AE, Van der Heijden HA, Biewenga J, Van der Baan S. Clinical aspects and distribution of immunologically active cells in the nasal mucosa of patients with nasal polyps after endoscopic sinus surgery and treatment with topical corticosteroids. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992; 249(6):313-7.
- 31 Malagutti N, Aimoni C, Balboni A, Stignani M, Melchiorri L, Borin M, *et al*. Decreased production of human leukocyte antigen G molecules in sinonasal polyposis. *Am J Rhinology* 2008; 22(5):468-473.
- 32 Bahar I, Kaiserman I, Lange AP, Slomovic A, Levinger E, Sansanayudh W, *et al*. The effect of mitomycin c on corneal endothelium in pterygium surgery. *Am J Ophthalmol* 2009; 147(3):447-452.
- 33 Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 genotypes in patients with nasal polyposis. *Laryngoscope* 2000; 110(3pt.1):422-5.
- 34 Erbeck SS, Yurtcu E, Erbeck S, Atac FB, Sahin FI, Cakmak O. Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis. *Arch Otolaryngology: Head Neck Surg* 2007; 133(7):705-709.
- 35 Settipane RA, Lieberman P. Update on nonallergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86(5):494-508.
- 36 Wu J, Bing L, Jin H, Jingping F. Gene expression profiles of nasal polyps associated with allergic rhinitis. *Am J Otolaryngol* 2009; 30:24-32.
- 37 Otto BA, Wenzel S. The role cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 16:270-274.
- 38 Bernstein JM, Gorfien J, Noble B. Role of allergy in nasal polyposis: a review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 113(6):724-32.
- 39 Bernstein JM, Gorfien J, Noble B, Yankaskas JR. Nasal polyposis: Immunohistochemistry and bioelectrical findings (a hypothesis for the development of nasal polyps). *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(2):165-75.
- 40 Hassid S. Sinusnasal polyposis. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1997; 51(4):367-70.
- 41 Moqbel R. Eosinophils, cytokines, and allergic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 725:223-33.

- 42 Howarth PH, Bradding P, Quint D, Redington AE, Holgate ST. Cytokines and airway inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 725:69-82.
- 43 Leff AR. Role of leukotrienes in bronchial hyperresponsiveness and cellular responses in airways. *Thorax* 2000; 55(Suppl. 2):S32-7.
- 44 Allen JS, Eisma R, Leonard G, Kreutzer D. Interleukin-3, interleukin-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in nasal polyps. *Am J Otolaryngol* 1997; 18(4):239-46.
- 45 Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997; 158(8):3902-8.
- 46 Simon H. Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis: similarities and differences. *Immunological Rev* 2001; 179:156-62.
- 47 Eliashar R, Levi-Schaffer F. The role of eosinophil in nasal diseases. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13(3):171-5.
- 48 Kowalski ML, Grzegorzczak J, Pawliczak R, Kornatowski T, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Decreased apoptosis and distinct profile of infiltrating cells in the nasal polyps of patients with aspirin hypersensitivity. *Allergy* 2002; 57(6):493-500.
- 49 Stern M, Meagher L, Savill J, Haslett C. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and modulated by IL-5. *J Immunol* 1992; 148(11):3543-9.
- 50 Lee CH, Lee KS, Rhee CS, Lee SO, Min YG. Distribution of rantes and interleukin-5 in allergic nasal mucosa and nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108(6):594-8.
- 51 Lamkhioued B, Gounni AS, Aldebert D, Delaporte E, Lionel P, Capron A, *et al.* Synthesis of type 1 (IFN gamma) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 796:203-8.
- 52 Gevaert P, Lang-Loidolt D, Lackner A, Stammberger H, Staudinger H, Van Zele T, *et al.* Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(5): 1133-1141.
- 53 Stoop AE, Van der Heijden HA, Biewenga J, Van der Baan S. Eosinophils in nasal polyps in nasal mucosa: an immunohistochemical study. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91(2):616-22.
- 54 Sánchez-Segura A, Brieva JA, Rodríguez C. Regulation of immunoglobulin secretion by plasma cells infiltrating nasal polyps. *Laryngoscope* 2000; 110(7):1183-8.

- 55 Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, *et al.* Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy* 2006; 61:1280-1289
- 56 Dellacono FR, Eisma R, Lafreniere D, Leonard G, Kreutzer D. Interferon gamma expression in human nasal polyps. *Laryngoscope* 1997; 107(5):626-30.
- 57 Voegels RL, Santoro P, Butugan O, Formigoni LG. Nasal polyposis and allergy: is there a correlation? *Am J Rhinology* 2001; 5(1):9-14.
- 58 Bernstein JM, Cropp GA, Nathanson I, Yankaskas JR. Bioelectric properties of cultured nasal polyp and turbinate epithelial cells. *Am J Rhinology* 1990; 4:45-8.
- 59 Hirschberg A, Jókúti A, Darvas Z, Almay K, Répássy G, Falus A. The pathogenesis of nasal polyposis by immunoglobulin E and interleukin-5 is completed by transforming growth factor-beta-1. *Laryngoscope* 2003; 113(1):120-4.
- 60 Van Cauwenberge P, Hoecke HV, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006, 6:487-494.
- 61 Park HS, Jung KS, Shute J, Roberts K, Holgate ST, Djukanovic R. Allergy 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):1476-82.
- 62 European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinology Suppl* 2005; 18:1-88.
- 63 Niederfuhr A, Kirsche H, Detschle T, Poppert S, Riechelmann H, Wellinghausen N. *Staphylococcus aureus* in nasal lavage and biopsy of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy* 2008; 63:1359-1367.
- 64 Bernstein JM, Ballou M, Rich G, Allen C, Swanson M, Dmochowski J. Lymphocyte subpopulations and cytokines in nasal polyps: is there a local immune system in the nasal polyp? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(5):526-35.
- 65 Stoop AE, Van der Heijden HA, Biewenga J, Van der Baan S. Lymphocytes and nonlymphoid cells in human nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87(2):470-5.
- 66 Linder A, Karlsson-Parra A, Hirvela C, Jonsson L, Kolling A, Sjoberg O. Immunocompetent cells in human nasal polyps and normal mucosa. *Rhinology* 1993; 31(3):125-9.

- 67 Jean-François P, Coste A, Gendron MC, Cordonnier C, Wingerstmann L, Peynègre R, *et al.* HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *The Laryngoscope* 2002; 112:2067-2075.
- 68 Sánchez-Segura A, Brieva JA, Rodriguez C. T Lymphocytes that infiltrate nasal polyps have a specialized phenotype and produce a mixed Th1/Th2 pattern of cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(6 pt.1):953-60.
- 69 Stoop AE, Hameleers DM, Vrun PE, Biewenga J, Van der Baan S. Lymphocytes and nonlymphoid cells in the nasal mucosa of patients with nasal polyps and of healthy subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84(5pt.1):734-41.
- 70 Wang D, Levasseur-Acker GM, Jankowski R, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Charron D. HLA class II antigens and T lymphocytes in human nasal epithelial cells. Modulation of HLA class II gene transcripts by gamma interferon. *Clin Exp Allergy* 1997; 27(3):306-14.
- 71 Liu CM, Shun CT, Hsu MM. Lymphocyte and antigen-specific IgE antibody in nasal polyps. *Ann Allergy* 1994; 72(1):19-24.
- 72 Bernstein JM. Pólipos nasais: determinando a causa, estabelecendo o tratamento. *J Respir Dis* 1998; 2:4-9.
- 73 Ohno I, Lea R, Finotto S, Marshall J, Denburg J, Dolovich J, *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene expression by eosinophils in nasal polyposis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5(6):505-10.
- 74 Jankowski R. Eosinophils in the pathophysiology of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol* 1996; 116(2):160-3.
- 75 Shin SH, Lee SH, Jeong HS, Kita H. The effect of nasal polyp epithelial cells on eosinophil activation. *Laryngoscope* 2003; 113(8):1374-7.
- 76 Vancheri C, Ohtoshi T, Cox G, Xaubet A, Abrams JS, Gauldie J, *et al.* Neutrophilic differentiation induced by human upper airway fibroblast-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4(1):11-7.
- 77 Xaubet A, Mullol J, López E, Roca-Ferrer J, Rozman M, Carrión T, *et al.* Comparison of the role of nasal polyp and normal nasal mucosa epithelial cells on in vitro eosinophil survival. Mediation by GM-CSF and inhibition by dexamethasone. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(4):307-17.
- 78 Le Bellego F, Perera H, Plante S, Chakir J, Hamid Q, Ludwig MS. Mechanical strain increases cytokine and chemokine production in bronchial fibroblasts from asthmatic patients. *Journal copilation* 2009; 64:32-39.

- 79 Ohori J, Ushikai M, Sun D, Nishimoto K, Sagara Y, Fukuiwa T, *et al.* TNF- α upregulates VCAM-1 and NF- κ B in fibroblasts from nasal polyps. *Auris Nasus Larynx* 2007; 34:177-183.
- 80 Rudack C, Hauser U, Stoll W. Effect of cytokines and fibroblasts on eosinophilic granulocyte survival in polyposis nasi. *Laryngorhinootologie* 1999; 78(7):378-81.
- 81 Mullo J, Roca-Ferrer J, Xaubet A, Traserra J, Picado C. Inhibition of GM-CSF secretion by topical corticosteroids and nedrocomil sodium. A comparison study using nasal polyp epithelial cells. *Resp Med* 2000; 94:428-431.
- 82 Gauldie J, Cox G, Jordana M, Ohno I, Kirpalani H. Growth and colony-stimulating factors mediate eosinophil fibroblast interactions in chronic airway inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 725:83-90.
- 83 Figueiredo CR, Santos RP, Silva IDCG, Weckx LLM. Microarray cDNA to identify inflammatory genes in nasal polyposis. *Am J Rhinology* 2007; 21(2):231-235.
- 84 Zuckerman JD, Lee WY, DelGaudio JM, Moore CE, Nava P, Nusrat A, *et al.* Pathophysiology of nasal polyposis: The role of desmosomal junctions. *Am J Rhinology* 2008; 22(6):589-597.
- 85 Simpson CB, White S, McGuff S. Anti-transforming growth factor beta as a treatment for laryngotracheal stenosis in a canine model. *The Laryngoscope* 2008; 118: 546-551.
- 86 Zhang N, Van Zele T, Perez-Novo C, Van Bruaene N, Holtappels G, DeRuyck N, *et al.* Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J Investigat Allergol Clin Immunol* 2008; 122(5):961-968.
- 87 Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, *et al.* Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy* 2006; 61:1280-1289.
- 88 Eisma RJ, Allen JS, Lafreniere D, Leonard G, Kreutzer DL. Eosinophil expression of transforming growth factor-beta and its receptors in nasal polyposis: role of the cytokines in the disease process. *Am J Otolaryngol* 1997; 18(6):405-11.
- 89 Bradley DT, Kountakis SE. Role of interleukins and transforming growth factor-beta in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Laryngoscope* 2005; 115(4):684-6.
- 90 Nonaka M, Pawankar R, Fukumoto A, Ogihara N, Sakanushi A, Yagi T. Induction of eotaxin production by interleukin-4, interleukin-13 and lipopolysaccharide by nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(5):804-11.

- 91 Martinez-Alvernia EA, Rudnick JA, Mankarious LA. Transforming growth factor β 3 increases chondrocyte proliferation and decreases apoptosis in murine cricoid cartilage in vitro. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 138:435-440.
- 92 Ohno I, Lea RG, Flanders KC, Clark DA, Banwatt D, Dolovich J, *et al.* Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor β 1 gene (TGF β 1). *J Clin Invest* 1992; 89(5):1662-8.
- 93 Little SC, Early SB, Woodard CR, Shonka DC, Han JK, Borish L, *et al.* Dual Action of TGF- β 1 on nasal-polyp derived fibroblasts. *The Laryngoscope* 2008; 118: 320-324.
- 94 Bradley DT, Kountakis SE. Role of interleukins and transforming growth factor- β in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *The Laryngoscope* 2005; 115: 684-686.
- 95 Seto H, Suzaki H, Shioda S. Immunohistochemical localization of eotaxin immunoreactivity in nasal polyps. *Acta Otolaringol* 2004; 553: 99-104.
- 96 Lezcano-Meza D, Dávila-Dávila B, Veja-Miranda A, Negrete-García MC, Teran LM. Interleukin (IL)-4 and to a lesser extent either IL-13 or interferon-gamma regulate the production of eotaxin-2/CCL24 in nasal polyps. *Allergy* 2003; 58:1011-1017.
- 97 Hamilos DL, Thawley SE, Kramper MA, Kamil A, Hamid QA. Effect of intranasal fluticasone on cellular infiltration, endothelial adhesion molecule expression, and proinflammatory, cytokine mRNA in nasal polyp disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(1 pt.1):79-87.
- 98 Nonaka M, Ogihara N, Fukumoto A, Sakanushi A, Pawankar R, Yagi T. Toll-like 2, 3, 4, 5 ligands and interleukin-4 synergistically induce TARC production in nasal polyp fibroblasts. *Auris Nasus Larynx* 2008; 35:515-520.
- 99 Terán LM, Ledesma-Soto Y, Krengel S, Lezcano-Meza D. The role of eotaxins in bronchial asthma and nasal polyposis. *Gaceta Méd Méx* 2006; 142 (2).
- 100 Bachert C, Wegenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(6pt.1):837-42.
- 101 Gevaert P, Bachert C, Holtappels G, Novo CP, Van der Heyden J, Franssen L *et al.* Enhanced soluble interleukin-5 receptor alpha expression in nasal polyposis. *Allergy* 2003 58(5):371-9.

- 102 Crosara PFTB, Nascimento E, Cronemberger Sobrinho S, 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 Otorrinolaringol* 2004; 70 (5): 658-63.
- 103 Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslet C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic granulocytes. *J Immunol* 1996; 156(11):4422-8.
- 104 Hebestreit H, Yousefi S, Balatti M, Weber M, Cramer R, Simon D et al. Expression and function of FAS on human blood and tissue eosinophils. *Eur J Immunol* 1996; 26(8):1775-80.
- 105 Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M, Blaser C et al. Role of Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony stimulation factor and interleukin-5. *Blood* 1998; 92(3):778-83.
- 106 Tennyson H, Helling ER, Wiseman J, Dick E, Lyons RC. The effect of topical mitomycin c on full-thickness burns. *Plast Reconstr Surg J* 2007; 120(4):879-886.
- 107 Tander B, Bicakci U, Kilicoglu-Aydin B, Ariturk E, Rizalar R, Bernay F. Antiadhesive effects of mitomycin C and streptopeptidase A in rats with intraperitoneal adhesions. *Pediatr Surg Int* 2007; 23:785-788.
- 108 Gray SD, Tritle N, Li W. The effect of mitomycin on extracellular matrix proteins in a rat wound model. *Laryngoscope* 2003; 113(2):237-42.
- 109 Ingrams DR, Volk MS, Biesman BS, Pankratov MM, Shapshay SM. Sinus surgery: does mitomycin C reduce stenosis? *Laryngoscope* 1998; 108(6):883-6.
- 110 Estrem SA, Vanleeuwen RN. Use of mitomycin-C for maintaining myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122(1):8-10.
- 111 Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Grierson I, Schultz G, Mcgorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993; 111(2):263-7.
- 112 Díaz L, Villegas VM, Emanuelli A, Izquierdo NJ. Efficacy and safety of intraoperative mitomycin c as adjunct therapy for pterygium surgery. *Cornea* 2008; 27(10):1119-1121.
- 113 Kraut A, Drnovsek-Olup B. Instillation of mytomycin C after recurrent pterygium surgery. *Eur J Ophthalmol* 1996; 6(3):264-7.
- 114 Kim JW, Kim SK, Song I, Kim I. Mitomycin C-induced apoptosis in cultured human Tenon's capsule fibroblasts. *Korean J Ophthalmol* 1999; 13(1):7-15.

- 115 Ayyala RS, Pierot L, Vinals AF, Goldstein MH, Schuman JS, Netland PA, *et al.* Comparison of mytomycin C trabeculectomy, glaucoma drainage device implantation, and laser neodymium: YAG cyclophotocoagulation in the management of intractable glaucoma after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 1998; 105(8):1550-6.
- 116 Yazwa Y, Suzuki M, Kitano H, Kitajima K. Intraoperative mitomycin C in endolymphatic sac surgery for Meniere's disease: a pilot study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999; 61(4):188-94.
- 117 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.
- 118 Becker CG. Tratamento cirurgico da otite média com efusão: tubo de ventilação *versus* aplicação tópica de mitomicina C. [tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
- 119 Ozturk L, Kaygusuz I, Akpolat N, Keles E, Karlidag T, Alpay HC, *et al.* Histopathologic changes in guinea pig mastoid mucosa after topical mitomycin C application followed by mastoidectomy. *Am J Otolaryngol* 2008; 300-304.
- 120 Abtin T, Seth MB, Vijay KA. Mitomycin C and endoscopic sinus surgery: where are we? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15:40-3.
- 121 Hu D, Sires BS, Tong DC, Royack GA, Oda D. Effect of brief exposure to mitomycin C on cultured human nasal mucosa fibroblasts. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2000; 16(2):119-25.
- 122 Rahal A, Peloquin L, Ahmarani C. Mitomycin C in sinus surgery: preliminary results in a rabbit model. *J Otolaryngol* 2001; 30(1):1-5.
- 123 Chung JH, Cosenza MJ, Rahbar R, Metson RB. Mitomycin C for the prevention of adhesion formation after endoscopic sinus surgery: a randomized, controlled study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126(5):468-74.
- 124 Seon-Tae K, Il-Gyu G, Heung-Eog C, Jong-Su H, Yoo-Sam C. Effect of mitomycin C on the size of antrostomy after endoscopic sinus surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115(9):673-678.
- 125 Iñiguez-Cuadra R, Prieto JSM, Iñiguez-Cuadra M, Erranz SZ, Pavez DJ, Bombardiere SG, *et al.* Effect of mitomycin in the treatment of tracheal stenosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134(7):709-714.
- 126 Holland BW, McGuirt Jr. WF. Surgical management of choanal atresia: improved outcome using mitomycin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127(11):1375-80.

- 127 Ward RF, April MM. Mitomycin C in the treatment of tracheal cicatrix after tracheal reconstruction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1998; 44(3):221-6.
- 128 Correa AJ, Reinisch L, Sanders DL, Huang S, Deriso W, Duncavage JA, *et al.* Inhibition of subglottic stenosis with mitomycin C in the canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108(11 pt.1):1053-60.
- 129 Liao SL, Kao SC, Tseng JH, Chen MS, Hou PK. Results of intraoperative mitomycin C application in dacryocystorhinostomy. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(8):903-6.
- 130 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Elsevier Sci* 2001; 25: 402-408.
- 131 Valera FCP, Queiroz R, Scrideliw C, Tonew LG, Anselmo-Lima WT. Evaluating budesonide efficacy in nasal polyposis and predicting the resistance to treatment. *Clin Experiment Allergy* 2009; 39:81-8.
- 132 Boeuf P, Vigan-Womas I, Jublot D, Loizon S, Barale JC, Akanmori BD, *et al.* CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use. *BMC Immunology* 2005; 6(5):1471-2172.
- 133 Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, Grimad JA, *et al.* *In situ* detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virologic Meth* 1996; 56:125-137.
- 134 Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Elsevier Sci* 2001; 25:386-401.
- 135 Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Techn* 2003; 14:33-43.
- 136 Cheadle EJ, Riyad K, Subar D, Rothwell DG, Ashton G, Batha H, *et al.* Eotaxin-2 and colorectal cancer: a potential target for immune therapy. *Hum Cancer Biol* 2007; 13(19).
- 137 Schulbin H, Bode H, Stocker H, Schmidt W, Zippel T, Loddenkemper C, *et al.* Cytokine expression in the colonic mucosa of human immunodeficiency virus-infected individuals before and during 9 months of antiretroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemoth* 2008; 3377-3384.
- 138 Lefever S, Hellemans J, Pattyn F, Przybylski DR, Taylor C, Geurts R, *et al.* RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucl Acids Res* 2009; 37(7):2065-2069.

- 139 Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4):611-622.
- 140 Toru Y, Yuko K, Akemi A, Hidenori Y, Tatsuya S, Kenji K, *et al.* Eotaxin-1, -2, and -3 Immunoreactivity and Protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *The Laryngoscope* 2009; 119:1053-1059.
- 141 Pawliczak R, Lewandowska-Polak A, Kowalski ML. Pathogenesis of nasal polyps: an update. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5:463-471.
- 142 Castro MCM, Assunção E, Castro MM, Araújo RN, Guimarães RE, Nunes FB. Effect of mitomocin C in eosinophilic nasal polyposis, in vivo: concentration of IL5 and GM-CSF, RT-qPCR. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006; 72(1):38-42.
- 143 Little SC, Early BS, Woodart CR, Shonka Jr DC, Han JK, Borish L, *et al.* Dual action of TGF β 1 on nasal polyps derived fibroblasts. *The Laryngoscope* 2008; 18:320-324.
- 144 Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Van Cauwemberg P. Mediators in nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2:481-487.
- 145 Bolger WE, Joshi AS, Spear S, Nelson M, Govindaraj K. Gene expression analysis in sinonasal polyposis before and after oral corticosteroids: A preliminary investigation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 137:27-3.

APÊNDICES E ANEXO

Apêndice A - Termo de consentimento livre esclarecido

Após leitura e compreensão do termo abaixo o paciente portador de polipose nasossinusal, candidato a tratamento cirúrgico, é convidado a participar da pesquisa.

“Perfil de expressão genética de IL-5, GM-CSF, TGF- β 1, EOTAXINA na polipose nasossinusal pós-cirurgia endoscópica e mitomicina C tópica “.

O estudo consiste na utilização tópica (local) do medicamento mitomicina C (MMC) na mucosa do nariz durante o procedimento cirúrgico para tratamento de polipose nasossinusal e na realização de biópsia dessa mucosa durante procedimento cirúrgico e após três semanas. Na mucosa da biópsia serão dosadas as citocinas citadas, que participam na manutenção da doença. A pesquisa será realizada no Hospital das Clínicas da UFMG, sob responsabilidade da Dr^a. Mirian Cabral Moreira de Castro, CRMMG 12.439.

O estudo tem como objetivo avaliar a ação da mitomicina C na redução das citocinas e seu benefício no controle da polipose nasossinusal. O objetivo final é o desenvolvimento de novas perspectivas de tratamento para a polipose nasossinusal.

O uso local da mitomicina C não envolve riscos. A participação na pesquisa não altera o curso do tratamento. O tratamento cirúrgico e acompanhamento pós-operatório serão os habituais, exceto biópsia no 21º dia.

Os dados coletados serão utilizados apenas para fins da pesquisa que será publicada na forma de tese de doutorado.

Não há remuneração para os participantes da pesquisa.

A participação no estudo poderá ser interrompida pelo paciente a qualquer momento sem restrições ou consequências ao tratamento habitual.

Após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu, portador de polipose nasossinusal, aceito voluntariamente participar da pesquisa “Perfil de

expressão genética de IL-5, GM-CSF, TGF- β 1, EOTAXINA na polipose nasossinusal pós-cirurgia endoscópica e mitomicina C tópica ”.

Autorizo a aplicação nasal da mitomicina C e a realização de biópsias nasais. Estou ciente de que a aplicação local do medicamento não traz riscos à minha saúde e que meu tratamento seguirá o curso habitual. Posso desistir da participação na pesquisa sem qualquer ônus.

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

Belo Horizonte, / /

Assinatura do paciente

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

Assinatura do pesquisador responsável (Mirian C. M. de Castro)

Contato com o pesquisador responsável:

Mirian Cabral Moreira de Castro

Endereço: Av. Alfredo Balena s/n – Santa Efigênia

Hospital São Geraldo - fone: 3248-9582

Contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) (ANEXO A).

Av. Antônio Carlos, 6.627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Campus Pampulha Belo Horizonte – MG (31) 3409.4592

Apêndice B - Perfil de expressão genética de IL-5, GM-CSF, TGF- β 1, eotaxina na polipose nasossinusal pós-cirurgia endoscópica e mitomicina C tópica

Protocolo da pesquisa

Nome:

Sexo:

Data de Nascimento:

Queixa:

- | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|
| - Obstrução nasal | Sim _____ | Não _____ |
| - Secreção nasal | Sim _____ | Não _____ |
| - Hiposmia ou anosmia | Sim _____ | Não _____ |
| - Dor ou pressão facial | Sim _____ | Não _____ |

Tempo de sintomas:

< 1 mês _____ entre 1 e 3 meses _____ > 3 meses _____

Tomografia computadorizada dos seios da face - Lund – Mackay

Endoscopia: Lanza-Kennedy

Porcentagem de eosinófilos na biópsia: _____

Apêndice C - Lista dos pacientes da pesquisa com idade, sexo e eosinofilia.

PACIENTE	IDADE	SEXO	EOSINOFILIA
AGO	72	M	40%
AGS	42	M	60%
HGS	65	M	70%
IPT	36	F	30%
EMS	50	F	30%
ZAF	50	F	60%
KPR	56	F	70%
IDV	58	M	80%
JFM	62	M	40%
AGD	44	M	50%
AAS	38	F	40%
MV	57	F	30%
LM	34	F	60%
AS	48	M	50%
AEG	37	M	40%
AMSA	61	F	40%
JFP	41	M	30%
RFR	57	F	60%
IMS	40	F	40%
RCO	58	F	30%
MAC	54	M	grupo controle
KM	39	F	grupo controle
CMCM	65	F	grupo controle
CFC	46	F	grupo controle
FPS	53	M	grupo controle
EES	63	M	grupo controle

Apêndice D - Estudo estatístico

Descrição do estudo

Foram avaliadas as citocinas Eotaxina, GM-CSF, IL5, TGF- β 1 dosadas a partir de RNA em seis casos de tecido normal e 20 casos de tecido doente nos lados direito e esquerdo e momentos zero e 21. Vale destacar que foram os mesmos 20 pacientes avaliados em ambos os lados e em ambos os tempos.

Objetivos

Comparar os valores de cada uma das quatro citocinas dosadas a partir de RNA em relação ao tecido normal e nos tecidos doentes do lado direito momentos zero e 21 e lado esquerdo momentos zero e 21 e também, dentro de cada grupo, avaliar o comportamento das citocinas entre si.

Métodos estatísticos

As informações coletadas foram digitadas em um banco de dados desenvolvido no Excel®. Os resultados descritivos foram obtidos utilizando frequências e porcentagens para as características das diversas variáveis categóricas e da obtenção de medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio-padrão) para as quantitativas.

Foram construídos gráficos *box-plots* para as citocinas. No gráfico *box-plot* os círculos indicam observações consideradas valores extremos, ou seja, muito diferentes dos valores apresentados pelas outras observações¹⁵³. O início da caixa representa o primeiro quartil, ou seja, que 25% das observações estão abaixo desse valor. A linha central representa a mediana, indicando que 50% dos valores estão acima e outros 50% abaixo desse valor. Em alguns casos esse também é o valor máximo. O fim da caixa representa o terceiro quartil, que indica que 75% das observações estão abaixo desse valor.

Nas tabelas, n corresponde ao número de observações, DP a desvio-padrão, mínimo a mínimo, máximo a máximo, 1º Q a 1º quartil e 3º Q a 3º quartil.

Avaliação das citocinas e grupos

A estratégia adotada para a análise de resultados foi a utilização de métodos estatísticos não paramétricos. Estas técnicas implicam a ordenação ascendente dos valores das citocinas não trabalhando com os valores medidos e sim com a posição que eles ocupam após a ordenação, sendo as principais vantagens não ter suposição de distribuição normal e não serem afetadas pela presença de valores extremos, *outliers*, visualizados nos gráficos *box-plots* na análise descritiva e que não devem ser excluídos da análise por serem valores autênticos.

As análises foram realizadas no *software* R, de domínio público. O nível de significância adotado foi de 5%.

Comparação entre os grupos em cada citocina

A comparação de cada uma das citocinas entre o tecido normal e os lados direito e esquerdos nos momentos zero e 21 foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney.

Já as comparações de cada uma das citocinas entre o lado direito momento zero e momento 21, lado esquerdo momento zero e momento 21, direito momento zero e esquerdo momento zero e direito momento 21 e esquerdo momento 21 foram realizadas pelo teste pareado de Wilcoxon.

Correlação entre as citocinas

O grau de associação entre as citocinas em cada um dos grupos analisados (tecido normal, lados direito e esquerdo nos momentos zero e 21) foi observado a partir da análise do coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente varia de -1 a +1. Assim, valores próximos de +1 indicam correlação positiva forte e de -1 indicam correlação negativa forte. Já valores de correlação próximos de zero indicam falta de associação entre as citocinas.

Apêndice E – Gráficos *box-plot* das citocinas por grupos segundo os valores-p em diferentes momentos com *outliers*

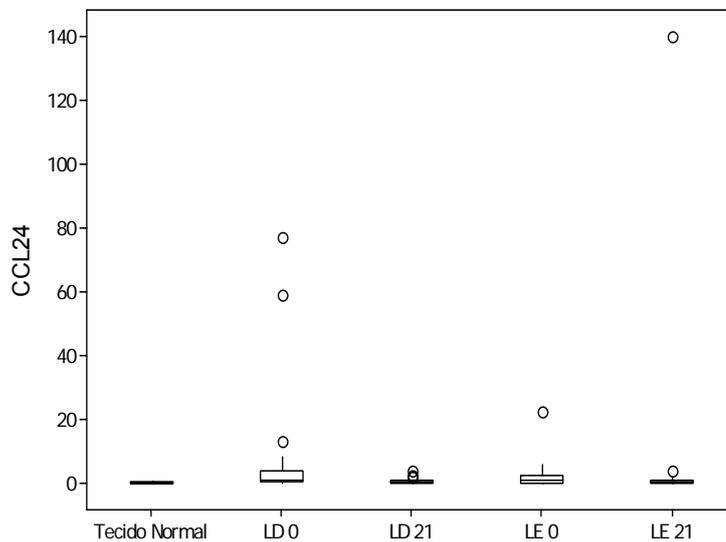


GRÁFICO 1 - *Box-plot* da CCL24 por grupo.

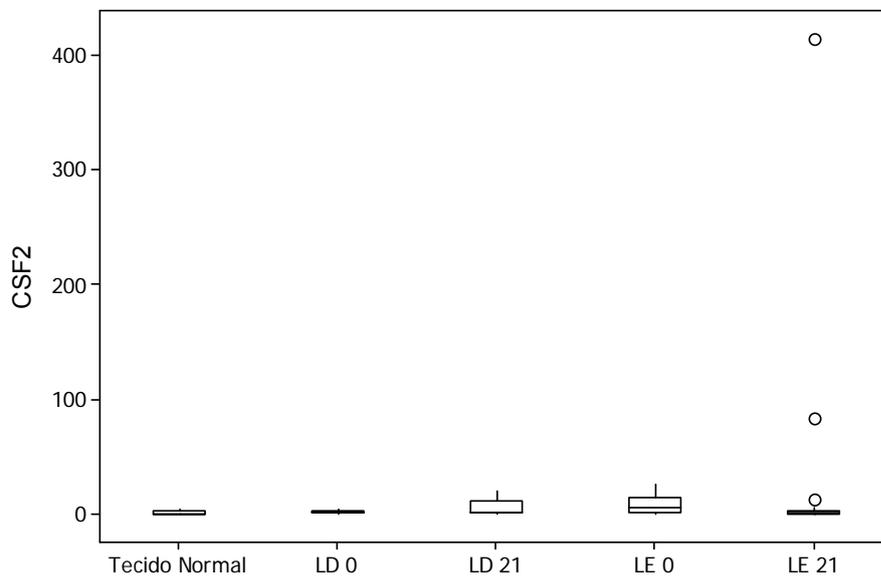


GRÁFICO 2 - *Box-plot* da CSF2 por grupo.

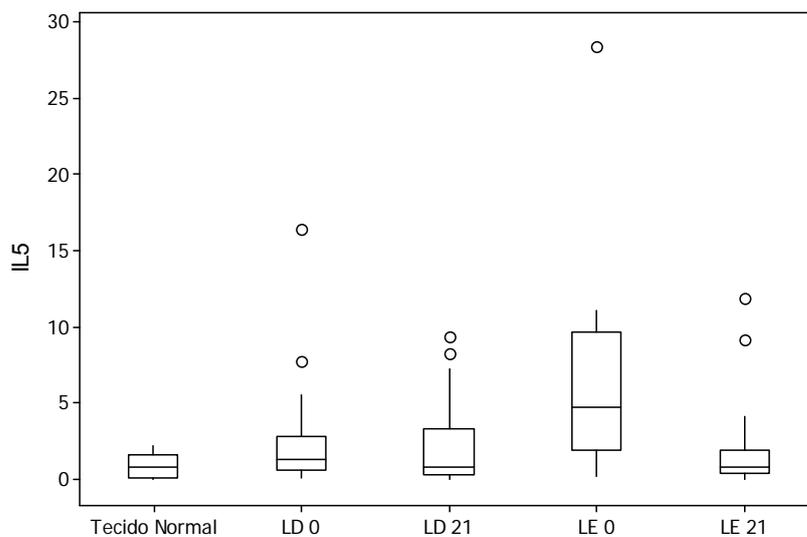


GRÁFICO 3 - *Box-plot* da IL5 por grupo.

Observam-se valores extremos para todos os grupos, exceto para o tecido normal.

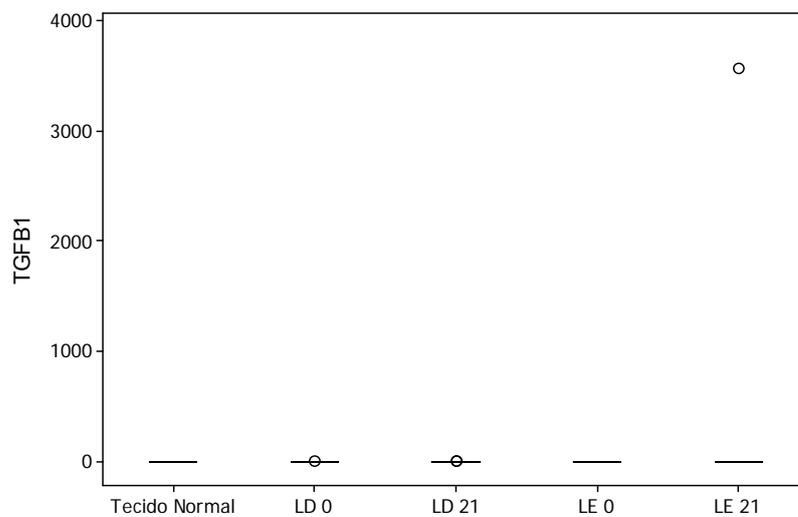
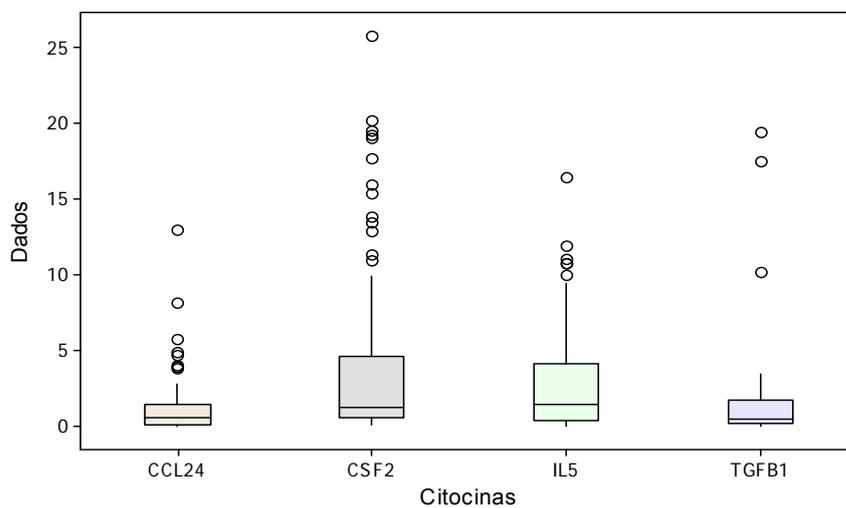


GRÁFICO 4 - *Box-plot* da TGF-β1 por grupo.

Observa-se no lado esquerdo, momento 21, o valor máximo de 3.580.

Apêndice F – Gráficos *box-plot* das citocinas dosadas a partir de RNA**GRÁFICO 5 - *Box-plot* das citocinas dosadas a partir de RNA.**

Apêndice G – Estatísticas descritivas das citocinas sem *outliers*

TABELA 1
Estatísticas descritivas sem *outliers*

Grupos	n	n*	Média	D.P.	Mínimo	1º Q	Mediana	3º Q	Máximo
CCL24									
Tecido normal	6	0	0,12	0,1	0,02	0,04	0,09	0,18	0,33
Lado direito momento	18	2	2,12	3,4	0,04	0,23	0,61	1,95	13,00
Lado direito momento	20	0	0,69	0,9	0,01	0,10	0,53	0,70	3,83
Lado esquerdo	19	1	1,35	1,8	0,01	0,04	0,49	1,83	5,78
Lado esquerdo	19	1	0,61	1,0	0,02	0,05	0,16	0,77	4,03
CSF2									
Tecido normal	6	0	1,04	1,3	0,07	0,16	0,39	2,16	3,48
Lado direito momento	20	0	1,44	1,1	0,25	0,60	1,18	2,29	4,38
Lado direito momento	20	0	5,41	6,7	0,11	0,78	1,94	10,83	19,57
Lado esquerdo	20	0	8,02	8,1	0,10	1,14	5,37	14,80	25,83
Lado esquerdo	18	2	1,85	3,2	0,09	0,18	0,70	2,20	13,46
IL5									
Tecido normal	6	0	0,92	0,8	0,03	0,12	0,82	1,64	2,27
Lado direito momento	20	0	2,79	3,8	0,15	0,60	1,33	2,86	16,46
Lado direito momento	20	0	2,23	2,9	0,00	0,26	0,78	3,35	9,42
Lado esquerdo	19	1	5,23	3,9	0,17	1,90	4,52	8,73	11,09
Lado esquerdo	20	0	2,01	3,1	0,05	0,36	0,83	1,93	11,92
TGFB1									
Tecido normal	6	0	1,99	1,0	0,06	1,47	2,38	2,58	2,60
Lado direito momento	20	0	1,99	4,2	0,06	0,25	0,67	1,99	19,44
Lado direito momento	20	0	2,30	4,2	0,02	0,21	0,78	2,53	17,52
Lado esquerdo	20	0	0,78	0,8	0,04	0,12	0,36	1,59	3,01
Lado esquerdo	19	1	0,71	0,6	0,01	0,22	0,47	1,19	2,24