Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica

Daniel Loiola Cordeiro

**Doença respiratória exacerbada por aspirina: papel da periostina em pacientes com
rinossinusite crônica e polipose nasossinusal**

Orientadora: Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Co-orientadora: Prof. Dra. Wilma Teresinha Anselmo Lima

Ribeirão Preto

2018

Daniel Loiola Cordeiro

**Doença respiratória exacerbada por aspirina: papel da periostina em pacientes com
rinossinusite crônica e polipose nasossinusal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cordeiro, Daniel Loiola

Doença respiratória exacerbada por aspirina: papel da periostina em pacientes com rinossinusite crônica e polipose nasossinusal. Ribeirão Preto, 2018

42p.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Orientadora: Arruda, LK.P

1. AERD 2. Periostina 3. Rinossinusite crônica

Nome: CORDEIRO, Daniel Loiola

Título: Doença respiratória exacerbada por aspirina: papel da periostina em pacientes com rinossinusite crônica e polipose nasossinusal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, que por motivos alheios à nossa compreensão, hoje me apoia e dá forças em outro plano espiritual. Sempre dedicado e amigo, nunca deixou de me incentivar tanto na busca por conhecimento, quanto na tentativa contínua de tornar o mundo à nossa volta um lugar melhor.

À minha mãe Rita, exemplo de honestidade, humildade e paciência, que sempre me aconselhou na vida e nos conhecimentos acadêmicos, mesmo nas horas em que a vida toma rumos inesperados.

À minha irmã, Thania, pelo exemplo de vida, perseverança e obstinação, sempre me estimulando nos caminhos da leitura e nos valores familiares.

À minha namorada Ana Rosa, pelo carinho, dedicação e paciência, demonstrando apoio incondicional à realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Karla Arruda, que não apenas acreditou neste projeto, como também me introduziu e guiou no mundo científico, sempre com sua sabedoria e calma, demonstrando um profissionalismo único, e uma exímia preocupação com o próximo.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Wilma Anselmo Lima, pelo exemplo de perseverança e por todo o apoio, incentivo e amizade durante todo este projeto.

À Dra. Adriana Moreno pela dedicação e orientação, e pela ajuda na realização dos experimentos no laboratório e contribuição na preparação dos dados.

À Dra. Adriana Murashima, pela valiosa ajuda na confecção das lâminas e preparo do material a ser estudado.

À toda a equipe de Otorrinolaringologia do HCFMRP-USP, em particular os Drs. Marcelo Leite, Ricardo Lessa e Ricardo Demarco, pelas orientações e auxílio na coleta do material.

Aos Drs. Mario Alberto Paino e Francesca Faria, patologistas, pelo auxílio nas análises das amostras coletadas.

À toda a equipe de Alergia/Imunologia do HCFMRP-USP, residentes, estagiários e contratados, especialmente as Dras. Janaína Melo, Thaís Nociti e Mariana Ferriani, pelo apoio sempre incondicional, não apenas durante este projeto, mas também na minha formação. Sem vocês, nenhuma das minhas conquistas seria possível.

RESUMO

CORDEIRO, DL. Doença respiratória exacerbada por aspirina: papel da periostina em pacientes com rinossinusite crônica e polipose nasossinusal. 2018. Dissertação de Mestrado – FMRP-USP.

Doença respiratória exacerbada por aspirina, conhecida como *AERD* (*Aspirin exacerbated respiratory disease*) é caracterizada por rinossinusite crônica eosinofílica, polipose nasossinusal, asma e hipersensibilidade a aspirina e outros anti-inflamatórios não-esteroidais. Expressão aumentada do biomarcador periostina foi descrita em pacientes com AERD, em tecido nasossinusal, incluindo membrana basal, matriz extracelular e pólipos nasal. Avaliamos níveis de periostina sérica em pacientes com AERD e comparamos com níveis em pacientes com rinite alérgica perene (RAP) e indivíduos saudáveis. Foram selecionados 29 pacientes (20F/9M) com diagnóstico de AERD, dentre aqueles atendidos nos Ambulatórios de Alergia e de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Estes pacientes realizaram exames confirmatórios, incluindo teste de provocação oral com aspirina, e foram submetidos a biópsia de pólipos nasais por nasofibrosopia. Como controles, foram selecionados 12 pacientes com RAP (9F/3M) e 23 indivíduos saudáveis (14F/9M). Eosinófilos foram quantificados em sangue periférico e em tecido de pólipo ou mucosa nasal. IgE total foi determinada por ImmunoCAP, e periostina sérica foi medida por ELISA. Número de eosinófilos teciduais por campo de grande aumento (CGA), número de eosinófilos por milímetro cúbico em sangue periférico, níveis de IgE total e de periostina sérica em pacientes com AERD foram comparados aos de pacientes com RAP e indivíduos saudáveis. Pacientes com AERD tinham idade maior (mediana 54 anos, faixa 22-60) que pacientes com RAP (mediana 30 anos, faixa 19-57, $p=0,0001$) e indivíduos saudáveis (mediana 29 anos, faixa 19-53, $p=0,0001$), sem diferença entre os sexos. Números de eosinófilos em sangue periférico e em tecido foram mais elevados em pacientes com AERD que em pacientes com RAP e indivíduos saudáveis. A mediana do número de eosinófilos em sangue periférico foi 640eos/ μ L (faixa 100-5.100); 200eos/ μ L (faixa 100-500); e 100 eos/ μ L (faixa 100-400) em pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis, respectivamente (AERD versus RAP, $p=0,0003$; AERD versus indivíduos saudáveis, $p=0,01$). A média do número de eosinófilos teciduais foi de 113,3células/CGA; 2,5células/CGA; e 0,7células/CGA, respectivamente (AERD versus RAP, $p=0,017$; AERD versus indivíduos saudáveis $p=0,003$). A média geométrica da IgE total foi de 290,18kU/L (faixa 59,5-8.140); 69,96kU/mL (faixa 5,5-898); e 43,14kU/mL (faixa 4-1.328) em pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis, respectivamente, sem diferença entre os grupos. Periostina sérica foi mais elevada em pacientes com AERD quando comparados a indivíduos saudáveis. A mediana de periostina sérica foi de 602ng/ml (faixa 290,7-1.055); 535,6ng/mL (faixa 209-733,2); e 496,7mg/mL (faixa 327,4-713,4), em pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis, respectivamente (AERD versus indivíduos saudáveis, $p=0,01$). Em subgrupo de pacientes brasileiros com AERD, observamos elevado número de eosinófilos em sangue periférico e em tecido, quando comparados a pacientes com RAP e indivíduos saudáveis. Níveis mais elevados de periostina sérica foram observados em pacientes com AERD, quando comparados a indivíduos saudáveis, indicando forte resposta do tipo 2 em pacientes com AERD em nosso meio.

Palavras-chave: AERD, periostina, rinossinusite crônica

ABSTRACT

CORDEIRO, DL. Aspirin exacerbated respiratory disease: role of periostin in patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps. 2018. Masters Dissertation – Ribeirão Preto Medical School-University of São Paulo.

Aspirin exacerbated respiratory disease (also known as AERD), is characterized by eosinophilic chronic hypertrophic rhinosinusitis, nasosinusal polyps, asthma and hypersensitivity to Aspirin or other non-steroidal anti-inflammatory drugs. A higher expression of the biomarker periostin has been described in patients with AERD, in nasosinusal tissue, including basal membrane, extracellular matrix and nasal polyps. We evaluated the levels of serum periostin in patients with AERD, and compare those levels with patients with perennial allergic rhinitis (PAR), and with healthy subjects. Twenty-nine patients (20F/9M) with AERD were selected from the Allergy and Otolaryngology Clinics, from the Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medicine School, University of São Paulo (HCFMRP-USP). Those patients underwent confirmatory exams, such as Oral Provocation test with aspirin, and were submitted to polyp biopsy through nasofibroscopy. As a control group, 12 patients (9F/3M) with PAR and 23 healthy subjects (14F/9M) were selected. Eosinophils were quantified in peripheral blood and in polyp tissue or nasal mucosa. Total IgE was determined by ImmunoCAP, and serum periostin was measured by ELISA. The number of tissue eosinophils by high magnification field (HMF), number of eosinophils by cubic milliliter in peripheral blood, total IgE levels and serum periostin levels in patients with AERD were compared with those from patients with PAR and healthy subjects. Patients with AERD were older (median 54 years, and range 22-60) than patients with PAR (median 30 years, range 19-57, $p=0,0001$) and healthy subjects (median 29 years, range 19-53, $p=0,0001$), with no difference between genders. The numbers of eosinophils in peripheral blood and in tissue were higher in patients with AERD than patients with PAR or healthy subjects. The median of eosinophil number in peripheral blood was 640eos/ μ L (range 100-5.100); 200eos/ μ L (range 100-500); e 100eos/ μ L (range 100-400) in patients with AERD, PAR and healthy subjects respectively (AERD vs PAR, $p=0,0003$; AERD vs healthy subjects, $p=0,01$). The average number of tissue eosinophils was 113,3cels/HMF; 2,5cels/HMF; e 0,7cels/HMF, respectively (AERD vs PAR, $p=0,017$; AERD vs healthy subjects, $p=0,003$). The geometric mean for total IgE was 290,18kU/mL (range 59,5-8.140); 69,96kU/mL (range 5,5-898); and 43,14kU/mL (range 4-1.328) in patients with AERD, PAR and healthy subjects respectively, with no difference between the groups. Serum periostin was higher in patients with AERD when compared with healthy subjects. The median for serum periostin was 602ng/ml (range 290,7-1.055); 535,6ng/mL (range 209-733,2); e 496,7ng/mL (range 327,4-713,4), in patients with AERD, PAR and healthy subjects respectively (AERD vs healthy subjects, $p=0,01$). In a Brazilian subgroup of patients with AERD, we observed an elevated number of eosinophils in peripheral blood and tissue, when compared with patients with PAR and healthy subjects. Higher levels of serum periostin were observed in patients with AERD, when compared with healthy subjects, indicating a strong type 2 response in patients with AERD in our environment.

Keywords: AERD, periostin, chronic rhinosinusitis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AERD	<i>Aspirin Exacerbated Respiratory Disease</i> - Doença Respiratória Exacerbada por Aspirina
AINEs	Antiinflamatórios Não Esteroidais
CGA	Campo de Grande Aumento
CysLT	Cysteinyl Leucotrienos
COX-1	Ciclooxygenase - 1
CRS	<i>Chronic Rhinosinusitis</i> - Rinossinusite Crônica
CRSwNP	<i>Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps</i> - Rinossinusite Crônica com Pólipos Nasais
CRSSNP	<i>Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps</i> - Rinossinusite Crônica sem Pólipos Nasais
F _{ENO}	<i>Fraction of Exhaled Nitric Oxide</i> - Fração de Óxido Nítrico Exalado
GMC-SF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-13	Interleucina 13
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
RAP	Rinite Alérgica Perene
TPO	Teste de Provocação Oral
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i> - Linfopoetina Tímica Estromal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Epidemiologia.....	11
1.2 Fisiopatologia	12
1.3 Rinossinusite crônica e AERD	13
1.4 Polipose nasal e AERD.....	13
1.5 Asma e AERD	14
1.6 Periostina e AERD	15
 2 OBJETIVOS	 17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
 3 SUJEITOS E MÉTODOS.....	 18
3.1 Sujeitos	18
3.2 Diagnóstico de hipersensibilidade a aspirina/AINEs	18
3.3 Coleta de amostras de sangue, pólipos nasais e mucosa nasal	19
3.3.1 Pacientes com AERD	19
3.3.2 Pacientes com RAP e indivíduos saudáveis	20
3.4 Dosagem de IgE total e quantificação de eosinófilos em sangue periférico	20
3.5 Contagem de eosinófilos teciduais	20
3.6 Dosagem de periostina sérica	21
3.7 Análise estatística	21
3.8 Período do estudo	22
3.9 Aspectos éticos	22
 4 RESULTADOS	 23
4.1 Características demográficas e clínicas	23
4.2 Idade	25
4.3 Eosinófilos em sangue periférico	26
4.4 Eosinófilos teciduais.....	27
4.5 IgE total	29
4.6 Periostina sérica.....	30

5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

A identificação de pacientes com Doença Respiratória Exacerbada por Aspirina ou AERD (*Aspirin Exacerbated Respiratory Disease*) é ainda um desafio⁽¹⁻⁴⁾. O diagnóstico desta condição clínica é feito pela presença de rinossinusite crônica hipertrófica eosinofílica com polipose nasossinusal, asma e hipersensibilidade a aspirina e outros inibidores da enzima ciclooxigenase-1 (COX-1). As características clínicas incluem congestão nasal com anosmia, progressão para pansinusite crônica, pólipos nasossinuais que reaparecem rapidamente após cirurgia de remoção, e obstrução nasal que pode levar à privação de sono^(1,5). AERD é uma condição grave na qual os pacientes sofrem de manifestações clínicas crônicas envolvendo vias aéreas superiores e inferiores, usualmente refratária aos tratamentos convencionais. O estudo AIANE demonstrou que até 80% dos pacientes com AERD necessitam doses intermediárias ou altas de corticoides inalatórios, e até 50% dos mesmos necessitam de corticoides sistêmicos para controle dos sintomas. Da mesma forma, o estudo TENOR demonstrou que até 20% dos pacientes com AERD chegam a necessitar intubação orotraqueal durante uma crise aguda⁽³⁾. O diagnóstico de AERD deve ser realizado através de história clínica detalhada evidenciando a presença de asma; rinossinusite com polipose nasossinusal, confirmada por tomografia computadorizada de seios da face e nasofibroscopia; e reações adversas a aspirina e/ou outros AINEs, que podem necessitar confirmação por teste de provocação oral com aspirina^(2,3,6,7).

1.1 Epidemiologia

A Doença Respiratória Exacerbada por Aspirina, nesta dissertação designada como AERD, é considerada uma condição subdiagnosticada, basicamente por depender de uma história clínica detalhada e pelo conhecimento limitado por parte dos médicos não-especialistas sobre a síndrome. Revisões da literatura demonstram uma incidência de até 21,1% de hipersensibilidade a aspirina entre pacientes asmáticos, diagnosticados após teste de provocação oral (TPO) com aspirina. A incidência aumenta para 24% em pacientes com asma grave, e para até 40% quando existe a associação entre asma, polipose nasal e rinossinusite^(1,3,6). A hipersensibilidade a aspirina aparece com mais frequência em pacientes entre 30 e 40 anos que já apresentam história de rinossinusite crônica e/ou asma⁽⁸⁾. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para alérgenos inalantes podem ser positivos em até 30 a 60% dos pacientes com AERD, mas não foi identificada associação entre

hipersensibilidade a aspirina e mecanismos IgE mediados^(2,3,6) AERD pode afetar até 0,3% da população geral^(1,8), e em mulheres pode ter apresentação mais grave⁽⁶⁾.

1.2 Fisiopatologia

Os mecanismos fisiopatológicos da AERD foram descritos em 1975 por Szczeklik et al., e incluem inibição farmacológica da enzima ciclooxigenase 1 (COX-1) pelos AINEs, induzindo um desvio no metabolismo do ácido araquidônico (AA) em direção à via da enzima lipoxigenase⁽⁹⁾. Nesta via, o AA é convertido em leucotrieno A4 (LTA4) pelas enzimas araquidonato 5-lipoxigenase (ALOX-5) ou 5-lipoxigenase (5-LO). O aumento na expressão dessas enzimas culmina com a síntese de cysteinyl leucotrienos (CysLT)⁽⁶⁾. Este desequilíbrio entre as vias leva a uma hiperativação da via da lipoxigenase, tendo como produto final a formação de leucotrienos^(3,9). Desta forma, a inibição da COX-1 por AINEs resulta em uma superprodução de leucotrienos em pacientes com AERD, levando à inflamação das vias aéreas e formação de pólipos nasossinusais⁽³⁾.

O processo inflamatório nas vias aéreas e região nasossinusal dos pacientes com AERD, por sua vez, inclui intenso infiltrado local de mastócitos, eosinófilos e basófilos na mucosa nasal, com produção de altos níveis de CysLT⁽¹⁰⁾. Os mastócitos presentes no local liberam histamina, triptase e prostaglandina D2 (PGD2), que são agentes broncoconstritores e vasodilatadores que podem potencializar a resposta aos leucotrienos⁽⁶⁾. Também tem sido descrito o papel das plaquetas, que quando ativadas produzem potentes mediadores inflamatórios, contribuindo para o aumento na ativação de leucócitos e produção de CysLT⁽¹¹⁾.

Outro fator importante é a expressão de citocinas específicas relacionadas a ativação e sobrevivência de eosinófilos em pólipos nasais, particularmente citocinas Th2, como a Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 5 (IL-5), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GMC-SF), e eotaxina, como reguladores do processo inflamatório local^(3,12), aumentando a intensidade da inflamação eosinofílica.

Acredita-se que indivíduos com AERD apresentam polimorfismos genéticos que levam a redução da atividade da isoenzima COX-1 e aumento da afinidade dos receptores de leucotrienos, apresentando uma baixa produção de Prostaglandina E2 (PGE2) e baixa expressão da COX-2 nos pólipos nasais. Uma vez que PGE2 possui uma atividade anti-inflamatória marcante, atuando na inibição da quimiotaxia e ativação de eosinófilos, a baixa produção dessa prostaglandina contribuiria para o desenvolvimento de uma inflamação

eosinofílica mais grave. Por outro lado, também é observada uma produção aumentada de Prostaglandina D₂ (PGD₂), que possui papel importante na constrição brônquica e atividade pró-inflamatória⁽¹³⁾. Essas alterações no metabolismo do ácido araquidônico levam a um desequilíbrio na relação prostaglandina (PG)/leucotrienos nesses pacientes, causando alterações inflamatórias nas vias aéreas superiores e inferiores^(2,3,6,9).

1.3 Rinossinusite crônica e AERD

A rinossinusite crônica (*Chronic Rhinosinusitis* CRS) é uma das principais condições clínicas em pacientes com AERD. É definida como sendo uma inflamação envolvendo a mucosa da cavidade nasal e dos seios paranasais, normalmente durando mais do que doze semanas consecutivas, que pode iniciar apenas com congestão nasal. A asma em pacientes com AERD em geral inicia em até dois anos do surgimento dos sintomas nasais^(2,3). Os sintomas clínicos podem ser divididos entre maiores, como obstrução nasal, pressão facial e descarga pós-nasal, e sintomas menores como prurido, hiposmia, anosmia, tosse crônica, cefaleia, dor nos dentes, fadiga e halitose⁽³⁾. O exame clínico é baseado na rinoscopia anterior e endoscopia nasal, normalmente demonstrando edema de mucosa e hiperemia⁽⁸⁾. Quanto à histologia, a CRS pode ser dividida em dois subtipos, baseados na presença de pólipos nasais ou de hipertrofia glandular. A CRS com pólipos nasais (*Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps* CRSwNP) afeta a espessura da mucosa nasal, sendo a mesma substituída por um epitélio edematoso normalmente eosinofílico, enquanto que a CRS sem pólipos nasais (*Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps* CRSsNP) é caracterizada por uma hipertrofia glandular local⁽³⁾.

1.4 Polipose nasal e AERD

Pacientes com AERD apresentam sinusite crônica com piora evolutiva, que normalmente inicia como uma inflamação moderada da mucosa, e progride até se tornar uma doença persistente grave, culminando com preenchimento da cavidade nasal com tecido inflamatório (Figura 1)^(2,6). Os pólipos nasais são formados por tecido conjuntivo, com edema, infiltrado inflamatório predominantemente eosinofílico, neoformação de glândulas mucosas e estruturas vasculares. O revestimento mucoso dos pólipos nasais é formado por epitélio pseudo estratificado glandular colunar, que também possui um papel na liberação de

citocinas inflamatórias⁽³⁾. Outras células inflamatórias também podem ser encontradas nos pólipos nasais, como linfócitos, plasmócitos e fibroblastos^(2,3,6).

Figura 1. Representação esquemática de (a) anatomia nasossinusal normal, e (b) polipose nasossinusal, indicando em (1) seio frontal; (2) recesso frontal; (3) processo uncinado; (4) hiato semilunar; (5) óstio do seio maxilar; (6) células etmoidais anteriores; (7) células etmoidais posteriores; (8) concha média (rebatida para cima); (9) concha superior; (10) seio esfenoidal; (11) concha inferior; (12) trompa de Eustáquio; (13) fossa cranial anterior; (14) secreção retida no interior dos seios frontal e esfenoidal; (15) pólipos nasais (Adaptado de Cruz et al. 2012)

1.5 Asma e AERD

Tipicamente, nos pacientes com AERD os sintomas de asma aparecem de 1 a 3 anos após o desenvolvimento de rinite, mas podem aparecer mais tardiamente ⁽⁶⁾. Da mesma forma que os sintomas nasossinusais, a asma demonstra características graves e de difícil tratamento em pacientes com AERD. Nestes pacientes há um aumento no remodelamento das vias aéreas inferiores, resultando no aumento do volume residual pulmonar^(6,14). Usualmente, o aparecimento da asma precede o desenvolvimento da hipersensibilidade aos AINEs, e após instalada, costuma seguir um curso paralelo à CRS, mesmo com a não-utilização destes medicamentos⁽²⁾. AERD tem prevalência de até 10-20% dentre os pacientes asmáticos, e 30-

40% em pacientes asmáticos com pólipos nasossinusais. Geralmente o aparecimento dos sintomas ocorre em média aos 34 anos, sendo mais comum em mulheres que em homens (57% vs 43%, respectivamente)(1,15).

1.6 Periostina e AERD

A periostina é uma proteína da matriz extracelular de 90-kDa originalmente isolada como um fator específico de osteoblastos, que tem sua produção induzida por IL-4 e IL-13, sendo estruturalmente homóloga à molécula de adesão celular fascilina-I (FAS I), que se liga a fibronectina, tenascina-D e colágeno(16,17). É encontrada em uma variedade de tecidos, tendo sua expressão aumentada nas células de tecido conectivo, incluindo ligamentos periodontais, tendões, válvulas cardíacas, miocárdio, pele e ossos(12). A periostina interage com múltiplas integrinas para iniciar uma variedade de efeitos biológicos, incluindo proliferação e migração celular, modulação das propriedades biomecânicas do tecido conectivo, regeneração de miócitos cardíacos após injúria e estaria implicada também na progressão de tipos específicos de células tumorais(18,19). Recentemente, foi observado que a periostina apresenta expressão elevada em células epiteliais de vias aéreas de pacientes com asma(16,17,19). Nestes pacientes, a inflamação é classicamente caracterizada por infiltração e ativação de eosinófilos, mastócitos e células Th2, com liberação de vários mediadores e citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-13(12,17), causando progressivo declínio da função pulmonar, com diminuição do VEF₁, que algumas vezes não apresenta melhora mesmo com medicações adequadas(19–21).

Neste contexto, a dosagem sérica da periostina mostrou ser um biomarcador de inflamação eosinofílica de vias aéreas, sendo apontada como um preditor independente importante da composição destes eosinófilos, mostrando-se também mais sensível e específico do que a medida da Fração de Óxido Nítrico Exalado (F_{ENO}), ou dosagem de eosinófilos séricos em alguns trabalhos(21,22), e tão sensível e específico quanto os mesmos, em outras publicações(23). Além disso, sugere-se que a periostina tenha o potencial de ser um biomarcador para estratificação de novos fenótipos de asma, bem como para a escolha da terapêutica a ser indicada nos casos de asma grave(21,24). Da mesma forma, pacientes com AERD também demonstram uma elevada expressão da periostina em suas células epiteliais de vias aéreas, estando envolvida, inclusive, no remodelamento tecidual e formação dos pólipos (Figura 2)(12,21,25).

Figura 2. Secreção de periostina na via aérea, em resposta à IL-13. (adaptado de Izuhara et al. 2016)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de biomarcadores inflamatórios, particularmente periostina sérica, em pacientes portadores de doença respiratória exacerbada por aspirina (AERD), e comparar os resultados com aqueles obtidos em pacientes com rinite alérgica perene (RAP) e indivíduos saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar as características clínicas em pacientes com AERD em nosso meio
2. Investigar a presença de eosinofilia periférica e tecidual em pacientes com AERD e comparar os resultados com aqueles em pacientes com rinite alérgica perene e em indivíduos saudáveis.
3. Comparar os níveis de IgE total entre pacientes com AERD, pacientes com rinite alérgica perene e indivíduos saudáveis.
4. Determinar a concentração de periostina sérica em pacientes com AERD e comparar com resultados obtidos em pacientes com rinite alérgica perene e em indivíduos saudáveis.

3 SUJEITOS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Foram selecionados 29 pacientes com idades entre 18 e 60 anos, atendidos de forma conjunta nos Ambulatórios de Alergia (ALE) do Serviço de Alergia e Imunologia, e de Rinite e Sinusite (ARIS) do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Estes pacientes apresentavam queixas de congestão nasal persistente, rinossinusite crônica, dispnéia, sibilância e hipersensibilidade a AINEs, com relato de exacerbação dos sintomas respiratórios e/ou cutâneos ao uso destas medicações. O diagnóstico de AERD foi confirmado através de exames realizados previamente, incluindo nasofibroscopia no Ambulatório de Rinite e Sinusite; tomografia computadorizada no Serviço de Radiologia; espirometria no Ambulatório de Alergia; e teste de provocação oral (TPO) com aspirina em casos selecionados.

Como controles foram selecionados dois grupos, provenientes do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HCFMRP-USP, que realizaram cirurgia eletiva para correção de alterações anatômicas: 12 pacientes com rinite alérgica perene sem rinossinusite crônica ou polipose nasossinusal e 23 indivíduos saudáveis, não alérgicos, que não apresentavam rinite, asma ou rinossinusite crônica.

Não foram incluídos no presente estudo aqueles pacientes que apresentavam: gravidez, imunodeficiência, asma grave não controlada com VEF1 pós-broncodilatador < 60%, diagnóstico de neoplasia de qualquer natureza, estando ou não em tratamento, e miocardiopatia hipertrófica.

3.2 Diagnóstico de hipersensibilidade a aspirina/AINEs

Em pacientes selecionados que não tiveram história consistente de reações a aspirina e/ou AINEs, foi realizado teste de provocação oral (TPO) com aspirina, na Enfermaria de Imunologia Clínica do HCFMRP-USP, seguindo um protocolo modificado do *Aspirin Desensitization Joint Task Force*(26). O TPO com aspirina foi realizado em ambiente controlado, com o paciente monitorizado recebendo doses crescentes de aspirina na sequência 40mg, 80mg, 165mg e 325mg respectivamente, com intervalo de 90 minutos entre as doses. O teste foi realizado em 12 pacientes, e foi considerado positivo quando o paciente apresentou dispnéia, sibilos à ausculta pulmonar, queda do pico de fluxo expiratório maior que 20% em

relação ao valor basal, alteração dos sinais vitais (PA, frequência cardíaca, saturação de O₂) e/ou aparecimento de lesões cutâneas incluindo urticária e angioedema, confirmando assim o diagnóstico de hipersensibilidade aos AINEs.

O diagnóstico de asma foi realizado pela equipe de médicos Alergistas e Imunologistas do Serviço de Alergia e Imunologia do HCFMRP-USP, de acordo com os critérios estabelecidos pelo consenso internacional mais recente da *Global Initiative for Asthma* GINA 2017⁽²⁷⁾, e incluiu realização de espirometria utilizando o aparelho da marca Inspire modelo Koko Digidoser, seguindo os parâmetros da *American Thoracic Society* (ATS),

3.3 Coleta de amostras de sangue, pólipos nasais e mucosa nasal

3.3.1 Pacientes com AERD

Os 29 pacientes com AERD foram submetidos a biópsia de pólipos nasais e coleta de sangue durante o seu acompanhamento no Ambulatório de Rinite e Sinusite (ARIS) do Serviço de Otorrinolaringologia do HCFMRP-USP. Durante consulta de rotina no referido Ambulatório, os pacientes selecionados foram questionados quanto à participação neste projeto de pesquisa, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a autorização de participação, os pacientes foram submetidos à coleta de 2ml de sangue em veia periférica, utilizando tubo de coleta a vácuo Vacutainer com anticoagulante EDTA. Este material foi então centrifugado a 14.000 RPM por 10 minutos, em centrífuga Eppendorf, e o soro armazenado a -80°C para posterior dosagem de periostina sérica. Logo após a coleta de sangue, os pacientes foram encaminhados para a realização da biópsia, tendo sido utilizada pinça Takahashi reta de 19cm, introduzida diretamente na cavidade nasal, guiada por nasofibroscopia, e coletados 2 fragmentos de pólipos nasais. Este material foi então fixado em formol tamponado a 10% e inserido em blocos de parafina, para posterior contagem de eosinófilos. Durante o procedimento, nenhum dos 29 pacientes selecionados apresentou sangramento excessivo, alteração de pressão arterial, frequência cardíaca ou nível de consciência, sendo os mesmos liberados após 1 hora de observação no próprio ARIS.

3.3.2 Pacientes com RAP e indivíduos saudáveis

Os 12 indivíduos com rinite alérgica perene (RAP) e os 23 indivíduos saudáveis foram submetidos à coleta de 2 fragmentos de mucosa nasal. Este procedimento foi realizado no Centro Cirúrgico do HCFMRP-USP, durante cirurgia eletiva para correção de anormalidades anatômicas, como rinoplastia e septoplastia, sob anestesia geral. Previamente ao ato operatório, todos os indivíduos selecionados foram questionados quanto à participação neste projeto de pesquisa, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a autorização de participação, foram submetidos à coleta de sangue em veia periférica, utilizando a mesma técnica e material descritos para o grupo dos pacientes com AERD. Durante o ato operatório, com os indivíduos já anestesiados, foi coletada amostra de mucosa nasal íntegra, utilizando pinça Takahashi reta de 19cm. A retirada dos fragmentos de mucosa nasal não interferiu no ato cirúrgico e não contribuiu para elevação do risco intra-operatório, uma vez que os mesmos seriam normalmente retirados como parte do procedimento. Assim como os fragmentos de pólipos nasais dos pacientes com AERD, os fragmentos de mucosa nasal foram fixados em formol tamponado a 10% e inseridos em blocos de parafina, para posterior contagem de eosinófilos.

3.4 Dosagem de IgE total e quantificação de eosinófilos em sangue periférico

A dosagem de IgE total foi realizada no laboratório central do HCFMRP-USP, por método de fluorescência enzimática, utilizando o sistema ImmunoCAP (Thermo Fisher, Brasil), conforme as instruções do fabricante, sendo as unidades fornecidas em kU/L.

A contagem de eosinófilos no sangue periférico foi obtida através dos resultados de hemograma realizado no laboratório central do HCFMRP-USP, solicitado como rotina para todos os pacientes desses Ambulatórios, sendo os resultados fornecidos em número de eosinófilos/ μ L.

3.5 Contagem de eosinófilos teciduais

Amostras de pólipos e de tecido de mucosa nasal foram coradas com Hematoxilina/Eosina (HE), e as lâminas foram avaliadas por dois patologistas independentes, Dra. Francesca Faria Lima, médica patologista do Departamento de Patologia do HCFMRP-USP, e Dr. Mario Alberto Paino, médico anátomo-patologista especialista pela Sociedade

Brasileira de Patologia. Para a contagem de eosinófilos, foi utilizado microscópio da marca Olympus modelo BX40, onde foram selecionados 5 campos de grande aumento (CGA) por lâmina, sob aumento de 400x, e obtida a média absoluta de eosinófilos por CGA. Foi calculado o coeficiente de relação intraclasse (ICC), sendo obtido um resultado de 0,996 e intervalo de confiança 95% entre 0,993 e 0,997, demonstrando elevada concordância entre os dois avaliadores.

3.6 Dosagem de periostina sérica

Para quantificação da periostina sérica, foi utilizado o Human Periostin ELISA Kit (OSF2), do fabricante Abcam, código ab213816, lote GR3194667-1. Todos os reagentes utilizados foram fornecidos pelo fabricante. Para a realização do ELISA, foram adicionados 100µL de soro de pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis, na diluição 1:500 feita com o tampão diluente de amostra do kit, a uma placa revestida com anticorpo anti-periostina humana, que foi incubada a 37°C por 90 minutos. Após a incubação, o conteúdo da placa foi descartado, e foram adicionados 100µL do anticorpo biotinilado anti-periostina humana na diluição 1:100 a esta placa. Após incubação a 37°C por 60 minutos, a placa foi lavada por 3 vezes utilizando-se PBS 0,01M (8,5g NaCl, 1,4g Na₂HPO₄, 0,2g NaH₂PO₄, 1L água, pH 7,4). Foram então adicionados à placa 100µL do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase na diluição 1:100, e realizada incubação a 37°C por 30 minutos. Após a terceira incubação, a placa foi lavada por 5 vezes com PBS 0,01M, e foram adicionados 90µL de TMB (substrato HRP com 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). Após incubação a 37°C por 15 minutos, no escuro, foram adicionados 90µL da *acidic stop solution*, e realizada leitura a 450 nm utilizando o aparelho Power WaveX, Bio-Tek Instruments, INC. Os dados foram obtidos através do software KC4, e as medidas fornecidas em ng/mL, sendo comparadas a uma curva padrão de periostina nas diluições 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; e 0,0 ng/mL.

3.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados por estatística descritiva, em que foi realizada a caracterização da amostra quanto às variáveis coletadas. Para verificar a associação entre as variáveis qualitativas, os dados foram submetidos ao Teste Exato de Fisher (Fisher, 1935). Análise de variância (ANOVA) (Montgomery, 2000) foi realizada através do *software* SAS, utilizando a *PROC GLM*. Para as comparações foram utilizados contrastes ortogonais

baseados na distribuição t. Para a verificação de concordância entre as variáveis contínuas foi utilizado o coeficiente de correlação intraclass - ICC (SNEDECOR e COCHRAN, 1989). O ICC verifica o grau de correlação entre as medidas dentro de cada classe. Todas as análises estatísticas foram realizadas com a utilização do *software* estatístico SAS. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

3.8 Período do estudo

O presente estudo teve início em Abril de 2015, com a seleção de pacientes e indivíduos saudáveis nos ambulatórios ARIS e ALE. Em Outubro de 2015 foram iniciadas as coletas de sangue e pólipos dos pacientes com AERD, preparação das lâminas e estocagem de soro para a dosagem de periostina sérica. Em Março de 2017 foram iniciadas as coletas de sangue e mucosa nasal dos pacientes com RAP e de indivíduos saudáveis, preparo de lâminas e estocagem de soro. Em Outubro de 2017 foram finalizadas as coletas, e realizada a análise das lâminas e dosagem de periostina sérica. Os dados obtidos foram tabulados e submetidos a análise estatística em Dezembro de 2017.

3.9 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, sob o protocolo número 68316216.8.0000.5440. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente à participação no estudo.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas e clínicas

As características demográficas e clínicas dos indivíduos participantes do estudo estão mostradas na Tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao sexo. Pacientes do sexo feminino foram 20 (68,9%); 9 (75%); e 14 (60,8%) nos grupos de pacientes com AERD e RAP, e em indivíduos saudáveis, respectivamente.

Pacientes com AERD haviam realizado entre 1 a 4 polipectomias. Como a presença de asma é critério essencial para o diagnóstico de AERD, todos os pacientes com AERD apresentavam asma.

Testes de provocação oral (TPO) com aspirina foram realizados em 12 pacientes (41,4%), todos com resultado positivo. Dezesete pacientes (58,6%) apresentavam história clínica inequívoca de reação a aspirina e/ou AINEs, não sendo necessária a realização de TPO com aspirina para o diagnóstico.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas de pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis

Características demográficas e clínicas	AERD (n=29)	RAP (n=12)	Indivíduos saudáveis (n=23)
Idade média em anos (faixa)	54 (22-60)	30 (19-57)	29 (19-53)
Sexo F(%)	20 (68,9%)	9 (75%)	14 (60,8%)
Polipectomias, mediana (faixa)	2 (1 - 4)	n.a.	n.a.
Asma n (%)	29 (100%)	n.a.	n.a.
TPO com Aspirina n (%)	12 (41,4%)	n.a.	n.a.
Eosinófilos em sangue periférico/microL, mediana (faixa)	640 (100 - 5.100)	200 (100 - 500)	100 (100 - 400)
Eosinófilos/CGA, média (faixa)	113,3 (0 - 820)	2,5 (0 - 13,5)	0,7 (0 - 7,5)
IgE total kU/L, média geométrica (faixa)	290,1 (59,5 - 8.140)	69,9 (5,5 - 898)	43,1 (4 - 1.328)
Periostina sérica ng/mL, mediana (faixa)	602 (290,7 - 1.055)	535,6 (309 - 733,2)	496,7 (327,4 - 713,4)

AERD: *Aspirin Exacerbated Respiratory Disease*; RAP: Rinite alérgica perene; TPO: Teste de provocação oral; CGA: Campo de grande aumento; n.a: não aplicável

4.2 Idade

A idade dos pacientes com AERD foi significativamente mais alta que a dos pacientes com RAP e dos indivíduos saudáveis (AERD versus RAP $p < 0,001$, Intervalo de Confiança IC 95% 9,61-23,09; AERD vs indivíduos saudáveis $p < 0,001$, 14,35-25,32) (Figura 3, Tabela 1)

Figura 3. Idade dos pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis

4.3 Eosinófilos em sangue periférico

O número de eosinófilos em sangue periférico foi significativamente maior em pacientes com AERD, quando comparados a pacientes com RAP e a indivíduos saudáveis (AERD versus RAP $p < 0,01$, IC 95% 210,63-1527,98; AERD vs indivíduos saudáveis $p < 0,003$, IC 95% 467,51-1496,82) (Figura 4, Tabela1).

Figura 4. Número de eosinófilos/ μL em sangue periférico de pacientes com AERD, RAP e em indivíduos saudáveis

4.4 Eosinófilos teciduais

O número de eosinófilos em tecido de pólipos de pacientes com AERD por campo de grande aumento (CGA) foi significativamente maior quando comparados ao número de eosinófilos em mucosa nasal de pacientes com RAP e de indivíduos saudáveis (AERD versus RAP $p < 0,017$, IC 95% 20,50-201,13; AERD vs indivíduos saudáveis $p < 0,003$, IC 95% 38,94-186,26) (Figuras 5, 6, 7 e 8; Tabela 1).

Figura 5. Eosinófilos em tecido de pólipos nasal em pacientes com AERD e em mucosa nasal de pacientes com RAP e indivíduos saudáveis, por campo de grande aumento CGA, 400x.

Figura 6. Eosinófilos em tecido de pólipos nasal de paciente com AERD, em aumento de 100x (a) e 400x (b). As setas indicam aglomerados de eosinófilos selecionados.

Figura 7. Eosinófilos em tecido de mucosa nasal de paciente com RAP, em aumento de 100x (a) e 400x (b). As setas indicam eosinófilos isolados.

Figura 8. Tecido de mucosa nasal de indivíduo saudável, em aumento de 100x (a) e 400x (b) sem visualização de eosinófilos.

4.5 IgE total

Não houve diferença significativa nos valores de IgE total entre pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis (Figura 9, Tabela 1).

Figura 9. IgE total em pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis, em kU/L

4.6 Periostina sérica

Os níveis de periostina sérica dos pacientes com AERD foram significativamente mais elevados quando comparados aos níveis em indivíduos saudáveis (AERD versus RAP $p < 0,7$, IC 95% -8,93-197,54; AERD vs indivíduos saudáveis $p < 0,01$, IC 95% 27,56-195,52) (Figura 10, Tabela 1).

Figura 10. Níveis de periostina sérica de pacientes com AERD, RAP e indivíduos saudáveis, em ng/mL

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, comparamos elementos da resposta imune do tipo 2, particularmente os níveis de periostina sérica, entre pacientes com Doença Respiratória Exacerbada por Aspirina (*Aspirin Exacerbated Respiratory Disease* AERD), pacientes com rinite alérgica perene (RAP) e indivíduos saudáveis. Nossos resultados demonstraram que os níveis de periostina sérica foram mais elevados em pacientes com AERD quando comparados a indivíduos saudáveis. Além disso, os resultados revelaram que pacientes com AERD em nosso meio apresentaram eosinofilia em sangue periférico e em tecido de pólipos nasais, em níveis significativamente mais elevados que os observados em sangue periférico e mucosa nasal de pacientes com RAP e de indivíduos saudáveis, em concordância com dados da literatura em grupos de pacientes com AERD de diferentes regiões do mundo. Por nosso conhecimento, não há estudos publicados avaliando níveis de periostina sérica entre pacientes brasileiros com AERD, sendo nossos resultados inéditos neste sentido.

Nos últimos anos, atenção especial tem sido dada à expressão da periostina como marcador de resposta imune do tipo 2, sabendo-se que sua produção é induzida pelas citocinas IL-4 e IL-13. A periostina sérica seria um marcador particularmente atrativo de resposta do tipo 2, pela facilidade de obtenção e quantificação. Entretanto, a periostina tem papel importante em outras doenças, limitando sua especificidade. Inicialmente, a expressão de periostina foi identificada em ligamentos periodontais, onde seria um importante regulador da formação dentária e sua manutenção. Embora sua denominação esteja ligada à identificação em perióstio de ossos longos, a expressão da periostina foi demonstrada em outros tecidos, incluindo miocárdio e pele, além dos ossos. Em 2009, Ruan et al. descreveram o papel da elevação deste biomarcador na gênese tumoral, especialmente no câncer de mama, câncer pulmonar de pequenas células, câncer de cólon, e tumores pancreáticos e ovarianos, onde estaria associada à angiogênese e progressão do tumor, sugerindo ser a periostina um possível alvo terapêutico(28). Também tem sido estudada a interação entre periostina e doenças arteriais coronarianas, valvares e hipertensão arterial, onde este biomarcador aumentaria a formação do colágeno tecidual em resposta a injúria e inflamação cardíacas(29,30). Outros estudos demonstraram que a expressão aumentada de periostina no tecido cutâneo contribui para aumento na secreção de fator de crescimento endotelial, contribuindo para a proliferação de tecido fibroso e formação de queloides(31).

Quanto ao tecido ósseo, Bonnet et al (2009) demonstrou o papel da periostina na formação óssea, ao estudar tíbias de ratos normais submetidas à compressão axial e compará-

las às de ratos *knockout* para periostina, evidenciando aumento significativo do volume ósseo nos ratos normais⁽³²⁾. Desta forma, é importante considerar a existência de outros fatores ou condições clínicas em que pode haver aumento de periostina sérica.

Em estudos com foco no papel da periostina em resposta imune do tipo 2, a comparação dos níveis de periostina sérica tem sido realizada entre pacientes com asma e pacientes com rinossinusite crônica com ou sem polipose nasal^(12,17,33,34). Na literatura consultada, poucos foram os estudos que incluíram avaliação de indivíduos saudáveis. Desta forma, o presente estudo traz uma contribuição adicional ao entendimento da relevância da resposta do tipo 2 em pacientes com AERD ao comparar os resultados com aqueles em indivíduos saudáveis e também em pacientes com rinite alérgica perene, mas sem sinusite crônica e/ou polipose nasossinusal. Kim et al. (2014) compararam os níveis de periostina sérica entre pacientes com fenótipos diferentes de asma, e evidenciaram aumento significativo deste marcador em pacientes com AERD (mediana 76,5 ng/mL), quando comparados a indivíduos saudáveis (mediana 46,2 ng/mL)⁽³⁵⁾, demonstrando uma relação entre os grupos semelhante à encontrada no presente estudo.

De forma inesperada, no presente estudo encontramos níveis de periostina bem mais elevados do que os relatados na literatura. Embora os níveis de periostina sérica tenham sido significativamente mais elevados em pacientes com AERD quando comparados a indivíduos saudáveis, os níveis foram cerca de 10 vezes mais elevados, tanto em pacientes com AERD (mediana 602 ng/mL, faixa 290,7-1.055) como em pacientes com RAP (mediana 535,6 ng/mL, faixa 309-733,2) e indivíduos saudáveis (mediana 496,7 ng/mL, faixa 327,4-713,4), do que os relatados na literatura. As razões para essas diferenças são ainda desconhecidas e necessitam ser investigadas em estudos subsequentes com número maior de pacientes e controles em nosso meio. Podemos formular a hipótese de que estas diferenças tenham causa metodológica, uma vez que existem vários kits para detecção de periostina disponíveis, de fabricantes diferentes, utilizando anticorpos anti-periostina distintos. Recentemente Izuhara et al. (2017) realizaram uma comparação entre dois kits comercialmente disponíveis (Shino-Test assay, e Genentech Inc. Elecsys), demonstrando haver uma diferença nos valores absolutos entre eles ($p < 0,0001$), sugerindo ser necessária uma padronização para cada um dos kits disponíveis⁽³⁶⁾. Da mesma forma, James et al. (2017) realizaram uma comparação entre os dois kits mencionados obtendo resultados semelhantes. Os autores sugerem ser importante a realização de novas comparações e classificações entre os kits disponíveis, uma vez que usam anticorpos diferentes, com diferentes afinidades, sensibilidades, e diferentes reagentes e curvas para calibração⁽³⁷⁾.

Uma outra possibilidade seria que em nosso meio temos uma resposta imune do tipo 2 exacerbada, explicando os níveis mais elevados de periostina em relação a países desenvolvidos. É possível que a exposição a parasitas intestinais, que é frequente em nosso meio e ocorre em geral cedo na vida, possa desviar a resposta imune para um perfil do tipo 2; outras exposições como a alérgenos potentes de ácaros e baratas em nosso meio são também frequentes e poderiam contribuir para este perfil de resposta. Uma possibilidade mais remota seria que o aumento de periostina seja devido a outras condições clínicas em que há aumento deste biomarcador, mas esta hipótese seria pouco provável dada à heterogeneidade de doenças que podem causar esta alteração, e ao fato de que os pacientes e indivíduos controle foram cuidadosamente avaliados pela equipe para presença de doenças de base.

Em concordância com a literatura, pacientes com AERD no presente estudo apresentaram evidência de forte resposta do tipo 2, dada pelo aumento de eosinófilos em sangue periférico e em tecido de pólipos nasais^(5,9,38). A eosinofilia periférica e tecidual em pacientes com AERD foi marcante quando comparada em pacientes com RAP e indivíduos saudáveis. Esta inflamação característica tem sido estudada em trabalhos recentes, onde o papel relevante de outras citocinas como IL-33 e linfopoetina tímica estromal (TSLP) tem sido identificado, contribuindo para resposta inflamatória eosinofílica patológica, característica da resposta do tipo 2. Estudos recentes tem demonstrado que ambos IL-33 e TSLP são fortemente expressados em pólipos nasais de pacientes com AERD^(5,39).

A IgE total é um outro biomarcador relevante de resposta do tipo 2, e sua associação com AERD foi investigada no presente estudo. Ainda é controverso o papel da IgE na patogênese de AERD, pois uma proporção variável de pacientes com AERD apresenta resposta negativa em testes cutâneos de hipersensibilidade imediata a alérgenos inalantes, e/ou IgE específica não detectável a esses alérgenos, e para muitos autores AERD não é dependente de IgE, não sendo classificada formalmente como uma doença alérgica^(3,5,6). Vários estudos demonstraram aumento de IgE total em pacientes com rinossinusite crônica e polipose nasal^(40–42), mas poucos investigaram IgE total em pacientes com AERD. Em estudo de Johns et al. (2014), pacientes com AERD atópicos (n = 60) e não atópicos (n = 22) foram avaliados quanto aos níveis de IgE total, e não houve diferença significativa entre os grupos (média 144 UI/mL vs 86 UI/mL, respectivamente)⁽⁴³⁾. Uma hipótese proposta é que o aumento dos níveis de IgE total em pacientes com AERD poderia ser causado por resposta IgE-mediada a superantígenos de *Staphylococcus aureus*⁽⁴⁴⁾, o que ainda necessita de maior comprovação científica. No presente estudo, foi encontrada uma variabilidade marcante entre

os níveis de IgE total, e não observamos diferenças significantes em relação a IgE total entre os grupos, provavelmente refletindo papel variável da IgE em pacientes com AERD.

A importância da associação entre a asma e doenças nasossinusais tem sido evidenciada de forma crescente^(45,46). Pacientes acometidos por estas condições clínicas frequentemente apresentam limitações significativas de suas atividades diárias e queda marcante em sua qualidade de vida devido a sintomas como dispneia, anosmia, obstrução nasal, secreção nasal e insônia⁽⁴²⁾. Pacientes com AERD em particular são um desafio pela gravidade dos sintomas e requerem uma abordagem complexa, multidisciplinar, que envolve tratamento clínico e muitas vezes cirúrgico, sendo frequentes múltiplas cirurgias para o tratamento de polipose nasossinusal recorrente, que é um aspecto característico da síndrome. Desta forma, a melhora no reconhecimento da doença, o diagnóstico precoce, a busca por biomarcadores e por tratamentos inovadores com alvo nos aspectos fisiopatológicos da doença são prioritários. Muitos aspectos de AERD ainda são desconhecidos, incluindo a identificação de desencadeante(s) para o surgimento da doença na idade adulta, a evolução com aparecimento de asma e hipersensibilidade a aspirina/AINEs, e a resposta limitada aos diversos tratamentos. Em particular, é intrigante o fato de que, embora a hipersensibilidade a aspirina/AINEs faça parte do quadro clínico e tenha papel importante na fisiopatologia, reações a estes fármacos não são os desencadeantes iniciais, e a doença evolui mesmo após AINEs serem rigorosamente evitados, de forma independente.

Neste contexto, a existência de um biomarcador que pudesse ser útil em identificar a associação entre asma, rinosinusite crônica e hipersensibilidade a aspirina/AINEs, tem sido investigada. Izuhara et al. (2016) demonstraram o papel da periostina em contribuir para aumento da produção de muco em vias aéreas e para fibrose tecidual pulmonar em doenças respiratórias. Os autores sugerem o uso da periostina sérica como marcador da progressão de tais doenças⁽²⁵⁾. Park et al. (2017) sugerem a utilização da periostina sérica e de outros biomarcadores, como a dosagem de Leucotrieno E4 (LTE4) urinário para classificar os pacientes com AERD em diferentes subtipos, como AERD com CRS/atopia sem urticária, AERD com CRS sem urticária/atopia, AERD sem CRS/urticária, e AERD com urticária⁽⁴⁵⁾.

O tratamento usual de pacientes com AERD inclui o uso de corticosteroides intranasais, corticosteroides inalatórios e broncodilatadores para asma, antileucotrieno, antihistaminicos, e em casos selecionados, dessensibilização seguida de terapia a longo prazo com altas doses de aspirina. Novas terapias têm se mostrado promissoras no controle dos sintomas e na melhora da qualidade de vida dos pacientes com AERD. É o caso de anticorpos monoclonais que atuam diretamente na resposta imune do tipo 2, apresentando a possibilidade

de serem utilizados como tratamento adjuvante às terapias convencionais. O omalizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado anti-IgE, causa diminuição dos níveis de IgE circulante e *downregulation* da expressão de receptores FcεRI na superfície de mastócitos e basófilos. Inicialmente desenvolvido para o tratamento da asma, o omalizumabe tem sido usado no tratamento de CRSwNP com bons resultados. Alguns estudos mostraram uma redução na necessidade do uso de corticosteroides sistêmicos, bem como uma diminuição dos *scores* utilizados para a avaliação do tamanho dos pólipos com o uso do omalizumabe^(47,48). Hayashi et al. (2016) investigaram a ação do omalizumabe em marcadores de ativação de mastócitos (LTE4 e PGD2 urinários) em pacientes com AERD, evidenciando uma redução importante dos níveis de LTE4 (76%, $p < 0,0001$) e PGD2 (89%, $p = 0,002$)⁽⁴⁹⁾. Devido ao papel já conhecido da IL-5 na formação, quimiotaxia e sobrevivência dos eosinófilos, um outro medicamento biológico, o mepolizumabe, também vem sendo estudado em pacientes com CRSwNP. Bachert et al. (2017) compararam o uso do mepolizumabe ($n = 54$) versus placebo ($n = 53$) em pacientes com esta patologia com indicação de polipectomia, e após acompanhamento por 25 semanas demonstraram uma redução significativa da necessidade de cirurgia no grupo de pacientes em uso do mepolizumabe (5% vs 30%, $p = 0,006$), bem como uma redução significativa no tamanho dos pólipos, segundo os *scores* utilizados⁽⁵⁰⁾. Embora estes estudos não tenham sido realizados em pacientes exclusivamente com AERD, os mesmos incluíram alguns pacientes com hipersensibilidade a aspirina. Outra terapia biológica promissora no tratamento de doenças com predomínio da resposta imune do tipo 2 é o dupilumabe, um anticorpo monoclonal que liga-se à subunidade α do receptor da IL-4, bloqueando assim a ação tanto da IL-4 quanto da IL-13, e levando à redução dos níveis de IgE total e quimiocinas ⁽⁴⁷⁾. Em 2016 um estudo multicêntrico conduzido por Bachert et al. avaliou pacientes com CRSwNP em uso de corticosteroide tópico nasal, e comparou a associação deste medicamento com dupilumabe ($n = 30$) e placebo ($n = 30$), demonstrando que o grupo em uso de dupilumabe apresentou redução significativa do tamanho dos pólipos segundo o *score* utilizado, em comparação ao grupo placebo, bem como uma melhora na qualidade de vida segundo questionário aplicado⁽⁵¹⁾. Embora tais estudos demonstrem uma evidente melhora dos pacientes com CRSwNP em uso desses medicamentos, serão necessários estudos para avaliar a eficácia dos biológicos em pacientes com AERD especificamente. Neste sentido, em um futuro próximo o uso de biomarcadores pode se mostrar útil na caracterização do endótipo de cada doença, auxiliando na escolha das metas terapêuticas, bem como na escolha apropriada de medicamentos biológicos⁽⁴⁷⁾.

Limitações do estudo

Uma vez que AERD se manifesta em geral após a terceira década de vida, a maior parte dos pacientes avaliados com essa doença tinha idade superior a 30 anos. Por outro lado, pacientes com RAP e indivíduos saudáveis foram selecionados em ambulatório especializado para cirurgia eletiva e estética, sendo a busca e indicação deste tipo de procedimento mais comum em uma faixa etária mais baixa. Sendo assim, a diferença da idade entre os grupos no presente estudo pode ser considerada uma limitação. James et al. (2017) demonstraram haver um aumento dos níveis de periostina sérica em pacientes com idades entre 60 e 75 anos, tanto asmáticos (IC95% 4,9-24,8, $p = 0,004$) quanto não-asmáticos (IC 95% 7,7-20,8, $p < 0,0001$), em uma população da Suécia⁽³⁷⁾.

A contagem de eosinófilos em sangue periférico dos pacientes com AERD foi obtida do hemograma mais recentemente realizado, e não no mesmo dia da biópsia de pólipos e coleta de sangue para dosagem de periostina sérica, levando à possibilidade de variação dos valores de eosinófilos. Desta forma, não foi possível fazer correlações entre eosinófilos em sangue periférico com eosinófilos teciduais ou níveis de periostina sérica.

Para a dosagem de periostina sérica foi usado o kit Human Periostin ELISA Kit (OSF2), do fabricante Abcam. Não identificamos estudos na literatura com a utilização deste kit em particular, que nos permitisse realizar comparações. Conforme descrito anteriormente, existem variações nos valores entre kits para dosagem de periostina disponíveis no mercado, e uma padronização entre os mesmos ainda é necessária⁽³⁷⁾.

6 CONCLUSÕES

1. Em pacientes com AERD, os níveis de periostina sérica foram mais elevados que em indivíduos saudáveis, sugerindo que a periostina sérica pode ser um biomarcador útil em pacientes com AERD.
2. Em concordância com estudos conduzidos em outras regiões do mundo, pacientes com AERD em nosso meio apresentaram eosinofilia marcante, tanto em sangue periférico quanto em tecido de pólipos nasais, quando comparados a pacientes com rinite alérgica perene e indivíduos saudáveis.
3. A IgE total não foi um biomarcador particularmente útil em pacientes com AERD quando comparados a pacientes com rinite alérgica perene ou indivíduos saudáveis, havendo ampla variabilidade dos valores de IgE total obtidos nos três grupos.
4. O presente estudo é particularmente relevante por ser pioneiro em avaliar os níveis de periostina sérica em pacientes brasileiros com AERD, rinite alérgica perene e em indivíduos saudáveis. Níveis de periostina sérica foram mais elevados, em magnitude aproximada de 10 vezes, nos três grupos quando comparados aos níveis relatados em estudos em outras regiões do mundo. Razões para esta diferença marcante não são ainda conhecidas, mas aspectos metodológicos e imunológicos podem estar implicados.
5. Pacientes com AERD em nosso meio apresentam evidência de forte ativação de resposta imune do tipo 2, dada pelo aumento de periostina sérica e eosinofilia periférica e tecidual marcantes. Estes biomarcadores são importantes para a definição de fenótipos e endótipos da doença, e para escolha da terapia mais apropriada para pacientes com AERD.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee RU, Stevenson DD. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease: Evaluation and Management. *Allergy, Asthma Immunol Res* [Internet]. 2011;3(1):3. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4168/aaair.2011.3.1.3>
2. Fokkens W, Lund V, Mullol J. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology* [Internet]. 2012;(20):1–136. Available from: http://eaaci.net/attachments/882_epos.pdf
3. Dunn NM, Katial RK. Chronic Rhinosinusitis and Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016;36(3):503–14.
4. Williams AN. Diagnostic Evaluation in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2016;36(4):657–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2016.06.003>
5. Cahill KN, Laidlaw TM. Pathogenesis of Aspirin-Induced Reactions in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2016;36(4):681–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2016.06.005>
6. Kennedy JL, Stoner AN, Borish L. Aspirin-exacerbated respiratory disease: Prevalence, diagnosis, treatment, and considerations for the future. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(6):407–13.
7. Kowalski ML, Makowska JS. Seven steps to the diagnosis of NSAIDs hypersensitivity: How to apply a new classification in real practice? *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2015;7(4):312–20.
8. Hamilos DL. Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and medical management. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(4):693–707.
9. Pavón-Romero GF, Ramírez-Jiménez F, Roldán-Alvarez MA, Terán LM, Falfán-Valencia R. Physiopathology and genetics in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Exp Lung Res*. 2017;43(8):327–35.
10. Laidlaw TM, Cahill KN. Current Knowledge and Management of Hypersensitivity to Aspirin and NSAIDs. *J Allergy Clin Immunol Pract*. Elsevier Inc; 2017;5(3):537–45.
11. Laidlaw TM, Boyce JA. Platelets in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;135(6):1407–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.02.005>

12. Maxfield AZ, Landegger LD, Brook CD, Lehmann AE, Campbell AP, Bergmark RW, et al. Periostin as a Biomarker for Nasal Polyps in Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2017;19459981773796. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0194599817737967>
13. Cahill KN, Bensko JC, Boyce JA, Laidlaw TM. Prostaglandin D2: A dominant mediator of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;135(1):245–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.031>
14. Izuhara K, Matsumoto H, Ohta S, Ono J, Arima K, Ogawa M. Recent developments regarding periostin in bronchial asthma. *Allergol Int* [Internet]. Elsevier B.V; 2015;64:S3–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2015.04.012>
15. Scadding GK, Durham SR, Mirakian R, Jones NS, Drake-Lee AB, Ryan D, et al. BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(2):260–75.
16. Anderson HM, Lemanske RF, Arron JR, Holweg CTJ, Rajamanickam V, Gangnon RE, et al. Relationships among aeroallergen sensitization, peripheral blood eosinophils, and periostin in pediatric asthma development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;139(3):790–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.033>
17. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013 Aug;132(2):305–12.e3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791506>
18. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, et al. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF- activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010;107(32):14170–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009426107>
19. Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, et al. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J*. 2011;37(5):1119–27.
20. Nair P, Kraft M. Serum periostin as a marker of T H2-dependent eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;130(3):655–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.021>
21. Jia G, Erickson R CD. *NIH Public Access*. 2013;70(4):646–56.

22. Matsumoto H. Serum Periostin: A Novel Biomarker for Asthma Management. *Allergol Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2014;63(2):153–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.2332/allergolint.13-RAI-0678>
23. Fingleton J, Braithwaite I, Travers J, Bowles D, Strik R, Siebers R, et al. Serum periostin in obstructive airways Disease. *Eur Respir J* [Internet]. 2016;47(5):1383–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01384-2015>
24. Kim MA, Yoon MK, Lee YS, Izuhara K, Ohta S, Ono J, et al. Clinical implication of the serum periostin level for differentiating phenotypes of NSAID hypersensitivity. *Allergol Int* [Internet]. Japanese Society of Allergology; 2016;65(4):492–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2016.04.013>
25. Izuhara K, Conway SJ, Moore BB, Matsumoto H, Holweg CTJ, Matthews JG, et al. Roles of periostin in respiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(9):949–56.
26. Macy E, Bernstein JA, Castells MC, Gawchik SM, Lee TH, Settipane RA, et al. Aspirin challenge and desensitization for aspirin-exacerbated respiratory disease: A practice paper. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. American College of Allergy, Asthma & Immunology; 2007;98(2):172–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60692-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60692-8)
27. Global Initiative For Asthma (GINA). Global Strategy For Asthma Management and Prevention. *Glob Initiat Asthma* [Internet]. 2017; <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strat>. Available from: www.ginasthma.org
28. Ruan K, Bao S, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(14):2219–30.
29. Landry NM, Cohen S, Dixon IMC. Periostin in cardiovascular disease and development: a tale of two distinct roles. *Basic Res Cardiol*. Springer Berlin Heidelberg; 2018;113(1):1–13.
30. Ashley SL, Wilke CA, Kim KK, Moore BB. Periostin regulates fibrocyte function to promote myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2017 Mar 20;10(2):341–51. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/mi.2016.61>
31. Zhang Z, Nie F, Chen X, Qin Z, Kang C, Chen B, et al. Upregulated periostin promotes angiogenesis in keloids through activation of the ERK 1/2 and focal adhesion kinase pathways, as well as the upregulated expression of VEGF and angiopoietin-1. *Mol Med Rep*. 2015;11(2):857–64.

32. Bonnet N, Standley KN, Bianchi EN, Stadelmann V, Foti M, Conway SJ, et al. The matricellular protein periostin is required for sost inhibition and the anabolic response to mechanical loading and physical activity. *J Biol Chem*. 2009;284(51):35939–50.
33. Matsusaka M, Kabata H, Fukunaga K, Suzuki Y, Masaki K, Mochimaru T, et al. Phenotype of asthma related with high serum periostin levels. *Allergol Int* [Internet]. Elsevier B.V; 2015;64(2):175–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2014.07.003>
34. Kim DW, Kulka M, Jo A, Eun KM, Arizmendi N, Tancowny BP, et al. Cross-talk between human mast cells and epithelial cells by IgE-mediated periostin production in eosinophilic nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(5):1692–1695.e6.
35. Kim MA, Izuhara K, Ohta S, Ono J, Yoon MK, Ban GY, et al. Association of serum periostin with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. American College of Allergy, Asthma & Immunology; 2014;113(3):314–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anai.2014.06.014>
36. Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, Ogawa M, Ono J, Mitamura Y, et al. Periostin in inflammation and allergy. *Cell Mol Life Sci*. Springer International Publishing; 2017;74(23):4293–303.
37. James A, Janson C, Malinovschi A, Holweg C, Alving K, Ono J, et al. Serum periostin relates to type-2 inflammation and lung function in asthma: Data from the large population-based cohort Swedish GA(2)LEN. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2017;72(11):1753–60.
38. Steinke JW, Payne SC, Borish L. Eosinophils and Mast Cells in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016;36(4):719–34.
39. Laidlaw TM, Boyce JA. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease — New Prime Suspects. Longo DL, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Feb 4;374(5):484–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcibr1514013>
40. Shiono O, Sakuma Y, Komatsu M, Hirama M, Yamashita Y, Ishitoya J, et al. Differential expression of periostin in the nasal polyp may represent distinct histological features of chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2015;42(2):123–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2014.09.003>
41. Kim DK, Jin HR, Eun KM, Mutusamy S, Cho SH, Oh S, et al. Non-eosinophilic nasal polyps shows increased epithelial proliferation and localized disease pattern in the early stage. *PLoS One*. 2015;10(10):1–13.

42. Asano T, Kanemitsu Y, Takemura M, Yokota M, Fukumitsu K, Takeda N, et al. Serum Periostin as a biomarker for comorbid chronic rhinosinusitis in patients with asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(5):667–75.
43. Johns CB, Laidlaw TM. Elevated total serum IgE in nonatopic patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(4):287–9.
44. Lee J-H, Jung C-G, Park H-S. An update on the management of aspirin-exacerbated respiratory disease. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2018 Feb 18;12(2):137–43. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17476348.2018.1417843>
45. Park H, Choi Y, Jung CG, Park HS. Potential Biomarkers for NSAID-Exacerbated Respiratory Disease. *Mediators Inflamm*. Hindawi; 2017;2017.
46. Woessner KM. Update on Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. Current Allergy and Asthma Reports; 2017;17(1):1–9.
47. Bachert C, Gevaert P, Hellings P. Biotherapeutics in Chronic Rhinosinusitis with and without Nasal Polyps. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. Elsevier Inc; 2017;1–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213219817303215>
48. Willson TJ, Naclerio RM, Lee SE. Monoclonal Antibodies for the Treatment of Nasal Polyps. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2017;37(2):357–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2017.01.008>
49. Hayashi H, Mitsui C, Nakatani E, Fukutomi Y, Kajiwarra K, Watai K, et al. Omalizumab reduces cysteinyl leukotriene and $9\alpha,11\beta$ -prostaglandin F₂ overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1585–1587.e1.
50. Bachert C, Sousa AR, Lund VJ, Scadding GK, Gevaert P, Nasser S, et al. Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;140(4):1024–1031.e14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.044>
51. Bachert C, Mannent L, Naclerio RM, Mullol J, Ferguson BJ, Gevaert P, et al. Effect of subcutaneous dupilumab on nasal polyp burden in patients with chronic sinusitis and nasal polyposis: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;315(5):469–79.