

Flávio Barbosa Nunes

PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM POLIPOSE
NASOSSINUSAL, ASSOCIADA À FIBROSE CÍSTICA, ANALISADO
POR RT-PCR

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2008

Flávio Barbosa Nunes

PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM POLIPOSE
NASOSSINUSAL, ASSOCIADA À FIBROSE CÍSTICA,
ANALISADO POR RT-PCR

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto E. Santos
Guimarães

Co-orientador: Prof. Dr. Evaldo Nascimento

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Dr. Ronaldo Tadeu Pena

VICE-REITORA

Prof^a. Dr^a. Heloisa Maria Gurgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof.Dr.Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Carlos Faria Santos Amaral

SUB-COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. João Lúcio dos Santos Jr.

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Prof.Dr. Edson Samesima Tatsuo

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Walter Antônio Pereira

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo (Coordenador)

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Denny Fabrício Magalhães Veloso Figueiredo (Representante discente)

Nunes, Flávio Barbosa
N9221p Perfil de citocinas em pacientes com polipose nasossinusal associada à fibrose cística analisado por RT-PCR. [manuscrito] / Flávio Barbosa Nunes; orientador Roberto E. Santos Guimarães; co-orientador Evaldo Nascimento.
– Belo Horizonte, 2008.
102 f., enc.: il.

Orientador: Roberto E. Santos Guimarães.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina, 2008.
Bibliografia: f. 72-84

1. Fibrose cística – Teses. 2. Pólipos nasais - Teses 3. Citocinas – Teses. I. Guimarães, Roberto E. Santos. II. Nascimento, Evaldo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. IV. Título.
CDD: 612.2

Catálogo na fonte por: Letícia Alves Vieira – CRB6/2337

PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM POLIPOSE
NASOSSINUSAL, ASSOCIADA À FIBROSE CÍSTICA, ANALISADO
POR RT-PCR

Tese apresentada e defendida perante Comissão Examinadora para
obtenção de grau de Doutor em Medicina, constituída pelos Professores:

Prof. Rodrigo de Paula Santos

Profa. Eulália Sakano

Prof. Paulo Fernando Tormim Borges Crosara

Profa. Ivana Duval de Araújo

Belo Horizonte, 02 de Junho de 2008.

À minha esposa, Gizelle, que sempre dedicou tanto amor, carinho e afeto a mim e à nossa família.

Ao meu filho Olavo, que tornou a vida mais alegre e bela.

Ao meu pai, José Dutra, e à minha mãe, Julieta, por proporcionarem as melhores condições de vida e de estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Roberto Eustáquio Guimarães**, orientador sempre dedicado e preocupado em orientar, não só na profissão como também na vida.

Ao **Prof. Dr. Celso Becker** e toda equipe de otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pelo grande carinho e amizade durante todos estes anos.

À **Drª. Tarcimara Moreira**, à **Drª. Miriam Cabral** e à **Drª. Letícia Franco** pela preciosa ajuda na realização desta tese.

Ao **Dr. Ricardo Nascimento Araújo**, pela paciência e persistência na análise das citocinas.

À **Profª. Drª. Helena Gonçalves Becker**, pelo apoio irrestrito e sincero nas diversas situações do dia-a-dia e pela minuciosa revisão deste trabalho.

Ao **Dr. Marco Aurélio Rocha**, pela atenção com que leu este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Militão Abrantes**, pelo apoio na realização dos dados estatísticos.

Ao **Dr. Paulo Fernando Tormin Borges Crosara**, pelo apoio e amizade durante todos esses anos.

À **Maria Socorro Maravilha** e à **Mirian Curi**, pelas correções, observações e orientações feitas.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica da UFMG, pela disposição e presteza na realização dos exames.

Aos amigos que sempre ajudaram neste trabalho, em especial, **Fernando Fernandes, Cláudia Pena, Lucas Vasconcelos, Paulo Augusto, Mariana Castro e Alexandre Zoni.**

À família Barbosa Nunes, pelo apoio em todos os momentos difíceis da minha vida.

À família Santos Maravilha, pela amizade e carinho durante anos.

A todos os amigos e colegas que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

Aos pacientes deste estudo, pela cooperação nas atividades de pesquisa.

RESUMO

A polipose nasossinusal freqüentemente complica a evolução dos pacientes com Fibrose Cística. As citocinas nos pólipos destes indivíduos são pouco estudadas, assim como a importância destas citocinas no prognóstico e na resposta terapêutica. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de citocinas em pacientes com polipose nasossinusal, associada à Fibrose Cística. Foram analisados os seguintes aspectos: percentagem de eosinófilos e perfil das citocinas. Realizou-se um estudo transversal, selecionando-se 13 pacientes com Fibrose Cística e polipose nasossinusal (grupo Fibrose Cística). Seis pacientes (46,15%) eram do sexo masculino, sete (53,85%) do sexo feminino e a média das idades foi de 22,45 anos (6-57). O grupo controle foi constituído de 11 pacientes sem doença nasossinusal e teste alérgico negativo, submetidos a procedimentos cirúrgicos otorrinolaringológicos. Cinco pacientes (45,45%) eram do sexo feminino, seis (54,54%) masculinos e a média das idades foi de 17,7 anos (3-43). A percentagem de eosinófilos foi analisada no fragmento do pólipos nasal (grupo Fibrose Cística), através de estudo anatomopatológico, e o perfil das citocinas, pesquisado nos fragmentos de mucosa (grupo Controle) ou pólipos nasal (grupo Fibrose Cística), através da reação reversa da cadeia de polimerase (RT-PCR). Foram estudadas as transcrições para as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ e GM-CSF, ajustadas pelo valor da β -actina. No grupo Fibrose Cística, três (23%) pólipos eram eosinofílicos e 10 (77%) não eosinofílicos. Não houve diferença estatisticamente significativa nos dois grupos em relação à idade ($p=0,32$). As interleucinas 5, 6, 8 e GM-CSF foram semelhantes nos dois grupos, observando-se menores valores de IFN- γ ($p=0,03$) e forte tendência de aumento de IL-4 ($p=0,06$) no grupo Fibrose Cística. As células inflamatórias e estruturais, incluindo epitélio, fibroblastos e endotélio vascular, teriam a habilidade de produzir RNA mensageiro para IL-4, bloqueando a produção de outras citocinas como o INF- γ , o que pode sugerir uma participação especial deste mecanismo na formação dos pólipos nasais da Fibrose Cística.

Palavras-chave: citocinas, polipose nasossinusal, fibrose cística.

ABSTRACT

Nasal polyposis often complicates the progress of patients with cystic fibrosis. There has been little study into the cytokines in the polyps of such individuals and the importance of these cytokines in the prognosis and response to therapy. The aim of the present study was to analyze the profile of cytokines in patient with nasal polyposis associated to cystic fibrosis. The percentage of eosinophils and cytokine profile were analyzed. A cross-sectional study was carried out on 13 patients with cystic fibrosis and nasal polyposis (Cystic Fibrosis Group); six patients (46.15%) were male and seven (53.85%) were female; average age was 22.45 years (6-57). The control group was made up of 11 patients with no nasal condition and negative allergy test, submitted to ororhinolaryngological surgery procedures; five patients (45.45%) were female and six (54.54%) were male; average age was 17.7 years (3-43). The percentage of eosinophils was determined in fragments from nasal polyps (Cystic Fibrosis Group) through an anatomopathological analysis and the cytokine profile was researched in mucous fragments (Control Group) or polyps (Cystic Fibrosis Group) through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Transcriptions were studied for the cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ and GM-CSF, adjusted for the β -actin value. In the Cystic Fibrosis Group, three (23%) polyps were eosinophilic and 10 (77%) were non-eosinophilic. There was no statistically significant difference between groups with regard to age ($p=0.32$). Interleukins 5, 6, 8 and GM-CSF were similar in both groups, whereas there were lower IFN- γ values ($p=0.03$) and a strong tendency toward an increase in IL-4 ($p=0.06$) in the Cystic Fibrosis Group. Inflammatory and structural cells, including epithelium, fibroblasts and vascular endothelium, appear to have the ability to produce messenger RNA for IL-4, blocking the production of other cytokines such as INF- γ , which may suggest a special participation of this mechanism in the formation of nasal polyps in cystic fibrosis.

Key words: cytokines, nasal polyposis, cystic fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Pólipos de pacientes com polipose nasossinusal.....	19
FIGURA 2. Fluxograma do delineamento do estudo.....	42
FIGURA 3. Teste cutâneo.....	44
FIGURA 4. Produtos da PCR analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corada pela prata.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na RT-PCR para citocinas.....	47
TABELA 2. Distribuição das medidas de tendência central e medidas de dispersão das idades dos pacientes nos grupos estudados.....	53
TABELA 3. Comparação dos valores de IL-4 entre os grupos Fibrose Cística e Controle.....	55
TABELA 4. Comparação dos valores de INF- γ entre os grupos Fibrose Cística e Controle.....	57
TABELA 5. Comparação dos valores das citocinas IL-5, IL-6, IL-8 e GM-CSF, corrigidos pela β -actina, entre os grupos Fibrose Cística e Controle.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Distribuição dos grupos por sexo.....	52
GRÁFICO 2. Percentagem de eosinófilos no grupo Fibrose Cística.....	54
GRÁFICO 3. Distribuição dos valores de IL-4 nos grupos Fibrose Cística e Controle	56
GRÁFICO 4. Distribuição dos valores de IFN- γ nos grupos Fibrose Cística e Controle	57
GRÁFICO 5. Distribuição dos valores de IL-5 nos grupos Fibrose Cística e Controle.....	58
GRÁFICO 6. Distribuição dos valores de IL-6 nos grupos Fibrose Cística e Controle.....	59
GRÁFICO 7. Distribuição dos valores de IL-8 nos grupos Fibrose Cística e Controle.....	59
GRÁFICO 8. Distribuição dos valores de GM-CSF nos grupos Fibrose Cística e Controle.....	60

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
µl	Microlitro
µg	Micrograma
AINE	Antiinflamatório não esteróide
ANOVA	Análise de variância
β-actina	Beta actina
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilo
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EPOs	Peroxidase eosinofílica
FC	Fibrose cística
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HLA	Antígeno leucocitário humano
IgE	Imunoglobulina E
IFN-γ	interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
LPS	Lipopolisacarídeos bacterianos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular – 1
MPB	Proteína básica principal
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
PNS	Polipose nasossinusal
PNSE	Polipose nasossinusal eosinofílica
PNSNE	Polipose nasossinusal não eosinofílica
NARES	Rinite eosinofílica não alérgica
RANTES	<i>Regulated and normal t cell expressed and secreted</i>
RT-PCR	Reação reversa em cadeia de polimerase
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TGF- β	Fator transformador de crescimento β1
U	Unidade
VCAM-1	Molécula de adesão de células vasculares-1

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Polipose nasossinusal	18
2.1.1 Incidência	19
2.1.2 Etiologia	20
2.1.3 Histologia	21
2.1.3.1 Polipose nasossinusal eosinofílica	23
2.1.3.2 Polipose nasossinusal não eosinofílica (Neutrofílica)	23
2.1.4 Mecanismos moleculares da PNS	24
2.1.5 Citocinas e pólipos nasais	26
2.2 Fibrose Cística	30
2.2.1 Conceito e apresentação clínica	30
2.2.2 Fibrose Cística e PNS	31
2.2.3 Fibrose Cística e citocinas	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 PACIENTES E MÉTODOS	38
4.1 População estudada	39
4.1.1 Critérios de inclusão	39
4.1.2 Critérios de exclusão	40
4.2 Delineamento do estudo	41
4.3 Avaliação nasossinusal	42
4.4 Teste cutâneo	43
4.5 Biópsia nasal para anátomo-patológico	44
4.6 Biópsia nasal para RT-PCR	45
4.6.1 Extração de RNA total	45
4.6.2 Síntese de cDNA e PCR	46
4.7 Perfil das citocinas	47
4.8 Métodos estatísticos	48
4.8.1 Codificação das variáveis	48
4.8.2 Variáveis respostas e análise estatística dos dados	48
4.8.3 Cálculo do erro tipo I e tipo II da amostra	49
4.9 Aspectos éticos	49
4.9.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	49
4.9.2 Consentimento livre e informado de participação na pesquisa	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Estudo Clínico	52
5.2 Percentagem de eosinófilos	54
5.3 Perfil das citocinas	55
6 DISCUSSÃO	61
6.1 Percentagem de eosinófilos	62
6.2 Perfil de citocinas	63
7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	85
ANEXOS	92

1 INTRODUÇÃO

A polipose nasossinusal (PNS) é uma doença inflamatória crônica da mucosa nasal, caracterizada pela presença de pólipos nasais múltiplos, de coloração acinzentada, normalmente bilaterais e originada do meato médio^{1, 2}. Apresenta epitélio pseudoestratificado, com membrana basal espessa, poucas glândulas, ausência de terminações nervosas e infiltrado eosinofílico ou neutrofílico².

Os pólipos eosinofílicos são a maioria absoluta, correspondendo a 85% dos casos³. Quando em pacientes com Fibrose Cística (FC), rinite vasomotora, imunodeficiências e outras doenças muco-ciliares são classificadas como não eosinofílicas (neutrofílicas), representando os 15% restantes⁴. Este pólio é caracterizado pela baixa resposta terapêutica ao uso de corticóides⁵.

Dentre as PNS não eosinofílicas, associadas às patologias muco-ciliares, destaca-se a mucoviscidose ou FC, doença congênita, caracterizada por disfunção glandular exócrina, obstrução pulmonar crônica, insuficiência pancreática e rinosinusopatia crônica¹. É autossômica recessiva e apresenta incidência de 1 em 2000 a 1 em 2500 indivíduos⁶⁻⁹. Os pólipos são encontrados em até 20% dos pacientes com FC, devendo-se nestes casos confirmar o diagnóstico através da iontoforese do suor e do estudo genético¹⁰.

A PNS é uma manifestação clínica de doenças com diferentes etiologias e a análise distinta dessas entidades é fundamental. Vários mecanismos patogênicos têm sido propostos para explicar o seu desenvolvimento, destacando-se a teoria alérgica e a inflamatória¹¹.

Durante muitos anos, acreditou-se que a polipose apresentava uma etiologia alérgica, entretanto, essa evidência foi contestada por diversos autores^{12, 13}. O microambiente inflamatório, as citocinas, as moléculas de adesão e o transporte iônico são os estudos mais recentes para esclarecer a patogênese da polipose nasossinusal¹⁴⁻¹⁶.

Com os grandes avanços da imunologia, diversos autores tentam identificar os mediadores imunológicos envolvidos na gênese da PNS em pacientes com FC. A análise da PNS como uma doença única, descrita muitas vezes na literatura mundial, utilizando-se de diferentes métodos na análise, de diferentes mediadores moleculares e sem distinção da patologia associada, não permite conhecer a evolução clínica de cada uma dessas entidades.

Neste contexto, torna-se importante analisar localmente alguns mediadores expressos nos pólipos de pacientes com FC, não somente na tentativa de elucidar a evolução natural dessa patologia, mas, também, colaborar no avanço do conhecimento das citocinas envolvidas, contribuindo para o desenvolvimento de novas armas terapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polipose nasossinusal

A PNS (FIG.1) é manifestação de doença inflamatória crônica, proliferativa, na mucosa do nariz e seios paranasais, associada a doenças sistêmicas e caracterizada por degeneração polipóide benigna^{1, 2, 17}.

O primeiro relato ocorreu há quase 5.000 anos, e referia-se como “uvas descendo pelo nariz”. Hipócrates (460-370 AC) foi o primeiro a revolucionar o tratamento cirúrgico da PNS, introduzindo diversas técnicas para exérese dos pólipos, enquanto Cato (234-149 AC) foi o pioneiro no tratamento medicamentoso através da aplicação de ervas¹³.

As queixas mais comuns são: obstrução nasal, devido ao efeito de massa; aumento e retenção de secreção, em consequência da diminuição do *clearance* nasal por ausência dos cílios e lesão da camada epitelial^{18, 19}; hiposmia, secundária à inflamação e edema no neuroepitélio¹⁸; cefaléia; alteração na qualidade da voz; infecções respiratórias de repetição e agravamento da asma^{19, 20}. Dor facial e cefaléia são raras^{1, 21, 22}.

Os pólipos apresentam-se róseos acinzentados e translúcidos¹¹, de consistência mole e aspecto brilhante, geralmente bilaterais, indolores e não sangrantes à manipulação²³. Estão aderidos à mucosa por um pedículo, provenientes do complexo óstio-meatal, principalmente entre hiato semilunar, orifícios das células etmoidais anteriores (48% no recesso frontal) e da superfície da concha média. Os locais de menor incidência são a fenda olfatória e septo nasal^{16, 23, 24}.

Outras condições estão associadas com pólipos nasais, incluindo síndrome de Churg-Strauss, síndrome de Young, sinusite fúngica alérgica e discinesias ciliares^{4, 12, 13, 21}.

Na presença de acometimento unilateral, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com outras doenças localizadas, tais como: papiloma invertido, pólipo de Killian, sinusite fúngica, doenças granulomatosas, neoplasias e menigoencefalocelos com exteriorização nasal⁴.

Seu tratamento ainda é insatisfatório, permanecendo um alto índice de recorrência²².

FIGURA 1. Pólipos de paciente com polipose nasossinusal.



2.1.1 Incidência

Acomete indivíduos adultos com prevalência de 0,5 a 4,3% da população, e é uma das doenças crônicas mais freqüentes do trato respiratório superior^{1, 2, 22}.

Geralmente se manifesta após os 20 anos, com pico aos 50 anos, rara em crianças abaixo dos 10 anos (0,1%), exceto quando associada à FC^{1, 3, 12, 13}. Está aumentada nos pacientes com asma (7 a 15%), FC (7 a 56%) e intolerância à aspirina (36 a 96%)^{1, 2, 13, 25}.

Existe uma alta taxa de recorrência, aproximadamente 40%¹³, principalmente naqueles pacientes com intolerância aspirínica, sinusite crônica e asma, indicando um possível controle genético na formação dos pólipos¹⁴.

2.1.2 Etiologia

PNS geralmente está associada à rinosinusite crônica, mas o inverso nem sempre coexiste, pois apenas 20% dos pacientes com rinosinusite crônica desenvolvem PNS². Frequentemente, PNS e rinosinusite crônica são consideradas como doença única, porém, até o momento, não está estabelecido se a rinosinusite crônica é o resultado de sinusites recorrentes com desenvolvimento de pólipos, ou se são doenças distintas com seu próprio mecanismo fisiopatológico²¹.

A alergia foi, inicialmente, descrita em 1930 e o seu papel na patogênese da PNS é controverso²⁶. Embora a patogênese da rinite alérgica seja imunoglobulina E (IgE), sua frequência é de apenas 1,5% nos pacientes com pólipos e níveis similares de IgE foram observados em pólipos de pacientes alérgicos e não alérgicos^{12, 13, 27, 28}.

Caplin *et al.* (1971)²⁹, avaliaram 3.000 pacientes atópicos e encontraram somente 0,5% de portadores de PNS, assim como outros trabalhos mostraram que a incidência de eosinófilos em PNS de atópicos e não atópicos são similares^{3, 23, 30}. Comparando pacientes não alérgicos com asma e rinite alérgica, observou-se maior índice de pólipos naqueles não alérgicos¹⁶. A mesma tendência é observada na rinite crônica, onde os pólipos representam 5% de pacientes não alérgicos, contra 1,5% de alérgicos^{2, 16, 25}.

Segundo alguns autores, embora a alergia não seja o fator básico na etiologia, está estritamente associada aos estágios tardios da PNSE, à recorrência e ao desenvolvimento dos pólipos^{13, 31}.

Várias teorias como infecção crônica, intolerância à aspirina, alteração aerodinâmica de poluentes no meato médio^{14, 16, 24}, aumento de exsudado na mucosa nasal, infecções crônicas nasais, lesão epitelial³², distúrbio genético, alergia, disfunção do sistema nervoso autônomo nasal, distúrbios das células T e anormalidades do metabolismo dos carboidratos foram propostas para explicar a formação da PNS^{1, 2, 14, 16, 33, 34}.

Bernstein *et al.* (1995)¹⁶, propuseram a teoria multifatorial na patogênese da PNS: o fluxo aéreo na parede lateral do nariz ou infecções bacterianas e virais produzem alterações inflamatórias na mucosa com ulceração e prolapso da submucosa.

Conseqüente reepitelização e formação glandular formam os pólipos. As estruturas celulares produzem RNA mensageiro para o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e outras citocinas, que representam a maior via de amplificação da resposta inflamatória. Assim, essa cascata imunológica teria efeito na integração bioelétrica nos canais de sódio e cloro, com retenção de líquido no interior das células e da lâmina própria, promovendo o edema, que representa o principal achado na polipose nasossinusal eosinofílica (PNSE).

Parece existir um fator hereditário para o seu desenvolvimento, caracterizado por uma história familiar em 14% dos pacientes¹³ e pela presença de PNS em gêmeos idênticos^{35, 36}.

HLA são antígenos leucocitários humanos, codificados no braço direito do cromossomo 6, uma região altamente polimórfica onde existem mais de 1000 alelos diferentes. Pessoas com HLA-DR7-DQA1*0201 e HLA-DR7-DQB1*0202 têm duas a três vezes mais possibilidades de desenvolver PNS^{4, 36-38}.

Segundo achados recentes, os superantígenos do *Staphylococcus aureus* podem induzir a produção local de IgE, associando-se ou provocando as respostas inflamatórias^{39, 40}. A análise de IgE específica revelou uma resposta para enterotoxinas do *Staphylococcus aureus* em 30 a 50% daqueles com PNS, e em 60 a 80% dos portadores de pólipos e asma. A colonização do meato médio por *Staphylococcus aureus* foi maior na PNS (63,6%) quando comparada à rinosinusite crônica (27,3%) e estava relacionada com a prevalência de anticorpos para enterotoxina⁴⁰.

O microambiente inflamatório, as citocinas, as moléculas de adesão e o transporte iônico são os estudos recentes para esclarecer a sua patogênese¹⁴⁻¹⁶.

2.1.3 Histologia

Os pólipos caracterizam-se por tecido edematoso, conseqüente ao extravasamento de plasma da junção endotelial dos vasos sanguíneos^{1, 16, 26}. Apresenta epitélio colunar pseudoestratificado com células caliciformes, ciliares e, em determinadas áreas, epitélio de transição ou escamoso, não queratinizado, com erosão e redução da quantidade de células caliciformes^{1, 2, 41, 42}.

A membrana basal encontra-se espessada, às vezes erodida, indicando processo inflamatório crônico^{1, 42-44}. O estroma é edematoso, infiltrado por macrófagos, neutrófilos, linfócitos e basófilos^{1, 2, 16, 25, 43}. O alto nível de células plasmáticas indica a grande produção local de imunoglobulina, principalmente em nível das glândulas submucosas³¹. Segundo Park *et al.* (1997), este infiltrado celular estaria em uma proporção similar àquela observada na mucosa bronquial de asmáticos, sugerindo que os mecanismos inflamatórios seriam semelhantes nas duas doenças¹⁷.

Algumas vezes os pólipos apresentam estroma fibrótico com reduzido número de vasos, proliferação de tecido conjuntivo, depósito de fibronectina e albumina². Observam-se poucas glândulas e estrutura neural, principalmente em nível periférico, justificando a perda do tônus vasomotor^{1, 2, 16, 26, 39}.

A grande variação histopatológica, presente em um mesmo pólipo, reflete grande dinamismo causado pelo trauma do fluxo aéreo, alergia e infecções^{14, 16}.

Baseado nos achados histológicos, a PNS pode ser classificada em quatro tipos: eosinofílica (estroma edematoso com grande número de eosinófilos), não eosinofílico ou neutrofílico (grande número, neutrófilos, linfócitos e poucos eosinófilos), seromucinoso (predomínio de glândulas seromucinosas) e atípicos (estroma indiferenciado). Dentre os quatro tipos, o eosinofílico (85 a 90%) e o não eosinofílico ou neutrofílico (15 a 20%) são os mais observados^{1, 23}.

Ingels *et al.* (1997)⁴⁵, compararam a sensibilidade da pesquisa de eosinófilos por esfregaço e por biópsia, concluindo que os eosinófilos eram mais facilmente observados na biópsia da mucosa nasal. Consideraram eosinofílica quando observaram mais de quatro eosinófilos em quatro campos microscópicos de grande aumento (400 vezes), ou o percentual de eosinófilos era superior a 20% das células inflamatórias.

Pólipos eosinofílicos apresentam membrana basal espessa, hialinização irregular do estroma, grande número de eosinófilos e mucina neutra em suas glândulas. Em contrapartida, os não eosinofílicos apresentam membrana basal delicada sem hialinização submucosa, poucos eosinófilos e predomínio de mucina ácida nos ductos⁴⁶⁻⁴⁸.

2.1.3.1 Polipose nasossinusal eosinofílica

A PNSE associa-se com hiper-reatividade nasal e/ou brônquica e responde bem à corticoterapia⁴⁵. Engloba pacientes com diferentes fatores etiológicos e evoluções clínicas em relação às vias aéreas superiores e inferiores. Apresentam biópsia da mucosa ou do pólipos com eosinofilia superior a 20% das células inflamatórias^{4, 36, 45}.

A rinite eosinofílica não alérgica (NARES) é responsável pela maioria das PNSE, freqüentemente associada à hiper-reatividade brônquica, anosmia e testes cutâneos negativos^{13, 28, 36, 45}.

Tríade aspirínica, também conhecida como *Síndrome de Fernand – Vidal* é encontrada em 5 a 35% das PNS^{1, 45}. Caracteriza-se pela presença de intolerância aspirínica, e está associada à asma intrínseca, intolerância a antiinflamatório não esteróide (AINE)^{1, 4}. Os pacientes manifestam broncoespasmo agudo e rinorréia até três horas após ingestão de aspirina¹³.

A rinite alérgica se apresenta por hiper-reatividade nasal, os pacientes demonstram história familiar positiva, e a sintomatologia inicia-se na infância. A presença de pólipos não é mais freqüente que a população normal, entretanto pode estar relacionada à maior freqüência de recidivas^{13, 31}. O teste cutâneo é positivo para alérgenos respiratórios⁴.

Na sinusite fúngica eosinofílica, a PNS se manifesta em 85% dos casos, enquanto que na Síndrome de Churg - Straus observa-se inflamação granulomatosa necrosante, vasculite, intensa eosinofilia vascular e extravascular, asma de difícil controle e pólipos em 34 a 50% dos casos^{4, 13}.

2.1.3.2 Polipose nasossinusal não eosinofílica (Neutrofílica)

A polipose nasossinusal não eosinofílica (PNSNE) não demonstra boa resposta terapêutica ao uso de corticóides, e os pacientes apresentam biópsia da mucosa ou do pólipos com eosinofilia inferior a 20% das células inflamatórias^{4, 5}.

Na rinite vasomotora, observa-se uma predominância do sistema nervoso parassimpático, caracterizada por rinorréia, obstrução nasal, crises esternutatórias ou prurido. Não há exacerbação dos sintomas por exposição a alérgenos e os testes cutâneos são negativos⁴.

Imunodeficiências podem ser primárias ou adquiridas, manifestando por infecções nasossinusais crônicas e PNS⁵.

As discinesias muco-ciliares são doenças congênitas com alterações da mobilidade ciliar ou espessura do muco. Os achados principais são infecções nasossinusais, infertilidade, bronquiectasias, PNSNE, infecções otológicas e pulmonares. Estão representadas pela *Síndrome de Young*, *Síndrome de Kartagener* e *FC*^{4, 5, 13}.

2.1.4 Mecanismos moleculares da PNS

O tecido polipóide é infiltrado, predominantemente, por eosinófilos, linfócitos, neutrófilos, células T ativadas e mastócitos^{23, 43}.

Acredita-se que os eosinófilos são os agentes principais na patogênese da PNS, correspondendo a 60% da população celular^{1, 12, 49, 50}. Eosinofilia, no sistema respiratório, pode estar relacionada não somente ao estado alérgico como também à infecção por fungos, vírus, *Staphylococcus aureus* e NARES^{23, 45}.

Os eosinófilos produzem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, estendendo sua sobrevivência, infiltração tecidual, citotoxicidade, neurotoxicidade e inibição programada da morte celular (apoptose)^{1, 26, 33, 34}. Quando ativados, originam um grande número de proteínas, como proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPOs), proteína básica principal (MPB), neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) que possuem grande capacidade de lesão epitelial e destruição da membrana basal^{12, 26, 34, 45, 51}. São fontes de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator transformador de crescimento beta (TGF- β), interleucina três (IL-3), interleucina quatro (IL-4), interleucina cinco (IL-5), interleucina seis (IL-6), interleucina oito (IL-8), *regulated and normal T cell expressed and secreted* (RANTES) e *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), as quais apresentam importantes efeitos autócrinos e moduladores de outras células

inflamatórias^{17, 28, 52}. A IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF são as principais citocinas relacionadas à eosinofilia tecidual⁵³.

Os neutrófilos são agentes importantes na primeira linha de defesa do sistema imune contra microorganismos invasores⁵⁴. Em nível celular, eles liberam elastase, responsável por lesões importantes na mucosa e prolongamento dos processos inflamatórios na PNS⁵. Sua mobilidade e fagocitose respondem a uma variedade de estímulos, dentre os quais se destacam os lipopolisacarídeos bacterianos (LPS) e GM-CSF⁵⁴. Aumento de GM-CSF, por sua vez, acarreta maior produção de IL-8, estimulando os neutrófilos e inibindo sua apoptose⁵⁴. Na PNSNE, os níveis de interleucina 1 β (IL-1 β), IL-8 e interleucina 13 (IL-13) estariam aumentados¹².

As células mais importantes na resposta imune são os linfócitos, principalmente CD8 (*supressor*). Estes são encontrados em maior quantidade do que os CD4 (*helper*)^{27, 55}, embora estes dados sejam questionados por outros autores⁵⁶. Os linfócitos T e B são células reguladoras e efetoras na resposta inflamatória, e mudanças locais no número de células T, possivelmente, resultam em uma alteração na defesa imunomediada celular⁵⁷. As células CD4⁺ apresentam dois subgrupos de células T *helper*, designados de “Th1” e “Th2”, distintos pelo perfil das citocinas, produzidas após ativação por antígenos^{58, 59}. As células “Th1” secretam principalmente o interferon gama (*IFN- γ*), IL-2 e interleucina 12 (IL-12), enquanto as citocinas IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 são as principais “Th2”^{36, 52, 59}. O padrão de resposta inflamatória nos pólipos alérgicos envolve a produção de IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF, enquanto nos eosinofílicos não alérgicos as citocinas IL-3, GM-CSF e *INF- γ* são as mais observadas^{21, 36, 60, 61}. Entretanto, quando comparados estes dois grupos, outros autores não evidenciaram diferenças de IL-4, IL-5 e *INF- γ* ^{34, 62, 63}.

Análises imunohistoquímicas mostram que os linfócitos T estão aumentados em todos os pacientes com PNS⁶⁴. Estes linfócitos são responsáveis pela liberação de IL-2, IL-3, IL4, IL-5, GM-CSF e *IFN- γ* ^{17, 57}.

Os mastócitos são importantes nas doenças mediadas por IgE com liberação significativa de histamina e leucotrienos, tanto em estimulações imunológicas, quanto não imunológicas¹⁷. Suas degranulações parecem não serem IgE dependentes e, sim, devido a citocinas liberadas por células CD4⁺T ativadas²⁶. Seus valores não estão aumentados na PNSNE, expressando uma variedade de

citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, TNF- α e IL-8^{7, 53}. Através de IL-4 e IL-13 são capazes de regular a liberação de GM-CSF e RANTES pelas células epiteliais e fibroblastos, indicando um ciclo vicioso que mantém o processo inflamatório pelos eosinófilos^{1, 23, 43, 65}.

Células não linfóides HLA-DR++, como os macrófagos, possivelmente participam do controle imune e na apresentação de antígenos^{27, 37}, e são abundantes no estroma dos pólipos e regiões epiteliais da concha média. Sua presença significa uma reação inflamatória ativa, incluindo supressão das respostas inflamatórias através da diminuição dos linfócitos CD8+^{27, 56}.

Células estruturais como epitélio, fibroblastos e células endoteliais são fundamentais para a resposta inflamatória nos pólipos^{44, 57}, sendo fontes de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF- β , GM-CSF, RANTES e eotaxinas^{1, 17, 57, 66}. Nos meios de cultura de epitélio polipóide, detectaram-se aumentos na concentração de GM-CSF e IL-6, mas somente GM-CSF foi produzido em valores significativos, contribuindo para o acúmulo de eosinófilos (teoria micro-ambiental)²⁸.

2.1.5 Citocinas e pólipos nasais

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular com funções reguladoras, essenciais para o crescimento, diferenciação, reparo tecidual, fibrogênese e ativação de células imunológicas^{36, 53}. Atuam em processos inflamatórios e as principais fontes são as células epiteliais, fibroblastos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, células T e células endoteliais^{15, 17}.

Várias citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β , GM-CSF, quimiocinas (eotaxinas, RANTES, IL-8), moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1) estão envolvidas na formação da PNS^{39, 67}. Elas influenciam a formação dos pólipos por dois mecanismos: estimulação do crescimento do tecido local (TGF- α e TGF- β) e manutenção permanente do estado inflamatório (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , dentre outras)¹⁵.

Hamilos *et al.* (1995)⁴³ mostraram que as principais citocinas nos pacientes com PNSE e teste alérgico positivo são GM-CS, IL-3, IL-4 e IL-5, enquanto naqueles

com PNSE e teste alérgico negativo as de maior prevalência são GM-CSF, IL-3 e IFN- γ ⁵³.

Várias citocinas atuam como proteínas antiinflamatórias, destacando IL-6, IL-10, IFN- γ e TGF- β ⁶⁸.

Previamente conhecida como hemopoetina multiespecífica, IL-3 estimula a proliferação e diferenciação de células hematopoéticas pluripotentes, produzida principalmente pelos linfócitos T^{3, 4}. É responsável pela sobrevivência, diferenciação e ativação dos eosinófilos, junto com IL-5 e GM-CSF, estando elevada na PNSE^{1, 3, 51, 52, 69}.

IL-4 é produzida principalmente por linfócitos T, macrófagos, mastócitos e estruturas tissulares dos pólipos^{3, 70}. Transforma o linfócito T *helper* 1 (Th1) em T *helper* 2 (Th2), processo essencial na produção de IgE nos casos atópicos e de regulação de moléculas de adesão de células vasculares 1 (VCAM – 1) nas células endoteliais⁵². Conseqüentemente, observa-se aumento de linfócitos, monócitos e principalmente eosinófilos^{7, 43, 62, 69}. É a principal responsável pela maturação, enquanto IL3, IL-5 e GM-CSF respondem pela sobrevivência dos eosinófilos¹⁷. Embora IL-4 esteja relacionada à alergia, o seu nível é similar quando comparado os pólipos alérgicos e os não alérgicos^{34, 70}.

IL-5 é uma citocina inflamatória com padrão “Th2”, produzida principalmente pelos eosinófilos, células T (CD3⁺) e mastócitos^{52, 58}. É a mais específica para o crescimento, diferenciação, proliferação e aumento da sobrevivência dos eosinófilos^{36, 51, 62, 69}, inibindo sua morte programada – apoptose^{12, 15}. Aumenta a liberação de ECP (principal marcador da eosinofilia tecidual), induzindo a exudação e o aumento dos pólipos^{7, 12, 43}. Grande aumento de RNA para IL-5 pode ser detectado nos pólipos e tem expressão semelhante em alérgicos e não alérgicos^{2, 42, 43, 49, 62}.

IL- 6 é secretada por células T, macrófagos, eosinófilos e células epiteliais, apresentando capacidade de potencializar a produção de IgE por IL-4 através das células B^{53, 62, 67}. É de grande importância na fase inflamatória aguda e na hematopoese¹⁵, e vários estudos sugerem que ela apresenta uma série de efeitos antiinflamatórios, preenchendo os sítios inflamatórios e limitando a ação dos neutrófilos⁹.

IL-8 é responsável pela indução e degranulação de neutrófilos, podendo estar relacionada à atração de eosinófilos em pacientes alérgicos^{1, 42, 62}. Suas principais

fontes são as células T, células endoteliais, fagócitos mononucleares e outras células inflamatórias^{1, 68}. Nos casos de processos inflamatórios crônicos, um ciclo vicioso de exudato neutrofílico e de geração de IL-8 pode ocorrer pelo epitélio, assim como indução de quimiotaxia eosinofílica, intermediado por IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF⁶⁸.

IL-10 tem um papel importante na regulação das respostas imunes através da inibição de macrófagos, células T e células *natural killer* (NK), bloqueando a ativação das citocinas, principalmente IL-8⁷¹. Concomitante com IL-4 estimula o aumento de células B¹⁵.

GM-CSF apresenta efeitos biológicos, regulando a sobrevivência, proliferação, ativação de granulócitos e a diferenciação de células hematopoéticas. Os macrófagos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, as células epiteliais e endoteliais são as fontes primárias^{4, 44, 53, 72, 73}. Pode ser produzida tanto por células “Th1” quanto “Th2”, e é responsável pela sobrevivência, diferenciação e ativação dos eosinófilos junto com IL-5^{44, 51, 52, 69}. Naqueles pólipos com teste alérgico positivo, apresenta uma relação estreita com IL-3 e IL-8^{2, 42, 49, 68}. Aumenta a habilidade dos neutrófilos na eliminação de microorganismos patógenos^{28, 54} e, quando da presença de VCAM – 1 e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM – 1), ativa e degranula os eosinófilos, embora não possa afetar diretamente a sua adesão^{68, 69}. Estas ações são intermediadas por IL-4 e IL-13⁶⁹.

Ohno *et al.* (1991)⁵⁰, mostraram que aproximadamente 30% dos eosinófilos apresentam expressão genética para GM-CSF. Existem evidências de seu efeito autócrino no aumento da sobrevivência dessas células, migração e viabilização de suas funções com liberação de MBP, ECP, EDN e mediadores lipídicos^{28, 50}.

O mecanismo de produção do INF- γ pelas células T é desconhecido, sabendo-se que é um produto das células *T helper*, NK e células CD8⁺ nos pólipos nasais⁵⁸. Recentemente, constatou-se que origina de uma subpopulação específica de linfócitos T designados CD4Th1 e está associada com a imunidade mediada por células induzida por patógenos intracelulares^{58, 74}.

Eosinófilos, macrófagos e células NK são ativados pelo IFN- γ , participando da retenção de eosinófilos e macrófagos nos locais de inflamação^{4, 15}. A produção pelas células NK é intensa em resposta aos polissacarídeos bacterianos⁷⁵, e possivelmente, está relacionado à má resposta à corticoterapia, podendo servir como marcador clínico de cronicidade da PNS⁷⁶.

Estudos de Miller *et al.* (1994)⁷⁷, sugeriram que o INF- γ tem importante papel no recrutamento de eosinófilos na PNS de indivíduos alérgicos, encontrando células “Th1”, com acúmulo de INF- γ e IL2. Estes autores estudaram o produto dos linfócitos e concluíram que a reação inflamatória do pólipos nasal é diferente da encontrada na resposta hipersensitiva tipo I.

TNF- α e IL-1 β são proteínas multifuncionais com grande espectro de efeitos inflamatórios. Elas estimulam as células do estroma para liberar várias citocinas, aumentando a adesão de granulócitos aos vasos sanguíneos, ampliando a migração transendotelial, piorando a citotoxicidade dos eosinófilos e acrescentando maior lesão epitelial^{15, 34, 78}.

RANTES é uma quimiocina liberada dos pólipos nasais em resposta à fitohemaglutinina de pacientes atópicos e não atópicos¹⁷. É produzida por macrófagos, plaquetas, fibroblastos, linfócitos e células epiteliais após ativação por INF- γ e TNF- α , apresentando um forte efeito na ativação dos eosinófilos^{68, 69, 72}. É, junto com IL-8, a maior responsável pelo aumento de neutrófilos e linfócitos na PNSNE¹.

TGF- β é importante para indução e proliferação de fibroblastos. Ela não é observada na mucosa normal, e se encontra inativa nos pólipos. Seu aumento está relacionado à maior fibrose do estroma^{1, 50}, à inibição da síntese de IL-5 e sua ausência indica diminuição dos mecanismos inflamatórios^{21, 39, 40, 44, 50}. Outra característica importante é o controle da função dos fibroblastos através do aumento de IL-4. Sabendo-se que os eosinófilos são fontes importantes de TGF- β , estes controlam a sua própria migração para os pólipos, controlando a função dos fibroblastos^{1, 67, 70}.

2.2 Fibrose Cística

2.2.1 Conceito e apresentação clínica

Fibrose Cística ou mucoviscidose foi descrita, primeiramente, por Anderson (1938)⁷⁹ apud Cimino (2003)¹⁰. É a doença autossômica recessiva mais comum e letal que afeta a população Caucasiana com incidência de um para cada 2000 a 2.500 nascimentos⁶⁻⁹.

A doença é devida às mutações no gen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), localizado na região q31 do cromossomo 7, na posição 508 ($\Delta F508$), responsável pela deficiência do transporte transmembrana para o cloro e sódio^{6, 8, 10, 46, 78, 80}. O genótipo mais freqüente é homozigoto para esta mutação ($\Delta F508/\Delta F508$)⁸¹, e aqueles que apresentam o genótipo heterozigoto são clinicamente mais estáveis^{10, 82, 83}.

Os canais de cloro estão localizados na região apical das células epiteliais respiratórias, biliares, intestinais, vias deferentes, glândulas sudoríparas e ductos pancreáticos^{5, 8}. A falha na sua regulação proporciona uma falência da secreção de cloro com uma excessiva absorção de sódio^{5, 10, 84}, levando ao acúmulo de líquido no interior das células, à desidratação extracelular e à precipitação protéica^{9, 46}. O mecanismo patogênico é controverso e pode envolver absorção excessiva de fluidos ou aumento na concentração de sal na superfície respiratória⁸⁴. A composição do muco se apresenta mais espessa, acarretando obstrução dos ductos das glândulas exócrinas e bloqueio do *clearance* ciliar^{6, 10, 85} com instalação de uma infecção crônica, hiperplasia das células caliciformes, metaplasia escamosa e perda do componente ciliar^{84, 86}.

Alterações crônicas na mucosa epitelial como a hiperplasia e metaplasia escamosa podem alterar a localização intracelular de CFTR, com perda da sua localização apical e, conseqüente, piora da função dos canais de cloro, já debilitada pelo fator genético⁸⁷.

Obstrução pulmonar crônica, insuficiência pancreática, rinosinusite crônica e infertilidade, apesar de uma estrutura ciliar normal, são achados importantes nesses pacientes devido à grande disfunção glandular estabelecida^{4, 6, 86}.

O diagnóstico é baseado em achados clínicos e história familiar, confirmado através do teste do suor e genético. Íleo meconial, peritonite meconial, icterícia prolongada e atraso no desenvolvimento devem levantar suspeita de FC na infância⁶.

Pâncreas e sistema respiratório são os mais afetados, e as manifestações pulmonares as mais comuns^{9, 46, 88}. Insuficiência respiratória e *cor pulmonare* são as principais causas de morte nesta doença, entretanto, a média de sobrevida tem aumentado de 14 anos em 1969 para 32 anos em 2000^{10, 82, 90}.

2.2.2 Fibrose Cística e PNS

As manifestações otorrinolaringológicas incluem a sinusite crônica e PNS^{71, 82}. A grande maioria desenvolve sinusite crônica, e 90 a 100% dos pacientes acima dos 08 meses de idade demonstram alterações radiológicas^{8, 10}.

A prevalência da PNS na FC, no nosso meio, tem sido estimada entre 7 a 56%^{5, 8, 10, 13, 82}. A incidência da PNS é muito maior nestes do que na população geral, e representa a maior manifestação otorrinolaringológica^{5, 7, 13, 91}. É estimado que 14% dos pacientes com FC são encaminhados para realização de procedimentos cirúrgicos endonasais, assim como podem constituir um distinto subgrupo com menor acometimento pulmonar, diagnóstico mais tardio e maior sobrevida⁸³.

Raramente os pólipos se apresentam antes dos cinco e após os 20 anos de idade. A PNS se manifesta entre os cinco e 14 anos^{10, 46, 82, 86}, e se uma criança apresenta PNS bilateral antes dos 10 anos de idade, o diagnóstico de FC deve ser aventado⁴⁶.

Alguns autores argumentam que a PNS pode ser uma forma monossintomática da FC, o que poderia explicar a freqüente associação com esta doença⁶. Estudos recentes mostraram a associação da extensão da PNS com 02 genótipos específicos ($\Delta F508/\Delta F508$ e $\Delta F508/G551D$)⁸, embora a base genética seja claramente estabelecida, nenhuma mutação particular do CFTR foi encontrada^{7, 10}.

Tos, Mogensen e Thomsen (1977)³² mostraram que os pólipos apresentam a mesma arquitetura naqueles com e sem FC. Apresentam predominância de epitélio colunar pseudoestratificado com pequenas áreas de metaplasia em epitélio escamoso estratificado e transicional. Não foram observadas dilatações das glândulas submucosas, as quais deveriam ser as grandes características destes pólipos.

Algumas diferenças histológicas são notadas nesses pólipos: membrana basal delicada sem hialinização submucosa, poucos eosinófilos e predomínio de mucina ácida nos ductos^{7, 86}. Quando comparado à PNSE, o estroma é edematoso, com maior acúmulo de mastócitos e neutrófilos^{6, 13, 21, 88}, e, desta forma, classificados como neutrofílicos⁸⁸.

Oppenheimer e Rosenstein (1979)⁹², observaram diferenças importantes na comparação com pólipos de pacientes com FC e eosinofílicos. No primeiro grupo, observaram uma membrana basal delicada sem hialinização submucosa, ausência de infiltração eosinofílica, preponderância de mucina ácida nas glândulas e dilatação cística nos pólipos. No segundo grupo, observaram uma membrana basal espessa, hialinização irregular, grande quantidade de eosinófilos e mucina neutra nas glândulas mucosas. Hiperplasia das glândulas mucosas, cistos mucosos de vários tamanhos, metaplasia focal do epitélio e mucina ácida nas células caliciformes foram considerados achados não específicos⁹².

Alterações importantes são encontradas na integridade epitelial e nos componentes da lâmina própria^{6, 82}. Transformações locais da organização epitelial como hiperplasia, atrofia, edema intercelular, metaplasia escamosa e anormalidades dos cílios contribuem para o espessamento da camada de muco^{6, 46}.

Apesar de caracterizado como neutrofílico, 40% dos indivíduos apresentam pólipos eosinofílicos, sugerindo que a ativação celular é mais relevante do que o número de células, e o aumento dos neutrófilos é em decorrência de infecções bacterianas associadas^{17, 93}. Pacientes portadores de PNSNE apresentaram altos índices de ECP, indicando uma contribuição importante dos eosinófilos na formação destes pólipos^{5, 93}.

As infecções são os maiores fatores de exacerbação e progressão das doenças crônicas pulmonares, mas não está estabelecida a relação entre esses agentes e a PNS, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenza*^{7, 8, 78, 82, 86}.

A colonização bacteriana, no trato respiratório inferior, pode ser explicada por aspiração sinusal ou por mecanismos inflamatórios semelhantes no trato respiratório superior e inferior^{8, 64}. Os mediadores inflamatórios nos seios paranasais poderiam desencadear broncoconstrição, através da estimulação de receptores neuronais no nariz, seios paranasais ou faringe^{8, 10, 78, 94}.

2.2.3 Fibrose Cística e citocinas

Estudos recentes mostraram que o processo inflamatório ocorre independente do processo infeccioso na FC, pelo menos no estágio inicial da doença⁹.

Pólipos de pacientes portadores de FC apresentam grande número de neutrófilos, porém, os eosinófilos estão presentes em vários graus, o que torna difícil a classificação exclusiva em neutrofílicos^{5, 21, 95}. A resposta inflamatória é o resultado do complexo balanço entre mediadores pró - inflamatórios e antiinflamatórios⁹.

TNF- α , IL-6 e IL-8 são as citocinas mais importantes nas lesões epiteliais do pulmão, e seus níveis estão aumentados nas infecções por *Pseudomonas aeruginosa*^{9, 79, 88}.

IL-6 apresenta uma série de efeitos antiinflamatórios, principalmente, limitando a ação dos neutrófilos e sua diminuição leva a uma excessiva resposta neutrofílica⁹. Alguns trabalhos mostraram baixos níveis de IL-6 em pulmões de pacientes portadores de FC, quando comparados com pacientes normais e portadores de outras pneumopatias⁹.

Grandes divergências são observadas na literatura em relação à concentração de IL-8 naqueles com FC e PNS. Aumento de IL-8, baixos valores de INF- γ e IL-5 foram observados quando comparados com PNSE^{7, 21}. As principais fontes de IL-8 são o tecido epitelial e os macrófagos e sua produção está defeituosa, permitindo a colonização bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa*^{81, 96}.

Sobol *et al.* (2002)⁷¹, entretanto, compararam pacientes com FC e sinusite crônica com grupo controle (pacientes sem alergia e sem infecções de vias aéreas superiores). Observaram aumento de INF- γ e IL-8, assim como níveis normais de IL-4, IL-5 e IL-10.

Henriksson *et al.* (2002)⁸ mostraram que IL-8 está aumentada em todos os pacientes portadores de FC quando comparados com grupo controle (pacientes sem alergia e sem rinosinusite), porém não existindo diferença em relação à presença da PNS, assim como Bergoin *et al.*(2002)⁹¹ que observaram aumento de IL-8, IL-5 e ECP ao comparar estes mesmos grupos.

No pulmão, os níveis de IL-8 aumentam progressivamente com a idade, estando relacionada à gravidade da doença, altos índices de neutrófilos e maior colonização bacteriana^{88, 90, 96, 97}. Alguns estudos mostraram crianças com intensa reação inflamatória pulmonar, grandes níveis de IL-8 e neutrófilos, porém, ausência de processo infeccioso^{88, 98}.

Recentemente, foi observado que os estímulos pró-inflamatórios podem modificar o transporte de íons e as propriedades do muco do sistema respiratório. Fatores exógenos, como as citocinas, podem afetar a função de CFTR e estas incluiriam a IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- α e INF- γ ^{84, 99}.

INF- γ é importante na regulação de CFTR, principalmente na região intestinal e pulmonar⁸⁷. Atua nos canais de cloro e sódio na árvore respiratória, através do bloqueio do gene que expressa CFTR^{84, 100}, principalmente na vigência de processos infecciosos, quando os seus valores se encontram aumentados¹⁰⁰.

IL-4 apresenta um importante papel na fluidificação do muco em toda árvore respiratória, principalmente nos processos inflamatórios⁸⁴. É responsável pela metaplasia das células caliciformes, aumento do muco e da secreção do cloro, assim como maior absorção de sódio. O excesso de concentração do sal no epitélio acarretaria diminuição do seu poder bactericida⁸⁴. Desta forma, na dependência do microambiente inflamatório, esta citocina pode contribuir para a hidratação do meio, espessamento das secreções ou diminuição das propriedades bactericidas⁸⁴.

Nos pacientes com FC, os fibroblastos nasais, após estimulação por IL-4 e lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), produzem grande quantidade de eotaxinas. Estes valores são maiores do que aqueles produzidos pelos estímulos alérgicos⁷⁰.

TNF- α tem o poder de aumentar a expressão de CFTR nas células epiteliais do nariz e dos brônquios, assim como IL-13 apresenta várias atividades similares à IL-4 nos pacientes portadores de FC, principalmente, relacionadas ao transporte de íons na árvore brônquica⁸⁴.

Após colonização por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* no pulmão, as secreções se apresentam rica em polimorfonucleares e com deficiência em IL-10. Esta citocina é responsável pela redução da produção de TNF- α e IL-1 pelos macrófagos. Assim, com níveis menores de IL-10, valores crescentes de TNF- α e IL-1 pelos macrófagos colaboram com o aumento da inflamação na árvore respiratória⁸¹.

Staphylococcus aureus, através de seus superantígenos, é capaz de ativar as células T que, uma vez ativadas, aumentam a produção de IL-4 e IL-5, promovendo uma inflamação eosinofílica⁶⁴. Sua enterotoxina, por meio da ligação ao receptor das células T, estimula a produção de IL4 e IL5 com conseqüente ativação dos eosinófilos. O resultado é uma inflamação intensa que reflete um aumento de IL5, ECP e IgE total. Portanto, o *Staphylococcus aureus* é capaz de induzir uma inflamação eosinofílica e, também, a síntese de IgE multiclonal com aumento de IgE total. A enterotoxina age, pelo menos, modificando a PNS na FC⁴⁰.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de citocinas em pacientes com polipose nasossinusal associada à Fibrose Cística.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar a percentagem de eosinófilos nos pacientes com polipose nasossinusal associada à Fibrose Cística.

- ✓ Analisar a expressão de RNAm para as interleucinas 4, 5, 6, 8, GM-CSF e INF- γ , nos pólipos de pacientes com polipose nasossinusal associada à Fibrose Cística e grupo Controle, através da RT-PCR.

4 PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal de pacientes com PNS, associada à Fibrose Cística.

As variáveis de interesse constituíram-se do perfil das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ e percentual de eosinófilos, nos pólipos de pacientes com PNS e FC.

4.1 População estudada

Treze pacientes com PNS, associada à Fibrose Cística, foram selecionados a partir da avaliação de 124 indivíduos, encaminhados do ambulatório de pneumologia do Hospital das Clínicas da UFMG, cujo diagnóstico foi estabelecido em bases clínicas e em teste do suor positivo. O grupo Controle foi constituído por 11 indivíduos que procuraram o Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UFMG para serem submetidos a procedimentos cirúrgicos otorrinolaringológicos e não apresentavam processos infecciosos de vias aéreas superiores. O período de estudo foi de dezembro de 2003 a dezembro de 2004 (APÊNDICE A).

Foram analisados 24 pacientes, divididos nos 02 grupos descritos a seguir: Grupo 1, composto por 13 pacientes com PNS, associada à Fibrose Cística; Grupo 2, composto por 11 pacientes sem PNS e teste alérgico negativo.

4.1.1 Critérios de inclusão

Grupo 1. FIBROSE CÍSTICA

Presença de PNS e Fibrose Cística.

Grupo 2 . CONTROLE

Ausência de PNS e alergia com comprovação pelo teste cutâneo por punctura negativo.

Indivíduos que procuraram o Serviço de Otorrinolaringologia para serem submetidos a procedimentos cirúrgicos e que apresentavam mucosa nasal normal ao exame rinológico.

4.1.2 Critérios de exclusão

Grupo 1. FIBROSE CÍSTICA

Presença de processo infeccioso nasossinusal agudizado.

Presença de processo infeccioso agudizado em trato respiratório inferior.

Uso de medicações à base de glicocorticóide tópico, sistêmico ou anti-histamínico no período de 30 dias.

Aqueles que não concordaram em participar do estudo.

Grupo 2. CONTROLE

Presença de sintomatologia infecciosa.

Presença de sintomatologia alérgica, caracterizada por exacerbação de sintomas de hiper-reatividade nasal.

Presença de teste cutâneo por punctura positivo.

Uso de medicação à base de glicocorticóide tópico, sistêmico ou anti-histamínico no período de 30 dias.

Aqueles que não concordaram em participar do estudo.

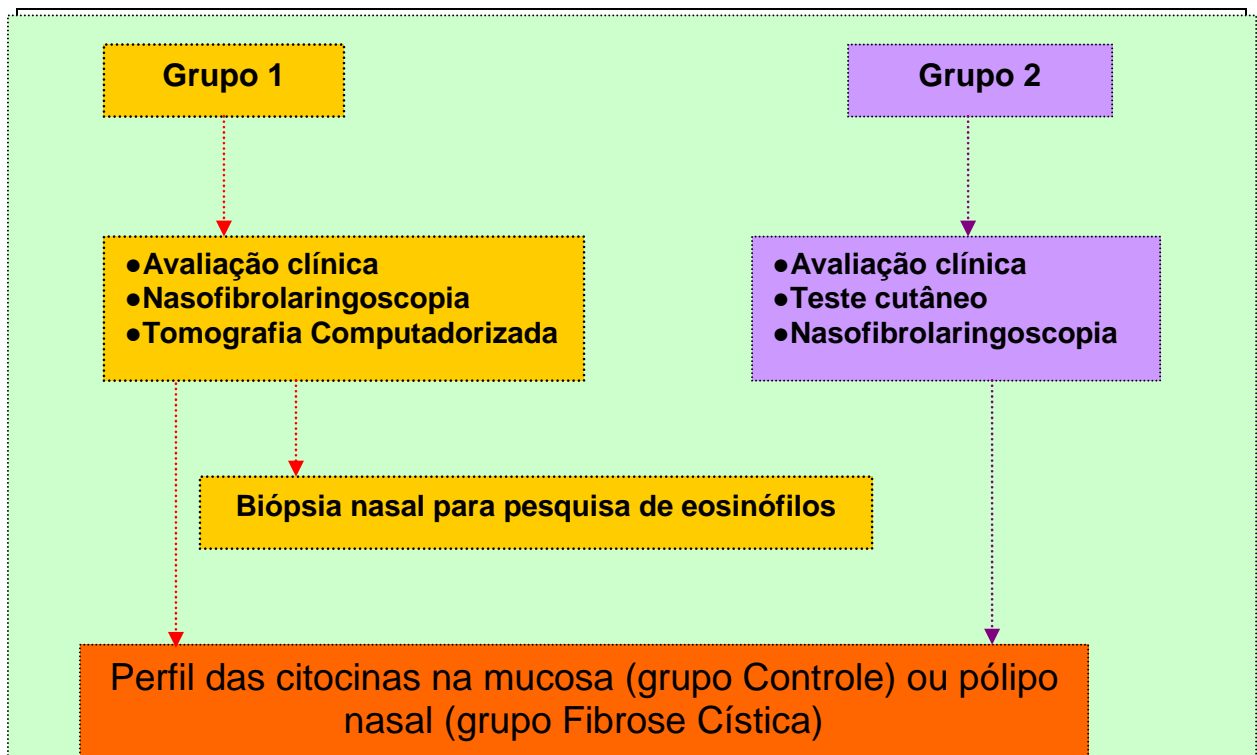
4.2 Delineamento do estudo

Foram estudados os pacientes com PNS e FC, assim como aqueles que procuraram o Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UFMG para serem submetidos a procedimentos cirúrgicos e apresentavam exame rinológico sem alterações da mucosa nasal (APÊNDICE A). Esses participantes foram avaliados por um mesmo especialista e submetidos à entrevista clínica, rinoscopia anterior, exame nasofibrolaringoscópico e, nos pacientes do grupo Controle, teste cutâneo por punctura (ANEXO A e B).

A seguir, os 13 primeiros pacientes que preencheram os critérios de inclusão para o grupo 1 foram submetidos à coleta de material para análise do perfil de citocinas e percentagem de eosinófilos nos pólipos , e os 11 primeiros que preencheram os critérios de inclusão para o grupo 2 foram submetidos à coleta de material para análise do perfil de citocinas. Nos pacientes do grupo Controle, a biópsia foi realizada no bloco cirúrgico, durante o procedimento cirúrgico, sob anestesia geral, removendo um pequeno fragmento de mucosa da concha média que foi encaminhada para realização da reação reversa em cadeia de polimerase (RT-PCR). Naqueles do grupo FC, a biópsia foi realizada em ambiente ambulatorial, com remoção de dois fragmentos dos pólipos: o primeiro enviado para estudo anátomo-patológico e o outro para RT-PCR (FIG.2).

Antes de submeter os pacientes às biopsias nasais para a histopatologia e perfil das citocinas, observou-se a não utilização de corticóides tópicos ou sistêmicos e anti-histamínicos por, pelo menos, 30 dias.

FIGURA 2. Fluxograma do delineamento do estudo.



4.3 Avaliação nasossinusal

A avaliação das fossas nasais foi realizada através de nasofibroscópio flexível Pentax® (Montvale, New Jersey, U.S.A) e fonte de luz Ferrari®. Assim, confirmou-se a presença de PNS no grupo Fibrose Cística, excluindo no grupo Controle e afastando a presença de sinais de infecção nasossinusal. Todos os pacientes do grupo Fibrose Cística foram submetidos à tomografia computadorizada de seios paranasais em cortes axiais e coronais, sem utilização de contraste, avaliando-se o grau de comprometimento sinusal.

4.4 Teste cutâneo

Todos os pacientes do grupo controle, após confirmação de não estarem em uso de anti-histamínicos ou corticóides por, pelo menos, trinta dias, fizeram teste cutâneo para alergia por punctura no antebraço (FIG.3). Utilizaram-se os antígenos *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum*, *Alternaria alternata*, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, *Canis familiaris*, *Felis domesticus*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Ermatothogoides pteronyssinus*, de bateria de antígenos do laboratório farmacêutico MERCK do Brasil (Merck, SP, Brasil).

Por convenção, o teste positivo é aquele que apresenta diâmetro maior que 03 mm comparado ao controle negativo, constituído por solução salina. O controle positivo foi representado pela histamina^{101, 102}.

Os exames ocorreram segundo a técnica de Dreborg¹⁰³:

- A região do antebraço foi limpa suavemente com algodão embebido em álcool, sem nenhum traumatismo, a fim de evitar a irritação da pele;
- Foram feitas 12 marcas na região do teste, utilizando uma caneta demográfica, a uma distância de aproximadamente 3 cm uma da outra, dispostas em linhas paralelas;
- Colocou-se uma gota de cada alérgeno na seqüência, definida pelo laboratório MERCK do Brasil (Merck, SP, Brasil).
- A pele foi perfurada, pressionando-se a lanceta (lanceta de Osterballe, uma para cada antígeno), na região central da gota de alérgeno, evitando-se sangramento e secada com papel absorvente;
- A leitura do teste foi feita 20 minutos após a aplicação dos alérgenos, desenhando-se as pápulas resultantes com uma caneta demográfica;
- Os resultados foram copiados no protocolo de cada paciente.

FIGURA 3. Teste cutâneo para alergia por punctura no antebraço.



4.5 Biópsia nasal para anátomo-patológico

Foi realizada biópsia na cavidade nasal que apresentava pólipos, em nível ambulatorial, com a utilização de pinça da marca EXPLORENT® (karl Storz, Miami, Flórida,USA), após aplicada anestesia tópica com algodão embebido com lidocaina 2%. As amostras foram encaminhadas para o *Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG*, em fragmentos que variaram aproximadamente entre 0,7 a 1,5 cm e fixados em formol a 10%⁴. No laboratório, as lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram analisadas pelo mesmo profissional. Considerou-se como pólipos eosinofílicos aqueles cuja porcentagem de eosinófilos nas células inflamatórias presentes no tecido polipóide estava acima de 20%, determinada pelo encontro de, pelo menos, quatro eosinófilos em cada um de quatro campos microscópicos, utilizando-se de grande aumento⁴⁵.

4.6 Biópsia nasal para RT-PCR

Realizaram-se biópsias nas cavidades nasais dos indivíduos do grupo 1 e 2. A coleta de fragmentos de mucosa nasal do grupo Controle foi efetuada durante o ato cirúrgico com anestesia geral, enquanto aquela do grupo FC foi realizada em nível ambulatorial. Neste grupo, todo o manuseio do tecido retirado envolvido na extração de RNA foi realizado com uso de luvas, materiais descartáveis e pinça EXPLORENT® (karl Storz, Miami, Flórida, USA) para evitar maceração tecidual.

Os tecidos colhidos foram colocados em tubos Eppendorf, numerados e conduzidos em caixa de isopor com gelo para o *Laboratório de Imunologia do Hospital São Geraldo - Hospital das Clínicas da UFMG*, onde permaneceram a oitenta graus negativos, até serem analisados quanto às citocinas.

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de imunologia do *Instituto de Ciências Biológicas da UFMG*, em caixa de isopor com gelo, e analisadas as citocinas, através de técnica da RT-PCR, por um único profissional que desconhecia os grupos estudados. Todo material utilizado na RT-PCR eram oriundos da mesma marca e lote.

4.6.1 Extração de RNA total

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, as amostras de aproximadamente 25 mg foram maceradas em homogeneizadores de vidro, contendo 1 ml do reagente Trizol® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, USA). A solução resultante foi transferida para tubos de 1,5 ml, adicionada de 0,2 ml de clorofórmio e centrifugada a 12000 x g por 15 min a 4°C. A camada superior resultante da centrifugação foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e o RNA precipitado com isopropanol (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). O RNA foi então ressuspendido em 40 µl de água

MilliQ e tratado com 2,5 U de DNase: RNase free (Promega Corporation ,Madison, Wisconsin, USA) por 20 minutos a 37°C. O RNA foi re-extraído utilizando, 200 µl de reagente Trizol® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, USA) e ressuspendido em 30 µl de água MilliQ. A concentração do RNA nas amostras foi quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e a integridade foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de agarose a 0,8%^{104, 105}.

4.6.2 Síntese de cDNA e PCR

O cDNA foi sintetizado a partir de 1,25 µg de RNA total, utilizando iniciadores hexâmeros randômicos (Promega Corporation ,Madison, Wisconsin, USA) e o sistema da transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR foi realizada em um volume final de 20 µl, na presença de 1µl do cDNA, 0,25 mM de dNTP, 0,2 µM de cada iniciador e 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, USA).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata (FIG.4). Os géis foram fotografados e os resultados analisados por densitometria, utilizando o AlphaDigiDoc 1201TM (AlphaInotech, San Leandro, CA, USA). Este programa calcula o valor integrado de densidade (IDV - *integrated density value*) para cada banda no gel. É definido como a intensidade dos pixels da região, delimitada pela banda subtraída da intensidade dos pixels da coloração de fundo (background)^{104, 105}.

4.7 Perfil das citocinas

O perfil das citocinas foi pesquisado no fragmento de pólipó nasal (grupo Fibrose Cística) e de mucosa nasal (grupo Controle) por meio da RT-PCR. Foram analisadas as transcrições para as seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ e ajustadas pelo valor da β -actina^{104, 105}.

As seqüências dos *primers* utilizados na RT-PCR estão descritas na Tabela 1.

FIGURA 4. Fotografia dos produtos da PCR analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corada pela prata.

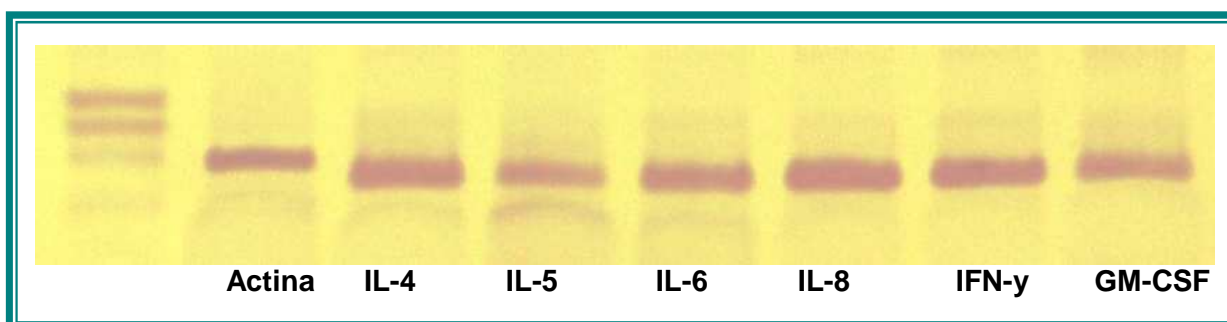


TABELA 1. Seqüência dos *primers* utilizados na RT-PCR para citocinas.

Primers	Senso 5' → 3'	Antisenso 5' → 3'
β -actina	ggatgcagaaggagatcactg	cgatccacacggagtaacttg
IL-4	ttgaacagcctcacagagcaga	gttgtgttcttgaggcagca
IL-5	ctgaggattcctgttctctgt	caactttctattatccactc
IL-6	tctccacaagegccttcg	ctcagggctgagatgccg
IL-8	gacttccaagctggccgtg	ctccttggcaaaaactgcacc
IFN- γ	actgacttgaatgtccaacgca	atctgactccttttctgcttcc
GM-CSF	agaaatgttgacctccagga	ttgcacaggaagtctccg

4.8 Métodos estatísticos

4.8.1 Codificação das variáveis

Na análise estatística, entre as medidas de interesse, foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos, com nível de significância estatística fixado em 5% e intervalo de confiança com mínimo de 80% e máximo de 95%.

As variáveis contínuas como a idade, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ e β -actina foram analisadas, e calculadas as medidas de tendência central (média e mediana). Estas informam sobre os dados centrais ao redor dos quais outros dados tendem a se agrupar. As medidas de dispersão (desvio-padrão e amplitude) avaliam o grau de dispersão dos dados encontrados nos grupos analisados.

A quantificação dos valores de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF e IFN- γ foi ajustada pela divisão do coeficiente da β -actina^{106, 107}.

4.8.2 Variáveis respostas e análise estatística dos dados

Neste estudo, as variáveis acima, identificadas como respostas, foram confrontadas para os dois grupos: Fibrose Cística e Controle.

Quando essas variáveis foram comparadas às categóricas, por exemplo, sexo, utilizou-se o qui-quadrado. Este teste foi utilizado para verificar se a variância correspondente ao quadrado de desvio padrão era homogênea entre os dois grupos dicotômicos, que, quando apresentava valor de $p > 0,05$, indicava homogeneidade. Neste caso, utilizaram-se testes paramétricos como o teste “t” para comparação de duas médias, e, “ANOVA” (*Analysis of Variance*), para comparação de mais de duas médias. Quando o valor de p foi menor que 0,05, indicando heterogeneidade, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, empregado para comparar duas ou mais medianas.

Quando o valor de p correspondente a estes testes (ANOVA, teste “t” e Kruskal-Wallis) foi menor que 0,05, as médias foram diferentes^{106, 107}.

4.8.3 Cálculo do erro tipo I e tipo II da amostra

O cálculo do erro tipo II, também chamado de erro beta, foi uma das análises estatísticas utilizadas. A definição de erro tipo II é “não encontrar uma diferença que existe”. No presente estudo, poderia significar que os valores das citocinas são, na média, diferentes entre os grupos 1 e 2, mas, pelo tamanho amostral, não foram demonstrados neste estudo (APÊNDICE B).

O erro tipo II pode ser causado, entre outros fatores, pelo tamanho insuficiente da amostra^{106, 107}.

4.9 Aspectos éticos

4.9.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto e o termo de consentimento pós-informado foram analisados e aprovados pelo *Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG* em 17 de dezembro de 2003, parecer nº.: ETIC 209/03 (ANEXO C)

4.9.2 Consentimento livre e informado de participação na pesquisa

Os participantes foram esclarecidos dos objetivos, metodologia simplificada, procedimentos, riscos e benefícios do estudo. Foi-lhes assegurado o direito de continuidade do atendimento médico após o término da investigação, e a liberdade de cancelar seu consentimento de participação a qualquer instante, sem que isso interferisse no atendimento presente e/ou futuro. Obteve-se consentimento pós-informado, por escrito, de todos os participantes (APÊNDICE C).

5 RESULTADOS

5.1 Estudo Clínico

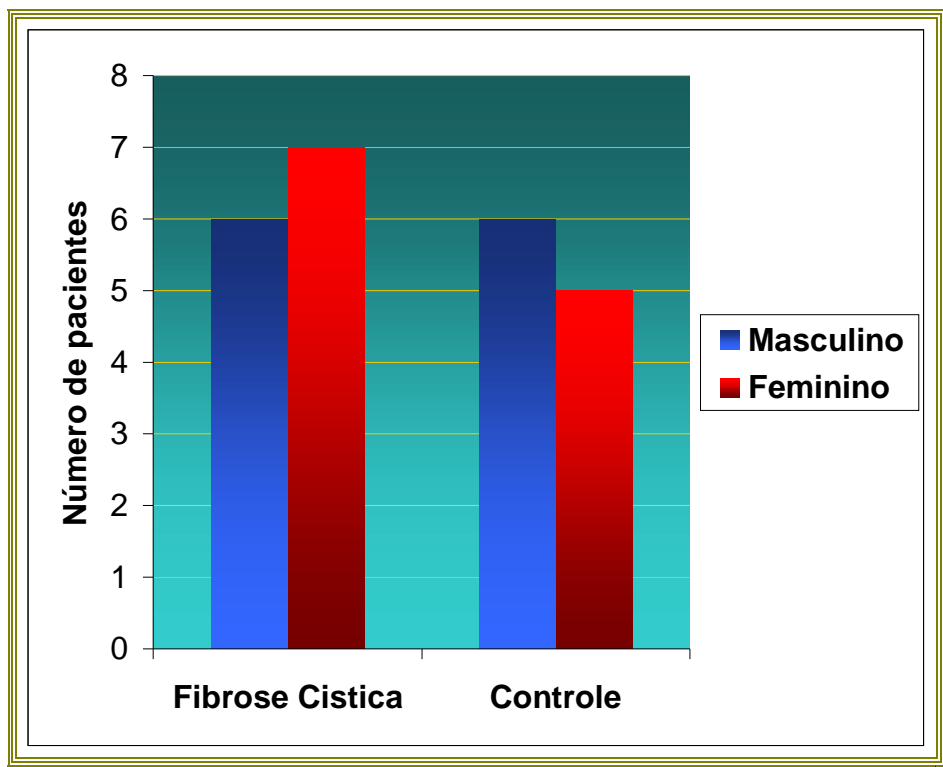
Cento e vinte e quatro pacientes com FC foram avaliados. Este grupo era composto de 74 (60%) indivíduos do sexo masculino e 50 (40%) do sexo feminino. A média da idade foi de 16,8 anos, e foram selecionados 13 indivíduos com PNS.

Foram estudados 24 pacientes, divididos em dois grupos. O Grupo 1 (Fibrose Cística), composto por 13 pacientes com PNS associada à Fibrose Cística e o Grupo 2 (Controle), composto por 11 pacientes sem PNS e teste alérgico negativo (APÊNDICE A).

No grupo Controle, quatro pacientes foram submetidos à septoplastia e turbinoplastia, um à adenoidectomia, três à timpanoplastia e três à adenoamigdalectomia (APÊNDICE A). Dois pacientes foram excluídos, devido a infecções de vias aéreas superiores.

No Grupo 1, seis (46%) eram do sexo masculino e sete (54%) do sexo feminino, enquanto no Grupo 2, seis (54%) eram do sexo masculino e cinco (46%) do sexo feminino (GRAF. 1).

GRÁFICO 1. Distribuição dos grupos por sexo.



A faixa etária dos pacientes variou de três a 57 anos, estando a média, a mediana, o desvio padrão e a amplitude detalhados na Tabela 2.

A distribuição da idade dos pacientes dos dois grupos em estudo foi assimétrica. Observou-se que a idade mediana para o grupo Fibrose Cística foi maior, comparado com o grupo Controle.

Não houve diferença estatisticamente significativa nos dois grupos ($p=0,32$).

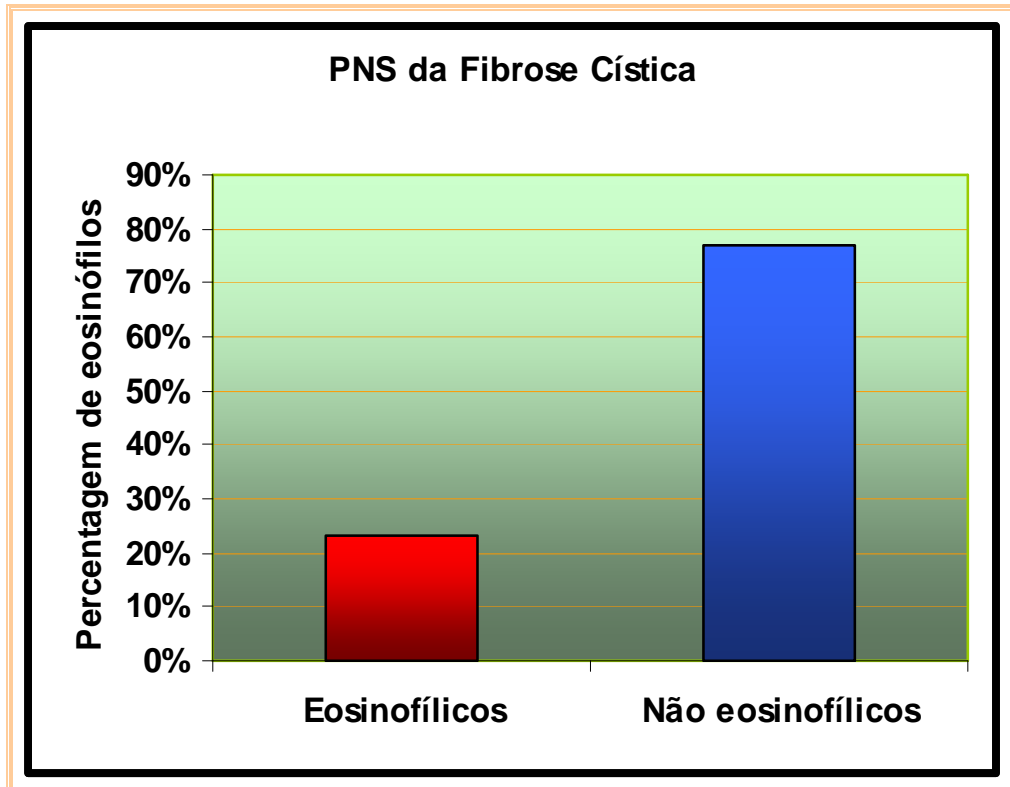
TABELA 2. Distribuição das medidas de tendência central e medidas de dispersão das idades dos pacientes nos grupos estudados.

	Grupo	Média	Mediana	Desvio-Padrão	Amplitude
Idade	Fibrose Cística	21,1	21,1	12,5	6-57
	Controle	17,7	15	13,6	3-43
	Valor de p	0,32			

5.2 Percentagem de eosinófilos

Ainda no Grupo 1, três (23%) pólipos eram eosinofílicos, enquanto 10 (77%) eram não eosinofílicos (GRAF. 2).

GRÁFICO 2. Percentagem de eosinófilos no grupo Fibrose Cística.



5.3 Perfil das citocinas

Os fragmentos de mucosa nasal foram analisados quanto à expressão de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ e GM-CSF.

Os valores de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ e GM-CSF foram ajustados pelo valor da β -actina entre os pacientes dos grupos Fibrose Cística e Controle (APÊNDICE D).

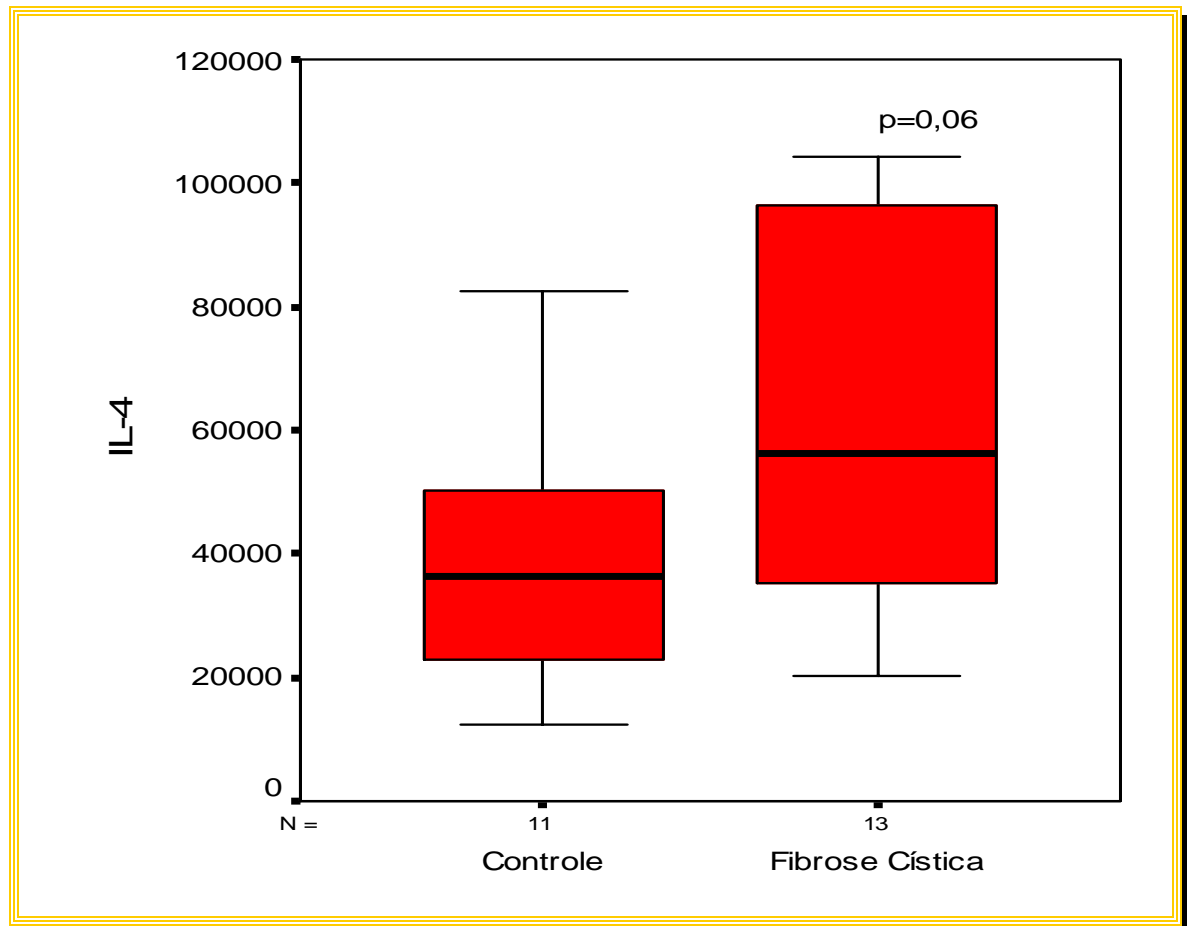
De acordo com a Tabela 3, podem-se constatar maiores valores de IL-4 com uma tendência de significância estatística nos pacientes com Fibrose Cística em relação ao grupo Controle (GRAF. 3).

TABELA 3. Comparação dos valores de IL-4 entre os grupos Fibrose Cística e Controle.

	Grupo	Média	DP	Mediana	Valor de p
IL-4	Controle	38538	21015	36495,9	0,06
	Fibrose Cística	64287,5	32835,1	56187,1	

DP: desvio padrão

GRÁFICO 3. Distribuição dos valores de IL-4 nos grupos Fibrose Cística e Controle.



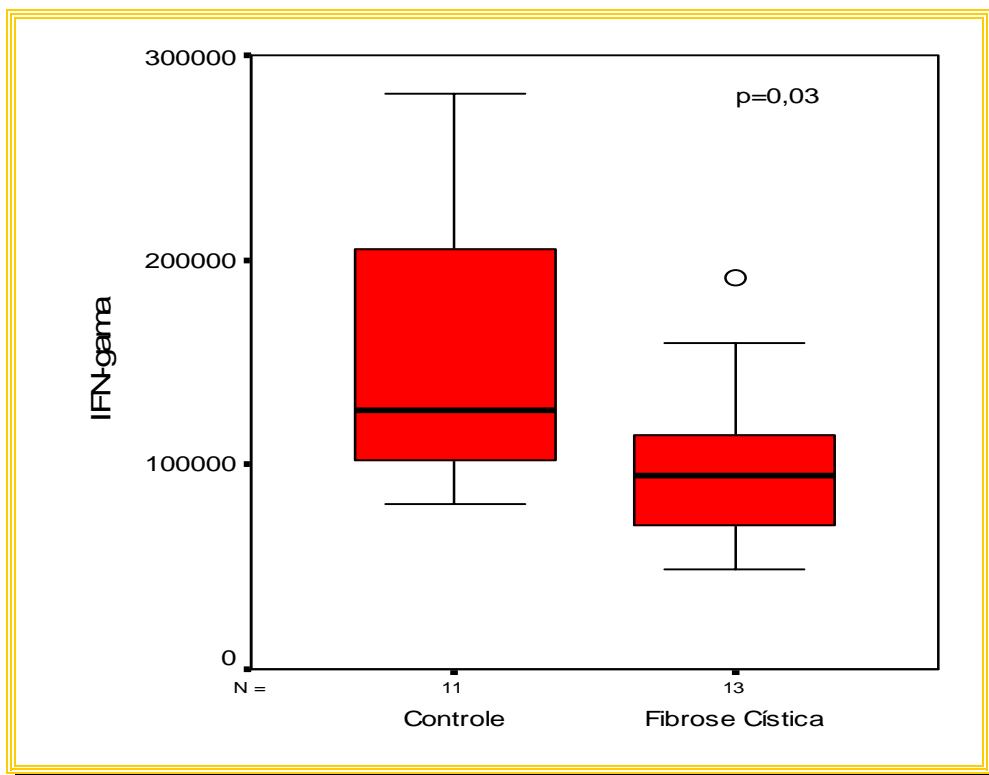
Na Tabela 4, podem-se constatar menores valores de IFN- γ , com significância estatística, no grupo Fibrose Cística (GRAF. 4).

TABELA 4. Comparação dos valores de IFN- γ entre os grupos Fibrose Cística e Controle.

	Grupo	Média	DP	Mediana	Valor de p
IFN-γ	Controle	153510,0	65026,5	126851,7	0,03
	Fibrose Cística	100839,3	40426,2	94889,7	

DP: Desvio Padrão.

GRÁFICO 4. Distribuição dos valores de IFN- γ nos grupos Fibrose Cística e Controle.



De acordo com a Tabela 5, não houve diferença com significância estatística, ao comparar IL-5, IL-6, IL-8 e GM-CSF entre os grupos Fibrose Cística e Controle (GRAF. 5, 6, 7 e 8).

TABELA 5. Comparação dos valores das citocinas IL-5, IL-6, IL-8 e GM-CSF, corrigidos pela β -actina, entre os grupos Fibrose Cística e Controle.

Variável	Controle			Fibrose Cística			Valor de p
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
IL-5	27803,6	15974,8	23625,3	29918,5	22119,2	28308,6	0,88
IL-6	60259,9	52404,5	40113,7	60631,7	34630	67502,5	0,51
IL-8	66254,5	47421,5	53019,9	74032,6	27356,4	78545,1	0,4
GM-CSF	4958,1	1306,4	5286	4119,6	2627,1	3033,9	0,4

DP = Desvio-padrão

GRÁFICO 5. Distribuição dos valores de IL-5 nos grupos Fibrose Cística e Controle.

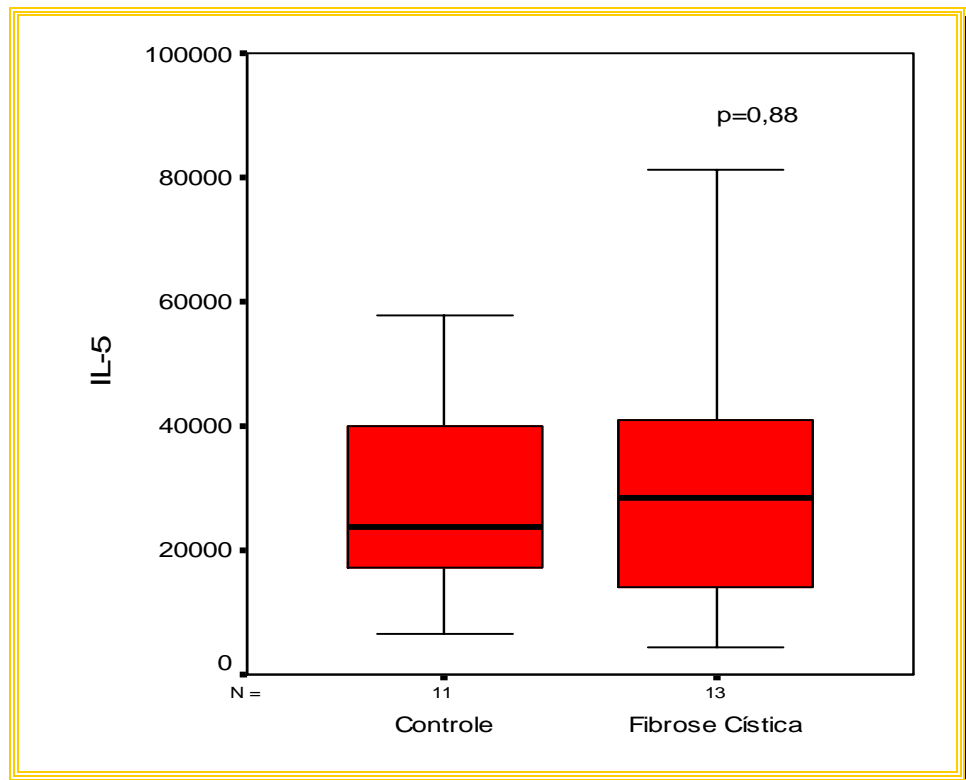


GRÁFICO 6. Distribuição dos valores de IL-6 nos grupos Fibrose Cística e Controle.

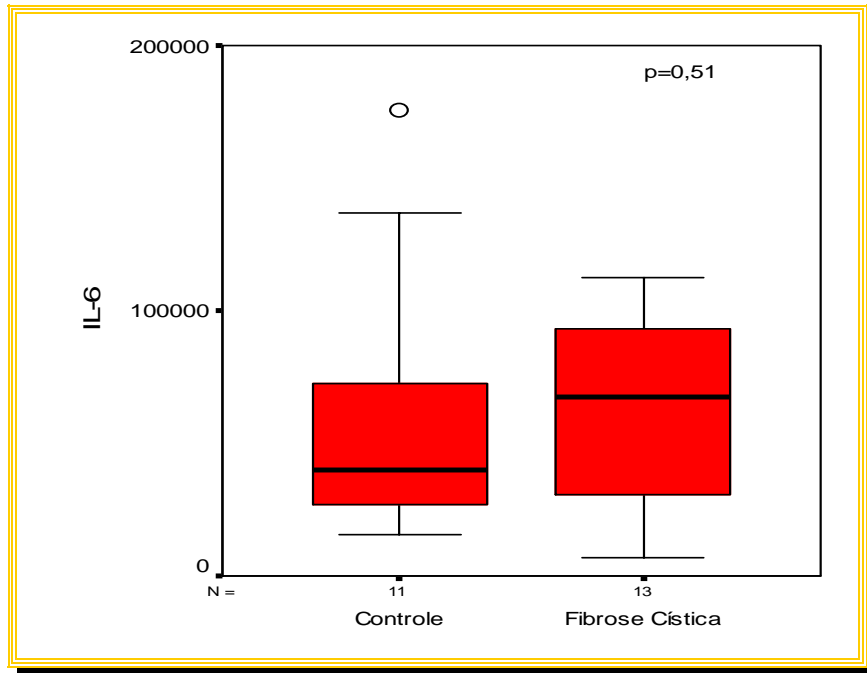


GRÁFICO 7. Distribuição dos valores de IL-8 nos grupos Fibrose Cística e Controle.

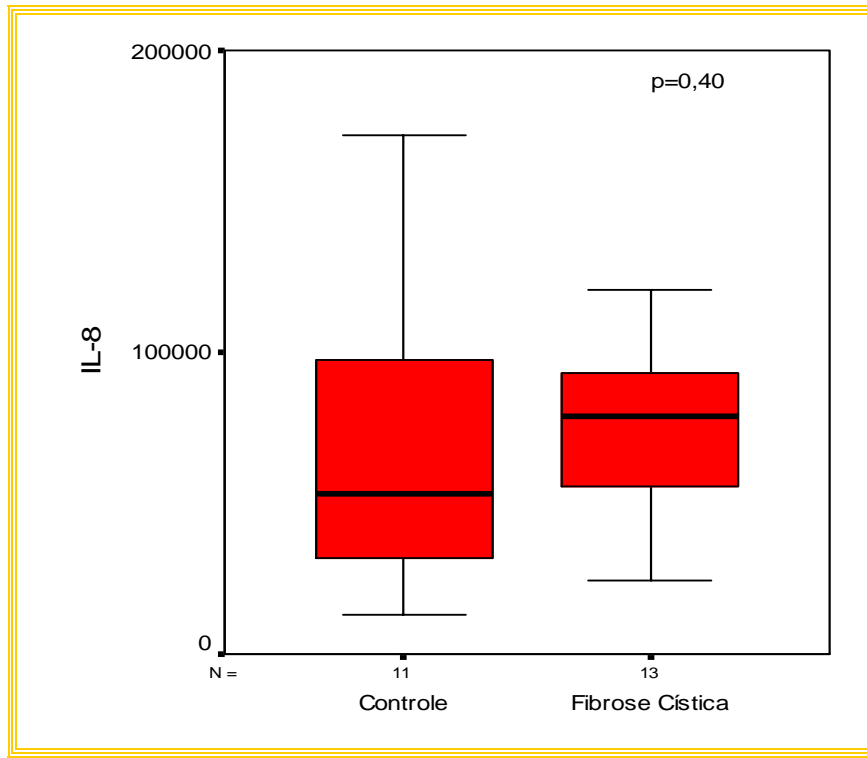
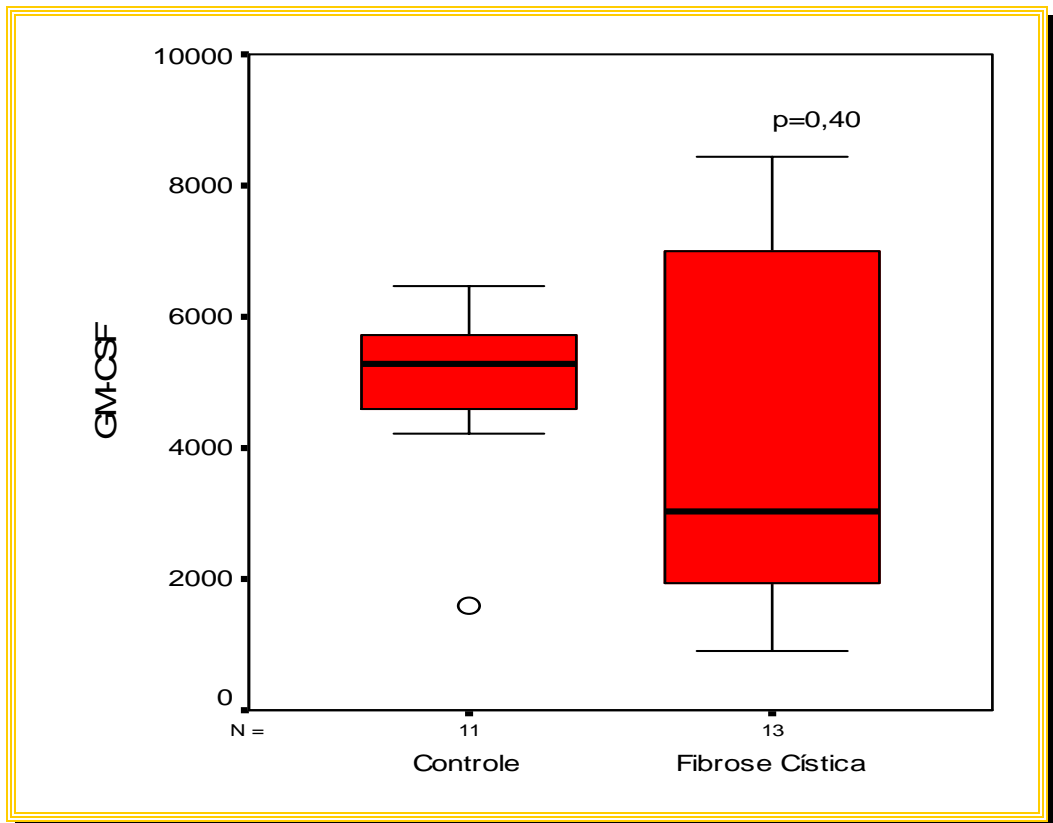


GRÁFICO 8. Distribuição dos valores de GM-CSF nos grupos Fibrose Cística e Controle.



6 DISCUSSÃO

6.1 Percentagem de eosinófilos

Este trabalho, embora apresente uma amostra pequena, sugere que os pólipos da FC não são exclusivamente neutrofílicos e que os eosinófilos podem exercer uma forte atuação no ambiente inflamatório da PNS da FC. Três (23%) pólipos eram eosinofílicos e 10 (77%) eram não eosinofílicos.

Pólipos, associados à FC, têm sido descritos como neutrofílicos^{32, 71, 92, 108}. Nos estudos de Rowe-Jones *et al.* (1997)⁵, pólipos de pacientes sem FC contêm mais eosinófilos do que aqueles com FC, enquanto estes apresentam mais neutrófilos e células plasmáticas.

Outros autores, semelhantes aos achados desse estudo, ponderam que, apesar de ser caracterizado como neutrofílico, até 40% dos pacientes demonstram pólipos eosinofílicos na FC, sugerindo que a ativação celular é mais relevante do que o número de células^{8, 17, 93}. Mesmo naqueles com FC e pólipos em que não são observados eosinófilos, pode-se constatar a presença de ECP e outras proteínas eosinofílicas^{5, 109}. Este fato pode ser atribuído à dificuldade de localização dos eosinófilos após ativação e liberação de seus grânulos⁹¹.

A interleucina 8 e a interleucina 6 são as principais citocinas relacionadas aos neutrófilos na PNS da FC^{75, 91}. IL-8 está relacionada à agudização de processos infecciosos com maior atração neutrofílica⁹¹ e IL-6 ocupa os sítios de ação destas células, impedindo a sua ativação⁷⁵. O aumento de IL-8 e a baixa de IL-6 são observados quando de neutrofília tecidual, diferente dos achados deste trabalho, onde não foi observada diferença estatística em relação à IL-6 e à IL-8, quando comparados os grupos FC e Controle. Estes dados sugerem que outros mecanismos celulares podem estar associados à PNS da FC, e não exclusivamente os neutrófilos ou, diferentes mecanismos de neutrofilia existem e são independentes de IL-8 e IL-6.

A patogênese dos pólipos seria a mesma, sendo ou não portador de FC, baseada na semelhança de arquitetura em ambos os grupos³². Dessa forma, os eosinófilos poderiam ter participação importante na PNS da Fibrose Cística, e o aumento dos neutrófilos seria em decorrência da infecção bacteriana crônica⁹³.

Bergoin *et al.* (2002)⁹¹, concluíram que nem os neutrófilos, nem os eosinófilos podem ser responsabilizados pela ocorrência da PNS nos pacientes com FC, sugerindo outros mecanismos para o seu desenvolvimento, dentre estes, os

linfócitos. Estas células apresentam características específicas, com comportamento clínico diferenciado, o que pode indicá-los como elementos cruciais nesta resposta imune^{76, 110-113}. O padrão de resposta inflamatória seria misto, com presença de citocinas dos tipos “Th1” e “Th2”²¹, principalmente uma produção acentuada daquelas “Th1” (IFN- γ) e de “Th2” (IL-4 ou IL-5)^{21, 57, 114, 115}.

No presente trabalho, foram observados baixos índices de IFN- γ e valores aumentados de IL-4, com forte tendência de significância estatística, dados não sugestivos dos linfócitos como agentes principais na patogênese da PNSNE associado à FC.

6.2 Perfil das citocinas

As citocinas são secretadas por células inflamatórias (linfócitos, eosinófilos e neutrófilos) e células constituintes (mastócitos, fibroblastos, células epiteliais e macrófagos)⁷⁷. Estas regulam os processos biológicos como: crescimento, ativação celular, quimiotaxia, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose e morfogênese⁴.

O seu perfil e das células inflamatórias na PNSE é bem documentada na literatura. Em contraste, muito pouco é conhecido sobre a patogênese da PNS em pacientes com FC, assim como comparação com outros trabalhos na literatura torna-se difícil devido à grande variação de parâmetros analisados.

Os valores de IL-5, IL-6, IL-8 e GM-CSF, avaliados através de RT-PCR entre os pacientes dos grupos Fibrose Cística e Controle, não mostraram diferença com significância estatística. Em contrapartida, foram observados menores valores de IFN- γ ($p=0,03$) nos pacientes com Fibrose Cística, e maiores valores de IL4 com tendência importante de significância estatística ($p=0,06$).

Bergoin *et al.* (2002), observaram aumento de IL-8 e neutrófilos naqueles com FC e PNS, ao comparar com a PNSE, afirmando que IL-8 é a maior quimiocina para os neutrófilos e tem participação crucial na sua degranulação⁹¹.

Vários autores observaram o aumento da produção de neutrófilos e IL-8 em secreções broncoalveolares na FC^{98, 113, 114}. Esta citocina é a principal responsável pela infiltração neutrofílica nos pulmões, e está relacionada à gravidade e à agudização da doença^{98, 111-113}.

Sobol *et al.* (2002), estudando indivíduos com sinusite crônica e FC, comparados a controles sadios (sem doenças de vias aéreas superiores e teste cutâneo negativo), demonstraram que a doença nasal na FC consiste de infiltrado neutrofílico com altos índices de IFN- γ e IL-8, similar ao encontrado nas alterações pulmonares. Entretanto, este estudo avaliou pacientes com FC, com quadro infeccioso e sem presença de PNS⁷¹.

Outros estudos não observaram aumento de IL-8 ou IL-6 na secreção nasal ao comparar FC e grupo Controle¹¹¹.

Noah *et al.* (1997)¹¹¹, mostraram que não existe evidência de aumento de IL-6 e IL-8, quando comparados lavados nasais daqueles com FC, sem doença nasal e controles sadios, porém, na presença de processo infeccioso, tanto a secreção nasal, quanto a secreção pulmonar mostraram índices elevados de IL-8.

Danel *et al.* (1996)¹¹⁶, observaram resultados semelhantes na biópsia nasal em adultos com FC e controles. É importante notar, entretanto, que foi avaliada mucosa nasal de pacientes com FC, os quais não manifestavam doença nasossinusal.

As principais fontes de IL-8 ainda não estão bem definidas, mas acredita-se que os neutrófilos, macrófagos e células epiteliais seriam as maiores fontes. Em resposta à presença bacteriana, ocorreria o aumento de neutrófilos e seus subprodutos como elastase, oxidantes e IL-8^{88, 96}. Estes exercem forte atuação no epitélio que produz grande quantidade de IL-8, mantendo o círculo vicioso neste microambiente inflamatório, e colaborando na formação da PNS na FC. Porém, depois de debelado o processo infeccioso, a produção de IL-8 tenderia à normalidade^{111, 112}.

A diferença dos resultados observados por esses autores, se comparados aos deste trabalho e aos demais dados citados na literatura, mostram que IL-8 está aumentada somente nos casos de agudização dos processos infecciosos, tanto em nível pulmonar quanto nasal¹¹¹⁻¹¹³. Assim, IL-8 poderia estar aumentada somente na ativação dos neutrófilos e não somente pela neutrofilia tecidual.

Vários estudos sugerem que IL-6 apresenta uma série de efeitos antiinflamatórios, principalmente, limitando a ação de células inflamatórias como os neutrófilos⁷⁵. É inativada na presença de elastase, perpetuando o estado inflamatório na árvore respiratória⁷⁸. Em pulmões estáveis de indivíduos com FC e sem agudização do quadro pulmonar, foi demonstrada grande quantidade de macrófagos

expressando IL-6⁷⁵. Outra característica marcante é a indução seletiva de IL-4 e, através do aumento de IL-4, maior estímulo para produção de IL-6^{67, 117}. Sua diminuição acarreta uma excessiva resposta inflamatória neutrofílica⁹. Alguns trabalhos mostraram baixos níveis de IL-6 em pulmões na FC, comparando pacientes normais ou aqueles portadores de pneumopatias como asma e broncodisplasias⁹.

Assim, caracterizando os pólipos como neutrofílicos na FC, era de se esperar baixos níveis de IL-6. Semelhante aos resultados encontrados, outros autores não observaram diminuição dessa citocina naqueles com FC e doença nasossinusal^{62, 111, 116}, ou se comparado à PNS e sinusite crônica⁶⁷.

O epitélio respiratório exerce atividade na modulação inflamatória dos pólipos, principalmente na PNSE, através da elaboração de citocinas como IL-6, GM-CSF e IL-8⁶⁶. Dentre estas, IL-8 e GM-CSF são as mais importantes, atuando na atração e sobrevivência dos eosinófilos⁶⁶. Assim, diferente da teoria de Bernstein *et al.* (1995)¹⁶ que mostraram grande lesão epitelial e conseqüente aumento de GM-CSF como fator primordial na formação dos pólipos, haveria uma maior integridade do epitélio na PNS da FC e menor participação de IL-8, IL-6 e GM-CSF, neste micro ambiente inflamatório, ao comparar à PNSE.

A PNSE, que representa 80% a 90% das poliposes nasossinusais, é manifestação de doença inflamatória crônica na mucosa do nariz e seios paranasais, caracterizada por infiltração de eosinófilos, cujo mecanismo patogênico não é totalmente conhecido¹⁴. Os eosinófilos constituem percentual superior a 20% das células inflamatórias presentes na PNSE e são capazes de modular respostas imunes pela liberação de fatores de crescimento, citocinas e quimioatraentes⁴⁵.

A continuidade da resposta inflamatória destes, que mostra um típico padrão "Th2", está ligada a citocinas como IL-5 e GM-CSF, que aumentam a sobrevivência e diminuem o índice de apoptose dos eosinófilos^{62, 71}.

Os eosinófilos expressam IL-5 em todas as PNSE, e aproximadamente 30% apresentam expressão genética para GM-CSF, com evidências de efeitos autócrinos^{20, 28}. São produzidas em grandes quantidades nos pólipos nasais, principalmente por células epiteliais, células endoteliais, macrófagos, linfócitos e fibroblastos^{28, 118}. Apresenta particular implicação nos eventos alérgicos, e é mais importante do que IL-4^{12, 119}. É a principal responsável pela eosinofilia nos pólipos,

independente do processo alérgico, o que enfatiza seu estímulo autócrino na ativação e sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos^{34, 120}.

Não houve, no atual estudo, aumento dos valores de GM-CSF e de IL-5. Esses resultados sugerem que, se os eosinófilos possuem participação importante na PNS associada à FC, diferentes mecanismos de eosinofilia existem e seriam independentes de IL-5 e GM-CSF.

Hamilos *et al.* (1995)⁴³, estudaram a expressão das citocinas em pacientes alérgicos e não alérgicos (NARES) portadores de PNS. Eles mostraram que diferentes mecanismos de eosinofilia existem em pacientes alérgicos e NARES, este último independente de IL-4 e IL-5.

Miller *et al.* (1994)⁷⁷ observaram aumento de IFN- γ e baixas concentrações de IL-4, ao comparar PNS em alérgicos e grupo controle, assim como investigaram a formação dos pólipos nasais, examinando as células T e seus produtos naqueles submetidos à polipectomia. Foi observado um típico perfil “Th1” com grande produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4, inversamente aos achados.

Outro fator importante é a colonização por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* naqueles com PNSNE e FC. Nestes, observam-se uma intensa resposta imune, desenvolvimento de pólipos e grande inflamação pulmonar^{17, 21, 64}. Embora o curso da doença seja caracterizado por exacerbações infecciosas, culturas de secreções nasais e pulmonares revelaram que *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* raramente são erradicadas⁸⁹. A habilidade de prolongar a sobrevivência nas células do hospedeiro explicaria o tratamento refratário aos antibióticos, cronicidade da doença e recorrência⁶⁴. As moléculas derivadas são capazes de ativar células T com produção de citocinas de padrão “Th2”, principalmente IL-4, IL-5, IL-8 e GM-CSF^{17, 21, 64}.

IL-4 induz eotaxinas nos fibroblastos nasais, mas não nos pulmonares, principalmente, se combinado com lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). Este, por meio da ligação ao receptor da célula T auxiliares CD4+ , estimulam a produção de IL4, aumentam os níveis de IgE e estimulam as células “Th2”, potencializadas por IL-5, IL-6 e IL-13. Em contrapartida, IFN- γ , IL-2 e IL-12 apresentariam efeito inverso, com bloqueio da produção de IgE e de células “Th2”⁵³.

Após opsonização bacteriana pela IgE, é observada uma ativação direta dos eosinófilos, das células epiteliais e das células apresentadoras de antígenos. O resultado reflete uma inflamação intensa com aumento de ECP, IgE total e, principalmente, IL-4. Portanto, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de induzir uma inflamação eosinofílica e, também, a síntese de IgE multiclonal com aumento de IgE total, intermediada pelo aumento de IL-4. A enterotoxina age, pelo menos, modificando a PNS por IgE, liberada pelos mastócitos, um mecanismo alternativo à alergia^{40, 65, 70}.

Diferente dos resultados encontrados, entretanto, outros estudos não observaram aumento destas citocinas e, inversamente, notaram uma diminuição importante de IL-4 com maiores níveis de IFN- γ ^{7, 71}. Vale ressaltar, mais uma vez, que estes trabalhos foram realizados naqueles pacientes com FC e sinusite crônica agudizada, que foi um critério de exclusão deste estudo.

Alguns autores consideram que as células mais importantes, na resposta da PNS, são as subpopulações de linfócitos^{57, 77}.

As células T representam 85% dos linfócitos no pólipso nasal, com predomínio de CD8 sobre CD4^{57, 121}. Assim, o padrão de resposta inflamatória seria misto, com presença de citocinas dos tipos "Th1" e "Th2"^{17, 21}. Na resposta tipo "Th1", estão envolvidas as citocinas IL-2, IL-12 e IFN- γ , com prevalência de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 na "Th2". As células "Th1" participam das reações de citotoxicidade e inflamação local, engajadas na defesa do hospedeiro contra doenças virais, microbianas e neoplásicas. As células "Th2" atuam, principalmente, na imunidade humoral, produzindo anticorpos em reações atópicas e para a defesa do hospedeiro contra doenças parasitárias^{4, 57, 77}.

Foram observados um aumento com tendência significativa de IL-4 e baixos valores de IFN- γ , sugestivo de uma reação com perfil "Th2". Dessa forma, embora os linfócitos sejam importantes na formação da PNS, não se pode excluir a participação de outros mecanismos em sua patogênese.

A interleucina 4 é importante na fluidificação do muco em toda árvore respiratória, principalmente na vigência de processos inflamatórios como a FC. Ela seria responsável pela diminuição da absorção de sódio e um aumento na secreção de cloro, atuando na hidratação e nas atividades bactericidas do fluido periciliar⁸⁴.

Seu aumento favorece a baixa concentração de sal, semelhante à diminuição de IFN- γ , podendo alterar as propriedades bactericidas no fluido periciliar¹²².

Originalmente definida como um agente antiviral, IFN- γ é importante na estimulação bactericida pelos fagócitos, apresentação antigênica através de moléculas MHC (*major histocompatibility complex*), interação leucócitos-endotélio e apoptose celular⁵⁸. Em infecções experimentais com patógenos intracelulares, a supressão da produção de IFN- γ acarretou proliferação bacteriana, devido à ausência do clearance intracelular⁵⁸.

Dellacono *et al.* (1997), mostraram que esta citocina, produzida pelos linfócitos T, tem um papel importante na regulação inflamatória⁷⁶. É produzida principalmente por células CD8⁺, bloqueando a resposta inflamatória tipo “Th2” e está elevada nos pacientes com sinusite crônica, devido a uma baixa de IL-4^{58, 123, 124}. Participa na ativação e recrutamento dos eosinófilos, assim como na síntese de colágeno pelos fibroblastos, estando relacionada à severidade da doença^{76, 122}. Atua na árvore respiratória através da regulação de canais de cloro e sódio^{84, 87, 99} e pode causar profundas alterações iônicas, principalmente, no transporte transmembrana de cloro, em epitélios normais e naqueles com FC, diminuindo a expressão de CFTR^{99, 100}.

A fina camada de líquido que cobre a superfície respiratória exerce um importante papel na proteção contra infecções, principalmente, uma atividade anti-pseudomonas e anti-estafilococcus dependentes de CFTR^{86, 99, 124}. O volume e a composição iônica são resultados do balanço entre absorção e secreção de íons e água. A água se movimenta através do epitélio guiada por forças osmóticas, fatores humorais e mecanismos intracelulares^{86, 99}.

Smith *et al.* (1996), observaram grande concentração de cloro no fluido epitelial nasal de pacientes com FC, aumento da absorção de sódio intracelular e uma redução importante da atividade bactericida. Eles concluíram que o epitélio secreta substâncias bactericidas na delgada camada fluida epitelial, da qual depende de baixas concentrações de sal¹²⁴.

Na FC, a perda dos canais de cloro dependentes de CFTR acarreta uma alta concentração de sal na superfície e na diminuição do poder bactericida. Essas alterações seriam muito mais proeminentes nestes pacientes, onde disfunções importantes nos CFTR já se encontram instalados, piorando um defeito básico coexistente^{86, 99}. Assim, seria observado um depósito bacteriano com ativação de

uma segunda linha de defesa, baseada principalmente em neutrófilos e macrófagos, ativação de várias citocinas e toda cascata inflamatória. IFN- γ seria uma citocina chave neste microambiente inflamatório, provavelmente, exercendo uma atividade fundamental neste contexto¹⁰⁰.

Assim, alterações de IFN- γ e IL-4 poderiam contribuir para maiores disfunções dos CFTR, alterando o balanço entre absorção e secreção de fluidos e eletrólitos, propiciando modificações no muco e da composição iônica¹²⁴.

Este trabalho sugere algumas alterações na teoria multifatorial de Bernstein *et al.* (1995)¹⁶, adaptando para a patogênese da PNS na FC: o fluxo aéreo na parede lateral do nariz ou infecções bacterianas (*Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*) e virais produziram alterações inflamatórias na mucosa com ulceração e prolapso da submucosa. Conseqüente reepitelização e formação glandular formariam os pólipos. As células inflamatórias e estruturais, incluindo epitélio, fibroblastos e endotélio vascular, teriam a habilidade de produzir RNA mensageiro para IL-4, bloqueando a produção de outras citocinas como o IFN- γ ¹⁶.

Esta representaria a maior via de amplificação da resposta inflamatória. A cascata imunológica teria efeito na integração bioelétrica nos canais de sódio e cloro, com retenção de líquido no interior das células e da lâmina própria, promovendo o edema e o desenvolvimento da PNS¹⁶.

Deve-se observar que esta resposta pode ser modificada pela presença de outras citocinas, células epiteliais e leucócitos. A realização desta análise através da RT-PCR apresentou-se como medida confiável, trazendo subsídios aos estudos das citocinas em pacientes portadores de PNS e FC.

Acredita-se que o reconhecimento e o aprofundamento dos achados deste estudo deverão ser continuados, na tentativa de se conhecer melhor o porquê de alguns indivíduos com FC desenvolverem PNS, auxiliando no desenvolvimento de terapias adjuvantes.

7 CONCLUSÕES

1. A infiltração eosinofílica na PNS, relacionada à FC, foi de 23%.
2. A expressão de RNAm para as interleucinas 5, 6, 8 e GM-CSF, analisadas pela RT-PCR, foi semelhante nos grupos Fibrose Cística e Controle. Baixos índices de IFN- γ e tendência a maiores valores de IL-4 associaram-se com o grupo Fibrose Cística.

8 REFERÊNCIAS

1. Pawanka R. Nasal polyposis: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3(1):1-6.
2. Rinia AB, Kostamo K, Ebbens FA, Van Drunen CM, Fokkens WJ. Nasal polyposis: a cellular-based approach to answering questions. *Allergy*. 2007; 62:348-58.
3. Voegels RL, Santoro P, Butugan O, Formigoni LG. Nasal polyposis and allergy: is there a correlation? *Am J Rhinol*. 2001; 5(1): 9-14.
4. Becker HMG. Estudo clínico-imunológico e pesquisa de eosinofilia conjuntival em pacientes portadores de polipose nasossinusal eosinofílica associada à intolerância aspirínica e à rinite eosinofílica não alérgica [tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.
5. Rowe-Jones JM, Shembekar M, Trendel-Smith N, Shembekar M, Mackay IS. Polypoid rhinosinusitis in patients with host defence deficiencies: cellular infiltration and disease severity. *Rhinology*. 1997; 35(3):113-7.
6. Beju D, Meek WD, Kramer JC. The ultrastructure of the nasal polyps in patients with and without cystic fibrosis. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2004; 36(2):155-65.
7. Claeys S, Van Hoecke H, Holtappels G, Gevaert P, De Belder T, Verhasselt B, et al. Nasal polyps in patients with and without cystic fibrosis : a differentiation by innate markers and inflammatory mediators. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35:467-72.
8. Henriksson G, Westrin KM, Karpati F, Wikström AC, Stierna P, Hjelte L . Nasal polyps in cystic fibrosis: clinical endoscopic study with nasal lavage fluid analysis. *Chest*. 2002; 121:40-7.
9. Osika E, Carvaillon J-M, Chadelat K, Boule M, Fitting C, Tournier G, et al. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J*. 1999; 14:339-46.
10. Cimino M, Cavaliere M, Nardone M, Plantullia A, Orefice A, Esposito V, et al. Clinical characteristics and genotype analysis of patients with cystic fibrosis and nasal polyposis. *Clin Otolaryngol*. 2003; 28:125-32.

11. Voegels LR. Estudo da correlação entre as interleucinas 1 β ,3,4 e 5 e a molécula de adesão VCAM-1 com a presença ou não de alergia [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1998.
12. Kramer MF, Ostertag P, Pfrogner E, Rasp G. Nasal interleukin-5, immunoglobulin E, eosinophilic cationic protein, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2000; 110:1056-62.
13. Setticone GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy and Asthma Proc*. 1996; 17(5):231-6.
14. Bernstein JM, Gorfien J, Noble B, Yankaskas J. Nasal polyposis: immunohistochemistry and biochemical findings (a hypothesis for the development of nasal polyps). *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99(2):165-75.
15. Henriksson G, Norlander T, Forsgren J, Stierna P. Effects of topical budesonide treatment on glucocorticoid receptor mRNA down-regulation and cytokine patterns in nasal polyps. *American Journal of Rhinology*. 2001; 15(1):1-8.
16. Bernstein JM, Gorfien J, Noble B. Role of allergy in nasal polyposis: a review. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995; 113(6):724-32.
17. Park HS, Jung KS, Shute J, Roberts K, Holgate ST, Djukanovic R. Allergen-induced release of GM-CSF and IL-8 in vitro by nasal polyp tissue from atopic subjects prolongs eosinophil survival. *Eur Respir J*. 1997; 10:1476-82.
18. Deal RT, Kountakis SE. Significance of nasal polyps in chronic rhinosinusitis: symptoms and surgical outcomes. *Laryngoscope*. 2004; 114(11):1932-5.
19. Crossara PFTB, Nascimento E, Sobrinho SC, Vasconcelos AC, Guimarães RES, Becker HMG, et al. Efeitos da mitomicina C em cultura de estroma de pólipos nasais eosinofílicos: indução de apoptose em eosinófilos. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004; 70(5):658-63.
20. Castro MCM, Assunção E, Castro MM, Araújo RN, Guimarães RE, Nunes FB. Efeitos da mitomicina C na polipose nasossinusal eosinofílica, in vivo: concentração de IL-5 e GM-CSF, RT-PCR. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006; 72(1): 38-42.

21. 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; 61:1280-89.
22. Cheng YK, Hwang GY, Lin CD, Tsai MH, Tsai SW, Chang WC. Altered expression profile of superoxide dismutase isoforms in nasal polyps from nonallergic patients. *Laryngoscope*. 2006; 116(3):417-22.
23. Hao J, Pang YT, Wang DY. Diffuse mucosal inflammation in nasal polyps and adjacent middle turbinate. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 134(2):267-75.
24. Andrews AE, Bryson JM, Rowe-Jones JM. Site of origin of nasal polyps: relevance to pathogenesis and management. *Rhinology*. 2005; 43(3):180-4.
25. Fokkens W. Evidence based diagnosis and treatment of rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinology*. 2005; 43(1):1.
26. Mygind N. Nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*. 1990; 86(6 Pt 1):827-9.
27. 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.
28. Jankowski R. Eosinophils in the pathophysiology of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol*. 1996; 116(2):160-3.
29. Caplin I, Haynes JT, Spahn J. Are nasal polyps an allergic phenomenon? *Ann Allergy*. 1971; 29(12):631-4.
30. Drake-Lee AB, McLaughlan P. Clinical symptoms, free histamine and IgE in patients with nasal polyposis. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1982; 69(3):268-71.
31. Polzehl D, Moeller P, Riechelmann H, Perner S. Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy*. 2006; 61(11):1275-9.
32. Tos M, Mogensen C, Thomsen J. Nasal polyps in cystic fibrosis. *J Laryngol Otol*. 1977; 91(10):827-35.

33. Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is up regulated in human nasal polyp tissue. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 99(6 Pt 1):837-42.
34. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Cuvelier C, Van Cauwenberge P. Nasal polyposis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol.* 2000; 14(5):279-90.
35. Drake-Lee A. Nasal polyps in identical twins. *J Laryngol Otol.* 1992; 106(12):1084-5.
36. Becker HMG, Guimarães RES, Nascimento E, Becker C, Gonçalves DU, Crossara PFTB. Perfil de citocinas e tipificação de HLA em pacientes com polipose nasossinusal tolerantes e intolerantes à aspirina. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003; 69(3): 296-02.
37. Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. HLA-DRB1,-DQA1, and -DQB1 genotypes in patients with nasal polyposis. *Laryngoscope.* 2000; 110(3 Pt 1):422-5.
38. Fritz SB, Terrell JE, Conner ER, Kukowska-Latallo JF, Baker JR. Nasal mucosal gene expression in patients with allergic rhinitis with and without nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112(6):1057-63.
39. Hirschberg A, Jokuti A, Darvas Z, Almay K, Repassy G, Falus A. The pathogenesis of nasal polyposis by immunoglobulin E and interleukin-5 is completed by transforming growth factor-beta1. *Laryngoscope.* 2003; 113(1):120-4.
40. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinology Suppl.* 2005; 18:1-88.
41. Kakoi H, Hiraide F. A histological study of formation and growth of nasal polyps. *Acta Otolaryngol.* 1987; 103(1-2):137-44.
42. Kostamo K, Sorsa T, Leino M, Tervahartiala T, Alenius H, Richardson M, et al. In vivo relationship between collagenase-2 and interleukin-8 but not tumour necrosis factor-alpha in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy* 2005; 60(10):1275-9.
43. Hamilos DL, Leung DYM, Wood R, Cunningham L, Bean DK, Yasruel Z, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 96:537-44.

44. 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.
45. Ingels K, Durdurez JP, Curvelier C, Van Cauwenberge P. Nasal biopsy is superior to nasal smear for finding eosinophils in nonallergic rhinitis. *Allergy.* 1997; 52(3):338-41.
46. Batsakis JG, El-Naggar AK. Cystic fibrosis and the sinonasal tract. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996; 105(4):329-30.
47. De Gaudemar I, Contencin P, Van den Abbeele T, Munck A, Navarro J, Narcy P. Is nasal polyposis in cystic fibrosis a direct manifestation of genetic mutation or a complication of chronic infection? *Rhinology.* 1996;34(4):194-7.
48. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154(5):1229-56.
49. Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Meyers A, Stephens JK, Barkans J, et al. Chronic hyperplastic sinusitis: association of tissue eosinophilia with mRNA expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 92(1 Pt 1):39-48.
50. 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.
51. Hamilos DL, Leung DY, Huston DP, Kamil A, Wood R, Hamid Q. GM-CSF, IL-5 and RANTES immunoreactivity and mRNA expression in chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (NP). *Clin Exp Allergy.* 1998; 28(9):1145-52.
52. Moqbel R. Eosinophils, cytokines, and allergic inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 725:223-33.
53. Howarth PH, Bradding P, Quint D, Redington AE, Holgate ST. Cytokines and airway inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 725:69-82.

54. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, et al. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood*. 2002; 100(5):1860-8.
55. Nishimoto K, Ukai K, Harada T, Jin CS, Sakakura Y. Lymphocyte subsets of maxillary mucosa in chronic inflammation. *Acta Otolaryngol*. 1988; 106(3-4):291-8.
56. 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.
57. 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.
58. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:749-95.
59. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1; 136(7):2348-57.
60. Valera FC, Anselmo-Lima WT. Evaluation of efficacy of topical corticosteroid for the clinical treatment of nasal polyposis: searching for clinical events that may predict response to treatment. *Rhinology*. 2007; 45(1):59-62.
61. Mastruzzo C, Greco LR, Nakano K, Nakano A, Palermo F, Pistorio MP, et al. Impact of intranasal budesonide on immune inflammatory responses and epithelial remodeling in chronic upper airway inflammation. *Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(1):37-44.
62. Lee CH, Rhee CS, Min YG. Cytokine gene expression in nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998; 107(8):665-70.
63. Min YG, Lee CH, Rhee CS, Kim KH, Kim CS, Koh YY, et al. Inflammatory cytokine expression on nasal polyps developed in allergic and infectious rhinitis. *Acta Otolaryngol*. 1997; 117(2):302-6.

64. Zhang N, Gevaert P, Van Zele T, Perez-Novo C, Patou J, Holtappels G, et al. An up date on the impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. *Rhinology*. 2005; 43:162-8.
65. Takasaka T, Kaku Y, Hozawa K. Mast cell degranulation in nasal polyps. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1986; 430:39-48.
66. Mulloi J, Xaubet A, Gaya A, Roca-Ferrer J, Lopez E, Fernandez JC, et al. Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25(7):607-15.
67. Bradley DT, Kountakis SE. Role of interleukins and transforming growth factor-beta in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2005; 115(4):684-6.
68. Shin SH, Lee SH, Jeong HS, Kita H. The effect of nasal polyp epithelial cells on eosinophil activation. *Laryngoscope*. 2003; 113(8):1374-7.
69. Beck LA, Stellato C, Beall LD, Schall TJ, Leopold D, Bickel CA, et al. Detection of the chemokine RANTES and endothelial adhesion molecules in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 98:766-80.
70. 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.
71. Sobol SE, Christodouloupoulos P, Manoukian JJ, Hauber HP, Frenkiel S, Desrosiers M, et al. Cytokine profile of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002; 128:1295-8.
72. Marcella R, Croce A, Moretti A, Barbacane RC, Di Giocchino M, Conti P. Transcription and translation of the chemokines RANTES and MCP-1 in nasal polyps and mucosa in allergic and non-allergic rhinopathies. *Immunol Lett*. 2003; 90(2-3):71-5.
73. Leff AR. Role of leukotrienes in bronchial hyperresponsiveness and cellular responses in airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(2 Pt 2):S125-32.
74. Sanchez-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.

75. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit. Care Med* 1995; 152:2111-8.
76. Dellacono FR, Roselle E, Denis L, Leonard G, Kreutzer D. Interferon gamma expression in human nasal polyps. *Laryngoscope*. 1997; 107(5):626-30.
77. Miller CH, Pudiak DR, Hatem F, Looney RJ. Accumulation of interferon gamma-producing TH1 helper T cells in nasal polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994; 111(1):51-8.
78. Kammouni W, Figarella C, Marchand S, Merten M. Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. *Infect Immun*. 1997; 65(12):5176-83.
79. Anderson DH. Cystic fibrosis of the pancreas. *J Chron Dis* 1938;3:58-62
80. Hull J, Skinner W, Robertson C, Phelan P. Elemental content of airway surface liquid from infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157(1):10-4.
81. Massengale AR, Quinn Junior F, Yankaskas J, Weissman D, McClellan WT, Cuff C, et al. Reduced interleukin-8 production by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 20(5):1073-80.
82. Ramsey B, Richardson MA. Impact of sinusitis in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992; 90(3 Pt 2):547-52.
83. Kingdom TT, Lee KC, FitzSimmons SC, Cropp GJ. Clinical characteristics and genotype analysis of patients with cystic fibrosis and nasal polyposis requiring surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996; 122(11):1209-13.
84. Galletta LJ, Pagesy P, Folli C, Caci E, Romio L, Costes B, et al. IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro. *J Immunol*. 2002 15; 168(2):839-45.
85. Yung MW, Gould J, Upton GJ. Nasal polyposis in children with cystic fibrosis: a long-term follow-up study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2002; 111(12 Pt1):1081-6.

86. Gysin C, Althman GA, Papsin BC. Sinonasal disease in cystic fibrosis: clinical characteristics, diagnosis, and management. *Pediatr Pulmonol.* 2000; 30(6):481-9.
87. Coltrera MD, Mathison SM, Goodpaster TA, Gown AM. Abnormal expression of the cystic fibrosis transmembrane regulator in chronic sinusitis in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999; 108(6):576-81.
88. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JP, Hull J, et al. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156(4 Pt 1):1197-204.
89. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150(2):448-54.
90. Wolter JM, Rodwell RL, Bowler SD, McCormack JG. Cytokines and inflammatory mediators do not indicate acute infection in cystic fibrosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(2):260-5.
91. Bergoin C, Gosset P, Lamblin C, Bolard F, Turck D, Tonnel AB, et al. Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2002; 1(3):110-5.
92. Oppenheimer EH, Rosenstein BJ. Differential pathology of nasal polyps in cystic fibrosis and atopy. *Lab Invest.* 1979; 40(4):445-9.
93. Jankowski R, Bouchoua F, Coffinet L, Vignaud JM. Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps. *Rhinology.* 2002; 40:173-8.
94. Hadfield PJ, Rowe-Jones JM, Mackay IS. A prospective treatment trial of nasal polyps in adults with cystic fibrosis. *Rhinology.* 2000; 38(2):63-5.
95. Bateman ND, Shahi A, Feeley KM, Woolford TJ. Activated eosinophils in nasal polyps: a comparison of asthmatic and non-asthmatic patients. *Clin Otolaryngol.* 2005; 30(3):221-5.

96. Black RH, Yankaskas JR, Johnson LG, Noah TL. Interleukin-8 production by cystic fibrosis nasal epithelial cells after tumor necrosis factor - α and respiratory syncytial virus stimulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 19(2):210-15.
97. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151(4):1075-82.
98. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1995; 20(2):63-70.
99. Galiotta LJ, Folli C, Marchetti C, Romano L, Carpani D, Conese M, et al. Modification of transepithelial ion transport in human cultured bronchial epithelial cells by interferon-gamma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278(6):L1186-94.
100. Besançon F, Przewlocki G, Baró I, Hongre AS, Escande D, Edelman A. Interferon-gamma down regulates CFTR gene expression in epithelial cells. *Am J Physiol*. 1994; 267(5 Pt 1):C1398-404.
101. Douglass JA, O'Hehir RE. Diagnosis, treatment and prevention of allergic disease:the basics. *Med J Aust*. 2006; 185(4):228-33.
102. Castro FFM. Rinite alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão. São Paulo: Lemos; 1997.
103. Dreborg S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy*. 1993; 48(7):473-5.
104. Bryan D, Walker KB, Ferguson M, Thorpe R. Cytokine gene expression in a murine wound healing model. *Cytokine*. 2005; 31(6):429-38.
105. Choi EW, Shin IS, Bhang DH, Lee DH, Bae BK, Kang MS, et al. Hormonal change and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146(1): 101-8.

106. Goulart EMA. Metodologia e informática na pesquisa médica. Belo Horizonte: Coopmed; 2000.
107. Soares JF, Siqueira AL. Introdução à estatística médica. 2ª. ed. Belo Horizonte: Coopmed; 2002.
108. Sorensen H, Mygind N, Pedersen CB, Prytz S. Long- term treatment of nasal polyps with beclomethasone dipropionate aerosol. *Acta Otolaryngol.* 1976; 82:260-2.
109. Wang D, Brihaye P, Smitz J, De Waele M, Clement P. Inflammatory cells and mediator concentrations in nasal secretions of patients with cystic fibrosis. *Acta Otolaryngol.* 1996; 116(3):472-6.
110. 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):1133-41.
111. Noah TL, Black HR, Cheng PW, Wood RE, Leigh MW. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1997; 175(3):638-47.
112. Dean TP, Dai Y, Shute JK, Church MK, Warner JO. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res.* 1993; 34(2):159-61.
113. Karpati F, Hjelte FL, Wretling B. TNF-alpha and IL-8 in consecutive sputum samples from cystic fibrosis patients during antibiotic treatment. *Scand J Infect Dis.* 2000; 32(1):75-9.
114. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol.* 1997; 24(2):137-42.
115. Stern RC, Boat TF, Wood RE, Matthews LW, Doershuk CF. Treatment and prognosis of nasal polyps in cystic fibrosis. *Am J Dis Child.* 1982; 136(12):1067-70.
116. Danel C, Erzurum SC, McElvaney NG, Crystal RGI. Quantitative assessment of the epithelial and inflammatory cell populations in large airways of normals individuals with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153:362-8.

117. Tosato G, Pike SE. Interferon- β 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human t lymphocytes. *J Immunol.* 1988; 141(5):1556-62.
118. Kondo H, Nachtigal D, Frenkiel S, Schotman E, Hamid Q. Effect of steroids on nasal inflammatory cells and cytokine profile. *Laryngoscope.* 1999; 109(1):91-7.
119. Wright ED, Christodoulopoulos P, Small P, Frenkiel S, Hamid Q. Th-2 type cytokine receptors in allergic rhinitis and in response to topical steroids. *Laryngoscope.* 1998; 108(10):1528-33.
120. Rudack C, Bachert C. Cytokines and chemokines in paranasal sinus diseases. *Laryngorhinotologie.* 1999; 78(9):481-90.
121. 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.
122. Al Ghamdi K, Ghaffar O, Small P, Frenkiel S, Hamid Q. IL-4 and IL-13 expression in chronic sinusitis: relationship with cellular infiltrate and effect of topical corticosteroid treatment. *J Otolaryngol.* 1997; 26(3):160-6.
123. Coste A, Rateau JG, Roudot-Thoraval F, Chapelin C, Gilain L, Poron F, et al. Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996; 122(4):432-6.
124. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* 1996; 85(2): 229-36.

APÊNDICES

APÊNDICE A – POPULAÇÃO ESTUDADA

TABELA 6. Dados da população estudada: grupo, idade e citocinas.

PACIENTE	GRUPO	ID	FRASCO	IL-6	IL-4	IL-5	IL8	IFN- γ	actina- β	GM-CSF
TAS	timpanoplastia	12	1b	129430	45000	54684	89280	155000	138584	5367
FAL	adenoidectomia	4	4b	42140	47025	41013	44640	250000	147258	3756
SEM	septoplastia/turbinoplastia	19	6b	30100	61875	10000	10000	160000	174528	3756
JCBS	adenoamigdalectomia	3	7b	54180	56925	18228	17856	185000	139982	5635
PSPS	timpanoplastia	36	73	23400	18683	40940	93744	82467	139770	4974
OSP	septoplastia/turbinoplastia	43	74	36000	43230	4094	124696	131580	110560	6841
LFRB	adenoamigdalectomia	6	77	32400	27680	40022	58938	89600	117810	1781
JAM	septoplastia/turbinoplastia	30	76	25200	33150	36456	41664	135000	90090	6219
LMSC	adenoamigdalectomia	6	5b	18000	26520	18150	68016	139320	113288	7463
KSL	septoplastia/turbincetomia	20	2b	275250	12375	18228	34270	125000	133072	4830
LSF	timpanoplastia	15	3b	84280	37125	22785	217856	205000	133072	5098
AMP	FIBROSE CÍSTICA	25	2A	101844	110424	47040	83325	113221	152200	8342
GCS	FIBROSE CÍSTICA	16	2E	70308	17340	28809	76398	127190	154549	2951
ISA	FIBROSE CÍSTICA	6	3E	18060	54450	14552	23808	185000	155120	1865
ESM	FIBROSE CÍSTICA	13	4E	57288	20230	10476	103683	116130	134713	2683
AAS	FIBROSE CÍSTICA	11	1E	59892	28900	13095	87312	141015	169426	2683
VBA	FIBROSE CÍSTICA	13	8A	139564	59813	18816	53328	89385	113400	1217
SAP	FIBROSE CÍSTICA	30	7A	94300	87419	68128	46662	81420	179450	567
RSM	FIBROSE CÍSTICA	23	6A	26199	82818	47040	53328	41713	174600	1450
RGS	FIBROSE CÍSTICA	20	5A	26404	78217	10000	106656	53631	169750	6528
RSM	FIBROSE CÍSTICA	20	4A	64124	27606	25872	49995	71508	164900	3627
KDSG	FIBROSE CÍSTICA	20	3A	7544	73616	54096	83325	101303	103700	7979
JNL	FIBROSE CÍSTICA	57	9A	35424	87419	41250	93324	95344	149608	567
GOD	FIBROSE CÍSTICA	20	1A	109388	119626	2352	113322	107262	132800	7979

APÊNDICE B – Cálculo do erro tipo I e tipo II da amostra

TABELA 7. Tamanho amostral calculado a partir dos valores de média e desvio – padrão.

Substância	Tamanho amostral necessário	
	Poder 80%	Poder 90%
IL-4	18	25
IL-5	1307	1749
IL-6	223677	299574
IL-8	389	521
IFN- γ	17	23
GM-CSF	96	129

APÊNDICE C - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR EM ESTUDO DE PESQUISA CLÍNICA

TÍTULO: ESTUDO CLÍNICO E IMUNOLÓGICO E PESQUISA DO PERFIL DAS CITOCINAS EM PACIENTES PORTADORES DE POLIPOSE NASOSSINUSAL NÃO EOSINOFÍLICA ASSOCIADA 'A MUCOVISCIDOSE.

*PESQUISADOR: Dr. Flávio Barbosa Nunes
Tel.: 33734917*

INTRODUÇÃO

É importante que você leia e compreenda as seguintes explicações sobre a importância deste estudo e sobre os procedimentos propostos.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar se os pacientes portadores de fibrose cística e pólipos nasais são semelhantes imunologicamente aos pacientes que apresentam pólipos nasais eosinofílicos não alérgicos.

PROCEDIMENTOS

Este estudo terá dois grupos de pacientes:

- 1. Controle (pacientes que serão submetidos a cirurgias otorrinolaringológicas).*
- 2. Portadores de pólipos nasais, associados à fibrose cística;*

Os procedimentos para classificação e avaliação dos pacientes portadores de fibrose cística e pólipos nasais são rotineiros no nosso serviço que visa a um diagnóstico da causa da polipose de cada paciente.

Para esta classificação você será submetido a:

- 1. Avaliação da sua história;*
- 2. Teste cutâneo: exceto os portadores de mucoviscidose, será realizado teste para detectar alergias mais comuns (mofo, poeira, cão, gato, etc). Tomografia computadorizada de seios paranasais: todos os pacientes portadores de polipose devem realizar tomografia para avaliar a presença de pólipos dentro dos seios da face e planejar a cirurgia;*

3. *Biópsia dos pólipos: retirada de pólipos por uma pinça própria de biópsia para estudo anátomo-patológico. Esta biópsia poderá ser realizada no ambulatório ou durante a sua cirurgia;*

4. *Perfil de citocinas nos pólipos: estuda as substâncias produzidas pelas células e serão quantificadas através de biópsia semelhante à anteriormente descrita;*

DESCONFORTOS

Pequeno sangramento nasal devido à biópsia, facilmente controlado.

RISCO

Pequeno sangramento nasal, facilmente controlado.

BENEFÍCIOS

Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento médico. O conhecimento da causa específica de sua polipose será importante para o acompanhamento futuro de sua doença.

CUSTO

Não haverá custos para os pacientes e você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

CONFIDENCIALIDADE

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei. As publicações dos dados não o (a) identificarão. Os seus registros médicos serão de conhecimento do pesquisador e poderão ser verificados pelo Comitê de Ética em Pesquisa - COEPIUFMG.

DESLIGAMENTO

A sua participação é voluntária. A sua recusa em participar não afeta o seu acompanhamento médico em andamento.

CONTATO COM A COMISSÃO DE ÉTICA

Qualquer dúvida que houver a respeito de seus direitos como um (a) paciente de pesquisa, você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa — COEPIUFMG, no telefone: 2489364.

CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento para participar neste estudo, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Assinatura do Paciente

Data

Assinatura da Testemunha

Data

APÊNDICE D – PERFIL DAS CITOCINAS

TABELA 8. Comparação da idade e dos valores das citocinas ajustados pelo valor da β -actina.

Variável	Controles				Fibrose Cística				Valor de P
	Média	DP	Mediana	Amplitude	Média	DP	Mediana	Amplitude	
IL-4	38538,0	21015,0	36495,9	12558,3- 82459,7	64287,5	32835,1	56187,1	20064,7- 104356,6	0,06
IL-5	27803,6	15974,8	23625,3	6444,0- 57867,5	29918,5	22119,2	28308,6	4328,7- 81327,9	0,88
IL-6	60259,9	52404,5	40113,7	15571,0- 175675,4	60631,7	34630,0	67502,5	6905,3- 112570,8	0,51
IL-8	66254,5	47421,5	53019,9	13326,8- 171973,0	74032,6	27356,4	78545,1	24567,5- 120438,6	0,40
IFN-γ	153510,3	65026,5	126851,7	80603,1- 281112,5	100839,3	40426,2	94889,7	48449,2- 190901,9	0,03
GM-CSF	4958,1	1306,4	5286,0	1602,2- 6455,9	4119,6	2627,1	3033,9	918,1- 8446,1	0,40
Idade	17,7	13,6	15,0	3-43	21,1	12,5	20,0	6-57	0,32
β-actina	130960	22315	154549	90090- 174528	150324	23318	135790	103700- 179450	0,052

DP=desvio-padrão.

ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO GRUPO CONTROLE**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
SERVIÇO DE OTORRINOLARINGOLOGIA****PROTOCOLO DE TESTE ALÉRGICO**

Nº _____ FRASCO Nº _____

DATA: ____/____/____

REGISTRO: _____._____._____._____._____

NOME DO RESPONSÁVEL:

NOME _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

IDADE: ____

SEXO: ____ 1- MASCULINA 2 – FEMININO

COR: ____ 1 – LEUCODERMA 2 – FEODERMA 9 – OUTROS

NATURALIDADE:

PROCEDÊNCIA:

ESCOLARIDADE: ____ 1 – PRIMEIRO GRAU 2 – SEGUNDO GRAU
9 – NENHUM

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: ____ - _____

CEP: _____._____-_____-_____-_____-_____-_____-

1. USO DE MEDICAMENTOS:

2. SINTOMAS NASAIS:

- RINORRÉIA ESPIRROS PRURIDO
 SECREÇÃO NASAL CONGESTÃO NASAL

3. ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA

A) PAI

- ASMA RINITE ALÉRGICA DERMATITE

ATÓPICA

B) MÃE

- ASMA RINITE ALÉRGICA DERMATITE

ATÓPICA

C) IRMÃOS

- ASMA RINITE ALÉRGICA DERMATITE

ATÓPICA

4. CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO

- CASA APARTAMENTO

A) MOFO SIM NÃO

B) FUMANTES NO DOMICÍLIO SIM NÃO

- PAI MÃE OUTROS

C) ANIMAIS DOMÉSTICOS SIM NÃO

- CACHORRO GATO OUTROS

D) CORTINA NO QUARTO SIM NÃO

E) CORTINA OUTROS CÔMODOS SIM NÃO

F) PISO DO DORMITÓRIO

CERÂMICA

MADEIRA

CIMENTO

G) REVESTIMENTO DO COLCHÃO

SIM

NÃO

E) REVESTIMENTO DO TRAVESSEIRO

SIM

NÃO

TESTES CUTÂNEOS DE HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA

ERITEMA / PÁPULA

- | | | |
|-----|---|---------------|
| 1. | CONTROLE NEGATIVO | _____ / _____ |
| 2. | <i>ASPERGILLUS FULMIGATUS</i> | _____ / _____ |
| 3. | <i>PENICILLIUM NOTATUM</i> | _____ / _____ |
| 4. | <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> | _____ / _____ |
| 5. | <i>BLATELLA GERMANICA</i> | _____ / _____ |
| 6. | <i>PERIPLANETA AMERICANA</i> | _____ / _____ |
| 7. | <i>CANIS FAMILIARIS</i> | _____ / _____ |
| 8. | <i>FELIS DOMESTICUS</i> | _____ / _____ |
| 9. | <i>BLOMIA TROPICALIS</i> | _____ / _____ |
| 10. | <i>DERMATOPHAGOIDES FARINAE</i> | _____ / _____ |
| 11. | <i>ERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS</i> | _____ / _____ |

**ANEXO B – AVALIAÇÃO OTORRINOLARINGOLÓGICA DOS PACIENTES
PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA**

PROTOCOLO

PARTE 1: Identificação

Número:

Nome:

Nome do responsável:

Registro (HC-UFMG):

Data de Nascimento: ___/___/___

Idade: ___ ___

Sexo: ___ 1 – Masculino 2- Feminino

Cor: ___ 1 – Leucoderma 2- Feoderma 9 – Outros

Naturalidade:

Procedência:

Escolaridade: ___ 1 – Primeiro Grau 2- Segundo Grau 3 – Nenhum

Endereço:

Telefone: ___ - ___ - ___

Cep: ___ . ___ . ___

Renda familiar média: ___ , ___

Número: ___ ___

PARTE 2: Avaliação Pneumológica

Escore de Schwachmann ___ ___ ___ (___ ___ / ___ ___ / ___ ___)

Número: ___ ___ ___

Data: ___ ___ / ___ ___ / ___ ___

PARTE 3: Avaliação Rinológica

1 – Sintomas relacionados:

(Seu filho / Você tem o nariz constantemente entupido?)

Obstrução nasal ___ 1 – Sim 2- Não 9 – Não sabe informar

(Seu filho / Você está com o nariz escorrendo nas duas últimas semanas?)

Rinorréia ___

(Você percebe descer / escorrer secreção atrás, do nariz para garganta?)

Gotejamento posterior ___

(Seu filho / Você respira constantemente de boca aberta? Seu filho / Você dorme de boca aberta?)

Respirador bucal ___

(Seu filho / Você está tossindo nas últimas duas semanas?)

Tosse ___

(Seu filho / Você dorme tranquilamente ou tem o sono agitado?)

Sono agitado ___

(Seu filho / Você tem sono durante o dia?)

Sonolência diurna ___

(Seu filho / Você sente dor de cabeça?)

Cefaléia ___

(Seu filho / Você identifica os alimentos pelo cheiro? Seu filho / Você percebe cheiros desagradáveis?)

Anosmia ___

(Seu filho / Você sente dor no rosto?)

Dor facial ___

(Seu filho / Você sente dor ao redor dos olhos?)

Dor periorbitária ___

(Seu filho / Você ficou rouco nas últimas duas semanas? Você percebe alguma alteração na sua voz?)

Alteração da voz ___

(Seu filho / Você cansa com facilidade durante atividades físicas como jogar bola, brincar de pique - esconde subir um morro ou escadas?)

Intolerância a atividades físicas ___

(Seu filho / Você tem tido mau hálito nas últimas duas semanas?)

Halitose ___

2 – Ectoscopia / Otoscopia:

Fascies atípica ___ Y - Sim N-Não
 Alargamento do dorso nasal ___
 Hipertelorismo ___
 Proptose ___
 Respiração bucal durante a consulta ___

MT direita ___

MT esquerda ___

1 – Brilhante e translúcida
 2 – Nível líquido
 4 – Hiperemia radiada
 8 – Retraída
 16 – Opacificada
 32 – TV

3 – Rinoscopia anterior ___

1 – Septo centralizado

2- Desvio de septo

9 – Não avaliado

4 – Oroscopia ___

1- Amígdalas crípticas ou grau I
 2 – Hipertrofia amigdaliana grau II
 3 – Hipertrofia amigdaliana grau III
 4 – Hipertrofia amigdaliana grau IV
 5 – Outros.....

Palato ogival ___

Y – Sim

N - Não

5 – Endoscopia:

5.1 – Cavidade nasal direita

1 – Sim

2 – Não

9 – Não avaliado

Normal ___

Mucosa nasal congesta ___
 Mucosa nasal hiperemiada___
 Secreção mucóide assoalho ___
 Secreção mucóide evidente em MM ___
 Secreção mucóide evidente em recesso EE ___
 Secreção mucopurulenta assoalho___
 Secreção mucopurulenta evidente em MM___
 Secreção mucopurulenta evidente em recesso EE___
 Pólipos nasais___
 Abaulamento medial da parede lateral___
 Óstios tubários livres___

5.1 – Cavidade nasal esquerda 1 – Sim 2 – Não 9 – Não avaliado

Normal ___
 Mucosa nasal congesta ___
 Mucosa nasal hiperemiada___
 Secreção mucóide assoalho ___
 Secreção mucóide evidente em MM ___
 Secreção mucóide evidente em recesso EE ___
 Secreção mucopurulenta assoalho___
 Secreção mucopurulenta evidente em MM___
 Secreção mucopurulenta evidente em recesso EE___
 Pólipos nasais___
 Abaulamento medial da parede lateral___
 Óstios tubários livres___

5.3 – Rinofaringe___

1- Rinofaringe livre
 2- Adenóide < 60%
 3 – Adenóide entre 60 e 70 %
 4 – Adenóide entre 70 e 80 %
 5 – Adenóide entre 80 e 90 %
 6 – Adenóide >90%

5.4 – Orofaringe ___

1 – Normal
 2 – Amígdalas obstrutivas

5.5 – Laringe ___

1 – Normal

2 – Alterada

6 – Estadiamento da polipose:

Polipose nasal à direita:

Plano horizontal D ___ 1– H1 2– H2 3– HT 4- Ausente

Plano vertical D ___ 1– V1 2– VS 3– Vi 4- VT 5- Ausente

Plano ant - post D ___ 1– P1 2– Pa 3– Pp 4-PT 5 – Ausente

Polipose nasal à esquerda:

Plano horizontal E ___ 1– H1 2– H2 3– HT 4- Ausente

Plano vertical E ___ 1– V1 2– VS 3– Vi 4- VT 5- Ausente

Plano ant - post E ___ 1– P1 2– Pa 3– Pp 4-PT 5 – Ausente

7 – Anatomia Patológica:

Biopsia de pólipos nasais ___

1– Eosinofílico

2– Não – eosinofílico

Biopsia de mucosa nasal ___

1– Normal

2– Alterada

8 – Radiografia de Seios da Face:

Data da radiografia de SF ___/___/___

Hipoplasia de frontal ___

Y - Sim

2– Não

Hipoplasia de esfenóide ___

Velamento maxilar à direita___

Velamento maxilar à esquerda ___

Outros ___

9- TC de Seios da Face:

Data da TC de SF ___/___/___

Hipoplasia de frontal ___

Y - Sim

2– Não

Hipoplasia de esfenóide ___

Velamento maxilar à direita___

Velamento maxilar à esquerda ___

Velamento etmoidal à direita ___

Velamento etmoidal à esquerda ___

Velamento esfenoidal à direita ___

Velamento esfenoidal à esquerda___

Desmineralização do proc. unciforme ___

(parede medial do maxilar)

Abaulamento medial da parede lateral ___

Concha bulhosa ___

ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Votopós:diligência.123

PROCESSO ETIC nº 209/03

Interessados:

Dr. **FLÁVIO BARBOSA NUNES**, otorrinolaringologista, mestre, doutorando
(pesquisador responsável).

Prof. **ROBERTO EUSTÁQUIO SANTOS GUIMARÃES**, orientador;

Dr **IVALDO NASCIMENTO**, co-orientador


Departamento: **Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia**

Unidade: **Faculdade de Medicina da UFMG**

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 17 de dezembro de 2003, após cumprida a diligência, o projeto de pesquisa intitulado « *Estudo Clínico-Imunológico e Pesquisa do Perfil das Citocinas em Pacientes Portadores de Polipose Nasossinusal Não-Eosinofílica Associada À Mucoviscidose* » .

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


Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco
Presidente do COEP/UFMG