



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JÚLIO CLÁUDIO SOUSA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM CULTURAS CELULARES
DERIVADAS DE PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS (ANTES E APÓS A AÇÃO
DO INTERFERON- α) E PESQUISA DE CÉLULAS NATURAL KILLER T
INVARIANTE (iNKT) EM PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS**

UBERABA - MG

2018

JÚLIO CLÁUDIO SOUSA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM CULTURAS CELULARES
DERIVADAS DE PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS (ANTES E APÓS A AÇÃO
DO INTERFERON- α) E PESQUISA DE CÉLULAS NATURAL KILLER T
INVARIANTE (iNKT) EM PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

UBERABA – MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação – CIP Brasil.

Catalogação na fonte

Sousa, Júlio Cláudio

S725a Avaliação do perfil de citocinas em culturas celulares derivadas de pólipos nasais eosinofílicos (antes e após a ação do interferon- α) e pesquisa de células natural killer t invariante (inkt) em pólipos nasais eosinofílicos. Júlio Cláudio Sousa. -- 2018
104 f.: fig.: quad.: tab.: graf.:

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

1. Polipose Nasal. 2. Citocina. 3. Interferon- α . I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Murta, Eddie Fernando Candido. III. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Título.

CDU 617.51

JÚLIO CLÁUDIO SOUSA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM CULTURAS CELULARES
DERIVADAS DE PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS (ANTES E APÓS A AÇÃO
DO INTERFERON- α) E PESQUISA DE CÉLULAS NATURAL KILLER T
INVARIANTE (iNKT) EM PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em _____ de _____ de 2018.

Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Orientadora

Prof. Dr. Júverson Alves Terra Júnior
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Membro da Banca Examinadora

Profa. Dra. Renata Margarida Etchebehere
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Membro da Banca Examinadora

Profa. Dra. Regina Helena Garcia Martins
Universidade Estadual Paulista
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr Richard Louis Voegels
Universidade de São Paulo
Membro da Banca Examinadora

*Aos meus pais, Paulo e Geralda, que sempre estiveram ao meu lado incentivando e
acolhendo-me nos momentos mais difíceis.*

Ao meu irmão, Thales, que é um amigo para todas as horas.

*À minha esposa, Karina, mulher com qual eu tenho compartilhado
minha vida há 28 anos.*

Às minhas filhas, Júlia e Laura, amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin, pela oportunidade, confiança e pelas orientações recebidas.

À Dra. Renata Margarida Etchebehere, pela colaboração no estudo histopatológico dos pólipos nasais.

À Profa. Dra. Maria Helena Castro Silva, pela avaliação pneumológica dos pacientes com polipose nasal.

Aos técnicos do IPON, Andjara e Cláudio, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Aos médicos assistentes da Disciplina de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da UFTM.

Aos alunos do IPON, em especial ao pós-graduando Eduardo, pela ajuda técnica e pelo companheirismo nesses anos de doutorado.

Aos funcionários do Ambulatório de Otorrinolaringologia da UFTM.

Ao secretário Júlio, do Departamento de Cirurgia da UFTM.

Aos pacientes que, gentilmente, concordaram em participar da pesquisa.

RESUMO

SOUSA, J. C. **Avaliação do perfil de citocinas em culturas celulares derivadas de pólipos nasais eosinofílicos (antes e após a ação do interferon- α) e pesquisa de células natural killer t invariante (iNKT) em pólipos nasais eosinofílicos.** 2018 104f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018.

Introdução: a rinossinusite crônica (RSC) é uma doença extremamente complexa e heterogênea caracterizada por inflamação na mucosa nasossinusal por mais de 12 semanas. Mostra-se bastante incidente na população geral e com relevante impacto na qualidade de vida desses pacientes, além de demandar elevados custos relacionados com seu tratamento. Atualmente, a RSC é classificada fenotipicamente em RSC sem pólipos nasais (RSCsPN) e RSC com pólipos nasais (RSCcPN). As bases moleculares e celulares desses dois fenótipos são distintas. Enquanto a RSCsPN caracteriza-se por padrão inflamatório Th1 com predomínio neutrofílico, 80% da RSCcPN, no Ocidente, exibe padrão inflamatório Th2 com predomínio eosinofílico. De acordo com os consensos vigentes, os corticosteroides, os antibióticos e a cirurgia constituem as principais alternativas terapêuticas. Entretanto, não raramente, essas possibilidades de tratamento falham por não atingirem o controle clínico adequado dos pacientes, em especial daqueles que apresentam padrão de citocinas Th2, intenso infiltrado eosinofílico e asma. Os interferons (IFNs) compreendem um conjunto de glicoproteínas que, devido às suas ações imunomoduladora, antiviral e antiproliferativa, são amplamente usadas no tratamento de vasta variedade de doenças crônicas. Também ocupam lugar definido no tratamento de doenças eosinofílicas, tornando-se uma opção em casos de pacientes refratários à corticoterapia ou, conjuntamente a essa, a fim de reduzir a dosagem do corticosteroide. **Objetivo:** esta pesquisa visa avaliar a ação do IFN- α sobre a produção da citocina Th2 subtipo IL-4, das citocinas Th1 subtipos IFN- γ e IL-2, das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- β e da citocina regulatória IL-10 em culturas celulares de pólipos nasais eosinofílicos, assim como detectar a presença de células iNKT e seus receptores de ativação (NKG2D) e de inibição (KIR) no tecido polipoide nasal. **Método:** foram realizadas culturas celulares a partir de amostras de tecido polipoide nasal coletadas de 13 pacientes com RSCcPN eosinofílica. Os pólipos foram considerados eosinofílicos segundo o exame histopatológico (>20 eosinófilos/campo de grande aumento). As culturas celulares

foram estimuladas com 3000 UI de IFN- α . As concentrações do IFN- γ , TNF- α e interleucinas 2, 4, 6 e 10 foram avaliadas, por citometria, no sobrenadante das culturas celulares, antes e após a estimulação com IFN- α . Avaliou-se também, a concentração de células iNKT e seus receptores NKG2D e KIR nas amostras de tecido polipoide nasal eosinofílico. **Resultados:** entre os pacientes da amostra, 61% eram homens. A média de idade do grupo era 53 anos. 46% dos pacientes eram asmáticos. Os pacientes apresentaram elevados valores para os índices de Lund-Mackay (média igual a 17 para total de 24) e Lund-Kennedy (média igual a 3,69 para total de 4). Houve diminuição significativa da concentração de IL-4 ($p = 0,0078$), em relação aos controles, 24 horas após a exposição das culturas à ação do IFN- α . Observou-se também que a redução da concentração de IL-4 foi significativamente mais intensa nas culturas avaliadas 24 horas após o estímulo do IFN- α , comparativamente às culturas avaliadas 12 horas após ($p = 0,0039$). Com relação à IL-6 ($p = 0,0186$), à IL-10 ($p = 0,0039$) e ao IFN- γ ($p = 0,0039$), as culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos apresentaram, relativamente aos controles, aumento significativo das suas concentrações, 24 horas após à ação do IFN- α . Notou-se também que a elevação da concentração destas citocinas foi significativamente mais relevante nas culturas avaliadas 24 horas após o estímulo do IFN- α , comparativamente às culturas avaliadas 12 horas após ($p = 0,0039$ para IL-6, $p = 0,0091$ para IL-10 e $p = 0,0269$ para IFN- γ). Ao que se refere às interleucinas IL-2 e TNF- α , não houve diferença significativa nas suas concentrações, em relação aos controles, após a estimulação das culturas com o IFN- α . Houve aumento significativo da concentração de células iNKT e seu receptor de ativação NKG2D no tecido polipoide nasal, em relação à mucosa sinusal de pacientes controle. Não houve diferença significativa na concentração do receptor de inibição KIR. **Conclusão:** a análise dos resultados demonstra que o IFN- α alterou o padrão de citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos. A estimulação das culturas com IFN- α produziu diminuição significativa da concentração da IL-4 (perfil Th2) e aumento significativo da IL-10 (perfil regulatório), do IFN- γ (perfil Th1) e da IL-6 (pró-inflamatória). Estas observações, em conjunto, sugerem que a ação do IFN- α , in vitro, promove um rebalanceamento dos perfis inflamatórios nas culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, favorecendo a expressão de citocinas Th1 e regulatórias, em detrimento das citocinas do padrão Th2. Os resultados demonstram também que o tecido polipoide

nasal eosinofílico apresenta, significativamente, maior população de células iNKT e seu receptor de ativação NKG2D, comparativamente à mucosa sinusal controle.

Palavras-chave: Polipose Nasal. Citocina. Interferon - α

ABSTRACT

SOUSA, J. C. **Evaluation of the cytokines profile in cellular cultures derived from eosinophilic ethanol polymers (before and after the action of interferon- α) and natural killer t invariant (iNKT) cell research in eosinophilic eosin polymers.** 2018 104f. Thesis (Doctorate in Health Sciences) - Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018.

Introduction: Chronic Rhinosinusitis (CRS) is an extremely complex and heterogeneous disease characterized by inflammation in the nasosinusal mucosa for more than 12 weeks. There is a significant incident in the general population and with a significant impact on the quality of life of these patients, in addition to demanding high costs related to their treatment. Currently, CRS is classified phenotypically in CRS without nasal polyps (CRSsNP) and CRS with nasal polyps (CRSsNP). The molecular and cellular bases of these two phenotypes are distinct. While CRSsNP is characterized by a Th1 inflammatory pattern with neutrophilic predominance, 80% of CRSsNP in the West exhibits a Th2 inflammatory pattern with eosinophilic predominance. According to the current consensus, corticosteroids, antibiotics and surgery are the main therapeutic alternatives. However, not infrequently, these treatment possibilities fail because they do not reach adequate clinical control of the patients, especially those with Th2 cytokine pattern, intense eosinophilic infiltrate and asthma. Interferons (IFNs) comprise a set of glycoproteins which, because of their immunomodulatory, antiviral and anti-proliferative actions, are widely used in the treatment of a wide variety of chronic diseases. They also occupy a definite place in the treatment of eosinophilic diseases, becoming an option in patient's refractory to corticoid therapy or, in conjunction with it, in order to reduce corticosteroid dosage.

Objective: This study aims to evaluate the action of IFN- α on the production of cytokine Th2 subtype IL-4, cytokines Th1 subtypes IFN- γ and IL-2, pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- β and regulatory cytokine IL -10 in cell cultures of eosinophilic nasal polyps, as well as to detect the presence of NKTi cells and their activation (NKG2D) and inhibitory (KIR) receptors in nasal polypoid tissue.

Method: Cell cultures were performed from samples of nasal polypoid tissue collected from 13 patients with eosinophilic CRSsNP. Polyps were considered eosinophilic according to histopathological examination (> 20 eosinophils / high magnification field). Cell cultures were stimulated with 3000 IU of IFN- α . Concentrations of IFN- γ , TNF- α and

interleukins 2, 4, 6 and 10 were assessed by cytometry in the supernatant of the cell cultures, before and after IFN- α stimulation. The concentration of NKTi cells and their NKG2D and KIR receptors in the samples of nasal polypoid eosinophilic tissue.

Results: Among the patients in the sample, 61% were men. The mean age of the group was 53 years. 46% of the patients were asthmatic. Patients presented high values for the Lund-Mackay indices (mean of 17 for a total of 24) and Lund-Kennedy (mean of 3.69 for a total of 4). There was a significant decrease in IL-4 concentration ($p = 0.0078$), compared to controls, 24 hours after exposure of the cultures to the action of IFN- α . It was also observed that the reduction of IL-4 concentration was significantly more intense in the cultures evaluated 24 hours after IFN- α stimulation, compared to cultures evaluated 12 hours later ($p = 0.0039$). With regard to IL-6 ($p = 0.0186$), IL-10 ($p = 0.0039$) and IFN- γ ($p = 0.0039$), cellular cultures of eosinophilic nasal polyps presented, relatively to the controls, a significant increase in their concentrations, 24 hours after the action of IFN- α . It was also noted that the elevation of these cytokines concentration was significantly more relevant in the cultures evaluated 24 hours after IFN- α stimulation, compared to the cultures evaluated 12 hours later ($p = 0.0039$ for IL-6, $p = 0, 0091$ for IL-10 and $p = 0.0269$ for IFN- γ). Concerning interleukins IL-2 and TNF- α , there was no significant difference in their concentrations, in relation to the controls, after the stimulation of cultures with IFN- α . There was a significant increase in the concentration of NKTi cells and their NKG2D activation receptor in the nasal polypoid tissue, in relation to the sinus mucosa of control patients. There was no significant difference in KIR inhibition receptor concentration.

Conclusion: Analysis of the results demonstrate that IFN- α altered the cytokine pattern in the supernatants of the cell cultures of the nasal eosinophilic polyps. Stimulation of IFN- α culture produced a significant decrease in IL-4 concentration (Th2 profile) and a significant increase in IL-10 (regulatory profile), IFN- γ (Th1 profile) and IL-6 (pro-inflammatory). These observations, together, suggest that the action of IFN- α , in vitro, promotes a rebalancing of inflammatory profiles in cell cultures of nasal eosinophilic polyps, favoring the expression of Th1 and regulatory cytokines, to the detriment of Th2 cytokines. The results also demonstrate that the eosinophilic nasal polypoid tissue has significantly larger population of NKTi cells and its activation receptor NKG2D, compared to the sinus mucosa control.

Key words: Nasal Polypoid. Cytokine. Interferon- α

RESUMEN

SOUSA, J. C. **Evaluación del perfil de citocinas en culturas celulares derivadas de pólipos nasales eosinofílicos (antes y después de la acción del interferon- α) e investigación de células natural killer t invariante (iNKT) en pólipos nasales eosinofílicos.** 2018 104f. Tesis (Doctorado en Ciencias de la Salud) - Universidad Federal del Triángulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018.

Introducción: la rinosinusitis crónica (RSC) es una enfermedad extremadamente compleja y heterogénea caracterizada por inflamación en la mucosa nasosinusal por más de 12 semanas. Se muestra bastante incidente en la población general y con relevante impacto en la calidad de vida de estos pacientes, además de demandar elevados costos relacionados con su tratamiento. Actualmente, la RSC se clasifica fenotípicamente en RSC sin pólipos nasales (RSCsPN) y RSC con pólipos nasales (RSCcPN). Las bases moleculares y celulares de estos dos fenotipos son distintas. Mientras que la RSCPN se caracteriza por el patrón inflamatorio Th1 con predominio neutrofílico, el 80% de la RSCcPN, en Occidente, exhibe el patrón inflamatorio Th2 con predominio eosinofílico. De acuerdo con los consensos vigentes, los corticosteroides, los antibióticos y la cirugía constituyen las principales alternativas terapéuticas. Sin embargo, no raramente, estas posibilidades de tratamiento fallan por no alcanzar el control clínico adecuado de los pacientes, en especial de aquellos que presentan patrón de citocinas Th2, intenso infiltrado eosinofílico y asma. Los interferones (IFN) comprenden un conjunto de glicoproteínas que, debido a sus acciones inmunomoduladora, antiviral y antiproliferativa, son ampliamente usadas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades crónicas. También ocupan lugar definido en el tratamiento de enfermedades eosinofílicas, convirtiéndose en una opción en casos de pacientes refractarios a la corticoterapia o, conjuntamente a esa, a fin de reducir la dosificación del corticoesteroide. **Objetivo:** Esta investigación pretende evaluar la acción del IFN- α sobre la producción de la citocina Th2 subtipo IL-4, de las citocinas Th1 subtipos IFN- γ e IL-2, de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- β y de la citocina en los cultivos celulares de pólipos nasales eosinofílicos, así como detectar la presencia de células iNKT y sus receptores de activación (NKG2D) y de inhibición (KIR) en el tejido polipoide nasal. **Método:** Se realizaron cultivos celulares a partir de muestras de tejido polipoide nasal recogidas de 13 pacientes con RSCcPN eosinofílica. Los pólipos fueron considerados eosinofílicos según el

examen histopatológico (> 20 eosinófilos / campo de gran aumento). Los cultivos celulares fueron estimulados con 3000 UI de IFN- α . Las concentraciones de IFN- γ , TNF- α e interleucinas 2, 4, 6 y 10 se evaluaron por citometría en el sobrenadante de los cultivos celulares, antes y después de la estimulación con IFN- α . Se evaluó también la concentración de células iNKT y sus receptores NKG2D y KIR en las muestras de tejido polipoide nasal eosinofílico. **Resultados:** Entre los pacientes de la muestra, el 61% eran hombres. El promedio de edad del grupo era de 53 años. El 46% de los pacientes eran asmáticos. Los pacientes presentaron altos valores para los índices de Lund-Mackay (media igual a 17 para total de 24) y Lund-Kennedy (media igual a 3,69 para total de 4). Se observó una disminución significativa de la concentración de IL-4 ($p = 0,0078$), en relación a los controles, 24 horas después de la exposición de los cultivos a la acción del IFN- α . Se observó también que la reducción de la concentración de IL-4 fue significativamente más intensa en los cultivos evaluados 24 horas después del estímulo del IFN- α , en comparación con los cultivos evaluados 12 horas después ($p = 0,0039$). En cuanto a la IL-6 ($p = 0,0186$), a la IL-10 ($p = 0,0039$) y al IFN- γ ($p = 0,0039$), los cultivos celulares de los pólipos nasales eosinofílicos presentaron, aumento significativo de sus concentraciones, 24 horas después de la acción del IFN- α . Se observó también que la elevación de la concentración de estas citocinas fue significativamente más relevante en los cultivos evaluados 24 horas después del estímulo del IFN- α , en comparación con los cultivos evaluados 12 horas después ($p = 0,0039$ para IL-6, $p = 0,0091$ para IL-10 e $p = 0,0269$ para IFN- γ). En lo que se refiere a las interleucinas IL-2 y TNF- α , no hubo diferencia significativa en sus concentraciones, en relación a los controles, después de la estimulación de los cultivos con el IFN- α . Se observó un aumento significativo de la concentración de células iNKT y su receptor de activación NKG2D en el tejido polipoide nasal, en relación con la mucosa sinusal de pacientes control. No hubo diferencia significativa en la concentración del receptor de inhibición KIR. **Conclusión:** El análisis de los resultados demuestra que el IFN- α alteró el patrón de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares de los pólipos nasales eosinofílicos. La estimulación de los cultivos con IFN- α produjo una disminución significativa de la concentración de IL-4 (perfil Th2) y un aumento significativo de la IL-10 (perfil regulatorio), del IFN- γ (perfil Th1) y de la IL-6 (pro-inflamatoria). Estas observaciones, en conjunto, sugieren que la acción del IFN- α , in vitro, promueve un rebalanceamiento de los perfiles inflamatorios en los cultivos celulares de los pólipos

nasales eosinofílicos, favoreciendo la expresión de citocinas Th1 y regulatorias, en detrimento de las citocinas del patrón Th2. Los resultados demuestran también que el tejido polipoide nasal eosinofílico presenta significativamente mayor población de células iNKT y su receptor de activación NKG2D, en comparación con la mucosa sinusal control.

Palabras-clave: Pólipos Nasales. La citocina. Interferones - α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mucosa sinusal demonstrando as proteínas envolvidas com as ligações intercelulares do epitélio respiratório.....	36
Figura 2	Citocinas liberadas pelo epitélio respiratório nasal que potencializam a resposta inflamatória Th2 culminando no recrutamento de eosinófilos em pacientes com RSCcPN eosinofílica.....	42
Figura 3	Fisiopatologia da RSCcPN eosinofílica.....	52
Figura 4	Vias de sinalização dos interferons tipo I.....	55
Figura 5	Vias de sinalização do interferon tipo II.....	56
Figura 6	Tecido polipoide nasal corado em hematoxilina e eosina. Infiltração eosinofílica predominante nos pacientes com RSCcPN eosinofílica (A). Infiltrado inflamatório sem predominância eosinofílica nos pacientes com RSCcPN não eosinofílica (B) (400x).....	68
Figura 7	Variedade fenotípica e funcional das células NK.....	78
Figura 8	Participação das células iNKT/Th2 like no modelo imunológico da asma.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	A-C Valores da porcentagem de gate das células natural killer T invariáveis (iNKT) (A) e dos seus receptores de ativação, NKG2D (B) e inibição, KIR (C).....	69
Gráfico 2	A/F- Concentração de citocinas em sobrenadantes de culturas celulares de pólipos nasais eosinofílicos, após 12 e 24 horas de estimulação com IFN- α	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características dos IFNs humanos.....	54
Quadro 2	Atividades biológicas dos interferons.....	57
Quadro 3	Marcadores extracelulares.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características da amostra.....	67
Tabela 2	Valores das medianas, máximo e mínimo das concentrações das interleucinas dosadas nos sobrenadantes das culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAFF	Fator de ativação de células B da família TNF
CBA	Citometric bead array
CCL1	C-C motif chemokine ligant 1
CCL18	C-C motif chemokine ligant 18
CCL23	C-C motif chemokine ligant 23
CCR3	Chemokine receptor 3
CD	Cluster differentiation
CGA	Campo de grande aumento
CVF	Capacidade vital forçada
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligant 12
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligant 13
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DCs	Células dendríticas
EBl2	Proteína 2 induzida-Epstein-Barr vírus
ECP	Proteína Catiônica eosinofílica
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FoxJ 1	Forkhead box j
FoxP3	Forkhead box 3
GAS	Sequência ativada gama
GATA 3	Fator de transcrição “trans” codificado pelo gene gata 3
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito macrófago
HCV	Vírus da hepatite C
HE	Hematoxilina eosina
IFN	Interferon
IFNAR1	Receptor 1 de ativação de interferon
IFNAR2	Receptor 2 de ativação de interferon
IFNGR1	Receptor alfa do interferon gama
IFNGR2	Receptor beta do interferon gama
IFNLR1	Receptor 1 do interferon lambida
IFNLR2	Receptor 2 do interferon lambida
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-25R	Receptor da interleucina 25

IL-33R	Receptor da interleucina 33
ILC	Célula linfóide inata
iNKT	Natural killer T invariante
IPON	Instituto de pesquisa em oncologia
IRF9	Fator regulador de interferon 9
ISGF3	Fator do gene estimulado por interferon
ISRE	Elemento de resposta interferon sensível
JAK 1	Janus quinase 1
k	Kappa
KIR	Killer immunoglobulin-like receptor
MCP4	Proteína quimiotática de monócitos 4
mDCs	Células Dendríticas Mielóides
MHC	Major Histocompatibility Complex
mL	Mililitro
MUC5AC	Mucina 5AC
NK	Natural Killer
NKG2D	Natural killer group 2D
ORL	Otorrinolaringologia
p	Probability
PAMP	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PBS	Phosphate buffered saline
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
PEG	Peguilato
pg	Picograma
PKR	Proteinoquinase
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RANTES	Regulated on activation normal T expressed and secreted
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell park memorial institute
RSC	Rinossinusite crônica
RSCcPN	Rinossinusite crônica com polipose nasal
RSCsPN	Rinossinusite crônica sem polipose nasal
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
sgp130	Glicoproteína solúvel 130
SHI	Síndrome Hipereosinofílica Idiopática

sIL-6R	Receptor solúvel da IL-6
SPLUNC	Short palate lung and nasal epithelium clone
STAT	Transdutores de sinais e ativadores da transcrição
TCR	Receptor de célula T
TCSP	Tomografia computadorizada dos seios paranasais
TGF	Fator transformador do crescimento
Th	Linfócito T auxiliar ou helper
TLR	Receptores semelhantes à Toll
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual
Treg	T regulatório
TSLP	Linfopoietina estromal tímica
TYK2	Tirosinoquinase 2
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VCAM	Molécula de adesão da célula vascular
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
°C	Grau Celsius
α	Alfa
α2PI	Inibidor da plasmina α2
β	Beta
γ	Gama
λ	Lambda
ω	Ômega

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVOS GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3	REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1	RINOSSINUSITE CRÔNICA COM POLIPOSE NASAL EOSINOFÍLICA.....	30
3.1.1	Conceito e epidemiologia	30
3.1.2	Fisiopatogenia	32
3.1.2.1	<i>A ação do microbioma</i>	32
3.1.2.2	<i>A barreira epitelial</i>	35
3.1.2.3	<i>Células efectoras da imunidade inata</i>	42
3.1.2.4	<i>Células efectoras da imunidade adaptativa</i>	49
3.1.2.5	<i>Remodelação tecidual</i>	50
3.1.3	Interferon	53
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	59
4.2	FORMATAÇÃO GERAL DO ESTUDO.....	60
4.3	BIÓPSIA DO PÓLIPO NASAL E DA MUCOSA SINUSAL CONTROLE	61
4.4.	AVALIAÇÃO E ESTADIAMENTO DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DOS SEIOS PARANASAIS (TCSP) E DA ENDOSCOPIA NASAL.....	62
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA ASMA.....	62
4.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DA EOSINOFILIA.....	63
4.7	MEIO DE CULTURA UTILIZADO.....	63
4.8	PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER T INVARIANTE (INKT) E SEUS RECEPTORES DE ATIVAÇÃO (NKG2D) E INIBIÇÃO (KIR) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	63
4.9	QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA).....	65
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
5	RESULTADOS	67
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	67

5.2	ANÁLISE DAS CÉLULAS NATURAL KILLER T INVARIANTES (INKT) E SEUS RECEPTORES DE ATIVAÇÃO (NKG2D) E INIBIÇÃO (KIR) NOS PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS.....	68
5.3	ANÁLISE DAS CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS CELULARES DOS PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS, ANTES E APÓS A AÇÃO DO INTERFERON-A.....	71
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	APÊNDICES.....	102
	APÊNDICE A - Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para sujeitos maiores de idade.....	102
	APÊNDICE B - Termo de consentimento livre, após esclarecimento.....	104

1 INTRODUÇÃO

A rinossinusite crônica (RSC) é uma doença multifatorial complexa, que se caracteriza por uma inflamação da mucosa nasossinusal por pelo menos 12 semanas. Clinicamente, exige a presença de pelo menos dois dos seguintes sinais e sintomas: obstrução (congestão) nasal, secreção anterior ou posterior, dor ou pressão facial, perda ou redução do olfato. Necessariamente, um dos sinais e sintomas deve ser obstrução (congestão) nasal ou secreção anterior ou posterior. Os achados endoscópicos nasais de pólipos, e/ou secreção, e/ou edema de meato médio, assim como os achados tomográficos de alterações da mucosa no complexo osteomeatal ou nos seios paranasais, corroboram com o diagnóstico dessa doença (FOKKENS et al., 2012b).

A prevalência da RSC na população geral é elevada, assim como são elevados os custos, diretos e indiretos, relacionados ao seu tratamento. Conhecer a real prevalência da RSC na população geral é um desafio para os estudos epidemiológicos, uma vez que seu diagnóstico é baseado em sintomas subjetivos atrelados ao reconhecimento objetivo de inflamação tecidual. Entretanto, os métodos para reconhecer objetivamente a inflamação tecidual, na maioria das vezes, não estão disponíveis em larga escala. Logo, os estudos populacionais de prevalência baseiam-se amplamente em questionários que avaliam a questão subjetiva dos sintomas. Um estudo europeu, avaliando 57.128 indivíduos adultos de 12 países, encontrou uma prevalência geral de 10,9%, com importante variação geográfica de 7% a 27% (HASTAN et al., 2011).

Durante pesquisa nacional de saúde em 2012, avaliando-se 34.525 indivíduos americanos, 12% dos entrevistados afirmaram terem recebido o diagnóstico de sinusite no ano anterior (BLACKWELL; LUCAS; CLARKE, 2014). No continente asiático, pesquisadores chineses avaliaram 10.636 indivíduos de sete cidades da China continental, encontrando uma prevalência de 8% e variação de 4,8% e 9,7% (SHI et al., 2015). A prevalência de RSC na cidade de São Paulo foi de 5,51%, segundo estudo que entrevistou 2003 indivíduos (PILAN et al., 2012).

Uma revisão sistemática, realizada em 2014, nos Estados Unidos, avaliou os custos diretos e indiretos relacionados com os vários aspectos do manejo da RSC. Segundo esse estudo, o sistema de saúde americano gasta entre 6,9 a 9,9 bilhões

de dólares em custos diretos e 13 bilhões em custos indiretos, ao ano, na assistência aos pacientes com RSC (SMITH; ORLANDI; RUDMIK, 2015).

Com os objetivos de avaliar os pacientes com RSC e padronizar ações terapêuticas, tradicionalmente, distinguem-se a RSC em duas apresentações clínicas: rinossinusite crônica sem polipose nasossinusal (RSCsPN) e rinossinusite crônica com polipose nasossinusal (RSCcPN) (FOKKENS et al., 2012b). Entretanto, na prática clínica, reconhecem-se importantes fenótipos da RSC, tais como: RSC infecciosa, RSC fúngica alérgica, RSC com doença respiratória exacerbada pela Aspirina, RSC com fibrose cística, RSC não eosinofílica e RSC eosinofílica (PAYNE; BORISH; STEINKE, 2011; STEINKE; BORISH, 2016). A distinção da RSC em RSCsPN e RSCcPN foi norteadada, em grande parte, pelos achados que indicavam a associação entre pólipos nasais e eosinofilia tecidual. De fato, vários estudos tem demonstrado que há uma predominância de eosinófilos nos pólipos nasais encontrados nos pacientes ocidentais com RSCcPN (POLZEHL et al., 2006; VAN ZELE et al., 2006; PAYNE et al., 2011).

Entretanto, a presença e a extensão desta eosinofilia podem variar extremamente, encontrando-se subgrupos de pacientes com RSCcPN onde não há predomínio de eosinófilos. Em países asiáticos, como China, Coréia e Japão, diversos trabalhos tem demonstrado ausência de predomínio eosinofílico nos pacientes com RSCcPN (CAO et al., 2009; YOSHIMURA et al., 2011; IKEDA et al., 2013).

Diante da compreensão dessa heterogeneidade fenotípica, e por entender que a caracterização fenotípica não prevê um completo esclarecimento da fisiopatologia celular e molecular subjacente, os avanços no conhecimento da RSC têm caminhado na direção de que essa doença seria constituída de subtipos biológicos, ou endótipos, os quais poderiam ser identificados por meio de biomarcadores.

Sob a perspectiva molecular e celular, inicialmente, associou-se a RSCcPN a um padrão inflamatório caracterizado por uma predominância de linfócitos T helper 2 (Th2) com aumento da expressão de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 13 (IL-13), fator de transcrição “trans” codificado pelo gene gata 3 (GATA-3) , imunoglobulina E (IgE) e proteína catiônica eosinofílica (ECP)(VAN ZELE et al., 2006; VAN BRUAENE et al., 2008). Por outro lado, na RSCsPN, haveria predomínio de linfócitos T helper 1 (Th1) com aumento de fator de transformação do

crescimento do tipo beta (TGF- β), interferon gama (IFN- γ) e diminuição da ECP (VAN ZELE et al., 2006; VAN BRUAENE et al., 2009).

Mais recentemente, várias pesquisas têm demonstrado que a polarização entre Th2/RSCcPN e Th1/RSCsPN não representa, na plenitude, o universo molecular no qual está inserido a RSC. Diversas interleucinas, como interleucina 17A (IL-17A), interleucina 21 (IL-21), interleucina 22 (IL-22), interleucina 33 (IL-33), interleucina 25 (IL-25) e interleucina 32 (IL-32), já foram detectadas, em maior expressão, no tecido dos pacientes com RSC. Assim, houve uma expansão dos endótipos da RSC, envolvendo também perfis celulares e moleculares T helper 17 (Th17) e T helper 22 (Th22) (TOMASSEN et al., 2016; SCHECKENBACH; WAGENMANN, 2016; SUN; OUYANG; LUO, 2017)

A abordagem terapêutica da RSC se apoia nos tratamentos clínico e cirúrgico. No que diz respeito ao tratamento clínico, vários fármacos já foram testados. Entretanto, apenas os corticosteroides tópicos e orais, assim como os antibióticos, encontram, na literatura, grau de evidência elevado e forte recomendação. Devido sua relevante ação antiinflamatória, o corticosteroide é a mais efetiva opção no controle inflamatório da RSC. O corticosteroide tópico demonstra efeitos satisfatórios sobre os sintomas dos pacientes com RSCsPN. Além disso, é capaz de melhorar o tamanho dos pólipos e a obstrução nasal nos pacientes com RSCcPN. O corticosteroide oral também exerce potente ação antiinflamatória, entretanto, devido aos possíveis efeitos colaterais, é recomendado por curto intervalo de tempo. Na medida em que a possibilidade de efeitos colaterais aumenta com o tempo de tratamento e com a dose utilizada, tratamentos longos e com altas doses de corticosteroide via oral devem ser desencorajados. O tratamento cirúrgico da RSC pode ser considerado quando não há melhora da sintomatologia, a despeito do máximo tratamento clínico (FOKKENS et al., 2012b; PETERS et al., 2014).

Uma vez que a RSC apresenta uma diversidade de fenótipos e endótipos, tanto o tratamento clínico quanto o cirúrgico não garantem homogeneidade com relação ao controle dos sintomas da doença. Diante do arsenal terapêutico de que se dispõe no momento, cerca de 38% a 51% dos pacientes com RSC ainda falham em responder ao tratamento proposto (LAL; SCIANNA; STANKIEWICZ, 2009; BAGULEY et al., 2014).

Em especial para um grupo de pacientes com RSCcPN, eosinofilia tecidual, perfil Th2 e asma, o controle clínico da doença torna-se tarefa de difícil alcance (VAN ZELE et al., 2014).

Recentemente, um estudo prospectivo multicêntrico revelou que 35% dos pacientes com RSCcPN apresentaram recidiva pós-operatória dos pólipos em seis meses de seguimento (DECONDE et al., 2017). Assim, torna-se evidente que, apesar de todo arsenal terapêutico disponível até o momento, o tratamento da RSC não atende às necessidades de todos os pacientes.

No caso da RSCcPN, novos alvos terapêuticos têm sido desenvolvidos, ancorados na caracterização das bases celular e molecular envolvidas na imunopatologia da RSCcPN. Sabe-se que a maioria dos casos de RSCcPN tem como sustentação uma predominância celular inflamatória do tipo Th2, com envolvimento de citocinas, IL-4, IL-5, IL-13, eosinófilos e IgE (TOMASSEN et al., 2016). Isso torna as citocinas Th2 e as células inflamatórias associadas e seus produtos, alvos perfeitos para intervenções terapêuticas mais recentes e inovadoras.

Um estudo duplo-cego, randomizado e placebo controlado, avaliou a ação do anticorpo monoclonal omalizumabe, um anticorpo com grande afinidade pela IgE livre, em pacientes alérgicos e não alérgicos com polipose nasal e asma. Os resultados mostraram significativa redução no tamanho dos pólipos e melhora das imagens tomográficas, das queixas de obstrução nasal, da rinorréia anterior e da anosmia (GEVAERT et al., 2013).

Tendo como alvo a IL-5, um estudo duplo-cego, placebo controlado, foi realizado avaliando a ação do mepolizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado específico contra IL-5 humana livre, em pacientes com polipose nasal severa, refratários ao tratamento com corticosteroide. Houve diferença significativa no tamanho dos pólipos, assim como nas avaliações das imagens tomográficas (GEVAERT et al., 2011).

Recentemente, um estudo duplo-cego, placebo controlado e randomizado, avaliou os efeitos do dupilumabe, um anticorpo monoclonal humanizado contra a subunidade alfa do receptor da IL-4, que interfere tanto na via da IL-4 quanto da IL-13, em 60 pacientes com polipose nasal bilateral, refratários ao tratamento com corticosteroide tópico. No grupo tratado, o escore endoscópico dos pólipos nasais, o escore da tomografia, e cada um dos sintomas típicos, bem como as medições de

fluxo nasal, melhoraram significativamente em comparação ao grupo placebo (BACHERT et al., 2016).

Os interferons (IFNs) compreendem um conjunto de glicoproteínas que, devido suas ações imunomoduladora, antiviral e antiproliferativa, são amplamente usadas no tratamento de uma vasta variedade de doenças crônicas, incluindo esclerose múltipla, infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e certos tipos de câncer. Também ocupam lugar definido no tratamento de doenças eosinofílicas, como a Síndrome Hipereosinofílica Idiopática (SHI), tornando-se uma opção de tratamento nos casos de pacientes refratários a corticoterapia ou em conjunto com a corticoterapia a fim de reduzir a dosagem desta (GOTLIB, 2015).

Diante desse contexto, esta pesquisa se propõe a avaliar a ação imunológica do Interferon- α (IFN- α), *in vitro*, frente a uma patologia essencialmente eosinofílica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- a) Avaliar a ação do interferon- α , *in vitro*, em culturas celulares derivadas de pólipos nasais eosinofílicos.
- b) Avaliar a presença de células Natural Killer T invariante (iNKT) e seus receptores de ativação e inibição nos pólipos nasais eosinofílicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar a alteração da expressão das interleucinas IL-4, IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-6 e IL-10 em culturas celulares de pólipos nasais eosinofílicos estimulados com interferon- α .
- b) Identificar e quantificar células Natural Killer T invariante e seus receptores de ativação (natural killer group 2D - NKG2D) e de inibição (killer immunoglobulin-like receptor - KIR) em pólipos nasais eosinofílicos, comparando os resultados com os de tecido sinusal de indivíduos controle.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RINOSSINUSITE CRÔNICA COM POLIPOSE NASAL EOSINOFÍLICA

3.1.1 Conceito e epidemiologia

A RSCcPN eosinofílica corresponde a uma fração dos casos de RSCcPN onde há predomínio tecidual de eosinófilos. Estudos indicam que cerca de 70 a 90% dos casos de RSCcPN, nos países ocidentais, apresentam predominância de eosinófilos nos pólipos nasais (RUDACK; SACHSE; ALBERTY, 2004; CINGI; DEMIRBAS; URAL, 2011; FOKKENS et al., 2012b).

Alguns fenótipos bem específicos da RSC, como rinosinusite crônica fúngica alérgica e rinosinusite crônica com doença respiratória exacerbada pela aspirina, expressam-se com polipose nasal eosinofílica (PORTER et al., 2014; STEINKE; BORISH, 2015).

Entretanto, será avaliado neste estudo, um endótipo caracterizado por polipose nasal eosinofílica excetuando a RSC fúngica alérgica e a RSC com doença respiratória exacerbada pela aspirina. Há, na literatura, outras nomenclaturas referentes à RSCcPN eosinofílica, tais como RSC eosinofílica idiopática e RSC eosinofílica hiperplásica (PAYNE; BORISH; STEINKE, 2011; STEINKE; BORISH, 2016).

Clinicamente, os pacientes com RSCcPN queixam-se, preferencialmente, de obstrução nasal, hiposmia/anosmia, rinorréia, gotejamento pós nasal, cefaleia, dor facial e distúrbio do sono. O exame intranasal revela tumoração polipoide bilateral, móvel, acinzentada, amolecida e parcialmente translúcida, que usualmente se origina do seio etmoidal e meato médio (GEORGY; PETERS, 2012).

Os pólipos nasais, de modo geral, acometem de 1 a 4% da população, ocorrendo em todas as raças, tendo uma predominância masculina e sendo mais comum após os 40 anos de idade. Na adolescência, sua ocorrência é rara e, no contexto pediátrico, deve-se, necessariamente, levantar a hipótese de fibrose cística (SETTIPANE; PETERS; CHIU, 2013).

Dentre todas as doenças relacionadas com RSCcPN, a asma é a associação mais comum. Aproximadamente 20 a 60% dos pacientes com polipose nasal

apresentam asma (KLOSSEK et al., 2005), e cerca de sete a 25% dos pacientes com asma tem polipose nasal (AHMADIAFSHAR et al., 2012).

Durante a evolução natural dessa combinação, uma história clínica de polipose nasal usualmente precede a asma e cerca de 45% dos pacientes com polipose nasal desenvolvem asma (JARVIS et al., 2012).

Em recente avaliação de pacientes com RSCcPN e asma comórbida, foram identificados pólipos eosinofílicos em 64% dos casos. Ainda, os pacientes com RSCcPN eosinofílica apresentaram, significativamente, maior taxa de recorrência dos pólipos após tratamento, asma comórbida mais severa, maiores índices de óxido nítrico exalado, maiores índices de IgE e maior eosinofilia periférica (WU et al., 2017).

Muitas similaridades histológicas e imunológicas tem sido encontradas entre a RSCcPN eosinofílica e a asma, fazendo alguns autores sugerirem que estas patologias corresponderiam ao mesmo processo acometendo as vias aéreas superior e inferior (PONIKAU et al., 2003).

A relação entre atopia e RSCcPN tem sido foco de vários estudos. Embora a porcentagem de pacientes com polipose nasal seja similar entre a população de pacientes com rinite alérgica e a população geral (0,5% e 4,5%) (FOKKENS et al., 2012b), cerca de 51 a 86% dos pacientes com RSCcPN são sensíveis a pelo menos um alérgeno (BATRA; TONG; CITARDI, 2013).

No caso específico da RSCcPN eosinofílica, encontra-se uma maior associação com a sensibilização alérgica (atopia). Isso tem suscitado questionamentos a respeito da causalidade entre RSCcPN eosinofílica e alergia, ou se a presença de alergia nos pacientes com RSCcPN eosinofílica simplesmente refletiria uma coincidência entre duas condições clínicas relativamente comuns. As teorias que vinculam a rinite alérgica à RSCcPN eosinofílica o fazem por meio das hipóteses de reação alérgica direta, de inflamação alérgica sistêmica ou de reação de sensibilização a patógenos colonizadores dos seios paranasais (KENNEDY; BORISH, 2013).

3.1.2 Fisiopatologia

3.1.2.1 A Ação do Microbioma

Sabe-se que as fossas nasais, assim como os seios paranasais, dos pacientes com RSCcPN são colonizados por uma microflora composta de fungos e bactérias. Entretanto, a real participação desses agentes na fisiopatogenia da RSCcPN ainda permanece em investigação. Atualmente, as pesquisas têm concentrado seus esforços na tentativa de esclarecer a ação dos fungos, dos superantígenos do *Staphylococcus aureus* e dos biofilmes.

A teoria fúngica da RSC foi incitada por Ponikau et al. (1999) ao sugerirem que a exposição e colonização da via aérea superior, por determinados fungos, poderia desencadear uma reação eosinofílica submucosa na ausência de uma reação de hipersensibilidade tipo I. Os autores sustentaram suas afirmações baseados no fato de que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com RSC, quando expostas a fungos, particularmente da espécie *Alternaria*, exibiam intensa reação inflamatória Th1 e Th2, o que não foi visualizado nos indivíduos controle. Assim, segundo os autores, a infiltração eosinofílica na RSC seria resultado de uma reação inflamatória anômala aos fungos colonizadores da via aérea superior (PONIKAU et al., 1999; SHIN et al., 2004).

Entretanto, contrariando a teoria fúngica da RSC, outros trabalhos não confirmaram as hipóteses levantadas inicialmente por Ponikau et al. (1999).

Douglas et al. (2007) avaliaram a resposta imunológica de linfócitos de sangue periférico de pacientes com RSCcPN, RSCsPN e indivíduos controle, frente à exposição a extratos fúngicos. Os autores mediram a expressão de IL-5 e IFN- γ pelos linfócitos em cultura celular. Segundo os autores, não houve diferença na expressão dessas interleucinas quando comparados os pacientes com RSC e os indivíduos controle. Também, Orlandi et al. (2009) não evidenciaram aumento da expressão das interleucinas IL-5, IL-4, IL-13 e IFN- γ nas culturas de linfócitos, isolados de sangue periférico, expostos a extratos fúngicos.

Outro fato que se mostra contrário à teoria fúngica da RSC refere-se aos ensaios clínicos que objetivaram realizar o tratamento de pacientes com RSC utilizando antifúngicos.

Ebbens et al. (2009) realizaram um estudo multicêntrico, duplo-cego, placebo controlado, em pacientes com RSCsPN e RSCcPN, avaliando o efeito tópico da anfotericina B, por 12 semanas, sobre os níveis de várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento pró inflamatórios na amostra de lavado nasal. Os autores não encontraram nenhuma alteração significativa na expressão desses marcadores inflamatórios sob a ação da anfotericina B.

Uma revisão sistemática, sujeita à metanálise, realizada por Isaacs et al. (2011) avaliou o efeito tópico da anfotericina B no tratamento da RSC. Os autores selecionaram trabalhos que eram placebo controlados e que avaliavam desfechos tomográfico, endoscópico e clínico. Segundo os autores, a revisão da literatura não sustenta o uso tópico de anfotericina B no tratamento de pacientes com RSC. Também, o tratamento da RSC com antifúngico sistêmico não forneceu amparo à teoria fúngica da RSC.

Kennedy et al. (2005) realizaram um estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, avaliando a ação da terbinafina sistêmica no tratamento de pacientes com RSC. Os autores analisaram os resultados tomográfico e clínico, observando ineficiência da terbinafina em promover melhora desses pacientes.

Embora haja falta de sustentação imunológica convincente e ausência de evidências de melhora em pacientes com RSC tratados com antifúngicos, contrariando a ideia dos fungos como agentes etiológicos universais da RSC, atualmente, entendem-se os fungos como potenciais modificadores da doença inflamatória nasossinusal em indivíduos predispostos (FOKKENS et al., 2012a).

Outro componente do microbioma das fossas nasais, que tem sido foco de pesquisas na fisiopatologia da RSCcPN, refere-se ao *Staphylococcus aureus* (SA). As investigações têm sugerido que o SA, colonizador do ambiente nasal, secreta enterotoxinas, que exerceriam ação como superantígenos, amplificando a inflamação eosinofílica local e fomentando o desenvolvimento de pólipos (BACHERT et al., 2008).

Van Zele et al. (2004) avaliaram a taxa de colonização de SA, assim como a produção local de IgE específica contra as enterotoxinas do SA, no meato médio de indivíduos controle, no meato médio de indivíduos com RSCsPN e nos pólipos nasais de indivíduos com RSCcPN. Segundo os autores, a taxa de colonização foi de 33,33% para o grupo controle, 27,3% para RSCsPN e 63,6% para RSCcPN.

Também, a dosagem de IgE específica contra as enterotoxinas do SA revelou a mesma proporção da taxa de colonização deste, porém, com valores menores.

Sachse et al. (2010) utilizando técnica de hibridização *in situ*, pesquisaram a presença de SA invadindo as células epiteliais da mucosa nasal de pacientes com RSCcPN, de pacientes com RSCsPN e de indivíduos controle. De acordo com os resultados, há um aumento significativo na presença de SA no grupo dos pacientes com RSCcPN em relação ao grupo controle e ao grupo dos pacientes com RSCsP.

Estudos *in vitro* sugerem que as enterotoxinas liberadas pelo SA têm potencial de induzir resposta inflamatória Th2, criando um ambiente favorável à infiltração eosinofílica.

Patou et al. (2008), analisando o sobrenadante de culturas celulares derivadas de pólipos de pacientes com RSCcPN e de corneto inferior de indivíduos controle, determinaram os níveis de várias citocinas pró-inflamatórias após estímulo com a enterotoxina B do SA. Os autores verificaram que, após 24 horas de estímulo, houve aumento das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, tanto nas culturas dos pólipos quanto na dos cornetos inferiores. No entanto, esse acréscimo foi significativamente maior na cultura dos pólipos. Durante a análise do aumento relativo das citocinas, percebeu-se que, na cultura dos pólipos, houve predominância das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-2, sugerindo claramente polarização na direção de um perfil Th2.

Todas essas evidências sugerem a atuação do SA e seus superantígenos como moduladores e amplificadores da resposta inflamatória na RSCcPN. Entretanto, a relação entre o SA e a etiologia da RSCcPN carece de confirmação, uma vez que a taxa de colonização pelo SA encontrada na RSCcPN é cerca de 65% e a proporção de pacientes com RSCcPN com IgE específica contra as enterotoxinas do SA está em torno de 50% (HSU; PETERS, 2011).

As bactérias que colonizam a superfície mucosa do nariz e seios paranasais podem se apresentar de forma planctônica, como unidades unicelulares, ou organizadas em comunidades denominadas biofilmes. O biofilme é um agrupamento de microorganismos altamente complexo e organizado, que se adere irreversivelmente às superfícies inerte ou viva. As próprias bactérias produzem uma matriz polimérica extracelular, composta por polissacarídeos, proteínas e ácido nucleico, que envolve tais microorganismos e compõem 90% da massa do biofilme. Esse modo de organização celular torna o biofilme extremamente resistente aos

mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como à ação dos antibióticos (COHEN et al., 2009).

Com relação à fisiopatogenia da RSCcPN, no que tange especificamente à participação dos biofilmes, as pesquisas são escassas. Zernotti et al. (2010) avaliaram 12 pacientes com RSCcPN submetidos à cirurgia endoscópica, e encontraram a presença de biofilme em 75% dos casos. Bezerra et al. (2009) também verificaram o biofilme em 55,6% dos espécimes coletados da bula etmoidal de pacientes com RSCcPN.

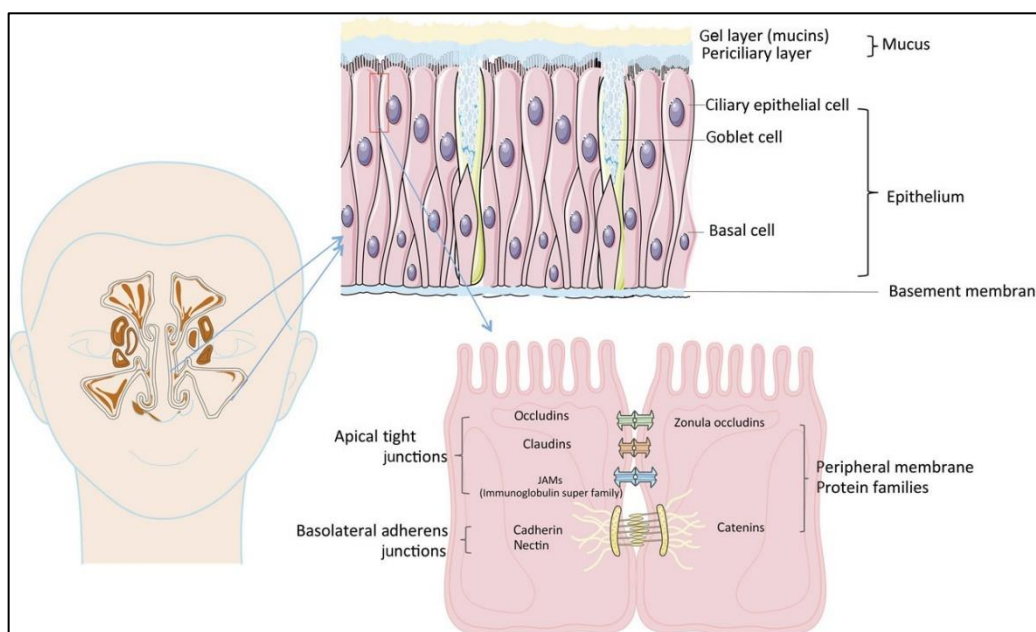
Foreman et al. (2011) estudando pacientes com RSCcPN, observaram que a presença de biofilme de SA associava-se a uma resposta inflamatória Th2 com predomínio eosinofílico, independente da presença de superantígenos. Assim, a literatura demonstra associação entre o biofilme e a polipose nasal. Porém, ainda é pobre ao tentar explicar quais são os mecanismos envolvidos nessa relação.

3.1.2.2 A barreira epitelial

O epitélio respiratório constitui uma barreira entre o ambiente externo e o meio interno, representando a primeira linha de defesa contra antígenos e microrganismos patogênicos. A preservação da sua integridade é de fundamental importância para se manter a homeostasia da submucosa adjacente. Eventuais falhas nessa barreira epitelial podem resultar efeito impactante na fisiopatogenia da RSCcPN, uma vez que permitiria maior exposição da submucosa a elementos do ambiente externo.

A função protetora básica do epitélio respiratório diz respeito à capacidade que as suas células têm de estabelecerem ligações intercelulares firmes (Tight Junctions) e, assim, criarem uma barreira física entre o lúmen da via respiratória e o tecido subepitelial. Já se demonstrou que defeitos na barreira epitelial da via aérea estão associados a doenças crônicas, tal como a asma (XIAO et al., 2011).

Figura 1 - Mucosa sinusal demonstrando as proteínas envolvidas com as ligações intercelulares do epitélio respiratório



Fonte: Adaptado de Bachert et al. (2016).

Defeitos na barreira epitelial do trato nasossinusal de pacientes com RSCcPN também têm sido documentados.

Soyka et al. (2012) avaliaram a expressão de proteínas responsáveis pela adesão celular (Ocludina e Proteína da Zônula de Oclusão -1), assim como a ação de interleucinas (IL-4, IFN- γ e IL-17) sobre a resistência transepitelial em cultura celular derivada do epitélio, comparando indivíduos controle com pacientes com RSCcPN e RSCsPN. Segundo os autores, a expressão das proteínas de adesão celular foi significativamente menor nos pacientes com RSCcPN, em relação aos indivíduos controle ou com RSCsPN. Ainda, as interleucinas IL-4 e IFN- γ reduziram a resistência transepitelial, in vitro, nos pacientes com RSC.

Rogers et al. (2011) também demonstraram diminuição da expressão das proteínas Ocludina e Claudina-1 na mucosa de pólipos nasais.

Outros aspectos importantes, relacionados com a proteção mecânica do epitélio respiratório, dizem respeito à produção e composição do muco, assim como ao transporte ciliar do mesmo. As fossas nasais e as cavidades paranasais, em condições fisiológicas, mantêm um equilíbrio entre a produção do muco e o seu transporte na direção da nasofaringe. Eventuais mudanças na produção, composição e transporte ciliar desse muco podem dificultar a movimentação muco-

ciliar, e assim favorecer o acúmulo de antígenos e microrganismos patogênicos no lúmen das cavidades nasais e paranasais, fomentando processo inflamatório na submucosa adjacente. As pesquisas envolvendo pacientes com RSCcPN têm demonstrado alterações nesse mecanismo de transporte muco-ciliar.

Li et al. (2014) avaliaram as características morfológicas dos cílios, assim como a expressão de marcadores relacionados com a ciliogênese, tais como o fator de transcrição FoxJ1 (Forkhead box J1), em pacientes com RSCcPN. Os resultados encontrados pelos autores destacam que o remodelamento epitelial que ocorre na mucosa dos pacientes com RSCcPN está associado a um significativo prejuízo da arquitetura e função ciliar.

Além das alterações estruturais e funcionais encontradas a nível ciliar, os pacientes com RSCcPN apresentam excessiva produção de muco. Essa grande quantidade de muco prejudica o transporte muco-ciliar, favorecendo infecções e perpetuando o processo inflamatório (ANTUNES; GUDIS; COHEN, 2009).

Ishinaga et al. (2017) avaliando pacientes com RSCcPN eosinofílica, demonstraram que a IL-33 está associada ao aumento da expressão gênica da mucina 5AC (MUC5AC), principal mucina da via aérea, assim como à hiperplasia das *globet cell* a nível epitelial.

Jiao et al. (2016), ao compararem culturas de células epiteliais derivadas de pacientes com RSCcPN e de indivíduos controle, verificaram diminuição do número de células ciliadas, assim como dos batimentos ciliares, nos pacientes com RSCcPN. Constataram também, neste mesmo grupo, aumento da expressão de FoxJ1 e MUC5AC. Além disso, observou-se que a estimulação das culturas com IL-13 (importante mediador inflamatório da resposta Th2 na RSCcPN eosinofílica) aumentou a expressão de MUC5AC.

O papel de defesa desempenhado pelo epitélio respiratório não se restringe à sua função como barreira mecânica separando o lúmen da via respiratória do ambiente interno. No momento, sob a luz dos conhecimentos atuais, entende-se o epitélio respiratório como elemento que participa ativamente tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Além das funções de barreira física e de transporte muco-ciliar, a participação das células epiteliais na resposta imune inata se dá pela capacidade de tais células produzirem agentes antimicrobianos e abrigarem receptores hábeis em reconhecer potenciais patógenos. Além disso, ao sintetizarem citocinas envolvidas na resposta inflamatória da submucosa, as células epiteliais

representam importante elo entre a resposta imune inata e a adaptativa (ZHANG et al., 2016).

No exercício da função de reconhecimento, as células epiteliais apresentam um grupo denominado receptores de reconhecimento de padrão (PRR), distribuídos na superfície celular e no citoplasma. Esses receptores desencadeiam resposta imune inata a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), assim como padrões moleculares associados a danos (DAMP). Em especial, as células epiteliais possuem subtipos de PRR conhecidos como receptores semelhantes à Toll (TLR). Esses compreendem, nos humanos, dez tipos de receptores transmembrana encontrados na superfície celular e em membranas intracelulares (KERN et al., 2008).

Vários grupos de pesquisadores têm avaliado a expressão dos TLR nos pólipos nasais e nas células epiteliais de indivíduos com RSCcPN, na tentativa de verificar se alterações na expressão desses importantes receptores poderiam estar associadas à fisiopatogenia da RSCcPN. Até o momento, os dados revelados por essas pesquisas são conflitantes, não deixando clara a relação entre os TLR e a fisiopatogenia da RSCcPN.

Zhao et al. (2011) ao compararem amostras de pólipos nasais com amostras de corneto inferior de pacientes sem RSC, verificaram aumento significativo da expressão de TLR-9 nos pólipos nasais. Os autores argumentaram que o acréscimo na expressão destes receptores desregularia o mecanismo imune inato em pacientes com RSCcPN, amplificando a resposta inflamatória.

Por outro lado, Ramanathan et al. (2008), avaliando culturas de células epiteliais de pacientes com RSCcPN, encontraram diminuição da expressão de TLR-9 em relação ao grupo controle. Os autores sugeriram que a baixa expressão deste receptor nas células epiteliais prejudica a resposta imune inata aos patógenos, o que representaria fator chave na doença inflamatória crônica da mucosa sinusal.

Outro papel importante das células epiteliais, na resposta imune inata, diz respeito à sua capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos. Um vasto arsenal de moléculas com propriedades antimicrobianas é liberado pelas células epiteliais, cada uma com alvo e função específica (FOKKENS et al., 2012b).

Na expectativa de relacionar prováveis defeitos da resposta imune inata com a fisiopatogenia da RSCcPN, alguns autores têm investigado a expressão dessas moléculas antimicrobianas nos pacientes com RSCcPN.

Wei et al. (2014) avaliaram a expressão da SPLUNC1 (short palate lung and nasal epithelium clone 1) em pacientes com RSCcPN eosinofílica, RSCcPN não eosinofílica, RSCsPN e indivíduos controle. A SPLUNC1, expressa pelas células epiteliais respiratórias, é uma proteína que apresenta, entre outras, função bactericida. Verificou-se significativa diminuição da expressão da SPLUNC1 nas amostras dos pólipos, comparativamente ao grupo controle e ao grupo com RSCsPN. Ao avaliarem os pólipos dos pacientes com RSCcPN eosinofílica e não eosinofílica, os pólipos eosinofílicos apresentaram significativa diminuição da SPLUNC1 em relação aos não eosinofílicos. Além disso, quando estimulada com IL-4 e IL-13, a cultura de células epiteliais dos pólipos nasais apresentou significativa redução da expressão da SPLUNC1.

Richer et al. (2008) avaliaram a expressão de genes epiteliais relacionados com a síntese de proteínas bactericidas da família S100, em pacientes com RSCcPN e RSCsPN. Os autores encontraram diminuição significativa da expressão das proteínas S100A7 e S100A8 em todos os pacientes com RSC.

Embora, tradicionalmente, não sejam consideradas células imunes, as células epiteliais das vias aéreas têm a habilidade de secretar grande número de citocinas, exercendo relevante influência na resposta inflamatória local (ZHANG et al., 2016).

Mais recentemente, três citocinas epiteliais têm merecido destaque no estudo da fisiopatogenia da RSCcPN eosinofílica. São elas a IL-25, IL-33 e Linfopoietina Estromal Tímica (TSLP). Essas interleucinas, produzidas pelo epitélio, influenciam tanto a resposta imune inata quanto a resposta adaptativa tipo 2, participando, portanto, ativamente do desenvolvimento da RSCcPN eosinofílica (KOUZAKI et al., 2016).

A IL-25, também conhecida como IL-17E, é uma das interleucinas que compõem a família IL-17. O seu receptor (IL-25R) é expresso nos linfócitos Th2, basófilos e células linfóides inatas 2 (ILC2s). Sabe-se que a IL-25 potencializa a produção de citocinas do tipo 2 por essas células (BULEK et al., 2010).

Essa interleucina, recentemente, tem ganhado atenção no que tange à fisiopatogenia da RSCcPN.

Lam et al. (2013) avaliaram a expressão gênica da IL-25 em amostras teciduais de pacientes com RSCcPN, RSCsPN e indivíduos controle. Os autores encontraram aumento significativo da expressão da IL-25 nos pólipos dos pacientes com RSCcPN, em comparação aos demais grupos investigados. Outro fato

interessante foi a concomitância deste aumento com pior avaliação tomográfica e maior eosinofilia periférica.

Shin et al. (2015) também encontraram aumento significativo da expressão da IL-25 em pólipos de pacientes com RSCcPN, comparativamente a pacientes com RSCsPN e indivíduos controle. Além disso, os autores testaram um anticorpo anti-IL-25, em um modelo animal de polipose, encontrando diminuição dos pólipos, do edema de mucosa, da deposição de colágeno e da infiltração de eosinófilos na mucosa. Diante disso, os autores sugeriram a IL-25 como possível alvo no tratamento da polipose nasal.

Contrariando os achados anteriores, Miljkovic et al. (2014) encontraram diminuição da expressão da IL-25 em amostras de tecido polipoide derivadas de pacientes com RSCcPN.

A IL-33, um membro da família das citocinas IL-1, é peça chave na resposta imune tipo 2 das doenças respiratórias. Seu receptor (IL-33R) está expresso nas células Th2, basófilos, mastócitos, células natural killer (NK) e ILC2s. Uma vez liberada pelas células epiteliais, a IL-33 participa tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa (DRAKE; KITA, 2017).

Sendo capaz de induzir resposta imune tipo 2, vários autores têm pesquisado a participação da IL-33 na RSCcPN.

Reh et al. (2010) avaliaram a expressão da IL-33 em culturas de células epiteliais derivadas de pólipos nasais de pacientes com RSCcPN submetidos ao tratamento cirúrgico. Segundo os autores, houve alta expressão da IL-33 nessas culturas. Além disso, esse achado revelou significativa relação com maior incidência de recidiva da doença.

Baba et al. (2014) avaliaram a expressão da IL-33 e seu receptor (IL-33R) em pacientes com RSCcPN eosinofílica, RSCcPN não eosinofílica e indivíduos controle. Segundo os autores, não houve diferença significativa na expressão da IL-33 entre os três grupos. Entretanto, houve aumento significativo da expressão dos receptores IL-33R nos pacientes com RSCcPN eosinofílica. Utilizando imunohistoquímica, os autores demonstraram que os eosinófilos eram as células que mais expressavam o IL-33R. Assim, os autores concluíram papel relevante da IL-33 e seu receptor na fisiopatogenia da RSCcPN eosinofílica.

Recentemente, Kim et al. (2017) demonstraram aumento da expressão da IL-33 em pacientes com RSCcPN. Entretanto, contrariando as demais evidências, tal

achado correlacionava-se positivamente a um aumento numérico de neutrófilos, assim como de marcadores inflamatórios Th1 e Th17 (KIM et al., 2017).

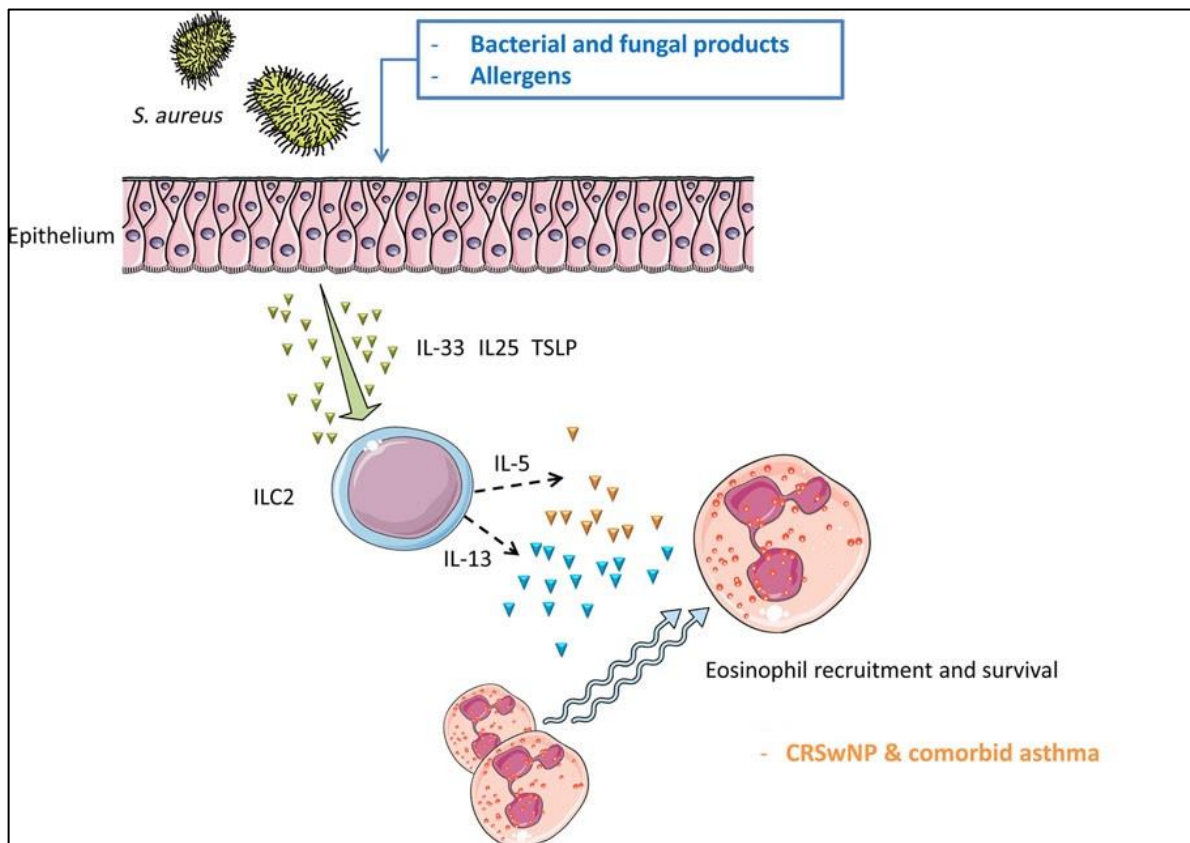
A TSLP é uma citocina que induz resposta inflamatória tipo 2, desempenhando papel de destaque na origem de doenças com perfil tipicamente Th2, como asma e dermatite atópica. Um mecanismo fundamental na criação do ambiente Th2 pela TSLP diz respeito à capacidade que essa citocina tem de induzir a conversão de linfócitos T virgens em células Th2, a partir da ativação de células dendríticas (WANG et al., 2013).

Dentre as três citocinas epiteliais, IL-25, IL-33 e TSLP, que supostamente estão envolvidas na fisiopatogenia de RSCcPN, a TSLP encontra maior respaldo na literatura.

Kimura et al. (2011) avaliaram a expressão da TSLP em pólipos nasais de pacientes com RSCcPN. Segundo os autores, a expressão desta citocina mostrou-se aumentada em tais pacientes, especialmente nos atópicos. Além disso, tal achado correlacionava-se a um aumento da eosinofilia e dos níveis de IgE no tecido polipoide.

Nagarkar et al. (2013) também demonstraram que a atividade da TSLP estava significativamente aumentada em pólipos nasais quando comparados a amostras sinusais de controle. Ainda neste trabalho, além da própria TSLP, seus metabólitos revelaram-se capazes de estimular mastócitos a sintetizarem IL-5.

Figura 2 - Citocinas liberadas pelo epitélio respiratório nasal que potencializam a resposta inflamatória Th2 culminando no recrutamento de eosinófilos em pacientes com RSCcPN eosinofílica.



Fonte: Adaptado de Bachert et al. (2016).

3.1.2.3 Células efetoras da imunidade inata

O trato nasossinusal é constantemente exposto a partículas e patógenos, contra os quais lutam as defesas do hospedeiro. O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra tais agentes agressores. Além da barreira epitelial, outro componente importante do sistema imune inato é o conjunto subepitelial de células efetoras (OOI; PSALTIS, 2010).

Dentre elas, algumas predominam nos pólipos de pacientes com RSCcPN eosinofílica. São elas eosinófilos, mastócitos, basófilos, células dendríticas, macrófagos e células linfoides inatas tipo 2 (SCHLEIMER, 2017).

Os eosinófilos são granulócitos circulantes, que são recrutados em direção à mucosa nasossinusal, representando a maior celularidade no tecido polipoide dos pacientes ocidentais com RSCcPN (SHAH; ISHINAGA; TAKEUCHI, 2016).

Vários mediadores solúveis, responsáveis pela ativação, recrutamento e sobrevivência dos eosinófilos, já foram identificados nos pólipos nasais. A IL-5, inserida no ambiente Th2 da RSCcPN eosinofílica, é peça fundamental na ativação e sobrevivência dos eosinófilos a nível tecidual. Inicialmente, a IL-5 estimula a diferenciação e proliferação dos eosinófilos a partir da medula óssea. Posteriormente, modula a expressão de moléculas de adesão facilitando a migração celular. Também, inibe a apoptose dos eosinófilos, prolongando sua sobrevivência tecidual. Finalmente, a IL-5 estimula a degranulação e liberação de várias proteínas citotóxicas pelos eosinófilos (FAN; WANG; TAKENAKA, 2007).

Outra citocina relevante na migração, adesão e sobrevivência dos eosinófilos é o Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), produzida por monócitos, fibroblastos, linfócitos T e células epiteliais respiratórias.

Shin et al. (2003) avaliando eosinófilos de sangue periférico em contato com cultura de células epiteliais de pólipos nasais, sugeriram que, provavelmente, os eosinófilos são ativados pela GM-CSF produzida pelas células epiteliais.

Corso et al. (2015) demonstraram que a GM-CSF encontra-se abundante em secreções nasais de pacientes com inflamações crônicas eosinofílicas.

Além da ativação e sobrevivência, o recrutamento de eosinófilos é uma etapa fundamental na indução da eosinofilia tecidual. Nesse sentido, as quimiocinas, produzidas predominantemente pelas células epiteliais, ligam-se a receptores de células alvo, desempenhando papel de destaque. Os eosinófilos expressam intensamente o receptor de quimiocinas CCR3 (Chemokine Receptor 3). As citocinas MCP4 (Proteína Quimiotóxica de Monócitos 4), RANTES (Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted), eotaxinas 1,2 e 3 têm potencial de recrutar eosinófilos a partir do CCR3. Dentre este grupo de quimiocinas, atenção especial deve ser dada às eotaxinas, pois já foi demonstrado estarem aumentadas em pólipos eosinofílicos (YAO et al., 2009).

Etapa importante da eosinofilia nos pólipos eosinofílicos, diz respeito à migração dos eosinófilos do espaço vascular para a mucosa nasossinusal. Neste sentido, destaca-se a molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1).

Jahnsen et al. (1995) evidenciaram aumento da expressão de VCAM-1 em pólipos nasais, quando comparados à mucosa dos cornetos inferior e médio destes mesmos pacientes. Além disso, observaram que o grau de eosinofilia no tecido polipoide mostrava-se diretamente relacionado com a expressão de VCAM-1.

Mais tarde, a partir de cultura de células endoteliais de pólipos nasais, os mesmos pesquisadores demonstraram, *in vitro*, que as interleucinas IL-4 e IL-13, componentes do ambiente Th2 da polipose nasal eosinofílica, induzem a expressão de VCAM-1 (JAHNSEN et al., 1997).

Recentemente, Eweiss et al. (2009) realizaram um follow-up de 12 meses em pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico de polipose nasossinusal, verificando que o índice de recorrência da polipose relacionava-se com maior expressão de VCAM-1.

Uma vez presentes e ativados, os eosinófilos atacam diretamente os tecidos por meio da liberação de mediadores tóxicos, assim como amplificam a resposta inflamatória ao produzirem citocinas que, por sua vez, recrutam outras células (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Um dos principais agressores teciduais liberados pelos eosinófilos é a ECP.

Sun et al. (2009) avaliaram os níveis de tal mediador em secreção nasal de pacientes com RSCcPN, correlacionando-os com a severidade da doença e sua recorrência após tratamento cirúrgico. Segundo os autores, os níveis de ECP revelaram-se maiores na secreção nasal dos pacientes com RSCcPN em relação ao grupo controle. Além disso, maiores níveis de ECP relacionavam-se à maior eosinofilia tecidual e maior comprometimento tomográfico. Durante follow-up de 18 meses, os pacientes que apresentaram recorrência da polipose após o tratamento cirúrgico, possuíam maiores níveis de ECP no pré-operatório.

Poposki et al. (2011) avaliando tecido polipoide de pacientes com RSCcPN eosinofílica, demonstraram que os níveis da quimiocina CCL23 (C-C motif chemokine ligand 23), potente amplificador da resposta inflamatória por meio do recrutamento de monócitos, células dendríticas e linfócitos, estavam aumentados. Ainda, verificou-se a correlação da presença de CCL23 com a de ECP, sugerindo serem os eosinófilos os principais produtores de CCL23 no tecido polipoide.

Os mastócitos são células bem conhecidas, especialmente no que tange à sua associação com alergia e respostas mediadas por IgE. Quando provocados, são hábeis em liberar grande quantidade de mediadores pré-estocados, como histamina e proteases, além de sintetizar outros mediadores, como prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, os mastócitos produzem, em abundância, citocinas que potencializam a resposta inflamatória a partir do recrutamento de eosinófilos, células NK, linfócitos e basófilos (ABRAHAM; JOHN, 2010).

Todo esse conhecimento acerca da biologia dos mastócitos suscitou o interesse em pesquisar sua participação na RSCcPN.

Shaw et al. (2012) avaliaram a presença de mastócitos, por meio de citometria de fluxo, em amostras de mucosa sinusal etmoidal de pacientes com RSCcPN, RSCsPN e indivíduos controle. Segundo os autores, a quantidade de mastócitos foi significativamente maior nos pacientes com RSCcPN. Além disso, esse aumento não ocorria, exclusivamente, nos pacientes com hipersensibilidade mediada por IgE.

Na RSCcPN, há expressivo número de mastócitos tanto no revestimento epitelial dos pólipos quanto nas glândulas subepiteliais destes. De acordo com sua localização em tais regiões, os mastócitos apresentam fenótipos diferentes. Enquanto os mastócitos epiteliais caracterizam-se pela expressão de triptase e carboxipeptidase A3, os mastócitos glandulares, além destas, também expressam quimase. Sabendo que a quimase estimula secreção de muco, supõe-se que os mastócitos quimase positivos participem do aumento da produção de muco nos indivíduos com RSCcPN (TAKABAYASHI et al., 2012).

Baba et al. (2017) avaliaram a presença de mastócitos em pacientes com RSCcPN eosinofílica e não eosinofílica. Segundo os autores, todas as amostras de pólipos dos pacientes com RSCcPN, seja eosinofílica ou não eosinofílica, apresentavam maior número de mastócitos, comparativamente aos indivíduos controle. Entretanto, a distribuição e os fenótipos de tais mastócitos eram diferentes.

Nos pacientes com RSCcPN eosinofílica, os mastócitos se concentravam nas regiões epitelial e glandular, além de serem triptase positivos. Nos pacientes com RSCcPN não eosinofílica, eles predominavam na submucosa e eram triptase/quimase positivos. Diante destes achados, os autores concluíram que os mastócitos participam da fisiopatogenia da polipose nasal, podendo agir de modo distinto nos casos eosinofílicos e não eosinofílicos (BABA et al., 2017).

Os basófilos, encontrados principalmente na circulação sanguínea, são granulócitos que atuam ativamente nas doenças alérgicas e na imunidade contra ectoparasitas. Sabe-se que os basófilos participam das respostas imunes tipo 2, secretando quantidades expressivas de IL-4 e IL-13 (VAN BEEK et al., 2012), citocinas presentes no ambiente Th2 da RSCcPN eosinofílica.

No entanto, até recentemente, pouco se discutia a respeito da atuação destas células no desenvolvimento da RSCcPN.

Em pesquisa realizada por Mahdavinia et al. (2014), utilizando marcação específica a partir de um anticorpo monoclonal, demonstrou aumento de basófilos no tecido polipoide de pacientes com RSCcPN. Uma vez aí demonstrada a presença abundante destas células, e considerando tal tecido um ambiente inflamatório rico em potenciais ativadores desses basófilos, é possível supor que eles exerçam, por meio da liberação de mediadores inflamatórios, importante contribuição na patogênese da RSCcP.

Kagoya et al. (2015) compararam a presença de basófilos em amostras de tecido polipoide de pacientes com RSCcPN eosinofílica e não eosinofílica. Os dados dos autores revelaram que a contagem de basófilos foi significativamente maior nos pólipos eosinofílicos. Além disso, observou-se correlação entre este aumento celular e maior comprometimento tomográfico destes pacientes eosinofílicos. Ainda, os autores sugeriram que os basófilos suscitam o recrutamento de eosinófilos para o tecido polipoide e que a quantidade de basófilos teciduais possa refletir a magnitude da inflamação eosinofílica.

As células dendríticas (DCs) representam um elo entre as respostas imunes inata e adaptativa. Estas células reconhecem, processam e apresentam antígenos às células T virgens, podendo, a partir da indução de respostas Th1, Th2, Th17 e Treg (T regulatório), exercer um ajuste na resposta imune. As DCs humanas são divididas em dois grandes grupos: células dendríticas mieloides (mDCs) e células dendríticas plasmocitoides (pDCs). As mDCs agem como potentes apresentadores de antígenos, tendo relevante função de controlar a polarização de células T auxiliares. Ao contrário, as pDCs são menos efetivas na apresentação de antígenos, porém exibem ação antiviral mais robusta. AS mDCs humanas são, por sua vez, subdivididas em mDC1 e mDC2 (MERAD et al., 2013).

Poposki et al. (2015) demonstraram aumento significativo de mDCs em pólipos nasais. Sabendo da polarização dos linfócitos T auxiliares pelas DCs, os autores sugeriram que seu acúmulo, no tecido polipoide, pode contribuir para a patogênese da RSCcPN.

Shi et al. (2014) relataram que as DCs estão aumentadas tanto em pólipos eosinofílicos quanto em não eosinofílicos. Os autores também evidenciaram, in vitro, que as DCs isoladas de ambos pólipos induziam linfócitos T virgens a um perfil Th1 e Th17. Entretanto, apenas as DCs isoladas dos pólipos eosinofílicos induziam linfócitos T virgens a um perfil Th2.

Os macrófagos são importantes células do sistema imune inato, amplamente reconhecidas pela sua heterogeneidade e por desempenharem funções distintas segundo o estado de polarização em que se encontram. Até o momento, dois polos de diferenciação, denominados M1 e M2, foram identificados. Os macrófagos M1 são caracterizados por um fenótipo pró-inflamatório, promovendo resposta imune tipo Th1 e atividade antitumoral, enquanto os macrófagos M2 exercem função regulatória no reparo e remodelação tecidual e promovem resposta imune Th2 (BARROS et al., 2013).

Banks et al. (2014) quantificaram, por meio de imunohistoquímica, a presença de macrófagos em amostras teciduais obtidas do meato médio de pacientes com RSCcPN, RSCsPN e indivíduos controle. Os dados dos autores revelaram que a concentração de macrófagos foi significativamente maior nos pacientes com RSCcPN.

Krysko et al. (2011) avaliaram a expressão fenotípica de macrófagos em amostras de mucosa nasossinusal de pacientes com RSCcPN, RSCsPN e controle. Também avaliaram a eficiência fagocítica destes macrófagos frente ao SA. Segundo os autores, os pacientes com RSCcPN apresentaram aumento significativo de macrófagos com fenótipo M2 (CD163 ou CD206) em relação aos indivíduos com RSCsPN e controle. Além disso, em se comparando a eficiência fagocítica, os macrófagos M2 dos pacientes com RSCcPN eram menos eficientes do que aqueles oriundos dos dois outros grupos. Os autores, então, sugeriram que o ambiente inflamatório Th2 do tecido polipoide poderia induzir à polarização de macrófagos M2, e assim favorecer a colonização pelo SA.

Poposki et al. (2011) demonstraram, em pólipos de pacientes com RSCcPN, aumento significativo da expressão da quimiocina CCL23 pelos eosinófilos. Evidenciaram também que tal aumento correlacionava-se positivamente à abundância de macrófagos M2. Sugeriram, então, que os eosinófilos, por meio da CCL23, seriam responsáveis pelo recrutamento de macrófagos para o tecido polipoide. Uma vez inseridos em um ambiente Th2, tais macrófagos se converteriam no fenótipo M2. Sabendo, por sua vez, que os macrófagos M2 são produtores de eotaxinas quimiotáticas para os eosinófilos, os autores sugeriram que esse mecanismo cíclico poderia representar uma alça de amplificação da resposta inflamatória na polipose eosinofílica.

Peterson et al. (2012) demonstraram que os macrófagos M2, derivados de pólipos de pacientes com RSCcPN, são potentes secretores da quimiocina CCL18 (C-C motif chemokine ligand 18), citocina quimiotática para células dendríticas, linfócitos Th2 e linfócitos T virgens, células estas sabidamente envolvidas na fisiopatogenia da polipose eosinofílica.

Yao et al. (2017) comparando pólipos eosinofílicos e não eosinofílicos, também demonstraram aumento significativo de macrófagos M2 nos pólipos eosinofílicos.

Recentemente, um novo grupo de células do sistema imune inato foi reconhecido. São as denominadas células linfóides inatas (ILCs), ativadas a partir de patógenos e determinadas citocinas. Assim como os linfócitos T auxiliares, as ILCs são classificadas em ILC1, ILC2 e ILC3, a depender do tipo de citocina por ela produzida. As ILCs2 produzem citocinas tipo 2, especialmente IL-5 e IL-13, e são ativadas por citocinas derivadas das células epiteliais, tais como interleucina 25 (IL-25), interleucina 33 (IL-33) e linfopoitina estromal tímica (TSLP)(KIM; ARTIS, 2015).

No momento, várias pesquisas têm avaliado a ação das ILCs2 na fisiopatogenia da RSC.

Miljkovic et al. (2014) avaliando pacientes com RSCsPN e com RSCcPN, demonstraram aumento significativo das ILCs2 nos pólipos nasais.

Walford et al. (2014) avaliaram pacientes com RSCcPN eosinofílica e não eosinofílica. Segundo os autores, a quantidade de ILCs2 nos pólipos eosinofílicos revelou-se o dobro em relação aos não eosinofílicos. Demonstrou-se também que o tratamento sistêmico com corticosteroide diminuía significativamente o número de ILCs2 nos pólipos nasais eosinofílicos.

Shaw et al. (2013) com o objetivo de avaliar a participação das ILCs2 na construção de um ambiente inflamatório Th2, demonstraram que as ILCs2, presentes nos pólipos nasais, produziam IL-13 ao serem estimuladas pela IL-33 secretada pelas células epiteliais do tecido polipoide

Ao corroborar com os estudos anteriores, Tojima et al. (2016) ao comparar pacientes com RSCcPN eosinofílica, RSCcPN não eosinofílica e RSCsPN, demonstraram aumento significativo das ILCs2 nos pacientes com RSCcPN eosinofílica, além de correlação positiva entre este achado e o grau de eosinofilia. Estes mesmos autores verificaram ainda que as células epiteliais dos pólipos eosinofílicos produziam, significativamente, maior quantidade de IL-33 quando

estimuladas pelo alérgeno *Alternaria*. Foi sugerida, portanto, a participação das ILCs2 e da IL-33 na fisiopatogenia da RSCcPN eosinofílicas.

3.1.2.4 Células efetoras da imunidade adaptativa

Frente ao ambiente pró-inflamatório arquitetado no tecido polipoide, não é surpresa que se encontre, nesse contexto, aumento de células do sistema imune adaptativo. Sabe-se que os linfócitos T constituem elementos fundamentais de tal sistema, participando ativamente do desfecho inflamatório da RSCcPN. Classicamente, a RSCcPN eosinofílica tem sido associada a um ambiente com predomínio de linfócitos Th2 e expressão aumentada de IL4, IL5 e IL13 (VAN ZELE et al., 2006; VAN BRUAENE et al., 2008; ZHANG et al., 2008).

Dereycke et al. (2014) compararam populações de linfócitos T presentes na mucosa sinusal de pacientes com RSCsPN, RSCcPN e fibrose cística, encontrando vários grupos destes linfócitos no ambiente imune da RSC. Interessantemente, linfócitos Th2 foram encontrados exclusivamente nos pacientes com RSCcPN. Além disso, tais linfócitos exibiam-se especialmente aumentados nos indivíduos com asma e/ou positivos para IgE anti enterotoxina do SA.

Shi et al. (2014) comparando o tecido polipoide de pacientes com RSCcPN eosinofílica e RSCcPN não eosinofílica, encontraram populações de linfócitos Th1 e Th17 aumentadas em ambos grupos. Porém, linfócitos Th2 mostraram-se abundantes apenas nos pacientes com RSCcPN eosinofílicas.

Outro foco de pesquisa envolvendo a RSCcPN tem sido a avaliação de linfócitos Treg. Ao contrário dos demais linfócitos T, que promovem resposta imune, os linfócitos Treg são imunossupressores e têm como principal função estabelecer auto tolerância, evitando, assim, a autoimunidade (WAN, 2010).

Van Bruaene et al. (2008) descreveram diminuição da expressão do fator de transcrição FOXP3 (Forkhead box P3), assim como de TGF- β , em tecido polipoide. O FoxP3 é um fator de transcrição, intensa e especialmente, expresso nos linfócitos Treg. Assim, os autores sugeriram que a redução da função supressiva dos linfócitos Treg, indicada pela baixa expressão do FOXP3, poderia relacionar-se com a persistência de severa inflamação eosinofílica no tecido polipoide.

Kim et al. (2010) avaliando pacientes com RSCcPN e RSCsPN, verificaram a diminuição dos linfócitos Treg e baixa expressão do FoxP3 em pólipos nasais.

Demonstraram também que o efeito da quimiocina CCL1(C-C motif chemokine ligant 1) em atrair os linfócitos Treg foi menor nos pacientes com RSCcPN.

Os linfócitos B representam um grupo celular que, por meio da produção de anticorpos, contribui para a resposta imune adaptativa humoral. Já foi demonstrado o aumento de linfócitos B em pólipos de pacientes com RSCcPN (GEVAERT et al., 2005; VAN ZELE et al., 2007).

Explica-se, provavelmente, este achado pelo aumento da expressão, nos pólipos nasais, de mediadores inflamatórios que recrutam, ativam e otimizam a sobrevivência dos linfócitos B. Quanto ao recrutamento, tem-se verificado, nos pólipos nasais, aumento da expressão de CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligant 12) e CXCL13 (C-X-C motif chemokine ligant 13), quimiocinas reconhecidas como envolvidas com a migração de linfócitos B (PATADIA et al., 2010).

Com relação, ainda, ao estímulo à chegada de linfócitos B ao tecido polipoide, Hulse et al. (2013) demonstraram aumento de proteína 2 induzida-Epstein-Barr vírus (EBI2) em pólipos nasais. Tal proteína é um receptor de superfície transmembrana que, uma vez expresso nos linfócitos B, favorece o recrutamento destes a partir dos centros germinativos (HULSE et al., 2013).

Dentre as várias citocinas abundantes na RSCcPN, Kato et al. (2008) verificaram o fator de ativação de células B da família TNF (BAFF), o qual participa intensamente da proliferação e ativação das células B. Os autores demonstraram, ainda, que o aumento do BAFF, no tecido polipoide, ocorria conjuntamente com o da imunoglobulina A (IgA). Sendo esta, potente estimuladora da degranulação de eosinófilos, sugeriu-se que o incremento do BAFF, ao estimular os linfócitos B a produzirem IgA, contribuiria com a patogênese da inflamação eosinofílica na RSCcPN. Há também evidências de que os linfócitos B, inseridos no tecido polipoide, se diferenciam em plasmócitos, produzindo imunoglobulina A, G e E (HULSE et al., 2013).

3.1.2.5 Remodelação tecidual

Na RSCcPN, os pólipos exibem superfície mucosa revestida por epitélio respiratório, intenso edema estromal, deposição de albumina, formação de pseudo cistos, escassez glandular e infiltrado inflamatório subepitelial e perivascular. O processo de remodelação tecidual que ocorre na RSC envolve relevantes alterações

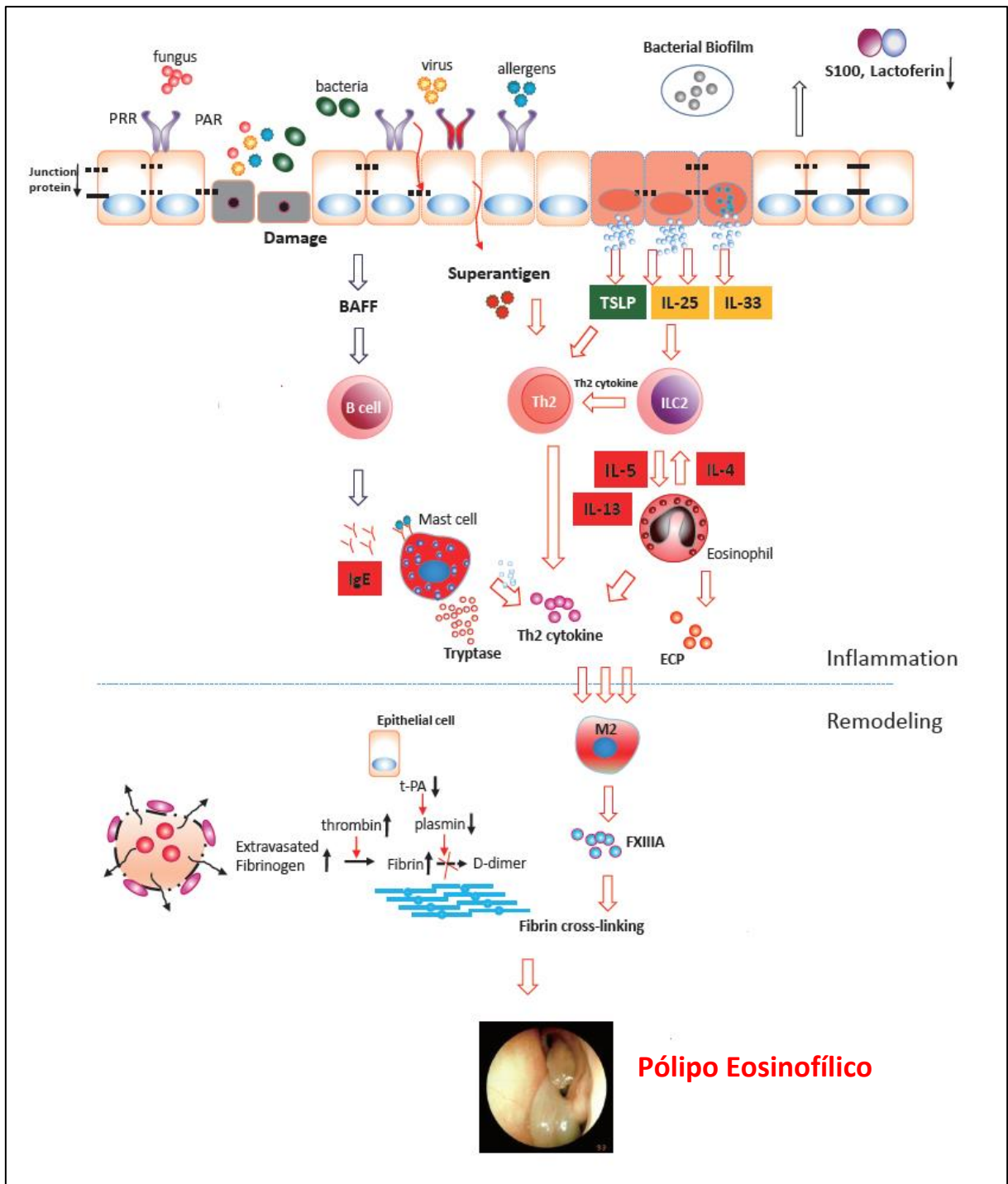
histopatológicas locais, tais como a deposição de algumas substâncias na matriz extracelular. Na RSCcPN, observa-se, a nível da submucosa, formação de uma rede de fibrina, a qual retém em si proteínas plasmáticas, acarretando intenso edema estromal e formação de pseudocistos. Atualmente, interpreta-se este acúmulo de fibrina como resultante da quebra de equilíbrio entre depósito e degradação desta proteína a nível tecidual.

Takabayashi et al. (2013a) descreveram aumento de fibrina e diminuição do ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) em pólipos nasais. O t-PA converte o plasminogênio em plasmina, que, por sua vez, promove a degradação da fibrina. Conclui-se, portanto, que a redução do t-PA proporciona aumento do depósito de fibrina. Os autores demonstraram, ainda, que interleucinas do padrão Th2, tais como IL-4 e IL-13, aumentadas na RSCcPN eosinofílica, reduzem a expressão do t-PA pelas células epiteliais.

Outra pesquisa de Takabayashi et al. (2013b) revelou, em pólipos nasais, aumento do fator XIII-A da coagulação, a partir de macrófagos M2. Tal fator exibe ação antifibrinolítica, uma vez que favorece a ligação do inibidor da plasmina $\alpha 2$ ($\alpha 2$ PI) à fibrina, reduzindo a degradação desta pela plasmina e, conseqüentemente, fomentando o depósito tecidual de fibrina. O fator XIII-A catalisa, ainda, uma ligação mais estável entre as moléculas de fibrina, incrementando a rede desta proteína na submucosa do tecido polipoide.

Shi et al. (2013) avaliaram a remodelação tecidual em pacientes com RSCcPN eosinofílica, RSCcPN não eosinofílica e RSCsPN. Segundo os autores, embora as duas formas de RSCcPN apresentassem maior edema que a RSCsPN, tal retenção hídrica tecidual revelou-se, significativamente, mais intensa na RSCcPN eosinofílica. Esta, por outro lado, mostrou-se, também significativamente, menos fibrótica do que a RSCcPN não eosinofílica e a RSCsPN. Ao estudarem a possível ligação entre marcadores inflamatórios e a remodelação tecidual, os autores evidenciaram relação direta entre marcadores pró-fibróticos e neutrofilia local e entre a expressão de ECP e o grau de edema.

Figura 3 - Fisiopatologia da RSCcPN eosinofílica.



Fonte: Adaptado de Kim e Cho (2017).

3.1.3 Interferon

Em 1957, Isaacs e Lindenmann descobriram uma substância que protegia as células contra infecções virais. Eles a chamaram de interferon (IFN). Desde então, muito se avançou na compreensão dos efeitos biológicos desta citocina nos seres humanos. Atualmente, o IFN é reconhecido como peça central na regulação da resposta imune, sendo suas ações categorizadas em três importantes atividades: antiviral, antitumoral e imunorregulatória (BORDEN et al., 2007).

OS IFNs são glicoproteínas pertencentes à família das citocinas. São distribuídos em três subtipos (I, II e III), segundo fatores estruturais, acoplamento em receptores específicos e atividades biológicas (DONNELLY; KOTENKO, 2010).

O grupo de IFNs humanos do tipo I é composto por IFN- α , β , ϵ , κ e ω . Estes iniciam suas ações a partir da ligação com complexos receptores formados por dois polipeptídeos estruturalmente semelhantes, IFNAR1 (Receptor 1 de ativação do interferon) e IFNAR2 (Receptor 2 de ativação do interferon). Os IFNs desta família são codificados a partir de um grupamento de genes localizados no braço curto do cromossomo 9. O IFN tipo II humano é representado pelo IFN- γ , cujo gene situa-se no cromossomo 12. Sua sinalização se dá a partir de receptores constituídos pelas subunidades IFNGR1 (Receptor alfa do interferon gama) e IFNGR2 (Receptor beta do interferon gama). A classe mais recente de IFN humano, descoberta em 2003, são os IFNs tipo III, representados pelo IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) e IFN- λ 3 (IL-28B). Estes são codificados por genes que se encontram no cromossomo 19 e sinalizam a partir de receptores compostos pelas cadeias IFNLR1 (Receptor 1 do interferon lambda) e IFNLR2 (IL-10R2) (Receptor 2 do interferon lambda) (CHELBI-ALIX; WIETZERBIN, 2007).

Quadro 1 - Características dos IFNs humanos

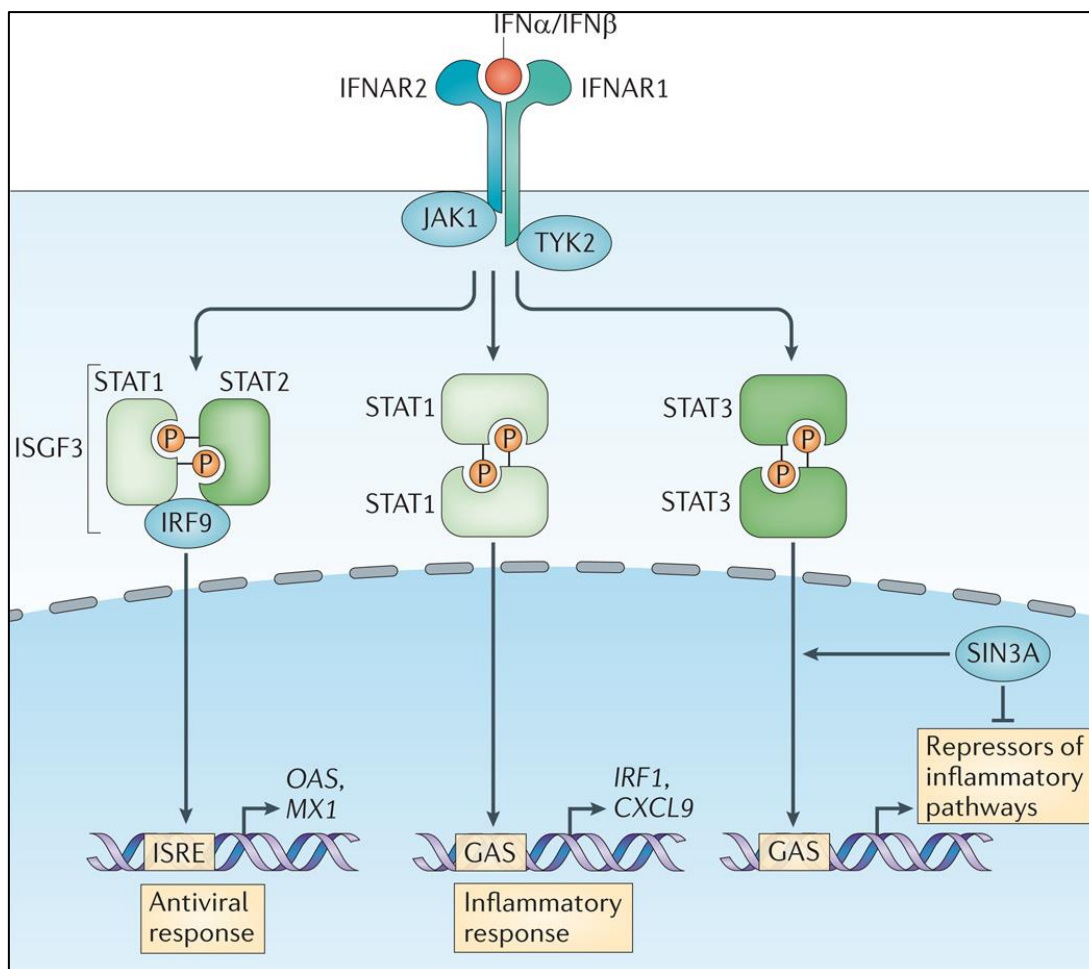
Interferon	Nome	Cromossomo	Receptor
Tipo I	IFN- α	Cromossomo 9	IFNAR1, IFNAR2
	IFN- β		
	IFN- ω		
	IFN- κ		
	IFN- ϵ		
Tipo II	IFN- γ	Cromossomo 12	IFNGR1, IFNGR2
Tipo III	IFN- λ 1 (IL-29)	Cromossomo 19	IFNLR1, IFNLR2/IL-10R2
	IFN- λ 2 (IL-28A)		
	IFN- λ 3 (IL28B)		

Fonte: Adaptado de Capobianchi et al. (2014).

As ações biológicas dos IFNs iniciam-se após sua ligação a receptores específicos. A partir de então, atividades intracelulares são induzidas, por meio de vias de transdução de sinal.

A ligação entre os IFNs tipo I e seus receptores específicos ativa as duas cinases de Janus que se encontram aderidas aos domínios citoplasmáticos destes receptores: Janus quinase 1 (JAK1) e tirosinoquinase 2 (TYK2). Uma vez ativadas, essas cinases realizam uma fosforilação na extremidade citoplasmática dos receptores, desencadeando recrutamento, fosforilação, dimerização e translocação nuclear dos fatores de transcrição denominados transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT). Os três principais grupamentos de STAT formados, em resposta à estimulação pelos IFNs tipo I, controlam a expressão de genes específicos, definindo a ação biológica preponderante. O grupamento conhecido como fator do gene estimulado por interferon 3 (ISGF3), o qual é composto por STAT1, STAT2 e fator regulador de IFN 9 (IRF9), liga-se ao elemento de resposta interferon-sensível (ISRE), ativando genes com clássica atividade antiviral. Por outro lado, grupamentos formados por homodímeros de STAT1 ligam-se à sequência ativada gama (GAS), induzindo genes pró-inflamatórios. Por fim, grupamentos formados por homodímeros de STAT3 ligam-se ao GAS estimulando genes supressores da resposta inflamatória (IVASHKIV; DONLIN, 2013).

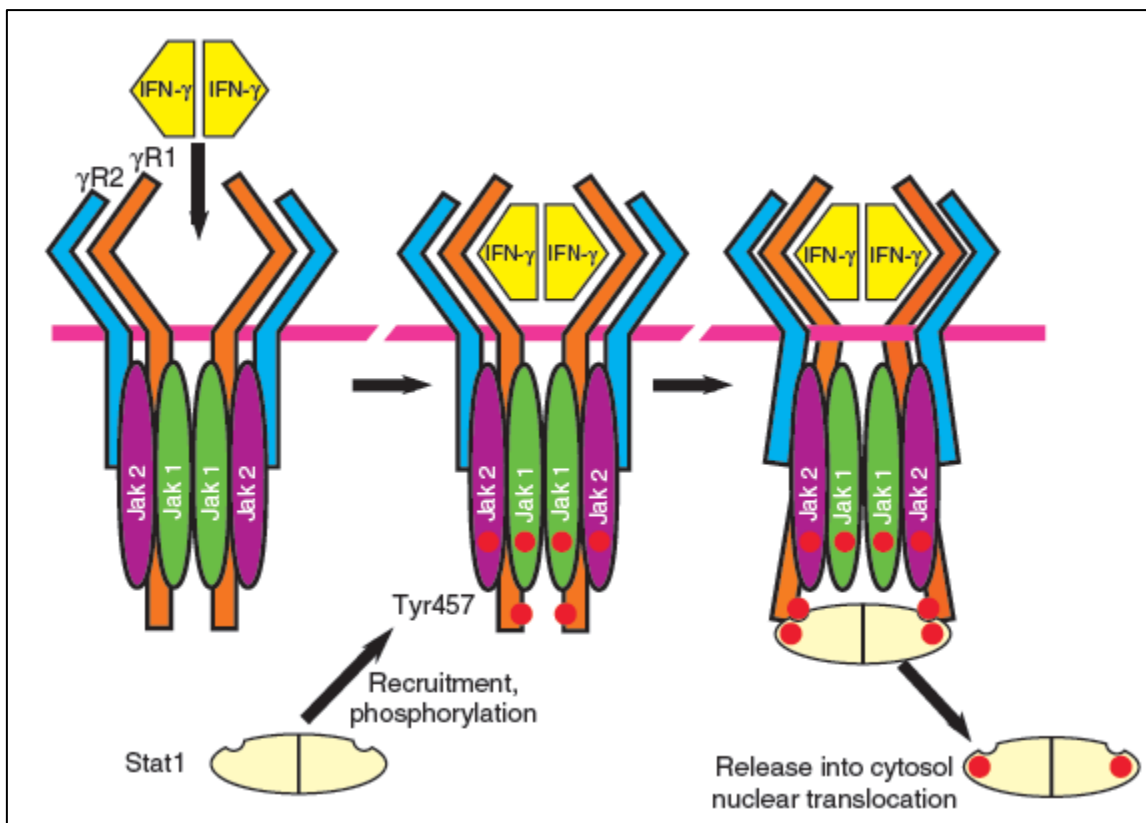
Figura 4 - Vias de sinalização dos interferons tipo I



Fonte: Adaptado de Ivashikiv e Donlin (2014).

O acoplamento do IFN tipo II (IFN- γ) aos receptores de superfície IFNGR1 e IFNGR2 dá início à sua ação. O IFN- γ é um dímero que se liga a duas cadeias IFNGR1, e não às IFNGR2. Assim conectado, há ativação das JAK1 e JAK2 presentes no domínio citoplasmático deste receptor. Essas cinases, por sua vez, realizam uma fosforilação na extremidade citoplasmática do receptor, desencadeando o recrutamento da STAT1. O grupamento formado por homodímeros de STAT1 transloca-se até o núcleo celular, ativando os genes reguladores do IFN- γ (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004).

Figura 5 - Vias de sinalização do interferon tipo II



Fonte: Adaptado de Pestka, Krause e Walter (2004).

Os interferons tipo III sinalizam a partir de receptores de superfície do tipo IFNLR1 e IFNLR2/IL-10R2. Embora a ligação dos IFN tipo I e dos IFN Tipo III ocorra em diferentes receptores, eles compartilham as mesmas vias intracelulares de sinalização e muitos dos seus efeitos biológicos. Ao contrário dos IFN tipo I, que têm seus receptores expressos em muitos tipos celulares, os IFN tipo III têm estes expressos basicamente em células de origem epitelial (DONNELLY; KOTENKO, 2010).

Desde que foram descobertos como moléculas capazes de interferir na replicação viral em células infectadas, os IFNs passaram a ser reconhecidos como reguladores centrais da resposta imune, exercendo atividades biológicas antivirais, antitumorais e imunomoduladora (Quadro 2).

Quadro 2 - Atividades biológicas dos interferons.

Atividade	IFN tipo I	IFN tipo II	IFN tipo III
Secretado por indução viral	++++	+++	++
Atividade antiviral	++++	++	++
Inibição do crescimento celular	++	++++	+
Indução de autofagia	++	++	NE
Estimulação/inibição da diferenciação celular	++	++++	NE
Estimulação de MHC de classe I	++	++++	++
Estimulação de MHC de classe II	++	++++	NE
Estimulação/inibição da fagocitose	++	++++	NE
Estimulação/inibição de produção de anticorpos	++	++++	NE
Inibição de parasitas intracelulares	+	++	NE
Indução de citocinas e quimiocinas	+	++	+

Fonte: Adaptado de Capobianchi et al. (2014).

Com relação à sua atividade antiviral, os IFNs agem sobre as células alvo, e não diretamente sobre o vírus, interferindo em uma ou mais fases do ciclo de replicação deste, e conferindo, assim, um estado de resistência viral às células. (CHELBI-ALIX; WIETZERBIN, 2007).

Modulam, também, a resposta imune inata, uma vez que otimizam a apresentação de antígenos, potencializam a ação de células NK e estimulam a produção de citocinas. Além disso, ativam a resposta imune adaptativa a partir de respostas celulares T e B, de alta afinidade antigênica e memória imunológica (CAPOBIANCHI et al., 2015).

Os IFNs, a fim de criarem um estado antiviral nas células infectadas (ação autócrina) e nas células vizinhas não infectadas (ação Parácrina), ativam nelas a transcrição de vários genes. Os principais sistemas enzimáticos originados da transcrição destes genes IFNs dependentes incluem as proteinoquinases (PKR) e as 2', 5' oligoadenilato sintetases, ambas ativadas por RNA de dupla fita. As PKR bloqueiam a transcrição viral e eventos translacionais, enquanto as 2', 5' oligoadenilato sintetases promovem a degradação do RNA viral (IMANISHI, 2004).

A atividade antitumoral dos IFNs acontece por ação direta sobre a célula tumoral ou, indiretamente, através da regulação de importantes processos biológicos

envolvidos no crescimento tumoral, tais como a angiogênese e o sistema imune (MUSELLA et al., 2017).

Os IFNs, sabidamente, afetam diferentes fases do ciclo mitótico, podendo prolongar ou bloquear o ciclo celular. Aos IFNs também é atribuída a capacidade de induzir apoptose, por meio da modulação das vias apoptóticas extrínseca e intrínseca (ou mitocondrial). Na via extrínseca, ocorre a estimulação de receptores de superfície, ativando a caspase-8. Na via intrínseca, as mitocôndrias são induzidas a liberar fatores apoptóticos, como o citocromo c, ativando outras caspases citoplasmáticas (THYRELL et al., 2002). Recentemente, também foi descrito que os IFNs induzem autofagia em células tumorais (SCHMEISSER; BEKISZ; ZOON, 2014).

Os IFNs atuam como potentes inibidores da angiogênese. Tal ação se dá através da inibição do fator de crescimento de fibroblasto (FGF), da diminuição da expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da inibição da proliferação e migração de células endoteliais. Estas atividades, em conjunto, têm, portanto, efeitos negativos sobre o crescimento tumoral (INDRACCOLO, 2010).

Além disso, os IFNs colaboram na elaboração de um ambiente imune antitumoral, aumentando a atividade lítica das células efectoras do sistema imune e potencializando a imunogenicidade das células tumorais. De fato, Os IFNs são capazes de aumentar, nas células tumorais, a expressão de antígenos de superfície, tal como o Major Histocompatibility Complex (MHC), resultando em reconhecimento mais eficiente destas células pelo sistema imune e, assim, favorecendo a ação dos leucócitos citotóxicos. Os IFNs induzem, também, a produção de anticorpos contra as células tumorais, facilitando a agressão destas pelo sistema complemento e pelos leucócitos anticorpos dependentes. Agem, ainda, como ativadores de várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, DCs, NKs, células B e células T (DI FRANCO et al., 2017)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo, desenvolvido no período de fevereiro de 2015 a dezembro de 2018, no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), em parceria com a Disciplina de Otorrinolaringologia (ORL) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM, com aprovação número 2672. Os pacientes foram esclarecidos a respeito dos objetivos do estudo (APÊNDICE A) e foi a eles solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B).

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por 13 pacientes portadores de RSCcPN eosinofílica, sendo oito do sexo masculino e cinco do sexo feminino, na faixa etária entre 19 e 73 anos, acompanhados no ambulatório de ORL da UFTM. Durante o procedimento de triagem, os pacientes foram submetidos à coleta da história clínica, exame otorrinolaringológico, endoscopia nasal, tomografia de seios paranasais e biópsia de pólipos da cavidade nasal. Os pacientes foram, também, avaliados por um pneumologista da Disciplina de Pneumologia da UFTM, com realização de espirometria.

Na seleção dos pacientes, foram adotados os seguintes critérios:

- a) **Critérios de inclusão:** pacientes maiores de 18 anos portadores de RSCcPN, segundo o European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012 (FOKKENS; LUND; MULLOL, 2012), e eosinofilia tecidual, verificada no estudo histológico dos pólipos nasais, apresentando mais de 20 eosinófilos por campo de grande aumento.
- b) **Critérios de exclusão:** RSCsPN, RSCcPN associada à fibrose cística, pólipo antrocoanal, rinossinusite fúngica alérgica, rinossinusite crônica associada a doença exacerbada pela aspirina e uso de corticosteroides nos 30 dias que antecederam a avaliação.

4.2 FORMATAÇÃO GERAL DO ESTUDO

Trata-se de estudo prospectivo, experimental, autopareado, com 13 amostras de pólipos nasais eosinofílicos. O grupo de estudo foi composto por culturas de células derivadas de pólipos nasais eosinofílicos, com aplicação de interferon- α in vitro. Para o grupo controle, seguiu-se o mesmo roteiro do grupo experimental, porém, sem a aplicação de interferon- α .

Todos os pacientes com RSCcPN, que se dispuseram a participar do estudo, após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento, foram agendados para comparecimento no ambulatório de Otorrinolaringologia da UFTM, em dia específico. Em tal data, após realização de tomografia de seios paranasais no setor de imagem da UFTM, o paciente foi encaminhado ao ambulatório de Otorrinolaringologia a fim de ali realizar história clínica, exame otorrinolaringológico, endoscopia nasal e biópsia dos pólipos nasais. Terminada a avaliação otorrinolaringológica, os pacientes foram orientados a procurar o ambulatório de Pneumologia da UFTM para avaliação clínica e realização de espirometria.

Durante a biópsia incisional dos pólipos nasais, foram coletados dois fragmentos de cada paciente. Um fragmento foi acondicionado em tubo plástico cônico, com formol, e encaminhado ao laboratório de Anatomopatologia da UFTM para realização de estudo histopatológico e determinação do infiltrado celular. O segundo fragmento foi acondicionado em tubo plástico cônico, estéril, com solução fisiológica a 0,9%, e encaminhado imediatamente ao laboratório do IPON da UFTM para realização de cultura celular.

O fragmento do pólipo destinado à cultura foi depositado em *placa de Petri* e divulgado, utilizando-se, para tal, pinças anatômicas e lâminas de bisturi número 21. O produto da divulsão foi lavado, na *placa de Petri*, com Roswell Park Memorial Institute (RPMI) incompleto, e transferido para tubo plástico cônico de 50 mililitros (ml). A este foi, então, adicionado RPMI incompleto até o volume de 15 ml. Em seguida, o tubo foi levado à centrifugação, a 4°C, velocidade de 2100 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos, sob refrigeração. Realizaram-se dois ciclos de centrifugação. Entre eles, o precipitado foi lavado com RPMI incompleto. Ao final da última centrifugação, o excesso de solução foi cuidadosamente removido e o precipitado foi ressuspenso em 8ml da solução. Em seguida, utilizou-se a *câmara de Neubauer* para contagem celular por ml de solução. Uma vez conhecida a

quantidade de células/ml da solução, foram semeadas 10^6 células, juntamente com RPMI completo, em uma placa de cultura contendo seis poços. Cada poço totalizava um volume de 2ml. As culturas foram, então, preservadas na incubadora. Ao término da preparação das culturas celulares, o restante da solução, que continha RPMI incompleto e pólipos nasais divulsionados, foi submetido ao protocolo de citometria de fluxo para identificação e quantificação de células Natural Killer T invariante (iNKT), assim como de seus receptores de ativação e inibição, descrito no item 4.8.

Todos os procedimentos foram executados em condições estéreis, utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

Vinte e quatro horas após a incubação das culturas, foram aplicadas, em quatro poços considerados como o grupo experimental, 3000 UI de interferon- α . Aos dois poços restantes não foi adicionado o interferon- α , passando estes a constituir o grupo controle. Após a aplicação da citocina citada, as culturas retornaram à estufa, considerando-se este momento como tempo zero. Doze horas decorridas da aplicação do interferon- α , coletou-se o sobrenadante da cultura de dois poços do grupo experimental, denominados, então, de experimento 12 horas. As culturas retornaram novamente para a estufa. Vinte e quatro horas após a introdução do interferon- α , recolheu-se o sobrenadante dos outros dois poços do grupo experimental, os quais foram classificados como experimento 24 horas. Nesse momento, foi coletado também o sobrenadante dos dois poços que não sofreram a ação do interferon- α (grupo controle). Todo sobrenadante coletado foi armazenado em eppendorfs e mantido, no freezer, a -80°C . Posteriormente, ele, na sua totalidade, foi analisado por CBA, através do que se verificou a concentração das interleucinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β e IFN- γ .

4.3 BIÓPSIA DO PÓLIPO NASAL E DA MUCOSA SINUSAL CONTROLE

A biópsia dos pólipos nasais foi realizada no ambulatório de ORL da UFTM. Após anestesia tópica com lidocaína a 2%, sem vasoconstritor, retiraram-se dois fragmentos dos pólipos nasais, utilizando-se, para tal, micro tesoura e micro pinça. Um fragmento foi enviado para cultura celular e o outro para estudo histopatológico, a fim de se determinar o infiltrado celular e a eosinofilia tecidual. Para constituir as amostras teciduais que serviram de controle da pesquisa de células iNKT, coletou-se fragmento de mucosa do seio esfenoidal de cinco pacientes que não apresentavam

doença de vias aéreas e que haviam sido submetidos à cirurgia transesfenoidal para acesso a tumor de hipófise.

4.4 AVALIAÇÃO E ESTADIAMENTO DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DOS SEIOS PARANASAIS (TCSP) E DA ENDOSCOPIA NASAL

Os pacientes foram submetidos à TCSP, sem uso de contraste. Utilizou-se, para tal, tomógrafo da marca *Toshiba Aquilion* 64 canais. As imagens, em cortes coronal e axial de 0,5 milímetros (mm) de volume e reconstrução de 5mm de espessura, foram analisadas pelo pesquisador e classificadas segundo o sistema proposto por Lund-Mackay (LUND; MACKAY, 1993).

Neste sistema, os seios paranasais (frontal, maxilar, etmoidal anterior, etmoidal posterior e esfenóide) são pontuados com a nota zero (sem opacificação), um (opacificação parcial) e dois (opacificação total). O complexo osteomeatal também recebe pontuações: nota zero (não obstruído) e nota dois (obstruído). Assim, considerando-se os lados direito e esquerdo das imagens analisadas, os pacientes receberam, na totalidade, um score que variou de 0 a 24 pontos.

A endoscopia foi realizada em ambas as fossas nasais, utilizando-se, para tal, fibra ótica rígida de 4mm de diâmetro e zero grau de angulação, da marca *Storz*. A quantificação da endoscopia baseou-se na proposta de Lund-Kennedy (LUND; KENNEDY, 1997).

Nessa classificação, a endoscopia é quantificada em zero (ausência de pólipos), um (pólipos confinados no meato médio) e dois (pólipos além do meato médio). Portanto, considerando as fossas nasais direita e esquerda, a pontuação dos pacientes variou de zero a quatro pontos.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA ASMA

Todos os pacientes foram avaliados pela disciplina de Pneumologia da UFTM, a qual definiu a presença ou ausência de asma, segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma de 2012. Foram considerados os seguintes critérios: história clínica (dispneia, tosse crônica, sibilância, opressão ou desconforto torácico, sobretudo à noite ou nas primeiras horas da manhã) e prova de função pulmonar (espirometria mostrando a relação

volume expiratório forçado no primeiro segundo/capacidade vital forçada (VEF1/CVF) < 75% com reversibilidade de pelo menos 7% após salbutamol) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2012).

4.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DA EOSINOFILIA

Os fragmentos destinados à análise histopatológica foram fixados em formaldeído diluído a 4% tamponado, processados, incluídos em parafina e corados segundo a técnica de hematoxilina-eosina (HE). A presença e a quantidade de eosinófilos, nas biópsias, foram avaliadas simultaneamente por dois observadores (um médico patologista do setor de Patologia da UFTM e o pesquisador). Os cortes histológicos, medindo cerca de 4µm de espessura e corados com HE, foram estudados em microscópio de luz comum (OLYMPUS BX41®) e, primeiramente, sob um aumento de 100 vezes, a fim de uma avaliação geral. Os eosinófilos, presentes no tecido conjuntivo subepitelial, foram contados segundo uma modificação do método proposto por Ruffoli et al. (2004). Quantificaram-se os eosinófilos, sob um aumento de 400 vezes, em cinco campos, calculando-se a média do número de eosinófilos por campo. Os pólipos que apresentaram média maior que 20 eosinófilos por campo de grande aumento (CGA) foram considerados eosinofílicos.

4.7 MEIO DE CULTURA UTILIZADO

As células derivadas dos pólipos nasais foram cultivadas, a 37°C, em 2000 microlitros de RPMI 1640 contendo 5% de CO₂, 10% de soro bovino fetal, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, 200 mµ de L-glutamina, 10.000UI de penicilina, beta mercapitanol e 10mg/ml de estreptomicina (meio completo comercializado por Sigma).

4.8 PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER T INVARIANTE (INKT) E SEUS RECEPTORES DE ATIVAÇÃO (NKG2D) E INIBIÇÃO (KIR) POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células, obtidas do produto de divulsão dos pólipos nasais e da mucosa sinusal dos pacientes controle, foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL.

Foram adicionados 30 mL de tampão PBS 1% (phosphate buffered saline 1%), sob pH 7,4. As células foram lavadas com meio RPMI incompleto e centrifugadas a uma rotação de 2000G, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, mantendo-se o precipitado de células no fundo do tubo cônico. Repetiu-se, novamente, a centrifugação, sob as mesmas condições, retirando o excesso do meio RPMI incompleto.

Ao final da segunda centrifugação, foi retirado o PBS, deixando aproximadamente 1mL no precipitado de células. Acrescentou-se, então, 3 µL da proteína transportadora inibitória (BD GolgistoTM). Incubou-se por 20 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 25 mL de PBS, utilizando-se a centrifugação e as mesmas condições anteriores, a fim de se retirar o excesso da proteína.

Concluída a centrifugação, retirou-se o sobrenadante, reservando apenas o precipitado de células, o qual foi ressuspendido em 1 mL de PBS. Transferiram-se, então, 20µL das células ressuspendidas para tubos Eppendorf contendo 180µL de solução de Turk, objetivando determinar a quantidade das células obtidas. Estas foram contadas utilizando-se microscópio óptico e câmara de Neubauer. Após a quantificação, 10⁶ células foram transferidas para cada tubo de ensaio, realizando-se a marcação extracelular. Os tubos foram distribuídos da seguinte forma: dois tubos para as marcações dos receptores de ativação e inibição e um tubo para o TCR invariante das células iNKT.

Os anticorpos utilizados para as marcações dos receptores de membrana extracelular foram o NKG2D APC BD (APC – *Allophycocyanin*), o iNKT FITC BD (FITC - *Fluorescein Conjugate*) e o KIRNKT₂ PE (PE – *Phycoerythrin*) (Quadro 3). Uma vez marcados, incubaram-se as células, a 4° e ao abrigo da luz, por 30 minutos.

Quadro 3 - Marcadores extracelulares.

Tubos	Extracelular	Intracelular
1	KIRNKT ₂ PE	-----
2	NKG2D APC	-----
3	NKT FITC	-----

Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

Em seguida, realizaram-se duas lavagem das células com 1mL de PBS, intercalando centrifugações a 2000G, a 4°C, por dez minutos, com o propósito de remover o excesso de anticorpos. Por fim, as células foram ressuspendidas em 500 µL de PBS para a leitura no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™. Os isotipos controle utilizados foram Mouse IgG2a PE BD, Mouse IgG2a APC BD e Mouse IgG1 Fitc BD. Os resultados obtidos foram armazenados em banco de dados para realização de análises e cálculo dos testes estatísticos.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

As amostras dos sobrenadantes das culturas celulares foram submetidas à dosagem de citocinas por Cytometric Bead Array (CBA) BD™ Kit II para dosagem de Citocinas Humanas Th1/Th2 (*Human Th1/Th2 Cytokine Kit II*: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, Catalog Number 551809 – Becton Dickinson Bioscience Pharmigen, BD™, San Diego, CA, EUA).

Inicialmente, os padrões de citocinas humanas Th1/Th2 foram reconstituídos antes de serem adicionadas as esferas de captura e o reagente de detecção. O padrão humano Th1/Th2 liofilizado foi reconstituído em um tubo de polipropileno de 5mL, rotulado como "Top Standard" padrão superior, para o qual foram transferidas as esferas e adicionados 2,0mL do diluente de ensaio. Logo após, o tubo foi incubado, por 15 minutos, a temperatura ambiente, antes da realização das diluições seriadas. A seguir, tubos foram identificados como 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256, pipetando-se 300µl de diluente de ensaio em cada um.

A partir desse ponto, iniciaram-se as diluições em série, transferindo-se 300µl do padrão superior para o tubo de diluição de 1:2, homogeneizando bem com a pipeta. Seguindo dessa forma, as diluições seriadas foram executadas, transferindo-se 300µl do tubo 1:2 para o tubo 1:4, e assim sucessivamente, até atingir o ponto final de 1:256, sempre homogeneizando bem com a pipeta. Para o branco da reação, preparou-se um tubo contendo somente diluente de ensaio, onde a concentração de citocinas era 0 pg/mL.

Finalizada a curva padrão, as esferas de captura foram preparadas adicionando-se 10µl de cada esfera em um único tubo rotulado mix de esferas de captura. A seguir, homogeneizou-se o tubo contendo as esferas de captura, em vortex, por alguns segundos, e incubou-se, por 30 minutos, à temperatura ambiente,

protegendo da exposição direta à luz. Após a incubação, as esferas de captura misturadas estavam prontas para serem transferidas para os tubos de ensaio de análise.

Nos respectivos tubos da curva padrão e dos pacientes a serem testados, adicionaram-se 50µl das esferas de captura misturadas. Em seguida, somaram-se 50µl do reagente de detecção humana PE Th1/Th2 aos tubos de ensaio, exceto ao tubo branco. Após esses dois passos, acrescentaram-se 50µl das diluições do padrão de citocinas em cada tubo identificado respectivamente com as diluições realizadas. Por conseguinte, adicionaram-se 50µl de cada amostra a ser testada aos tubos de ensaio teste (pacientes). Finalizado esse processo, incubaram-se os tubos de ensaio, durante três horas, à temperatura ambiente, protegido da exposição direta à luz. Adicionou-se, então, 1ml de tampão de lavagem a cada tubo de ensaio, centrifugando-os a 200 x g por cinco minutos. Concluída a centrifugação, foi aspirado, cuidadosamente, e descartado o sobrenadante de cada tubo de ensaio. Acrescentaram-se 300µl de tampão de lavagem em cada tubo, ressuspendendo o pellet de esferas. A seguir, realizaram-se o procedimento de calibração do citômetro de fluxo e as amostras foram analisadas no mesmo dia. O software utilizado para calibração e leitura das amostras foi o *BD Citometric Bead Array v1.4, BD™*.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Não houve cálculo estatístico para definição do tamanho da amostra, sendo esta definida por acessibilidade. Os resultados obtidos foram lançados em um banco de dados, empregando-se o *Microsoft Access 2000®*, e analisados por meio do programa *GraphPad Prism 5* para a análise estatística. A comparação estatística foi realizada por uma análise não paramétrica, usando o teste de *Wilcoxon*. Os testes foram considerados significativos quando a probabilidade de rejeição da hipótese era menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram analisadas amostras de tecido polipoide nasal de 13 pacientes com RSCcPN eosinofílica. A faixa etária dos pacientes variou de 19 a 73 anos, com média igual a 53 anos. Em relação ao sexo, houve predominância do sexo masculino (61%) em relação ao feminino (39%). Segundo critérios clínicos e provas pulmonares, 46% dos pacientes foram diagnosticados como asmáticos. A avaliação tomográfica dos pacientes determinou uma média do escore de Lund-Mackay de 17 pontos (total máximo de 24), enquanto que a endoscopia das fossas nasais revelou uma pontuação média de 3,69 pontos (total máximo de 4), segundo a proposta de Lund-Kennedy (Tabela 1).

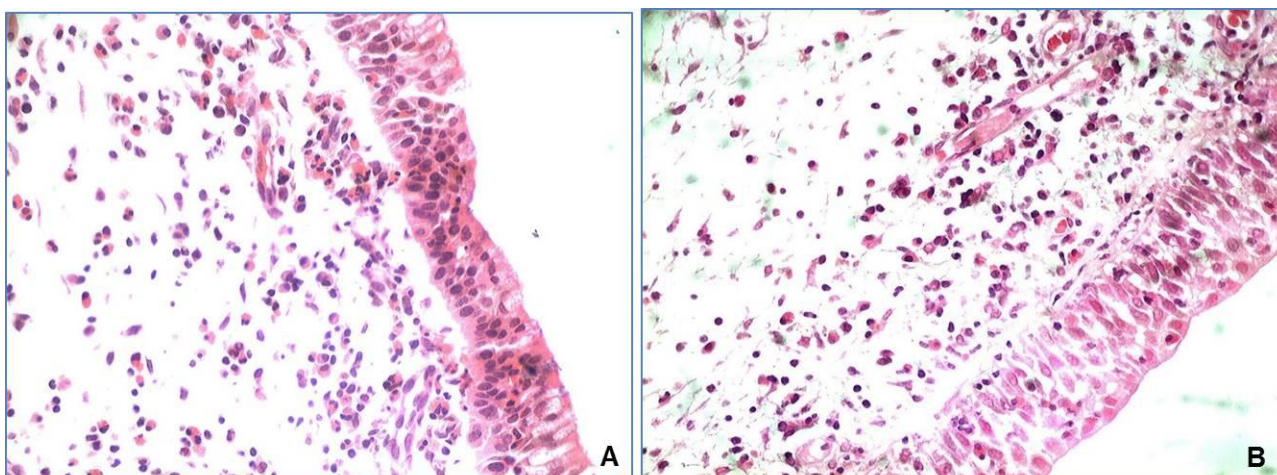
Tabela 1 - Características da amostra. Uberaba (MG), (2017).

Caso	Idade	Sexo	Asma	Lund-Mackay	Lund-Kennedy
1	72	F	Positivo	22	4
2	42	M	Negativo	12	3
3	69	M	Positivo	20	4
4	68	F	Positivo	22	4
5	53	M	Negativo	14	4
6	35	F	Positivo	14	3
7	54	M	Negativo	15	4
8	73	F	Negativo	16	4
9	50	M	Positivo	18	4
10	19	F	Negativo	14	4
11	44	M	Positivo	22	3
12	58	M	Negativo	16	4
13	52	M	Negativo	17	3

Todas as amostras de tecido polipoide nasal utilizadas na pesquisa apresentaram, na análise histopatológica, mais de 20 eosinófilos por campo de

grande aumento. Esse achado serviu de referência para classificação dos pólipos nasais em eosinofílicos.

Figura 6 - Tecido polipoide nasal corado em hematoxilina e eosina. Infiltração eosinofílica predominante nos pacientes com RSCcPN eosinofílica (A). Infiltrado inflamatório sem predominância eosinofílica nos pacientes com RSCcPN não eosinofílica (B) (400x).



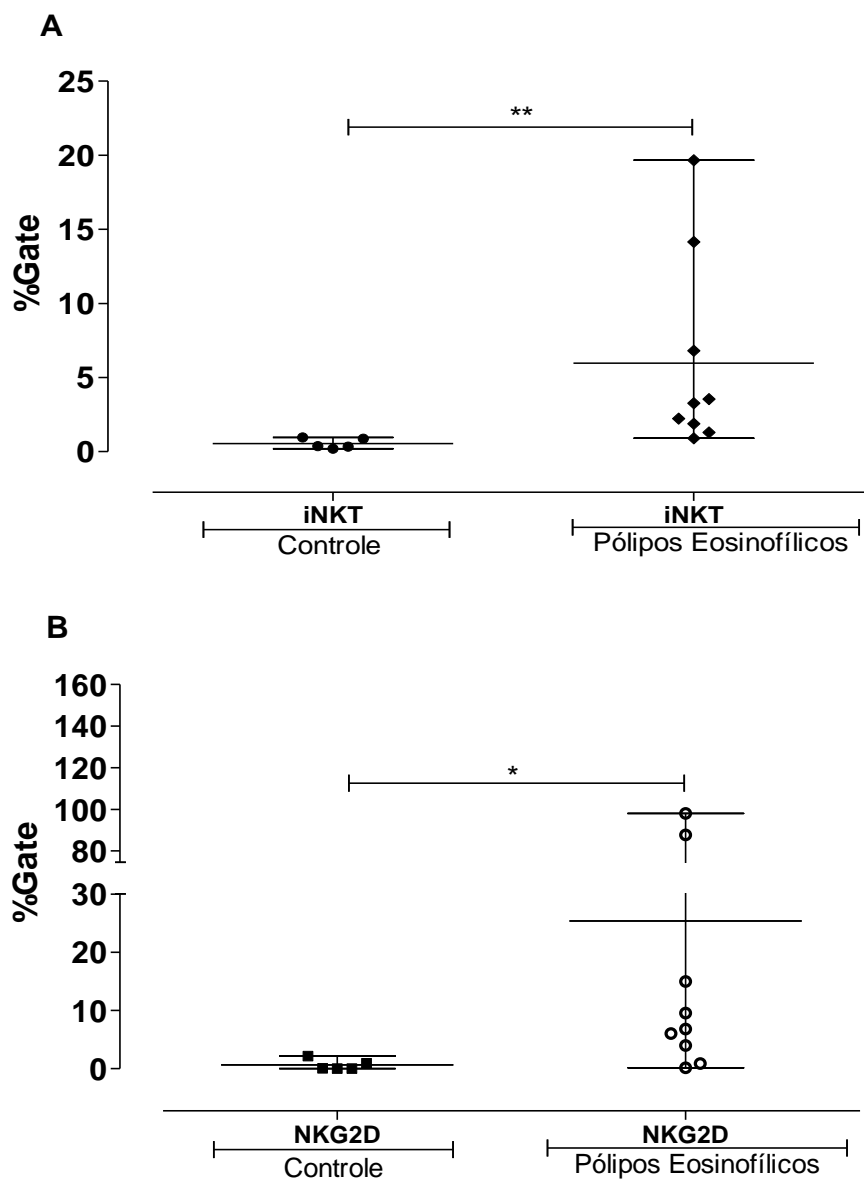
Fonte: Elaborado pelo autor (2018).

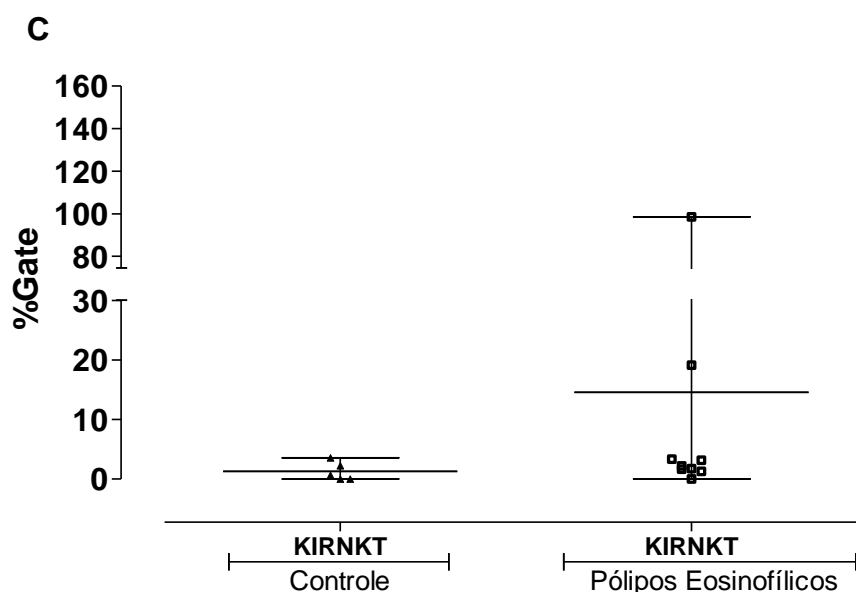
5.2 ANÁLISE DAS CÉLULAS NATURAL KILLER T INVARIANTES (iNKT) E SEUS RECEPTORES DE ATIVAÇÃO (NKG2D) E INIBIÇÃO (KIR) NOS PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS

As amostras de tecido polipoide nasal eosinofílico selecionadas para o estudo foram coletadas de 13 pacientes com RSCcPN. Após a realização das culturas celulares, apenas nove dessas amostras apresentaram celularidade suficiente para serem submetidas ao protocolo de análise das células iNKT e seus receptores NKG2D e KIR. Na identificação das células iNKT e seus receptores de ativação (NKG2D) e inibição (KIR), foram utilizados os anticorpos de marcação extracelular NKT FITC, NKG2D APC e KIRNKT2 PE, respectivamente.

Os dados são apresentados em mediana de Gate percentage (número de células positivas para cada marcador), a qual foi obtida a partir de amostras de tecido polipoide nasal eosinofílico de pacientes com RSCcPN e de mucosa do seio esfenoidal de pacientes sem patologia nasossinusal (controle) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - A-C Valores da porcentagem de gate das células natural killer T invariantes (iNKT) (A) e dos seus receptores de ativação, NKG2D (B) e inibição, KIR (C).





Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo. Os valores representam a análise comparativa entre o tecido polipoide nasal eosinofílico, e a mucosa do seio esfenoidal de pacientes sem doença nasossinusal. Os resultados foram analisados utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

O gráfico 1A demonstra que o tecido polipoide nasal eosinofílico apresenta concentração significativamente maior ($p=0,002$) de células iNKT em relação à mucosa sinusal controle. Da mesma forma, o gráfico 1B também evidencia concentração significativamente maior ($p=0,012$) dos receptores de ativação, NKG2D, das células iNKT, no tecido polipoide nasal eosinofílico, comparativamente ao controle. Embora tenha havido maior concentração dos receptores de inibição, KIR, no tecido polipoide nasal, essa diferença não se mostrou significativa em relação à mucosa sinusal controle, segundo consta no gráfico 1C.

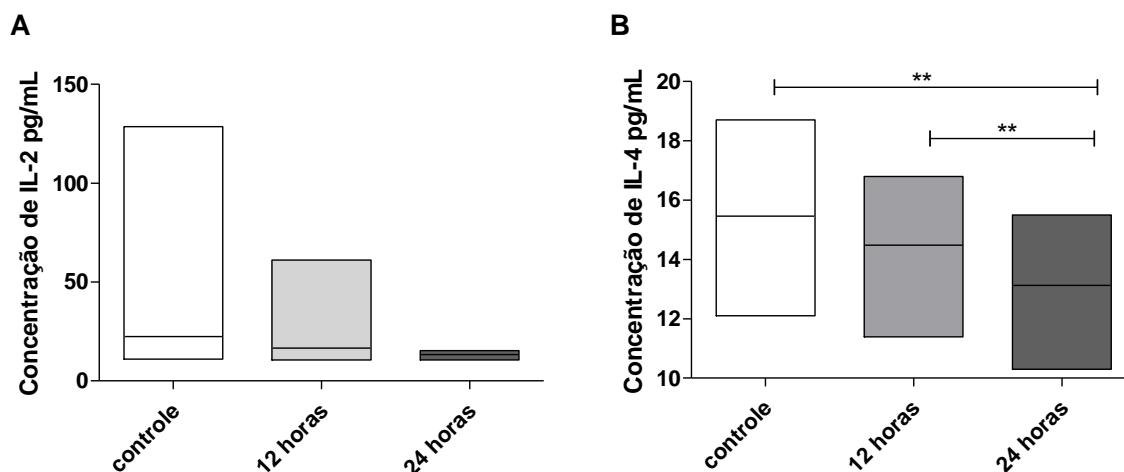
Os achados descritos acima indicam presença significativamente maior de células iNKT e do seu receptor de ativação (NKG2D), no tecido polipoide nasal dos pacientes com RSCcPN eosinofílica, em relação à mucosa sinusal controle, sugerindo sua ativação e participação na fisiopatogenia da polipose nasal eosinofílica.

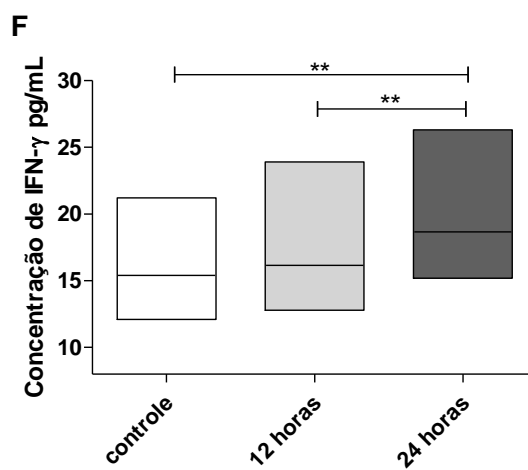
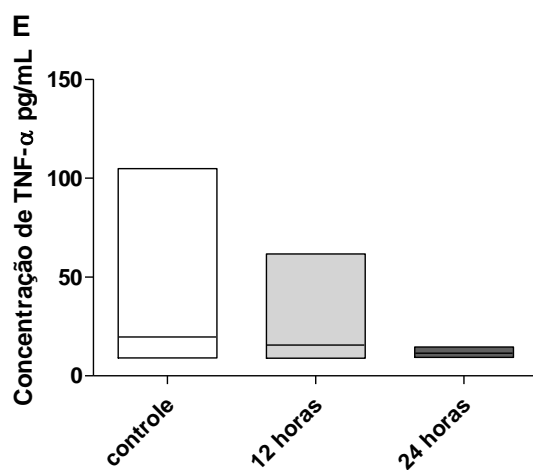
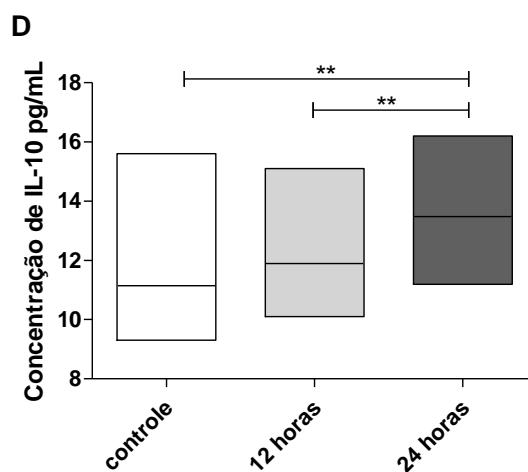
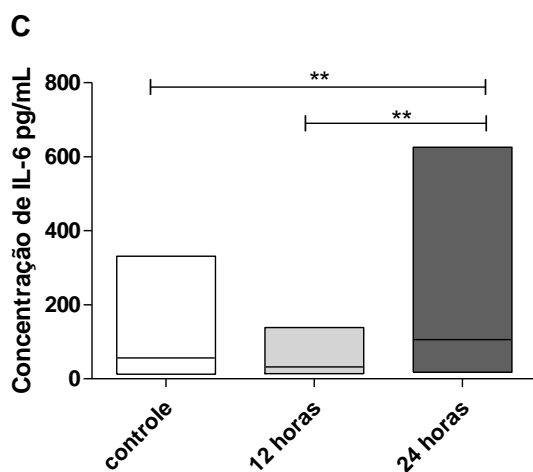
5.3 ANÁLISE DAS CITOCINAS NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS CELULARES DOS PÓLIPOS NASAIS EOSINOFÍLICOS, ANTES E APÓS A AÇÃO DO INTERFERON- α

As citocinas são elementos fundamentais na construção do ambiente inflamatório. Relacionam-se com a proliferação celular, quimiotaxia, apoptose e diferenciação celular. A RSCcPN eosinofílica representa uma condição inflamatória heterogênea, com vários perfis de citocinas presentes, merecendo destaque o perfil Th2. O IFN- α é uma citocina com habilidade imunomoduladora, utilizada no tratamento de várias condições clínicas.

Nesse sentido, a fim de verificar sua ação imunorregulatória sobre a RSCcPN eosinofílica, foi realizada a quantificação, por CBA, das seguintes citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , em sobrenadantes de culturas celulares de pólipos nasais eosinofílicos, antes e após a ação do IFN- α . Os resultados estão apresentados no gráfico 2 e na tabela 2.

Gráfico 2 - A/F- Concentração de citocinas em sobrenadantes de culturas celulares de pólipos nasais eosinofílicos, após 12 e 24 horas de estimulação com IFN- α .





Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo de concentração (pg/mL) das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Os resultados foram analisados utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

Tabela 2 - Valores das medianas, máximo e mínimo das concentrações das interleucinas dosadas nos sobrenadantes das culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos.

	Controle	12 horas	24 horas
IL-4	15,80 (12,10 - 18,70)**	15,30 (11,40 - 16,80)##	13,20 (10,30 - 15,50)**/##
IL-6	29,20 (12,20 - 331,50)**	20,90 (14,50 - 138,30)##	32,90 (17,90 - 625,90)**/##
IL-10	10,70 (9,30 - 15,60)**	11,50 (10,10 - 15,10)##	13,80 (11,20 - 16,20)**/##
IFN-γ	14,70 (12,10 - 21,20)**	15,60 (12,80 - 23,90)##	17,90 (15,20 - 26,30)**/##
IL-2	13,80 (10,90 - 128,50)	13,10 (10,60 - 61,10)	12,95 (10,60 - 15,30)
TNF-α	12,00 (9,10 - 104,80)	12,20 (9,00 - 61,70)	11,30 (9,50 - 14,70)

Legenda: ** p<0,05 para as comparações entre controle e 24 horas / ## p<0,05 para as comparações entre 12 e 24 horas.

Ao avaliar a concentração das interleucinas no sobrenadante das culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, encontrou-se uma diminuição significativa da concentração de IL-4 ($p = 0,0078$), em relação aos controles, 24 horas após a exposição das culturas à ação do IFN- α . Observou-se também que a redução da concentração de IL-4 foi significativamente mais intensa nas culturas avaliadas 24 horas após o estímulo do IFN- α , comparativamente às culturas avaliadas 12 horas após ($p = 0,0039$) (gráfico 2 B).

Com relação à IL-6 ($p = 0,0186$), à IL-10 ($p = 0,0039$) e ao IFN- γ ($p = 0,0039$), as culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos apresentaram, relativamente aos controles, aumento significativo das suas concentrações, 24 horas após à ação do IFN- α . Notou-se também que a elevação da concentração destas citocinas foi significativamente mais relevante nas culturas avaliadas 24 horas após o estímulo do IFN- α , comparativamente às culturas avaliadas 12 horas após ($p = 0,0039$ para IL-6, $p = 0,0091$ para IL-10 e $p = 0,0269$ para IFN- γ) (gráficos 2 C, D e F).

Ao que se refere às interleucinas IL-2 e TNF- α , não houve diferença significativa nas suas concentrações, em relação aos controles, após a estimulação das culturas com o IFN- α (gráficos 2 A e E).

6 DISCUSSÃO

Os conhecimentos atuais a respeito da RSCcPN permitem afirmar que essa patologia representa uma doença, essencialmente inflamatória, de etiologia desconhecida. Com o avanço da compreensão sobre a arquitetura da biologia molecular e celular que permeia a RSCcPN, tornou-se evidente que o diagnóstico fenotípico de RSCcPN envolve uma variedade de vias inflamatórias distintas. A tendência, atualmente, é individualizar tais vias, por meio de biomarcadores, a fim de se conhecer os vários endótipos da RSCcPN (CHIN; HARVEY, 2013).

Os estudos têm demonstrado que, no Ocidente, a maioria dos pacientes com RSCcPN apresenta endótipo caracterizado por infiltrado celular predominantemente eosinofílico e perfil imunológico, onde se destacam as citocinas do perfil Th2. As citocinas exercem papel de destaque na individualização dos endótipos da RSCcPN, uma vez que se relacionam com a resposta imune adaptativa a fatores exógenos e influenciam o ambiente tecidual local, a partir do recrutamento de vários tipos celulares (STEVENS et al., 2015; WANG et al., 2016; TAN; MIN; HULSE, 2017).

A intensidade da infiltração eosinofílica no tecido polipoide caracteriza a RSCcPN em eosinofílica ou não eosinofílica, além de ter implicações prognósticas. A RSCcPN eosinofílica está associada a maior severidade clínica e radiológica, maior risco de ocorrência de asma e maior incidência de recidiva da polipose após tratamento cirúrgico (LÓPEZ-CHACÓN; MULLOL; PUJOLS, 2015).

No estudo de Aslan et al (2017), a severidade clínica de 53 pacientes com RSCcPN foi avaliada por meio da análise de tomografia computadorizada de seios paranasais (usando índice de Lund-Mackay) e de endoscopia nasal (usando índice de Lund-Kennedy). Os pólipos nasais foram classificados em eosinofílicos (eosinofilia tecidual > 10 eosinófilos/CGA) e não eosinofílicos (eosinofilia tecidual < 10 eosinófilos/CGA). Os autores encontraram, nos pacientes com pólipos eosinofílicos, pontuação média igual a 13,5 para o índice de Lund-Mackay e 2,8 para o índice Lund-Kennedy. Estes valores foram significativamente maiores que os encontrados nos pólipos não eosinofílicos.

Em outra pesquisa, Wang et al. (2014), utilizando critérios de eosinofilia tecidual, valores > 5 eosinófilos/CGA (pólipos eosinofílicos) e < 5 eosinófilos/CGA (pólipos não eosinofílicos), estudaram 60 pacientes com RSCcPN. Os índices médios de Lund-Mackay para tomografia de seios paranasais e Lund-Kennedy para

endoscopia nasal foram, respectivamente, 14,42 e 3,59, para os pólipos eosinofílicos, e 9,64 e 2,06 para os não eosinofílicos.

Na amostra desta pesquisa de pacientes com RSCcPN eosinofílica, cujo critério para eosinofilia tecidual foi de 20 ou mais eosinófilos/CGA, também verificou-se valores relevantes dos índices de Lund-Mackay (17/24) e Lundy-Kennedy (3,69/4). Esses achados, em conformidade com a literatura, reafirmam a severidade clínica dos pacientes com polipose nasal eosinofílica.

Sabe-se que 46% dos pacientes avaliados em neste estudo receberam o diagnóstico de asma. De fato, a associação entre asma e RSCcPN já é conhecida, e, do ponto de vista histopatológico, tais entidades compartilham algumas alterações, tais como: inflamação eosinofílica, dano epitelial e espessamento da membrana basal da mucosa respiratória (PONIKAU et al., 2003). Uma Pesquisa, realizada por Hopkins et al. (2009), avaliou 2176 pacientes com RSCcPN submetidos a tratamento cirúrgico de polipose nasal. Destes, 37,5% dos pacientes eram asmáticos.

A faixa etária dos pacientes deste estudo variou de 19 a 73 anos, com média igual a 53. A distribuição por sexo apresentou 61% masculino e 39% feminino.

Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Rugina et al. (2002), onde avaliaram-se 224 pacientes com RSCcPN e cuja idade variava de 14 a 73 anos (média igual a 46), sendo 63% do sexo masculino. Durante um estudo de incidência de RSCcPN, Larsen e Tos (2002) avaliaram 253 pacientes, sendo 69% do sexo masculino. Os autores observaram que a incidência de RSCcPN foi maior no grupo etário de 50 a 59 anos.

Ao confrontar as características clínicas e epidemiológicas desta amostra com a literatura, é possível afirmar que se trata de um grupo de pacientes representativo do universo da RSCcPN.

Em se tratando de definir eosinofilia no tecido polipoide, o que o caracteriza como eosinofílico, não há, na literatura, um consenso sobre qual seria o melhor método de quantificar essa celularidade. Isso representa o principal obstáculo na padronização das pesquisas em RSCcPN eosinofílica.

Alguns autores têm elaborado sistema de classificação que leva em consideração a severidade da infiltração eosinofílica no tecido polipoide: zero (não eosinofílico), um (infiltração leve), dois (moderada) e três (acentuada) (HAO; PANG; WANG, 2006; KIRTSREESAKUL; ATCHARIYASATHIAN, 2006).

Entretanto, esse sistema se baseia na avaliação subjetiva do patologista. Outros estudos têm definido a eosinofilia tecidual segundo a proporção dos eosinófilos em relação ao restante da celularidade (BONFILS et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Porém, esse método apresenta também limitações, uma vez que a proporção muda de acordo com o número total de células do infiltrado inflamatório.

Outra forma de se aferir a eosinofilia tecidual, que foi, primariamente, utilizada no estudo do papel do eosinófilo na fisiopatogenia da RSCcPN, diz respeito ao uso de marcadores imunológicos para o eosinófilo e seus produtos (THOMPSON et al., 2016). A maioria das pesquisas sobre RSCcPN eosinofílica utiliza a contagem tecidual de eosinófilos/CGA para definir a eosinofilia. Entretanto, não há consenso em relação ao valor de corte que melhor expressaria a importância da eosinofilia no tecido polipoide. Os estudos arbitram valores extremamente variados para a contagem dos eosinófilos, a qual define a RSCcPN em eosinofílica ou não eosinofílica: > que 5 eosinófilos/CGA (KIM et al., 2013), > que 10 eosinófilos/CGA (SOLER et al., 2010), > 70 eosinófilos/CGA (TOKUNAGA et al., 2015) e, até mesmo > que 100 eosinófilos/CGA (IKEDA et al., 2013).

Então, diante da dificuldade de se definir eosinofilia tecidual, quando se propõe classificar a RSCcPN em eosinofílica ou não eosinofílica, segundo a contagem de eosinófilos/CGA, espera-se que o valor de corte tomado como referência reflita diferenças clínicas, assim como desfechos pós tratamento.

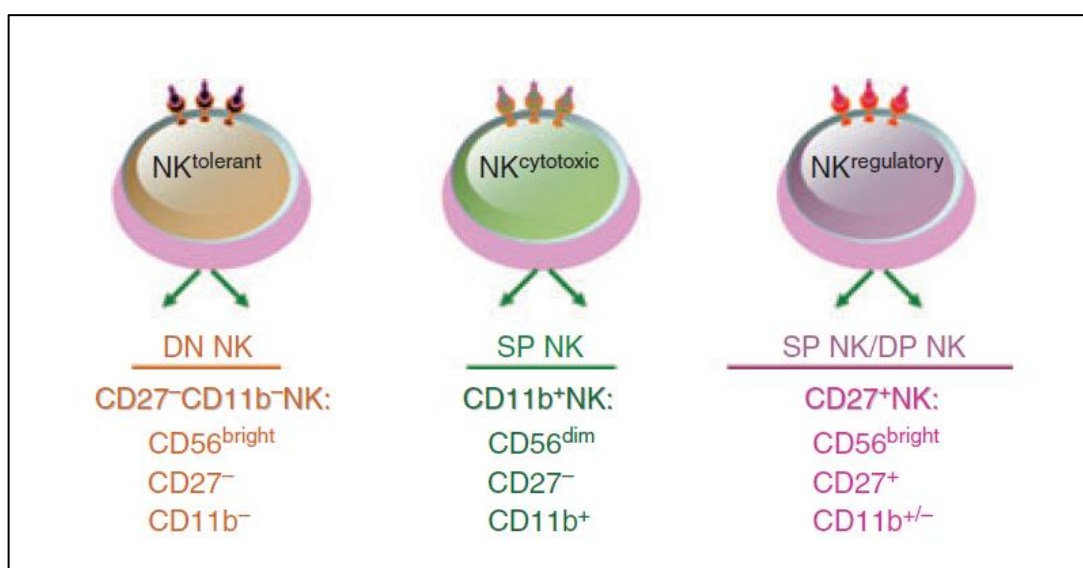
Um estudo prospectivo, realizado por Soler et al. (2010), avaliou o impacto da eosinofilia tecidual no score de qualidade de vida de pacientes com RSCcPN e RSCsPN, antes e após tratamento cirúrgico. Segundo os autores, eosinofilia ≥ 10 eosinófilos/CGA, como critério para eosinofilia tecidual, refletiu o menor ganho em qualidade de vida após o tratamento cirúrgico.

Em outro estudo, Snidvongs et al. (2012) avaliaram as queixas clínicas e o comprometimento tomográfico dos seios paranasais e endoscópico das fossas nasais de pacientes com RSCcPN e RSCsPN submetidos a tratamento cirúrgico. Ao basear-se no resultado histopatológico pós-cirúrgico, os pacientes foram agrupados segundo três níveis de eosinofilia tecidual: < 5 eosinófilos/CGA, 5-10 eosinófilos/CGA e ≥ 10 eosinófilos/CGA. Quando confrontadas as avaliações clínicas com os níveis de eosinofilia tecidual, os autores identificaram piores avaliações clínicas nos pacientes com eosinofilia ≥ 10 eosinófilos/CGA. Assim, optou-se pela

presença de ≥ 20 eosinófilos/CGA como critério de corte para definição de pólipos nasal eosinofílico.

Os resultados desta pesquisa demonstraram aumento significativo de células iNKT, assim como seu receptor de ativação NKG2D, nos pólipos eosinofílicos, em relação à mucosa sinusal de pacientes controle. As investigações a respeito da fisiopatogenia do processo inflamatório da RSCcPN eosinofílica têm dispensado atenção especial à participação das respostas imunes inata e adaptativa. As células NK compreendem um grupo de linfócitos bastante heterogêneo no que se refere aos seus marcadores de superfície e funcionalidade. Inicialmente, essas células foram concebidas como componentes do sistema imune inato, capazes de destruir células tumorais ou infectadas por vírus. Entretanto, atualmente, tornou-se evidente sua capacidade de formatar e influenciar a resposta imune adaptativa, exercendo ação imunorregulatória (FU et al., 2014).

Figura 7 - Variedade fenotípica e funcional das células NK.



Fonte: Adaptado de Fu, Tian e Wei (2014).

As células NKT compreendem um subgrupo específico de linfócitos que apresentam características tanto das células NK quanto das células T convencionais. Formam um grupo heterogêneo de células identificadas a partir do tipo de TCR presente na superfície (SEINO; TANIGUCHI, 2005). Geralmente, as funções efetoras das células NKT são reguladas pelo balanço entre a sinalização de receptores de ativação e inibição presentes nestas células. O NKG2D é um receptor

de ativação, semelhante à lectina tipo C, capaz de reconhecer uma série de proteínas, e que se destaca na determinação do estado de atividade das células NK. Por outro lado, o KIR corresponde a um receptor inibitório, que tem como principal ligante o MHC classe I (MISTRY; O'CALLAGHAN, 2007).

Também conhecidas como células NKT tipo I ou clássicas, as iNKT são células $CD4^+$ ou $CD4^-CD8^-$ que expressam na superfície um TCR formado por uma cadeia α invariante ($V\alpha 24-J\alpha 18$) em combinação com $TCR\beta$ ($V\beta 11$). Essas células são ativadas por antígenos lipídicos ligados a uma molécula do complexo de histocompatibilidade não clássica chamada CD1d. Quando ativadas, as iNKT prontamente produzem grande quantidade de citocinas. Essa produção ocorre muito mais rapidamente do que a realizada pelas células T convencionais, podendo, assim, regular e amplificar a resposta imune adaptativa e influenciar, portanto, a função das células DCs, NK, B e T (GAPIN, 2016).

Embora sejam crescentes as evidências de que o sistema imune inato participe da patogênese da RSCcPN eosinofílica, pouco se sabe a respeito da participação das células NK e, em especial, das células iNKT no desenvolvimento da polipose nasal.

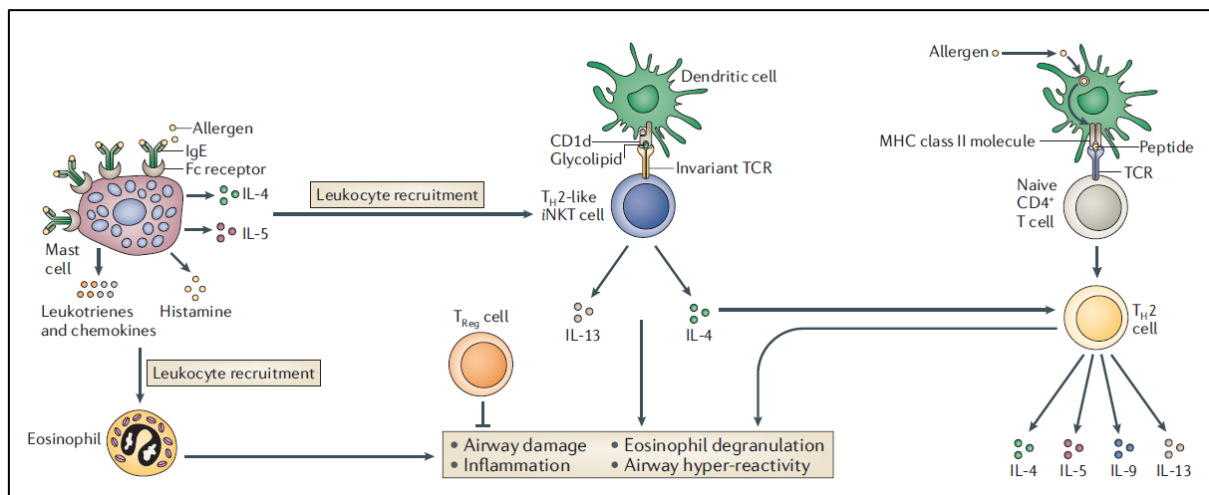
Yamamoto et al. (2007) pesquisaram a presença de células NKT, assim como a expressão de citocinas do perfil Th2, na mucosa sinusal de 16 pacientes com RSCcPN asmáticos e não asmáticos. Utilizou-se a avaliação histológica da mucosa sinusal para separá-los em eosinofílicos ou neutrofílicos. Os resultados demonstraram a presença de células NKT, em graus variados, nos pacientes com RSCcPN eosinofílicos e asmáticos. Não foi observada a presença de células NKT nos pacientes não asmáticos. As citocinas do perfil Th2 também tiveram sua expressão aumentada significativamente nos pacientes asmáticos em relação aos não asmáticos. Os autores concluíram que as células NKT podem, portanto, executar importante papel no aumento da expressão de citocinas Th2 e favorecerem a infiltração de eosinófilos, observados na mucosa sinusal dos pacientes com RSCcPN e asmáticos (YAMAMOTO et al., 2007).

Em outro estudo, Cao et al. (2009) por meio da expressão de um marcador de células NKT ($V\alpha 24$), compararam a infiltração dessas células em amostras de tecido polipoide de pacientes com RSCcPN eosinofílica e não eosinofílica. Encontraram aumento significativo de células NKT em pólipos eosinofílicos, quando comparados aos não eosinofílicos.

Embora o papel das células iNKT na fisiopatogenia da RSCcPN eosinofílica não tenha ainda sido investigado, estudos têm demonstrado que as células iNKT exercem função de destaque nos processos inflamatórios eosinofílicos das vias aéreas inferiores, tal como a asma (UMETSU; DEKRUYFF, 2006; GORSKA, 2017).

Akbari et al. (2006) examinaram a frequência e distribuição das células iNKT no tecido pulmonar de pacientes com asma persistente moderada a severa. Aproximadamente, 60% das células $CD4^+CD3^+$ nesses pacientes, não eram células T $CD4^+$ ligadas ao MHC de classe II, e sim células iNKT com a expressão do TCR invariante ($V\alpha 24-J\alpha 18$). Além disso, essas células expressaram perfil de citocinas semelhante às células Th2, com destaque para IL-4 e IL-13. Os autores concluíram que os pacientes com asma apresentam aumento da população de células iNKT-Th2 *like* que, juntamente com as células Th2, contribuem para potencializar o processo inflamatório pulmonar (AKBARI et al., 2006)

Figura 8 - Participação das células iNKT/Th2 like no modelo imunológico da asma



Fonte: Adaptado de Umetsu e Dekruff (2006).

Ao considerar as evidências de que as células iNKT atuam na fisiopatogenia da asma potencializando um ambiente inflamatório eosinofílico Th2, e, sabendo que a RSCcPN eosinofílica, assim como a asma, também se caracteriza pela eosinofilia e por um perfil de citocinas Th2, é razoável supor que o aumento de células iNKT e seu receptor de ativação (NKG2D), nos pólipos eosinofílicos, esteja, de alguma maneira, participando da fisiopatogenia dessa doença, e, provavelmente contribuindo com a inflamação eosinofílica.

O tratamento da RSCcPN eosinofílica ainda é um desafio para a otorrinolaringologia. Muitos pacientes demonstram controle insatisfatório da doença, a despeito do máximo tratamento clínico-cirúrgico. Os estudos têm demonstrado que os pacientes com RSCcPN eosinofílica apresentam desfechos clínicos piores que os não eosinofílicos, além de maior tendência à recidiva da polipose após o tratamento cirúrgico (SOLER et al., 2010; ISHITOYA; SAKUMA; TSUKUDA, 2010).

Até o momento, os corticosteroides, nas suas apresentações tópica e sistêmica, representam as opções terapêuticas com maiores níveis de evidência no tratamento da RSCcPN eosinofílica (FOKKENS et al., 2012b). Entretanto, por se tratar de uma doença de evolução crônica, o uso frequente da corticoterapia, principalmente, na forma sistêmica produz, não raramente, efeitos colaterais indesejáveis.

Bonfils, Halimi e Malinvaud (2006) avaliaram tais efeitos em 46 pacientes com RSCcPN severa que utilizaram, durante 12 meses, mais de três ciclos de corticoterapia via oral (prednisolona 1mg/Kg de peso corporal ao dia por seis a 10 dias). Os autores encontraram 43,5% de osteopenia na coluna lombar e 48,8% de insuficiência adrenal secundária.

Assim, ao considerar as limitações dos tratamentos disponíveis para a RSCcPN eosinofílica e o maior conhecimento a respeito da sua fisiopatogenia, procuram-se, atualmente, alternativas terapêuticas que estejam atreladas às bases moleculares dessa doença. Sob essa perspectiva, terapias biológicas, utilizando anticorpos monoclonais endereçados contra os biomarcadores da resposta inflamatória Th2, têm ganhado relevância. Destacam-se as pesquisas com omalizumab (anti-IgE), reslizumab/mepolizumab (anti-IL-5) e dupilumab (anti-receptor de IL-4 α) (GREVE et al., 2017).

No tratamento de doenças eosinofílicas, o IFN- α é considerado como opção na abordagem da Síndrome Hipereosinofílica Idiopática (SHI) e Síndrome de Churg-Straus. Entre as estratégias de tratamento da SHI, o IFN pode ser usado como monoterapia ou em combinação com os corticosteroides ou hidroxiuréia. Estudos *in vitro* sugerem alguns mecanismos sobre os quais o IFN atuaria nas síndromes eosinofílicas.

Segundo Aldebert et al. (1996), os eosinófilos apresentam um receptor de superfície para o IFN- α que, uma vez ativado, inibe a liberação dos seus grânulos tóxicos, contendo neurotoxina derivada do eosinófilo e proteína catiônica

eosinofílica. Outra ação do IFN- α , sobre a eosinofilia, diz respeito à sua habilidade em aumentar a expressão de IFN- γ , uma citocina pró-inflamatória produzida por linfócitos CD4 Th1, a qual inibe a diferenciação e migração dos eosinófilos *in vitro* (OCHIAI et al., 1995). Ainda, a ação do IFN- α , sobre células T e mastócitos, pode reduzir a produção de citocinas ativadoras dos eosinófilos (ZELLA et al., 2000) (KRISHNASWAMY et al., 2002).

O uso do IFN- α , no tratamento de doenças atópicas com perfil Th2, tem sido, mais recentemente, explorado.

Kroegel et al. (2006) avaliaram a ação do IFN α no manejo clínico de pacientes com asma persistente, severa e dependente de corticoterapia. O IFN- α foi administrado na dose de 9 μ g, subcutâneo, três vezes por semana, por um período superior a 24 meses. Segundo os autores, houve uma redução $\geq 60\%$ da necessidade do uso diário de beta 2 agonista pelos pacientes, assim como uma redução, de pelo menos 70%, das visitas às unidades hospitalares de emergência. Ao mesmo tempo, o uso do IFN α permitiu, pela primeira vez em oito anos, a descontinuação da dose diária do corticosteroide em todos os pacientes.

Recentemente, Neff et al. (2017) relataram uma série de oito pacientes com otite média eosinofílica tratados com interferon- α 2a e 2b peguilato (PEG-IFN). Os pacientes receberam uma injeção subcutânea semanal de PEG-IFN, na dose inicial de 90 μ g/semana para o IFN2a e 50 μ g/semana para o IFN2b. Os autores relataram resposta clínica satisfatória, com resolução completa da otorrêia, normalização da mucosa da orelha média e descontinuação da corticoterapia em 50% da amostra.

Não foram encontrados na literatura, nenhum relato de tratamento da RSCcPN eosinofílica com IFN- α . Foi proposto, então, a pesquisar, *in vitro*, se o IFN- α alteraria o perfil de citocinas da RSCcPN eosinofílica, a qual sabidamente se caracteriza pela predominância de um padrão Th2.

Este estudo encontrou uma diminuição significativa na concentração de IL-4 nos sobrenadantes das culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, 24 horas após a exposição destas ao IFN- α .

As citocinas do perfil Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13, orquestram a reação inflamatória na RSCcPN eosinofílica. A IL-4, importante citocina Th2, é produzida por eosinófilos, basófilos, mastócitos, células NK e células Th2, estimula a diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th2 e é um importante cofator na prevenção da apoptose das células T ativadas. A IL-4, também, é a principal citocina

responsável pela mudança de classe de imunoglobulina dos linfócitos B para o fenótipo IgE. Participa, ainda, do recrutamento de eosinófilos ao aumentar a expressão de VCAM-1 nas células endoteliais (OTTO; WENZEL, 2008; OYER et al., 2013).

No estudo de Ramanathan et al. (2008), os autores demonstraram que células epiteliais coletadas da mucosa sinusal de pacientes com RSCcPN, quando expostas à IL-4, diminuem a expressão de genes relacionados com a imunidade inata. Segundo os mesmos, essa redução pode contribuir com a colonização microbiana e com a resposta imune anormal associada à RSCcPN..

O fato do IFN- α reduzir a concentração da IL-4 nas culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, e tendo em vista a importância dessa citocina na construção do ambiente inflamatório Th2, demonstra que o IFN- α apresenta potencial de modular negativamente o padrão inflamatório Th2 da RSCcPN eosinofílica. Essa proposição encontra respaldo na literatura, uma vez que tem-se demonstrado que o IFN- α , de fato, pode regular negativamente as funções das células Th2.

Segundo Huber et al. (2014) interferons tipo I (IFN- α/β) são capazes de inibir o fator de transcrição GATA-3, tanto em células Th2 em desenvolvimento quanto em células Th2 já diferenciadas. O GATA-3 é um fator de transcrição que, uma vez acionado, potencializa o *locus* das citocinas Th2, entre elas a IL-4, estabelecendo um ciclo de retroalimentação positiva, a qual mantém elevada a expressão do GATA-3. Logo, o bloqueio desse fator de transcrição pelo IFN- α sustenta sua aplicação no manejo de doenças eosinofílicas.

Com relação às IL-10, IFN- γ e IL-6, encontrou-se um aumento significativo nas suas concentrações após 24h de exposição das culturas ao IFN- α .

A IL-10 é considerada a citocina anti-inflamatória mais importante, fundamental na prevenção de danos teciduais provocados pela inflamação. É produzida por uma variedade de células, especialmente Treg e Th2, regulando tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (MINGOMATAJ; BAKIRI, 2016).

Segundo Lloyd e Hawrylowicz (2009), na asma, doença sabidamente eosinofílica com perfil Th2, a IL-10 atua sobre as células apresentadoras de antígeno, amenizando a ativação de células T, inclusive Th2, e inibindo a ativação de mastócitos e eosinófilos. O papel que a IL-10 ocupa na fisiopatogenia da RSCcPN eosinofílica ainda é controverso, uma vez que os autores divergem quanto

ao aumento da expressão da IL-10 no tecido polipoide em relação à mucosa nasossinusal (SHI et al., 2009; OYER et al., 2013).

Entretanto, recentemente, alguns autores têm sugerido que o endótipo dos pacientes com RSCcPN, caracterizado pela presença de IL-10, apresenta doença menos severa e mais facilmente tratável (HARUNA et al., 2018; LIAO et al., 2018). De fato, já foi demonstrado que o IFN- α é capaz de aumentar a expressão da IL-10 induzida pelo TCR em células T CD4⁺ periféricas ativadas e em cultura de sangue total (CORRE et al., 2013).

Assim, é possível que o IFN- α , ao aumentar a concentração da IL-10 nas culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, exerça uma ação regulatória sobre o processo inflamatório eosinofílico.

O IFN- γ é a principal citocina Th1, secretada por linfócitos CD8⁺, células NK, células B e outras células apresentadoras de antígenos. Os níveis dessa interleucina estão, comumente, aumentados na RSCsPN e diminuídos na RSCcPN (VAN ZELE et al., 2006; BACHERT; AKDIS, 2016). Entretanto, observou-se um aumento significativo dessa citocina 24h após a estimulação das culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos com IFN- α .

Segundo Zhu et al. (2006), uma das maneiras pela qual o fator de transcrição GATA-3 potencializa o desenvolvimento do perfil Th2 é a inibição da resposta Th1. Ainda, de acordo com os autores, esse mecanismo inibitório se daria, possivelmente, pelo bloqueio da expressão de Tbet, o principal fator de transcrição Th1.

No estudo de Ferber et al. (1999) os autores demonstraram, em animais, que a introdução de GATA-3 cDNA em células Th1 em desenvolvimento, por meio de infecção retroviral, é capaz de inibir a síntese de IFN- γ . Portanto, uma vez que o IFN- α bloqueia o fator de transcrição GATA-3 (HUBER et al., 2014), ele diminui a negatividade sobre o desenvolvimento Th1, aumentando a concentração do IFN- γ nas culturas celulares.

A IL-6 é uma citocina multifuncional, com propriedades pró e anti-inflamatórias bem definidas. É sintetizada por várias células, incluindo as epiteliais, linfócitos B e T, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e fibroblastos (TANAKA; KISHIMOTO, 2014). As pesquisas têm revelado que essa citocina está presente no tecido polipoide, embora sua participação na fisiopatogenia da polipose nasal não esteja definida.

No estudo de Danielsen et al. (2006) os autores avaliaram 13 pacientes com polipose nasal e encontraram aumento significativo da concentração da IL-6 no tecido polipoide em relação à mucosa do corneto inferior.

Em outro estudo, Peters et al. (2010) avaliaram a via de trans-sinalização da IL-6 na mucosa sinusal de pacientes com RSCsPN, no tecido polipoide de pacientes com RSCcPN e na mucosa do corneto inferior de pacientes controle. Para tal, foram mensuradas as concentrações da IL-6, do seu receptor solúvel (sIL-6R), da glicoproteína solúvel 130 (sgp130) e do STAT3. Houve aumento significativo da IL-6, do sIL-6R e da sgp130 no tecido polipoide, comparativamente aos extratos de mucosa dos pacientes com RSCsPN e controle. Entretanto, a concentração de STAT3 foi significativamente menor no tecido polipoide. Segundo os autores, embora tenha se verificado aumento da IL-6 e do sIL-6R no tecido polipoide, a baixa concentração da STAT3 e a alta da sgp130 sugerem que a via de trans-sinalização da IL-6 esteja reprimida (PETERS et al., 2010).

Neste estudo, observou-se, nas culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, aumento significativo da concentração da IL-6 24h após o estímulo com IFN- α . Desse modo, é razoável supor que o IFN- α potencializa a via de sinalização da IL-6, provavelmente modulando positivamente o fator de transcrição STAT3. Além disso, se a via de trans-sinalização da IL-6, responsável pelas ações pró-inflamatórias, estiver inibida no tecido polipoide, segundo Peters et al. (2010), é possível que a IL-6 esteja sinalizando por meio da via clássica, cuja sinalização determina as ações anti-inflamatórias desta citocina (WOLF; ROSE-JOHN; GARBERS, 2014)

Este estudo demonstrou que alterações do sistema imune inato, provavelmente, estão relacionadas à fisiopatogenia da RSCcPN eosinofílica, uma vez que o tecido polipoide nasal eosinofílico apresentou uma concentração significativamente aumentada de células iNKT e seu receptor de ativação NKG2D. Além disso, observou-se que o IFN- α alterou o padrão de citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, acarretando um rebalanceamento dos perfis inflamatórios, com diminuição de citocinas Th2 e aumento de citocinas Th1 e regulatória.

7 CONCLUSÕES

- a) O tecido polipoide nasal eosinofílico apresenta maior concentração de células iNKT do que a mucosa sinusal controle.
- b) O tecido polipoide nasal eosinofílico apresenta maior concentração de receptores de ativação de células iNKT (NKG2D) do que a mucosa sinusal controle.
- c) O IFN- α altera, *in vitro*, o padrão de citocinas da polipose nasal eosinofílica.
- d) O IFN- α ocasiona, nas culturas celulares dos pólipos nasais eosinofílicos, redução de IL-4 e aumento de IL-6, IL-10 e IFN γ , rebalanceando os perfis Th2 e Th1.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, Soman N.; ST JOHN, Ashley L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 6, p. 440-452, June 2010.
- AHMADIAFSHAR, Akefeh et al. Nasal polyposis in patients with asthma and allergic rhinitis. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 126, n. 8, p. 780-783, Aug. 2012.
- AKBARI, Omid et al. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 11, p. 1117-1129, Mar. 2006.
- ALDEBERT, Delphine et al. Eosinophils express a functional receptor for interferon α : inhibitory role of interferon α on the release of mediators. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2354-2360, Mar. 1996.
- ANTUNES, Marcelo B.; GUDIS, David A.; COHEN, Noam A. Epithelium, cilia, and mucus: their importance in chronic rhinosinusitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 631-643, Nov. 2009.
- ASLAN, Figen et al. Could Eosinophilia predict clinical severity in nasal polyps? **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-5, Aug. 2017.
- BABA, Shintaro et al. Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **The Laryngoscope**, v. 124, n. 4, p. E115-E122, Apr. 2014.
- BABA, Shintaro et al. Distribution, subtype population, and IgE positivity of mast cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 119, n. 2, p. 120-128, Aug. 2017.
- BACHERT, Claus et al. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 8, n. 1, p. 34-38, Feb. 2008.
- BACHERT, Claus et al. Effect of subcutaneous dupilumab on nasal polyp burden in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis: a randomized clinical trial. **Jama**, v. 315, n. 5, p. 469-479, Feb. 2016.
- BACHERT, Claus; AKDIS, Cezmi A. Phenotypes and emerging endotypes of chronic rhinosinusitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice**, v. 4, n. 4, p. 621-628, July/Aug. 2016.
- BAGULEY, Campbell et al. The fate of chronic rhinosinusitis sufferers after maximal medical therapy. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 4, n. 7, p. 525-532, July 2014.

BANKS, Caroline A. et al. Macrophage Infiltrate Is Elevated in CRSwNP Sinonasal Tissue Regardless of Atopic Status. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 151, n. 2, p. 215-220, Aug. 2014.

BARROS, Mário Henrique M. et al. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80908, Nov. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3829941/pdf/pone.0080908.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

BATRA, Pete S.; TONG, Liyue; CITARDI, Martin J. Analysis of comorbidities and objective parameters in refractory chronic rhinosinusitis. **The Laryngoscope**, v. 123, suppl. 7, p. S1-S11, Dec. 2013.

BEZERRA, Thiago Freire Pinto et al. Biofilm in chronic sinusitis with nasal polyps: pilot study. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 6, p. 788-793, Nov./Dec. 2009.

BLACKWELL, Debra L.; LUCAS, Jacqueline W.; CLARKE, Tainya C. Summary health statistics for U.S. adults: national health interview survey, 2012. **Vital and Health Statistics. Series 10, Data from the National Health Survey**, n. 260, p. 1-161, Feb. 2014.

BONFILS, Pierre et al. Eosinophil infiltration of nasal polyps in patients with nasal polyposis: role in clinical evolution after medical and surgical treatment. **The Journal of Laryngology and Otology**, v. 123, n. 5, p. 509-516, May 2009.

BONFILS, Pierre; HALIMI, Philippe; MALINVAUD, David. Adrenal suppression and osteoporosis after treatment of nasal polyposis. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 126, n. 11, p. 1195-1200, Dec. 2006.

BORDEN, Ernest C. et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 6, n. 12, p. 975-990, Dec. 2007.

BULEK, Katarzyna et al. Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, n. 3, p. 257-268, Mar./Apr. 2010.

CAO, Ping-Ping et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 3, p. 478-484, Sept. 2009.

CAPOBIANCHI, Maria Rosaria et al. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 2, p. 103-111, Apr. 2015.

CHELBI-ALIX, Mounira K.; WIETZERBIN, Juana. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. **Biochimie**, v. 89, n. 6/7, p. 713-718, June/July 2007.

CHIN, David; HARVEY, Richard J. Nasal polyposis: An inflammatory condition

requiring effective anti-inflammatory treatment. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 21, n. 1, p. 23-30, Feb. 2013.

CINGI, Cemal; DEMIRBAS, Duygu; URAL, Ahmet. Nasal polyposis: an overview of differential diagnosis and treatment. **Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 241-252, Sept. 2011.

COHEN, Michael et al. Biofilms in chronic rhinosinusitis: a review. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 23, n. 3, p. 255-260, May/June 2009.

CORRE, Béatrice et al. Type I interferon potentiates T-cell receptor mediated induction of IL-10-producing CD4+T cells. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 10, p. 2730-2740, 2013.

CORSO, Eugenio dea. et al. Nasal lavage levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and chronic nasal hypereosinophilia. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 5, n. 6, p. 557-562, June 2015.

DANIELSEN, Arild et al. Interleukin 5, IL6, IL12, IFN- γ , RANTES and Fractalkine in human nasal polyps, turbinate mucosa and serum. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 263, n. 3, p. 282-289, Mar. 2006.

DECONDE, Adam S. et al. Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. **The Laryngoscope**, v. 127, n. 3, p. 550-555, Mar. 2017.

DERYCKE, Lara et al. Mixed T helper cell signatures in chronic rhinosinusitis with and without polyps. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e97581, June 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0097581&type=printable>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

DI FRANCO, Simone et al. Role of Type I and II interferons in colorectal cancer and melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 878, July 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526853/pdf/fimmu-08-00878.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

DONNELLY, Raymond P.; KOTENKO, Sergei V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 30, n. 8, p. 555-564, Aug. 2010.

DOUGLAS, Richard et al. Response of peripheral blood lymphocytes to fungal extracts and staphylococcal superantigen B in chronic rhinosinusitis. **The Laryngoscope**, v. 117 n. 3, p. 411-414, Mar. 2007.

DRAKE, Li Yin; KITA, Hirohito. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. **Immunological Reviews**, v. 278, n. 1, p. 173-184, July 2017.

EBBENS, Fenna A. et al. The effect of topical amphotericin B on inflammatory markers in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter randomized controlled study. **The Laryngoscope**, v. 119, n. 2, p. 401-408, Feb. 2009.

EWEISS, Ahmed et al. VCAM-1 and eosinophilia in diffuse sino-nasal polyps. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 266, n. 3, p. 377-383, Mar. 2009.

FAN, Guo-Kang; WANG, Hualin; TAKENAKA, Hiroshi. Eosinophil infiltration and activation in nasal polyposis. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 127, n. 5, p. 521-526, May 2007.

FERBER, Iris A. et al. GATA-3 significantly downregulates IFN- γ production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. **Clinical Immunology**, v. 91, n. 2, p. 134-144, May 1999.

FOKKENS, Wytske J. et al. Role of fungi in pathogenesis of chronic rhinosinusitis. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 20, n. 1, p. 19-23, Feb. 2012a.

FOKKENS, Wytske J. et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. **Rhinology. Supplement**, v. 50 suppl. 23, p. 1-298, Mar. 2012b.

FOREMAN, Andrew et al. Adaptive immune responses in Staphylococcus aureus biofilm-associated chronic rhinosinusitis. **Allergy**, v. 66, n. 11, p. 1449-1456, Nov 2011.

FU, Binqing; TIAN, Zhigang; WEI, Haiming. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. **Immunology**, v. 141, n. 4, p. 483-489, Apr. 2014.

GAPIN, Laurent. Development of invariant natural killer T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 39, p. 68-74, Apr. 2016.

GEORGY, Mary S.; PETERS, Anju T. Chapter 7: Nasal polyps. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 33, Suppl 1, p. 22-23, June 2012.

GEVAERT, Philippe et al. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to Staphylococcus aureus enterotoxins in nasal polyp tissue. **Allergy**, v. 60, n. 1, p. 71-79, Jan. 2005.

GEVAERT, Philippe et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 989-995, Nov. 2011.

GEVAERT, Philippe et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 1, p. 110-116, Jan. 2013.

GORSKA, Magdalena M. NK cells in asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 17, n. 1, p. 50-54, Feb. 2017.

GOTLIB, Jason. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 11, p. 1077-1089, Nov. 2015.

GREVE, Glynnis De et al. Endotype-driven treatment in chronic upper airway diseases. **Clinical and Translational Allergy**, v. 7, n. 1, p. 22, July 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5506670/pdf/13601_2017_Article_157.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2018.

HAO, Jing; PANG, Yoke-Teen; WANG, De-Yun. Diffuse mucosal inflammation in nasal polyps and adjacent middle turbinate. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 134, n. 2, p. 267-275, Feb. 2006.

HARUNA, Takenori et al. Association between impaired IL-10 production following exposure to Staphylococcus aureus enterotoxin B and disease severity in eosinophilic chronic rhinosinusitis. **Allergology International**, v. 67, n. 3, p. 392-398, July 2018.

HASTAN, Deniz et al. Chronic rhinosinusitis in Europe - an underestimated disease. A GA²LEN study. **Allergy**, v. 66, n. 9, p. 1216-1223, Sept. 2011.

HOPKINS, Claire et al. Long-term outcomes from the english national comparative audit of surgery for nasal polyposis and chronic rhinosinusitis. **The Laryngoscope**, v. 119, n. 12, p. 2459-2465, Dec. 2009.

HSU, Joy; PETERS, Anju T. Pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyp. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 25, n. 5, p. 285-290, Sept./Oct. 2011.

HUBER, Jonathan P. et al. IFN- α Suppresses GATA3 Transcription from a Distal Exon and Promotes H3K27 Trimethylation of the CNS-1 Enhancer in Human Th2 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5687-5694, June 2014.

HULSE, Kathryn E. et al. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by B-cell inflammation and EBV-induced protein 2 expression. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 1075-1083, Apr. 2013.

IKEDA, Katsuhisa et al. Subclassification of chronic rhinosinusitis with nasal polyp based on eosinophil and neutrophil. **The Laryngoscope**, v. 123, n. 11, p. E1-E9, Nov. 2013.

IMANISHI, Jiro. Basis and Clinical Applications of Interferon. **JMAJ**, v. 47, v.1, p. 7-12, Jan. 2004.

INDRACCOLO, Stefano. Interferon- α as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. **Autoimmunity**, v. 43, n. 3, p. 244-247, Apr. 2010.

ISAACS, Seth et al. A meta-analysis of topical amphotericin B for the treatment of chronic rhinosinusitis. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 1, n. 4, p. 250-254, July/Aug. 2011.

ISHINAGA, Hajime et al. Interleukin-33 induces mucin gene expression and goblet cell hyperplasia in human nasal epithelial cells. **Cytokine**, v. 90, p. 60-65, Feb. 2017.

ISHITOYA, Junichi; SAKUMA, Yasunori; TSUKUDA, Mamoru. Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis in Japan. **Allergology International**, v. 59, n. 3, p. 239-245, Sept. 2010.

IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36-49, Jan. 2014.

JAHNSEN, Frode L. et al. Eosinophil infiltration is related to increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 in nasal polyps. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 12, n. 6, p. 624-632, June 1995.

JAHNSEN, Frode L. et al. Expression of functional VCAM-1 by cultured nasal polyp-derived microvascular endothelium. **The American Journal of Pathology**, v. 150, n. 6, p. 2113-2123, June 1997.

JARVIS, Deborah et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: The GA²LEN survey in Europe. **Allergy**, v. 67, n. 1, p. 91-98, Jan. 2012.

JIAO, Jian et al. Role of IFN- γ , IL-13, and IL-17 on mucociliary differentiation of nasal epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 46, n. 3, p. 449-460, Mar. 2016.

KAGOYA, Ryoji et al. Correlation of basophil infiltration in nasal polyps with the severity of chronic rhinosinusitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 114, n. 1, p. 30-35, Jan. 2015.

KATO, Atsushi et al. Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1385-1392, June 2008.

KENNEDY, David W. et al. Treatment of chronic rhinosinusitis with high-dose oral terbinafine: a double blind, placebo-controlled study. **The Laryngoscope**, v. 115, n. 10, p. 1793-1799, Oct. 2005.

KENNEDY, Joshua L.; BORISH, Larry. Chronic sinusitis pathophysiology: the role of allergy. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 27, n. 5, p. 367-371, Sept./Oct. 2013.

KERN, Robert C. et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. **American Journal of Rhinology**, v. 22, n. 6, p. 549-559, Nov./Dec. 2008.

KIM, Brian S.; ARTIS, David. Group 2 innate lymphoid cells in health and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 5, p. a016337, Jan. 2015.

Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448620/pdf/cshperspect-III-a016337.pdf>>. Acesso em 14 jun. 2018.

KIM, Dong-Kyu et al. The role of interleukin-33 in chronic rhinosinusitis. **Thorax**, v.

72, n. 7, p. 635-645, July 2017.

KIM, Su Jin et al. Changes in histological features of nasal polyps in a Korean population over a 17-year period. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 149, n. 3, p. 431-437, Sept. 2013.

KIM, Yong Min et al. Migration of regulatory T cells toward airway epithelial cells is impaired in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. **Clinical Immunology**, v. 137, n. 1, p. 111-121, Oct. 2010.

KIMURA, Satoko et al. Increased expression and role of thymic stromal lymphopoietin in nasal polyposis. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, v. 3, n. 3, p. 186-193, July 2011.

KIRTSREESAKUL, Virat; ATCHARIYASATHIAN, Viraporn. Nasal polyposis: role of allergy on therapeutic response of eosinophil- and noneosinophil-dominated inflammation. **American Journal of Rhinology**, v. 20, n. 1, p. 95-100, Jan./Feb. 2006.

KLOSSEK, Jean Michel et al. Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study. **Allergy**, v. 60, n. 2, p. 233-237, Feb. 2005.

KOUZAKI, Hideaki et al. Epithelial Cell-Derived Cytokines Contribute to the Pathophysiology of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 36, n. 3, p. 169-179, Mar. 2016.

KRISHNASWAMY, Guha et al. Regulation of Eosinophil-Active Cytokine Production from Human Cord Blood-Derived Mast Cells. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 22, n. 3, p. 379-388, Mar. 2002.

KROEGEL, Claus et al. Interferon- α con-1 treatment of three patients with severe glucocorticoid-dependent asthma. Effect on disease control and systemic glucocorticosteroid dose. **Respiration**, v. 73, n. 4, p. 566-570, June 2006.

KRYSKO, Olga et al. Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. **Allergy**, v. 66, n. 3, p. 396-403, Mar. 2011.

LAL, Devyani; SCIANNA, Joseph M.; STANKIEWICZ, James A. Efficacy of targeted medical therapy in chronic rhinosinusitis, and predictors of failure. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 23, n. 4, p. 396-400, July/Aug. 2009.

LAM, Matthew et al. Clinical severity and epithelial endotypes in chronic rhinosinusitis. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 3, n. 2, p. 121-128, Feb. 2013.

LARSEN, Knud; TOS, Mirko. The estimated incidence of symptomatic nasal polyps. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 122, n. 2, p. 179-182, Mar. 2002.

LI, Ying Ying et al. Impairment of cilia architecture and ciliogenesis in hyperplastic

nasal epithelium from nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 6, p. 1282-1292, Dec. 2014.

LIAO, Bo et al. Multidimensional endotypes of chronic rhinosinusitis and their association with treatment outcomes. **Allergy**, v. 73, n. 7, p. 1459-1469, July 2018.

LLOYD, Clare M.; HAWRYLOWICZ, Catherine M. Regulatory T cells in asthma. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 438-449, Sept. 2009.

LÓPEZ-CHACÓN, Mauricio; MULLOL, Joaquim; PUJOLS, Laura. Clinical and biological markers of difficult-to-treat severe chronic rhinosinusitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 15, n. 5, p. 19, May 2015.

LUND, Valerie J.; KENNEDY, David W. Staging for rhinosinusitis. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 117, n. 3 Pt 2, p. S35-S40, Sept. 1997.

LUND, Valerie J.; MACKAY, Ian S. Staging in rhinosinusitis. **Rhinology**, v. 31, n. 4, p. 183-184, Dec. 1993.

MAHDAVINIA, Mahboobeh et al. Basophils are elevated in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis without aspirin sensitivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 6, p. 1759-1763, June 2014.

MERAD, Miriam et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 563-604, 2013.

MILJKOVIC, Dijana et al. Association between group 2 innate lymphoid cells enrichment, nasal polyps and allergy in chronic rhinosinusitis. **Allergy**, v. 69, n. 9, p. 1154-1161, Sept. 2014.

MINGOMATAJ, Ervin; BAKIRI, Alketa H. Regulator Versus Effector Paradigm: Interleukin-10 as Indicator of the Switching Response. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 50, n. 1, p. 97-113, Feb. 2016.

MISTRY, Anita R.; O'CALLAGHAN, Chris A. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. **Immunology**, v. 121, n. 4, p. 439-447, Aug. 2007.

MUSELLA, Martina et al. Type-I-interferons in infection and cancer: Unanticipated dynamics with therapeutic implications. **Oncolimmunology**, v. 6, n. 5, p. e1314424, Apr. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2017.1314424>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

NAGARKAR, Deepti R. et al. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 3, p. 593-600, Sept. 2013.

NEFF, Brian A. et al. Treatment of eosinophilic otitis media with pegylated interferon- α 2a and 2b. **The Laryngoscope**, v. 127, n. 5, p. 1208-1216, Mar. 2017.

OCHIAI, Kenichi et al. Effect of IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) on IL-3- and IL-5-induced eosinophil differentiation from human cord blood mononuclear cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 99, n. 1, p. 124-128, Jan. 1995.

OOI, Eng H. et al. Innate Immunity. **Otolaryngology Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 473-487, June 2010.

ORLANDI, Richard R. et al. Immunologic response to fungus is not universally associated with rhinosinusitis. **Otolaryngology - Head Neck Surgery**, v. 141, n. 6, p. 750-756, Dec. 2009.

OTTO, Bradley A.; WENZEL, Sally E. The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 16, n. 3, p. 270-274, June 2008.

OYER, Samuel L. et al. Cytokine correlation between sinus tissue and nasal secretions among chronic rhinosinusitis and controls. **The Laryngoscope**, v. 123, n. 12, p. E72-E78, Dec. 2013.

PATADIA, Monica et al. Evaluation of the presence of B-cell attractant chemokines in chronic rhinosinusitis. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 24, n. 1, p. 11-16, Jan./Feb. 2010.

PATOU, Joke et al. Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 1, p. 110-115, Jan. 2008.

PAYNE, Spencer C. et al. Evidence for distinct histologic profile of nasal polyps with and without eosinophilia. **The Laryngoscope**, v. 121, n. 10, p. 2262-2267, Oct. 2011.

PAYNE, Spencer C.; BORISH, Larry; STEINKE, John W. Genetics and phenotyping in chronic sinusitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 4, p. 710-720, Oct. 2011.

PESTKA, Sidney; KRAUSE, Christopher D.; WALTER, Mark R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 8-32, Dec. 2004.

PETERS, Anju T. et al. Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 397-403, Feb. 2010.

PETERS, Anju T. et al. Diagnosis and management of rhinosinusitis: A practice parameter update. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 113, n. 4, p. 347-385, Oct. 2014.

PETERSON, Sarah et al. Increased expression of CC chemokine ligand 18 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 1, p. 119-127, Jan. 2012.

PILAN, Renata Ribeiro de Mendonça et al. Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. **Rhinology**, v. 50, n. 2, p. 129-138, June 2012.

POLZEHL, Doreen et al. Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. **Allergy**, v. 61, n. 11, p. 1275-1279, Nov. 2006.

PONIKAU, Jens U. et al. The Diagnosis and Incidence of Allergic Fungal Sinusitis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 9, p. 877-884, Sept. 1999.

PONIKAU, Jens U. et al. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: Is the histopathology similar to asthma? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 5, p. 877-882, Nov. 2003.

POPOSKI, Julie A. et al. Increased expression of the chemokine CCL23 in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 73-81, July 2011.

POPOSKI, Julie A. et al. Elevated presence of myeloid dendritic cells in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, n. 2, p. 384-393, Feb. 2015.

PORTER, Paul C. et al. Airway surface mycosis in chronic TH2-associated airway disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 2, p. 325-331, Aug. 2014.

QI, Qibin et al. Sugar-sweetened beverages and genetic risk of obesity. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 15, p. 1387-1396, Oct. 2012.

RAMANATHAN, Murugappan et al. Th2 cytokines associated with chronic rhinosinusitis with polyps down-regulate the antimicrobial immune function of human sinonasal epithelial cells. **American Journal of Rhinology**, v. 22, n. 2, p. 115-121, Mar./Apr. 2008.

REH, Douglas D. et al. Treatment-recalcitrant chronic rhinosinusitis with polyps is associated with altered epithelial cell expression of interleukin-33. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 24, n. 2, p. 105-109, Mar./Apr. 2010.

RICHER, Sara L. et al. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. **American Journal of Rhinology**, v. 22, n. 3, p. 228-234, May/June 2008.

ROGERS, Gamwell Aaron et al. Epithelial tight junction alterations in nasal polyposis. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 1, n. 1, p. 50-54, Jan./Feb. 2011.

ROTHENBERG, Marc E.; HOGAN, Simon P. The Eosinophil. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 147-174, 2006.

RUDACK, Claudia; SACHSE, Florian; ALBERTY, Jürgen. Chronic rhinosinusitis - need for further classification? **Inflammation Research**, v. 53, n. 3, p. 111-117, Feb.

2004.

RUFFOLI, Riccardo et al. Distribution of 3-nitrotyrosine in the nasal polyps of atopic patients. **The Laryngoscope**, v. 114, n. 1, p. 118-125, Jan. 2004.

RUGINA, Michel et al. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. **Rhinology**, v. 40, n. 2, p. 75-79, Jun. 2002.

SACHSE, Florian et al. Staphylococcus aureus invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. **Allergy**, v. 65, n. 11, p. 1430-1437, Nov. 2010.

SCHECKENBACH, Kathrin; WAGENMANN, Martin. Cytokine patterns and endotypes in acute and chronic rhinosinusitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 16, n. 1, p. 3, Jan. 2016.

SCHLEIMER, Robert P. Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. **Annual Review of Pathology**, v. 12, p. 331-357, Jan. 2017.

SCHMEISSER, Hana; BEKISZ, Joseph; ZOON, Kathryn C. New Function of Type I IFN: Induction of Autophagy. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 34, n. 2, p. 71-78, Feb. 2014.

SEINO, Ken-ichiro; TANIGUCHI, Masaru. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1623-1626, Dec. 2005.

SETTIPANE, Russel A.; PETERS, Anju T.; CHIU, Alexander G. Chapter 6: Nasal polyps. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 27, suppl 1, n. 3, p. 20-25, May/June 2013.

SHAH, Said A.; ISHINAGA, Hajime; TAKEUCHI, Kazuhiko. Pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis. **Journal of Inflammation**, v. 13, p. 11, Apr. 2016.

SHAW, Joanne L. et al. Increased percentage of mast cells within sinonasal mucosa of chronic rhinosinusitis with nasal polyp patients independent of atopy. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 2, n. 3, p. 233-240, May/June 2012.

SHAW, Joanne L. et al. IL-33-responsive innate lymphoid cells are an important source of IL-13 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 188, n. 4, p. 432-439, Aug. 2013.

SHI, Jingfang et al. Characterizing T-cell phenotypes in nasal polyposis in Chinese patients. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 4, p. 276-282, 2009.

SHI, Jianbo B. et al. Epidemiology of chronic rhinosinusitis: results from a cross-sectional survey in seven Chinese cities. **Allergy**, v. 70, n. 5, p. 533-539, May 2015.

SHI, Li-Li et al. Features of airway remodeling in different types of Chinese chronic

rhinosinusitis are associated with inflammation patterns. **Allergy**, v. 68, n. 1, p. 101-109, Jan. 2013.

SHI, Li-Li et al. Disease-specific T-helper cell polarizing function of lesional dendritic cells in different types of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 6, p. 628-638, Sept. 2014.

SHIN, Hyun-Woo et al. IL-25 as a novel therapeutic target in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1476-1485, June 2015.

SHIN, Seung-Heon et al. The effect of nasal polyp epithelial cells on eosinophil activation. **The Laryngoscope**, v. 113, n. 8, p. 1374-1377, Aug. 2003.

SHIN, Seung-Heon et al. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 6, p. 1369-1375, Dec. 2004.

SMITH, Kristine A.; ORLANDI, Richard R.; RUDMIK, Luke. Cost of adult chronic rhinosinusitis: a systematic review. **The Laryngoscope**, v. 125, n. 7, p. 1547-1556, July 2015.

SNIDVONGS, Kornkiat et al. Structured histopathology profiling of chronic rhinosinusitis in routine practice. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 2, n. 5, p. 376-385, Sept./Oct. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38, supl. 1, p. S1-S46, abr. 2012.

SOLER, Zachary M. et al. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 142, n. 1, p. 64-71, Jan. 2010.

SOYKA, Michael B. et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 5, p. 1087-1096, Nov. 2012.

STEINKE, John W.; BORISH, Larry. Factors driving the aspirin exacerbated respiratory disease phenotype. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 29, n. 1, p. 35-40, Jan./Feb. 2015.

STEINKE, John W.; BORISH, Larry. Chronic rhinosinusitis phenotypes. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 117, n. 3, p. 234-240, Sept. 2016.

STEVENS, Whitney W. et al. Cytokines in chronic rhinosinusitis role in eosinophilia and aspirin-exacerbated respiratory disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 192, n. 6, p. 682-694, Sept. 2015.

SUN, Changzhi; OUYANG, Hong; LUO, Renzhong. Distinct characteristics of nasal

polyps with and without eosinophilia. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 83, n. 1, p. 66-72, Jan./Feb. 2017.

SUN, Dong-Il et al. Clinical significance of eosinophilic cationic protein levels in nasal secretions of patients with nasal polyposis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 266, n. 7, p. 981-986, July 2009.

TAKABAYASHI, Tetsuji et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 2, p. 410-420, Aug. 2012.

TAKABAYASHI, Tetsuji et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, n. 1, p. 49-57, 2013a.

TAKABAYASHI, Tetsuji et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 3, p. 584-592, Sept. 2013b.

TAN, Bruce K.; MIN, Jin-Young; HULSE, Kathryn E. Acquired Immunity in Chronic Rhinosinusitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, n. 7, p. 49, July 2017.

TANAKA, Toshio; KISHIMOTO, Tadimitsu. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 4, p. 288-294, Apr. 2014.

THOMPSON, Christopher F. et al. A pilot study of symptom profiles from a polyp vs an eosinophilic-based classification of chronic rhinosinusitis. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 6, n. 5, p. 500-507, May 2016.

THYRELL, Lena et al. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. **Oncogene**, v. 21, n. 8, p. 1251-1262, Feb. 2002.

TOJIMA, Ichiro et al. Group 2 innate lymphoid cells are increased in nasal polyps in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis. **Clinical Immunology**, v. 170, p. 1-8, Sept. 2016.

TOKUNAGA, Takahiro et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. **Allergy**, v. 70, n. 8, p. 995-1003, Aug. 2015.

TOMASSEN, Peter et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1449-1456, May 2016.

UMETSU, Dale T.; DEKRUYFF, Rosemarie H. A role for natural killer T cells in asthma. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 12, p. 953-958, Dec. 2006.

VAN BEEK, Adriaan A. et al. Recent developments in basophil research: Do basophils initiate and perpetuate type 2 T-helper cell responses? **International**

Archives of Allergy and Immunology, v. 160, n. 1, p. 7-17, 2013.

VAN BRUAENE, Nicholas et al. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1435-1441, Jun. 2008.

VAN BRUAENE, Nicholas et al. TGF- β signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 2, p. 253-259, Aug. 2009.

VAN ZELE, Thibaut et al. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 4, p. 981-983, Oct. 2004.

VAN ZELE, Thibaut et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. **Allergy**, v. 61, n. 11, p. 1280-1289, Nov. 2006.

VAN ZELE, Thibaut et al. Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, n. 12, p. 1840-1847, Dec. 2007.

VAN ZELE, Thibaut et al. Differences in initial immunoprofiles between recurrent and nonrecurrent chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 28, n. 3, p. 192-198, May/June 2014.

WALFORD, Hannah H. et al. Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness. **Clinical Immunology**, v. 155, n. 1, p. 126-135, Nov. 2014.

WAN, Yisong Y. Multi-tasking of helper T cells. **Immunology**, v. 130, n. 2, p. 166-171, June 2010.

WANG, En-Tong et al. Eosinophilic chronic rhinosinusitis in East Asians. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 12, p. 873-882, Dec. 2014.

WANG, Wei L. et al. Thymic stromal lymphopoietin: A promising therapeutic target for allergic diseases. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 160, n. 1, p. 18-26, 2013.

WANG, Xiangdong et al. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: a multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 5, p. 1344-1353, Nov. 2016.

WEI, Yi et al. The antimicrobial protein short palate, lung, and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1) is differentially modulated in eosinophilic and noneosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 2, p. 420-428, Feb. 2014.

WOLF, Janina; ROSE-JOHN, Stefan; GARBERS, Christoph. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. **Cytokine**, v. 70, n. 1, p. 11-20, Nov. 2014.

WU, Dawei et al. Two inflammatory phenotypes of nasal polyps and comorbid asthma. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 118, n. 3, p. 318-325, Mar. 2017.

XIAO, Chang et al. Defective epithelial barrier function in asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 549-556, Sept. 2011.

YAMAMOTO, Hiroyuki et al. Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. **Allergy**, v. 62, n. 12, p. 1451-1455, Dec. 2007.

YAO, Toru et al. Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. **The Laryngoscope**, v. 119, n. 6, p. 1053-1059, June 2009.

YAO, Yin et al. Increased expression of TIPE2 in alternatively activated macrophages is associated with eosinophilic inflammation and disease severity in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 7, n. 10, p. 963-972, Oct. 2017.

YOSHIMURA, Katsuhiko et al. Clinical epidemiological study of 553 patients with chronic rhinosinusitis in Japan. **Allergology international: Official Journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 60, n. 4, p. 491-496, Dec. 2011.

ZELLA, Davide et al. IFN- α 2b reduces IL-2 production and IL-2 receptor function in primary CD4+ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2296-2302, Mar. 2000.

ZERNOTTI, Mario E. et al. Evidence of bacterial Biofilms in nasal polyposis. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 20, n. 5, p. 380-385, 2010.

ZHANG, Nan et al. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 5, p. 961-968, Nov. 2008.

ZHANG, Nan et al. Barrier function of the nasal mucosa in health and type-2 biased airway diseases. **Allergy**, v. 71, n. 11, p. 295-307, Mar. 2016.

ZHANG, Xin-Hao et al. Overexpression of miR-125b, a novel regulator of innate immunity, in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 2, p. 140-151, Jan. 2012.

ZHAO, Chun-Yuan et al. Microarray gene analysis of Toll-like receptor signaling elements in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 156, n. 3, p. 297-304, 2011.

ZHU, Jinfang et al. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: Induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. **Cell Research**, v. 16, n. 1, p. 3-10, Jan. 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para sujeitos maiores de idade



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
SUJEITOS MAIORES DE IDADE
(Versão de junho/2011)

Título do Projeto___ Avaliação do Perfil de Citocinas em Culturas Celulares
Derivadas de Pólipos Nasais Eosinofílicos (antes e após a ação do Interferon- α) e
Pesquisa de Células Natural Killer T Invariante (iNKT) em Pólipos Nasais
Eosinofílicos

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo Avaliação de células derivadas da polipose nasossinusal após tratamento com interferon in vitro, por apresentar uma doença chamada polipose nasal. Os avanços na área do tratamento dessa doença ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é avaliarmos a resposta de crescimento das

células derivadas dos pólipos na presença de um remédio chamado interferon e caso você participe, será necessário autorizar que estudemos as “carnes do nariz” que eventualmente sejam retiradas durante uma biópsia ou cirurgia. De antemão esclarecemos que já faz parte da rotina enviarmos para estudo qualquer tecido retirado em biópsias e cirurgias. No caso da pesquisa em questão realizaremos mais alguns estudos que normalmente não são realizados. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida pois utilizaremos informações e material derivados do seu próprio tratamento. Ainda, pedimos sua autorização para avaliarmos suas consultas e seus exames presentes no prontuário médico de maneira totalmente sigilosa.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre, após esclarecimento

Título do Projeto:

Eu, (*nome do voluntário*), li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba,//.....

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal
Identidade

Documento de

Assinatura do pesquisador responsável
pesquisador orientador

Assinatura do

Telefone de contato dos pesquisadores _____ Júlio 99780191

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.