**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARIANA LIMA COELHO SILVEIRA

**Pesquisa de miRNA em pacientes com rinossinusite
crônica com pólipos nasais**

**Ribeirão Preto
2020**

MARIANA LIMA COELHO SILVEIRA

**Pesquisa de miRNA em pacientes com rinossinusite
crônica com pólipos nasal**

Versão Corrigida

**Versão original encontra-se na Unidade que aloja o Programa de Pós-
Graduação**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

**Orientadora: Profa. Dra. Fabiana
Cardoso Pereira Valera**

Ribeirão Preto

2020

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silveira, Mariana Lima Coelho

Pesquisa de miRNA em pacientes com rinossinusite crônica com pólipos nasais. / Mariana Lima Coelho Silveira; Orientadora, Fabiana Cardoso Pereira Valera. Ribeirão Preto - 2020.

121p.: 28il., 30cm.

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

1. MicroRNA. 2. Pólipo nasal. 3. Rinossinusite crônica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Silveira, Mariana Lima Coelho

Título: Pesquisa de miRNA em pacientes com rinossinusite crônica com pólipos nasais

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Dedicatória

Dedico esta tese de doutorado à minha família. Aos meus pais, pilares da minha formação como ser humano e melhores orientadores na vida.

Ao meu marido, que me deu todo suporte para que eu pudesse desenvolver este projeto, incentivando todos os dias, sendo o melhor parceiro na realização deste sonho.

Agradecimentos

Agradeço a toda equipe que me auxiliou na elaboração deste estudo. Primeiramente, à Profa. Dra. Fabiana Pereira Cardoso Valera, pelo auxílio primoroso em todas as etapas. Sua dedicação à pesquisa e sua disponibilidade como educadora são virtudes inquestionáveis desta professora que tenho como inspiração.

Também agradeço a coorientação dos professores Wilma Terezinha Anselmo-Lima e Edwin Tamashiro, sempre com auxílios pontuais de grande valor. Agradeço a toda equipe do ambulatório de Rinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio técnico, para que a execução do estudo fosse possível.

Agradeço enormemente aos técnicos e pós-graduandos dos laboratórios de Medicina Genômica e Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que auxiliaram na execução das etapas laboratoriais: Anemari Ramos Dinarte dos Santos, Ronaldo Bragança Martins Júnior, Kamila Chagas Peronni Zueli, Lilian Eslaine Costa Mendes da Silva e Raul Torrieri.

Por fim, agradeço a colaboração imprescindível dos professores Francesca Maia Faria, Wilson Araújo da Silva Junior e Eurico de Arruda Neto.

“Cada qual sabe amar a seu modo; o modo, pouco
importa; o essencial é que saiba amar.”

Machado de Assis

Apoio Financeiro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da Bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Resumo

Silveira MLC. **Pesquisa de miRNA em pacientes com rinossinusite crônica com pólipos nasal.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2020.

Estudos indicam a importância de microRNAs (miRNA) em pacientes portadores de doenças inflamatórias crônicas, dentre elas a rinossinusite crônica com pólipos nasal (RSCcPN). No entanto, estudos que tenham avaliado a sua expressão nos pólipos nasais e a repercussão clínica decorrente são escassos em literatura. Foram objetivos do estudo: comparar a presença de miRNAs em pacientes com RSCcPN aos controles; associar a expressão de miRNA aos diversos padrões inflamatórios (Th1, Th2, Th17 e Treg) e avaliar a sua influência em aspectos clínicos como extensão da doença e a presença de sinais e sintomas. Amostras de pólipos nasais de pacientes com RSCcPN (sem vigência de tratamento clínico) e mucosa nasal de concha média dos controles foram colhidas para processamento. Os níveis de 1996 miRNA maduros humanos foram comparados por meio de *microarray*, e os miRNA diferentemente expressos tiveram seus níveis confirmados por *qRT-PCR*. As dosagens de citocinas pró-inflamatórias foram medidas por *Luminex*. A comparação entre os dois grupos se deu por meio de testes não-pareados. Após, os miRNAs diferentemente expressos pelos dois exames foram correlacionados com as concentrações das citocinas pró-inflamatórias e com os dados clínicos, aplicando-se testes de correlação paramétricos. Após as duas análises (*microarray* e *qRT-PCR*), seis miRNAs: hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-449a e hsa-miR-449b-5p tiveram expressão significativamente diferente, todos com níveis aumentados nos pólipos nasais em comparação aos controles. Houve correlação direta positiva e significativa entre miR-205-5p com a expressão de IL-5, o grau de eosinofilia e a piora do padrão clínico (SNOT-22). O miRNA 205-5p parece ser muito importante na fisiopatogênese da RSCcPN, aumentando o processo inflamatório, sobretudo para citocinas Th2, havendo relação significativa com a expressão de IL-5, o grau de eosinofilia e com a piora no escore de qualidade de vida.

Palavras-chave: MicroRNA. Pólipos nasal. Rinossinusite crônica.

Abstract

Silveira MLC. **MicroRNA expression profile of nasal polypsis.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2020.

Studies have highlighted the importance of microRNAs (miRNA) in patients with chronic inflammatory diseases, among them Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). However, few studies evaluated the expression of miRNA on nasal polyps, and the clinical impact related to them. The objectives of this study were: 1) to compare the presence of miRNA in patients with CRSwNP to controls; 2) to associate their expression to inflammatory patterns (Th1, Th2, Th17 and Treg); and 3) to evaluate the influence on clinical outcomes, such as extensiveness of the disease and intensity of symptoms. Samples of nasal polyp were collected from patients with CRSwNP (with a wash out period of one month), while middle turbinate mucosa were obtained from controls. The levels of 1996 mature human miRNAs were analyzed by *microarray*, and those differently expressed between groups were confirmed by *qRT-PCR*. Pro-inflammatory cytokines were measured by *Luminex*. The comparison between groups was performed with unpaired statistical analyses. miRNAs that were differently expressed were correlated to the concentration of pro-inflammatory cytokines and with clinical data, through parametric correlation tests. After both assays (*microarray* and *qRT-PCR*), six miRNAs were up-regulated on nasal polyps: miR-205-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-378a-3p, miR-449a and miR-449b-5p. There was a significantly positive correlation between miR-205-5p, and: IL-5 concentration; tissue eosinophilia; and worst SNOT-22. miRNA 205-5p seems to be a very important miRNA in CRSwNP physiopathology, inducing the inflammatory process (especially of Th2 cytokines, with a positive relationship with IL-5 concentration); increasing the eosinophil level on nasal tissue and worsening quality of life scores.

Keyword: MicroRNA. nasal polyps. chronic rhinosinusitis.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Fisiopatologia da RSCcPN	33
Figura 2 -	Processos patológicos associados aos miRNAs	38
Figura 3 -	miRNAs diferentemente expressos em RSCcPN	39
Figura 4 -	Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs	40
Figura 5 -	miR125-b e RSCcPN.....	43
Figura 6 -	Protocolo preconizado para extração de ácidos nucleicos e proteínas	51
Figura 7 -	Resultados obtidos no Agilent-2100 Bioanalyzer.....	52
Figura 8 -	Representação esquemática do ensaio de hibridização por <i>microarray</i>	54
Figura 9 -	Curvas de eficiência dos miRNAs analisados	56
Figura 10 -	Exemplo de <i>layout</i> de placas com abordagem tipo maximização de amostras. (A) controle; (B) pólipo.....	57
Figura 11 -	miRWalk 2.0 - Faculdade de Medicina da Universidade de Heidelberg	58
Figura 12 -	KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.....	60
Figura 13 -	Representação esquemática do método Luminex®	62
Figura 14 -	<i>Heatmap</i> e <i>Volcano Plot</i>	66
Figura 15 -	Curvas de eficiência dos três endógenos candidatos.....	68
Figura 16 -	Curvas de amplificação no qRT-PCR dos endógenos selecionados. (A) hsa-miR-26a-5p; (B) hsa-miR-191-5p, no qRT-PCR.....	68
Figura 17 -	Curva de amplificação no qRT-PCR do hsa-miR-205-5p	70
Figura 18 -	Confirmação dos dados de <i>microarray</i> por qRT-PCR para os miRNAs diferentemente expressos	71
Figura 19 -	Vias de sinalização e os seis miRNAs expressos de forma diferente entre RSCcPN e controles: hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR- 449a e hsa-miR-449b-5p	72

Figura 20 -	Regressão linear evidenciando associação positiva entre (A) hsa-miR-205-5p e IL-5; e (B) hsa-miR-449a e INF- α	77
Figura 21 -	Regressão linear evidenciando associação positiva entre hsa-miR-205-5p e eosinofilia tecidual.....	78
Figura 22 -	Regressão linear evidenciando associação positiva entre SNOT-22 e: (A) hsa-miR-205-5p; e (B) hsa-miR-221-3p	79
Figura 23 -	KEGG - via da integridade epitelial: junções apertadas	83
Figura 24 -	KEGG - via da integridade epitelial: junções aderentes	84
Figura 25 -	KEGG - via da sinalização ErbB.....	88
Figura 26 -	KEGG - via da orientação axonal	90
Figura 27 -	KEGG - via da endocitose	91
Figura 28 -	Resumo gráfico das principais vias de sinalização associadas aos miRNAs diferentemente expressos	94

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Comparação entre subgrupos pelo teste estatístico de Mann-Whitney	65
Tabela 2 -	miRNA com expressão diferente entre pólipos nasais e mucosas controles no microarray. Descrição do transcrito, valores individuais e comparativos e valores estatísticos	67
Tabela 3 -	Diferença de expressão de miRNAs entre pólipos nasais e mucosas controles confirmados por qRT-PCR	69
Tabela 4 -	As principais vias relacionadas aos miRNAs expressos de forma diferente entre RSCcPN e controles, de acordo com a via KEGG (programa fonte miRWalk 2.0), após o ajuste de p-valor	72
Tabela 5 -	Todas as demais vias relacionadas aos miRNAs expressos de forma diferente entre RSCcPN e controles, de acordo com a via KEGG (programa fonte miRWalk 2.0), após o ajuste de p-valor	73
Tabela 6 -	Resultados do Luminex observados entre os pacientes com RSCcPN e controles	76
Tabela 7 -	miRNAs com associação de expressão significativa com a expressão de citocinas. Descrição do transcrito, valores individuais e valores estatísticos	77
Tabela 8 -	Correlação entre os miRNAs com expressão diferente entre os grupos e o grau de eosinofilia Descrição do transcrito, valores individuais e valores estatísticos	78
Tabela 9 -	Correlação entre os miRNAs com expressão diferente entre os grupos, e o escore SNOT-22. Descrição do transcrito, valores individuais e valores estatísticos	79

Lista de Siglas e Abreviaturas

AGO-	Proteínas da família Argonaute
AJC-	Complexo juncional apical (do inglês, <i>Apical junctional complex</i>)
AJs-	<i>Adherens junctions</i> , Junções do tipo aderentes
APCs-	Células apresentadoras de antígenos (do inglês <i>Antigen-presenting cells</i>)
Beads-	Microsféricas fluorescentes
CCL11-	Eotaxina-1
CCL24-	Eotaxina-2
CCL26-	Eotaxina-3
CEN-	Cirurgia Endoscópica Nasal
CEP-	Comitê de Ética em Pesquisa
CGA-	Campo de grande aumento
cPLA-	Fosfolipase A citosólica
DREA-	Doença Respiratória Exacerbada pela Aspirina
EGFR-	Receptor do fator de crescimento epitelial
EPOS-	<i>European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps</i>
EUA-	Estados Unidos da América
FDR-	Parâmetros de p-valor corrigido
Foxp3-	<i>Forkhead box protein 3</i>
GA2LEN-	<i>Global Allergy and Asthma Network of Excellence</i>
HCFMRP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
ICAR-	<i>International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis</i>
IgE-	Imunoglobulina E
INCS-	Corticoesteroides intranasais

IL-	Interleucina
JAMs-	Moléculas de adesão juncional
KEGG-	Enciclopédia de Kyoto de genes e genomas (do inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
LK-	Sistema de Lund-Kennedy
LM-	Escala de Lund-Mackay
Log2-	Escala logarítmica de base 2
MAPK-	Proteína quinase ativada por mitogênio
MBAA-	Ensaio multiplex de esferas
miRBase-	Banco de dados miRNA
miRNAs-	microRNAs
NT-	Nucleotídeos
PACT-	Proteína quinase ativadora de interferon
PAMPs-	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PE-	Ficoeritrina
PI-3K-	Fosfatidilinositol-3-quinase
PRRs-	Receptores de reconhecimento de padrões citoplasmáticos (do inglês, <i>Pattern recognition receptors</i>)
PSQI-	Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh
qRT-PCR-	PCR em tempo real (do inglês, <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>)
RGE-	Refluxo Gastro-esofágico
RISC- RNA-	Complexo de silenciamento RNA-induzido (do inglês, <i>Induced Silencing Complex</i>)
RQ-	Relative Quantification
RSC-	Rinossinusite Crônica

RSCcPN-	Rinossinite Crônica com Polipose Nasossinusal
RSCsPN-	Rinossinite Crônica sem Polipose Nasossinusal
<i>S. aureus-</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAg-	Superantígenos
SNOT-22-	Teste de desfecho sinonasal (do inglês, <i>Sino-Nasal Outcome Test</i>)
TAC-	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
TC-	Tomografia computadorizada
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TER-	Resistência transepitelial
Th-	Thelper
TJs-	Junções do tipo estreitas (do inglês, <i>Tight junctions</i>)
TLR-	<i>Toll-like receptor</i>
Treg-	Resposta T reguladora (do inglês, <i>Regulatory T cells</i>)
TSLP-	Linfopoietina do estroma tímico TSLP
ZEB2-	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>
β-ME-	β-mercaptoethanol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Fatores associados à RSC com polipose nasossinusal	24
1.2. Fisiopatologia da RSCCPN.....	28
1.3. Manejo clínico da RSCcPN.....	33
1.4. microRNAs.....	37
1.5. miRNA e RSC.....	42
2. OBJETIVOS.....	44
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	46
3.1. Avaliação anátomo-patológica.....	48
3.2. Extração de miRNAs e proteínas.....	49
3.3. <i>Microarray</i>	52
3.4. <i>qRT-PCR</i>	55
3.5. Tratamento bioinformático dos resultados de miRNAs	57
3.6. Luminex das proteínas	60
3.7. Análise estatística	62
4. RESULTADOS.....	63
4.1. Dados demográficos.....	64
4.2. <i>Microarray</i>	65
4.3. <i>qRT-PCR</i>	67
4.4. Luminex	76
4.5. Relação entre miRNAs e citocinas / parâmetros clínicos	76
5. DISCUSSÃO	80
5.1. Via da integridade epitelial	82
5.2. Via da sinalização ErbB	87
5.3. Via da orientação axonal.....	89
5.4. Via da endocitose	91
5.5. Relações finais	92
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8. ANEXO.....	107
9. APÊNDICES	116

1. *Introdução*

A rinossonusite crônica (RSC) apresenta-se como uma doença heterogênea, definida por inflamação da mucosa nasossinusal. Existem dois principais consensos sobre essa doença: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps (EPOS - 2012) e International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis (ICAR - 2016). De acordo com ambos, essa é uma doença com alto impacto negativo, seja pela alta prevalência, pela alteração psicossocial decorrente ou pelo impacto à sociedade. É caracterizada pela presença de dois ou mais sintomas, pelo período acima de 12 semanas, sendo os sintomas maiores: obstrução/congestão nasal e rinorreia (anterior ou posterior); e os sintomas menores: dor/pressão facial, redução ou perda de olfato (1,2).

Nos Estados Unidos da América (EUA), onde os custos da RSC são constantemente apurados em vários níveis, com base em coortes institucionais e análises de bancos de dados de assistência médica privada, os custos médicos diretos foram quantificados em US\$ 921 a US\$ 1220 por paciente-ano. Estudos com informações baseadas em declarações de imposto de renda evidenciaram que os custos, no ano que antecederam a cirurgia endoscópica nasal (CEN), foram de US\$ 2449, dos quais US\$ 1789 atribuídos a despesas hospitalares e honorários médicos. A carga geral de custos médicos diretos da RSC nos EUA foi estimada em US \$ 8,6 bilhões por ano (2).

Somam-se aos valores acima os custos indiretos da RSC, que incluem: os custos sociais relacionados à ausência do trabalho (absenteísmo); diminuição da produtividade do trabalho (presenteísmo) e outras formas de perda de produtividade na vida familiar (9,0% de limitações sociais e de 6,0% de limitações cognitivas). Isso se traduz em 61,2 milhões de dias úteis perdidos por ano entre os adultos nos EUA e perda estimada de produtividade no trabalho de US\$ 3,79 bilhões por ano (2).

A fim de se obterem dados de epidemiologia, um questionário postal baseado nos critérios do EPOS foi enviado a uma amostra aleatória de adultos, entre 15 e 75 anos, em 19 centros na Europa. O estudo da Global Allergy and Asthma Network of Excellence (GA2LEN) concluiu que a RSC possui prevalência global de 10,9% (3). Em São Paulo, num modelo experimental semelhante ao do GA2LEN, foi encontrada prevalência de 5,51% em população acima de 12 anos de idade (4).

O impacto da RSC vai, geralmente, além dos sintomas nasossinusais e pode ter efeitos profundos no bem-estar funcional e na qualidade de vida relacionada à saúde em geral. Isto pode ser medido usando escalas individuais de sintomas ou qualidade de vida. Soler et al., utilizando o instrumento de transformação *Short Form 6D*, analisaram o estado de saúde de 230 pacientes com RSC e encontraram média de 0,65 (0 = morto, 1 = saúde perfeita), uma avaliação pior do que foi relatado para outras doenças como: insuficiência cardíaca congestiva, distúrbio pulmonar obstrutivo crônico e doença de Parkinson (5). Fadiga grave e dor corporal também são sintomas relatados por 54% dos pacientes com RSC. Este sintomas melhoram de forma significativa após tratamento cirúrgico (2,5).

Sono de má qualidade também é uma queixa frequente dos pacientes com RSC. Um estudo de 2013 analisou essas duas disfunções, utilizando o Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (PSQI), em uma coorte multicêntrica de 268 pacientes. O PSQI é um questionário autorrespondido (faixa de 0 a 21, considerado anormal quando é maior do que 5) que mede a qualidade e os distúrbios do sono, no período de um mês. O escore dos pacientes com RSC foi de 9,4 com 75% deles reportando qualidade de sono “ruim” (6).

O impacto que a doença promove na qualidade de vida pode ser demonstrado utilizando questionários com ênfase nasossinusal, como o SNOT-22 (sigla em inglês de *Sino-Nasal Outcome Test*, teste de desfecho sinonasal), que tem a vantagem de combinar questões específicas da doença nasossinusal com questões de saúde geral; e sua versão em português foi validada no contexto da cultura brasileira. Os escores médios apresentam diferença significativa entre doentes e sadios, demonstrando a habilidade do instrumento em captar diferenças entre esses grupos, considerando o valor 8 como limite da normalidade. A versão final do instrumento apresentou o coeficiente geral alfa de Cronbach de 0,9276, revelando boa consistência interna do instrumento e sua reprodutibilidade foi suficiente na aplicação interentrevistadores ($r=0,81$) (7).

1.1 Fatores associados à RSC com polipose nasossinusal

Atualmente, existem duas entidades clinicamente conhecidas: a rinossinusite crônica com polipose nasossinusal (RSCcPN) e a rinossinusite crônica sem polipose

nasossinusal (RSCsPN). As duas apresentam distintas expressões de mediadores inflamatórios e remodelação tecidual. Para fins de pesquisa, a RSC é definida de acordo com a característica clínica, e a diferenciação entre RSCsNP e RSCcNP deve ser baseada em endoscopia nasal (1). Além dos mediadores inflamatórios e da caracterização fenotípica, a presença do pólipó é importante para o prognóstico: pacientes com RSCcPN apresentam maior dificuldade de controle clínico e maior necessidade de cirurgias revisionais do que aqueles com RSCsPN, com *odds ratio* de 2,02 (8).

Alguns estudos de revisão sobre RSC sugerem a relação entre a atopia e predisposição ao desenvolvimento da doença (9). Foi postulado que a rinite alérgica promove edema da mucosa nasal nos óstios dos seios paranasais, o que pode comprometer a ventilação e até mesmo obstruí-los, levando à retenção de muco e infecção secundária (10). No entanto, o papel da alergia na RSC é questionado por outros estudos epidemiológicos que não demonstraram aumento na incidência de doenças infecciosas, durante a estação do pólen, em pacientes sensibilizados (11). Em conjunto, os autores do ICAR - 2016 encontraram 18 estudos epidemiológicos que abordam o papel da alergia na RSCcPN, e concluíram não ter havido consenso para o assunto: enquanto que dez desses estudos (1 nível 2b, 9 nível 3b) apoiaram uma associação; sete (3 nível 3b, 4 nível 4) foram contra a associação e um estudo (nível 3b) foi inconclusivo (2). Wilson et al. levantaram as evidências de associação entre as duas entidades, e concluíram que o teste de alergia pode ser considerado uma opção em pacientes com RSCcPN para se encontrarem gatilhos inflamatórios (12). Por fim, não há evidências que alergias alimentares desempenham papel na fisiopatologia da doença (13). Dessa forma, estudos adicionais serão necessários para a definição de existência ou não dessa relação.

Desde a introdução do conceito de vias aéreas unidas, grande número de evidências correlaciona asma à presença de pólipó nasal (14). Asma se caracteriza por ser uma doença de vias aéreas baixas com hiperresponsividade brônquica, alteração epitelial, fibrose subepitelial, aumento da massa muscular lisa, hiperplasia de células caliciformes e de glândulas submucosas, neovascularização e polarização da resposta imune para Th2, com aumento de eosinófilos, mastócitos e linfócitos nas vias aéreas, bem como de níveis sorológicos de imunoglobulina E

(IgE) (15). O estudo GA2LEN pesquisou mais de 52.000 adultos, com idades entre 18 e 75 anos, e concluiu que há forte associação entre asma e RSC, sobretudo nos paciente que relataram rinite concomitante (3). Chiado e desconforto respiratório estão presentes em 31% a 42% dos pacientes, e asma foi diagnosticada em 26% daqueles com RSCcPN, comparados com 6% dos controles (16). Ademais, 7% dos asmáticos têm pólipos nasais, com prevalência de 13% na asma não atópica e de 5% na asma atópica (17).

Esta prevalência aumenta quando são avaliados pacientes com asma e sensibilidade à aspirina: 36-96% apresentam polipose nasossinusal e até 96% alterações radiográficas que afetam os seios paranasais (18). O tratamento da RSC diminui a gravidade da asma. A CEN demonstrou melhorar os escores de gravidade da asma, reduzir a necessidade de corticosteroides inalados e a frequência de atendimentos de emergência relacionados à doença (19). Sella et al., em estudo de coorte e seguimento médio dos pacientes por 10 anos, demonstraram que a asma, foi o fator predominantemente associado à cirurgia revisional aumentando a chance em 5,54 vezes nos pacientes com RSCsPN, e em 3,27 naqueles com RSCcPN (8). Portanto, a asma é uma comorbidade importante durante a avaliação de um paciente com RSC.

Muitos organismos na mucosa nasossinusal possuem a capacidade de formar um biofilme, uma comunidade de bactérias ou de fungos que se envolve em uma matriz extracelular protetora. Isso torna os microorganismos mais resistentes a insultos externos, incluindo as defesas do hospedeiro, além de sofrerem mudança fenotípica que exige menos oxigênio e nutrientes para o metabolismo, conferindo resistência adicional aos antimicrobianos convencionais (20). A relação precisa entre a formação de biofilme e a patogênese da RSC é pouco conhecida. Sabe-se que pacientes colonizados por biofilmes apresentam resultados pós-operatórios menos satisfatórios, e maior necessidade de cirurgia revisional (21). No entanto, é importante ressaltar que os biofilmes também podem ser encontrados em indivíduos sem RSC (controles), mostrando que eles não são necessários nem suficientes para causar a doença (22).

É proposto que o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) protegido por biofilmes ou sequestrado dentro de células epiteliais, secreta toxinas conhecidas como

superantígenos (SAG). Os Sags promovem estimulação generalizada e policlonal de células T, liberação de citocinas e resposta IgE local, resultando no recrutamento de eosinófilos e em alterações clínicas e histopatológicas associadas à RSCcPN (23,24). Ademais, o estudo de Foreman et al., por meio da técnica FISH, evidenciou que diferentes espécies de biofilmes em pacientes com RSC estão associadas a diferentes fenótipos da doença: os biofilmes de *H. influenzae* são encontrados em pacientes com doença leve, enquanto os de *S. aureus* são observados naqueles com doença mais grave. Os autores sugerem que é mais importante a investigação da espécie relacionada ao biofilme do que a presença dele em si (25). No entanto, essa é uma linha de pesquisa ainda a ser melhor explorada: a identificação do biofilmes é limitada a grandes centros de pesquisa, pela necessidade de equipamentos ultraespecializados; e as estratégias terapêuticas precisam ser otimizadas.

O refluxo gastroesofágico (RGE) também tem sido aventado como contribuinte para a fisiopatologia da RSC, atuando de diversas maneiras: exposição direta da mucosa nasal ao ácido gástrico, resposta vagal mediada pela estimulação esofágica e superinfecção pelo *Helicobacter pylori* (2). Uma revisão sistemática sobre o assunto mostra que ainda faltam estudos controlados, com número expressivo de pacientes e critérios diagnósticos precisos de RGE para que se confirme essa relação entre as duas entidades. Ademais, os ensaios clínicos randomizados que avaliam a melhora dos sintomas da RSC após o tratamento do RGE também são inconclusivos. Alguns autores como Vaezi et al. e Pincus et al. observaram melhora significativa dos sintomas da RSC após o tratamento (26,27), enquanto que outros como DiBaise et al. e Durmus et al. relataram não haver diferença estatística (28,29). Portanto, parece que há prevalência relativa de RGE em pacientes com RSC de difícil controle, mas os estudos atuais são insuficientes para confirmar essa hipótese (30).

O Projeto Microbioma Humano revelou que a mucosa nasal de pacientes saudáveis não é estéril e que um amplo espectro de micróbios, como bactérias, fungos e vírus estão associados à saúde. Assim, o microbioma existe como uma comunidade funcional exercendo papel benéfico no epitélio, incluindo a exclusão de patógenos, produção de antimicrobianos locais, fortificação da barreira epitelial, e o

aprimoramento do sistema imunológico e das funções metabólicas (31). Técnicas modernas de identificação como PCR em tempo real (Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time, *qRT-PCR*) e imuno-histoquímica ampliaram esse conhecimento, ante a detecção oferecida pelos meios de cultura. Yan et al. demonstraram que existem diferenças substanciais na microbiota, tanto entre os indivíduos quanto entre as diferentes subregiões anatômicas do nariz e dos seios paranasais (32). Em contraste com as ricas associações de bactérias que povoam o nariz e os seios paranasais no estado saudável, os pacientes com RSC são colonizados por uma quantidade total de bactérias semelhante, mas muito menos diversificadas em termo de espécies (33). Além disso, a administração de antibióticos pode resultar em diminuição dramática da riqueza e diversidade das comunidades bacterianas residentes, com aumento proporcional de *S. aureus* (34). No entanto, essa também é uma linha de pesquisa ainda a ser melhor explorada: não está clara a associação entre a diminuição da diversidade bacteriana e as alterações patológicas encontradas na doença.

1.2 Fisiopatologia da RSCCPN

A etiopatologia da inflamação sintomática persistente da mucosa nasossinusal continua a ser uma questão de debate vigoroso e vários fatores ambientais e do hospedeiro são implicados. Na camada subepitelial da mucosa nasossinusal residem linfócitos, plasmócitos, macrófagos, células dendríticas e glândulas. A motilidade ciliar e a integridade estrutural do epitélio servem como fatores mecânicos que limitam a estimulação antigênica. Alérgenos, fungos, bactérias e vírus possuem atividade proteolítica, o que pode diminuir a integridade epitelial e expor o tecido subjacente à estimulação externa. Apesar dessas exposições, essa integridade epitelial geralmente é mantida e, quando ocorrem lesões, os processos de reparo restauram a barreira mecânica.

A integração das respostas imunes inata e adquirida no trato nasossinusal começa com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões citoplasmáticos (*Pattern recognition receptors* - PRRs), desencadeando

a liberação de quimiocinas e citocinas, estimulando células apresentadoras de antígenos (*Antigen-presenting cells* - APCs) e atraindo componentes celulares para o tecido (35). Entre as famílias de PRRs destaca-se o *toll-like receptor* (TLR). O TLR2 desempenha importante papel nas respostas às bactérias Gram-positivas (incluindo *S. aureus*) e fungos. Danos ao epitélio expõem mais PRRs a PAMPs, amplificando a resposta imune, e se o estímulo PAMP for suficientemente forte, resultará em resposta imune adquirida. A mucosa nasal expressa uma variedade de TLRs e estudos de expressão gênica evidenciam que TLR2, TLR4 e TLR7 mostram-se aumentados em amostras de pólipos nasais quando comparados a amostras de mucosa nasal de pacientes com RSCsPN, ou controles (36). Em indivíduos saudáveis, o microbioma convive com funções equilibradas e normais do sistema imunológico inato. Nos doentes, um dos mecanismos para a perpetuação do estado inflamatório crônico é a superativação de TLRs, mantendo mecanismos imunes inatos patologicamente sobrecarregados que, por sua vez, levam a alterações na regulação das respostas inata e adaptativa (37).

Quando ativadas, as células dendríticas funcionam como importantes APCs, e iniciam um processo fagocítico e migram para os linfonodos, onde apresentam antígenos às células Thelper (Th). A IL (interleucina)-6 tem sido proposta como uma citocina pró-inflamatória chave, porque inibe a resposta inata e promove a resposta adaptativa, principalmente pela diminuição da resposta T reguladora (regulatory T cells - Treg), representada pela IL-10; e, consequentemente, liberando as células Th dos efeitos supressores anti-inflamatórios. Atualmente, a resposta Th é dividida, principalmente, em Th1, Th2, Th17 e Treg, baseado no perfil de citocinas expressas. A resposta Th1 (IL-2 e INF- γ) facilita a defesa contra patógenos intracelulares, enquanto que a resposta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) é importante na imunidade contra parasitas e é relacionada com asma e alergia. A resposta Th17 (IL-6, TGF- β e IL-23) desempenha um papel na defesa contra bactérias extracelulares e a resposta Treg medeia a imunossupressão e a tolerância imunológica. O tipo, a duração e a intensidade do estímulo PAMP moldam o meio ambiente e são críticos na determinação do perfil Th. O equilíbrio Th17/Treg influencia o resultado das respostas imunes e fornece uma base de compreensão no mecanismo de doenças autoimunes e inflamatórias (38). Os mediadores inflamatórios clássicos da resposta

Th2, como IL-5, IL-13, eotaxina-1 (CCL11), eotaxina-2 (CCL24) e eotaxina-3 (CCL26) estão aumentados nos pólipos nasais (39,40). Eles estão envolvidos no recrutamento e ativação de eosinófilos, por meio da ativação de seu receptor de quimiocina CC3 (41).

A mucosa nasosinusal funciona como barreira epitelial a uma grande variedade de agentes exógenos, limitando e regulando a resposta imune secundária, de forma que, quando ela falha em excluir um patógeno, as citocinas e quimiocinas derivadas das células epiteliais agem para moldar a resposta imune subsequente. A proteção mecânica promovida pela barreira epitelial se dá por dois componentes: o muco respiratório e o epitélio subjacente. O muco retém o material reconhecidamente como externo e o move em direção à nasofaringe e suas propriedades físicas e químicas desempenham papel significativo na eficiência e seletividade desse processo (2).

Abaixo do muco residem as células epiteliais que estão ligadas umas às outras por junções do tipo estreitas (*tight junctions* - TJs) e aderentes (*adherens junctions* - AJs). Sua combinação corresponde ao complexo juncional apical (*apical junctional complex* - AJC), criando uma barreira semipermeável. Os agentes exógenos (vírus, bactérias e fungos) possuem proteases que lhes permitem degradar estas proteínas juncionais, tornando a barreira mais permeável (42). Portanto, para que ela se mantenha, há uma produção contínua de proteínas AJC, bem como de moléculas inibidoras de proteases. As TJs são compostas por pelo menos três tipos de proteínas transmembranas: ocludina, claudina e moléculas de adesão juncional (JAMs); e uma "placa" citoplasmática que consiste em diversas proteínas que formam grandes complexos. Estão envolvidas na montagem de junções, regulação de barreira, polaridade celular, transcrição de genes e outras vias (40). Esta barreira epitelial que, envolve TJs e AJs, está comprometida na RSCcPN, por meio da redução nos níveis de proteínas do complexo juncional como ocludina-1 e ZO-1 (43). Além dos fatores exógenos, como alérgenos e patógenos, a quebra da barreira epitelial também pode ser mediada por citocinas Th2. Isso leva a uma indiferenciação epitelial em direção a um fenótipo mesenquimal, que contribui para a fibrose e permanência da inflamação (40). Ademais, permanece o debate sobre: se as células epiteliais na RSC são inerentemente disfuncionais ou se exposições a

fatores internos ou externos induzem essa desregulação. É possível que a ruptura induzida pelo patógeno do epitélio nasossinusal possa promover infecção bacteriana adicional, colonização, ou mesmo a formação de biofilme e, por sua vez, potencializar ainda mais o processo global da doença crônica (1).

O epitélio de pólipos nasal ainda apresenta alteração na taxa de reparo cicatricial, quando comparado à mucosa nasal de pacientes sem RSC (44). Ainda, a presença de exoprodutos do *S. aureus* interferiu consideravelmente no processo de cicatrização epitelial *in vitro*, sendo que esse efeito foi muito mais evidente nos pólipos nasais do que na mucosa de pacientes sem RSC.

Quando avaliados os níveis de mRNA das proteínas de superfície celular (S100A7, S100A8 e S100A9,) de amostras epiteliais de doentes descobriu-se que esses níveis foram significativamente menores em processos uncinados quando comparados aos ~~cornetos~~ às conchas inferiores (45). Os estudos funcionais também documentam esse aumento da permeabilidade da barreira na RSC (46). Além disso, um estudo de metanálise sobre os ensaios de *microarray* em pacientes com RSCcPN indicou que o epitélio do pólipo nasal exibe uma assinatura genética menos madura, tipicamente associada à transição de epitelial para mesenquimal com perda da integridade (47). Além das PRRs clássicas, evidências recentes indicam que receptores de sabor amargo e doce também estão presentes nas células epiteliais e funcionam como PRRs ao se detectarem produtos microbianos, desencadeando um *clearance* mucociliar aprimorado e liberando moléculas de defesa (48).

As citocinas e quimiciocinas elaboradas pelas células epiteliais, assim como sua relação com as células dendríticas, também desempenham papel fundamental na formação da resposta imune adaptativa subsequente. Em pessoas saudáveis ocorre a homeostase da mucosa nasal, mantendo sua tolerância a alérgenos e comensais e sua defesa contra patógenos. Na RSC, a inflamação da mucosa permanece crônica, mantendo uma resposta celular inata e adaptativa persistente, com estímulo à produção de citocinas epiteliais específicas IL-25, IL-33 e linfopoietina do estroma tímico (TSLP) (49). A exposição a *S. aureus* aumenta a expressão de IL-33, TSLP, IL-5 e IL-13 no tecido do pólipo nasal que, acompanhado da ativação das vias NF- κ B, induz a liberação e propagação de citocinas Th2 através da ligação ao TLR-2

(1). Outra forma da resposta imune adaptativa contribuir para a inflamação crônica da doença é através das células T, que representam um componente importante dessa resposta. A contagem de células T CD31 mostrou-se aumentada nos pólipos nasais, assim como a relação de células T CD4/CD8 (50). Isso, associado à diminuição na expressão, tanto de *forkhead box protein 3* (Foxp3) quanto de citocina regulatória de TGF- β , levam ao aumento de células inflamatórias na mucosa das vias aéreas, gerando comprometimento de células Treg e desequilíbrio nos processos pró e anti-inflamatórios (51).

As células B também contribuem significativamente para a inflamação nasosinusal. A população de células B *naïve*, assim como a população de células plasmáticas ativadas, estão aumentadas nos pólipos nasais. Esse influxo de células B é secundário ao aumento de fatores quimiotáticos específicos como CXCL13 e CXCL12 e dos níveis de fator de ativação de células B da família TNF e IL-6 (40,52). As células B também possuem funções efectoras. Os níveis de IgG1, IgG2, IgG4, IgA, IgE e IgM estão aumentados nos pólipos nasais, de forma local mas não sistêmica (52).

Como em outras doenças inflamatórias crônicas, a remodelação tecidual também ocorre na RSC. Os pólipos nasais são caracterizados histologicamente por infiltrado celular inflamatório, formação de pseudocistos e edema de tecido estromal, com níveis de colágeno reduzidos (53). O crescimento em si ocorre através do extravasamento de proteínas plasmáticas (infiltrando a barreira vascular e epitelial, que se encontram disfuncionais), aumentando a deposição de fibrina no lúmen, que por sua vez, forma uma espécie de andaime, aprisionando ainda mais proteínas plasmáticas e aumentando o edema. Essa malha de fibrina é estabilizada pelo fator XIIIa, cujos níveis estão aumentados em pacientes com RSCcPN (54). Além disso, estudos indicam que há desequilíbrio na formação de fibrina (aumento dos níveis de fibrina e fator XIIIa) e degradação (redução do ativador do plasminogênio tecidual e dos níveis de D-dímero) contribuindo para a formação do pólipos nasal (Figura 1) (40).

Figura 1 - Fisiopatologia da RSCcPN

Fonte: Stevens et al. (40).

1.3 Manejo clínico da RSCcPN

A endoscopia nasal tem utilidade diagnóstica bem estabelecida na literatura para avaliar a RSC, graduar a intensidade de processo inflamatório e discriminar os fenótipos. Permite avaliar os seguintes parâmetros: edema da mucosa nasal, presença de secreção e de pólipos. Além disso, a endoscopia nasal pode auxiliar na obtenção de culturas e biópsias direcionando a avaliação de diagnósticos diferenciais como tumores nasais ou hipertrofia adenoidiana. Bhattacharyya e Lee determinaram que, comparada apenas aos critérios clínicos, a adição de endoscopia nasal aumenta consideravelmente a precisão diagnóstica da RSC, com

especificidade e valor preditivo positivo estimados em 84% e 66%, respectivamente (55).

As diretrizes atuais recomendam a tomografia computadorizada (TC) de seios paranasais, como modalidade diagnóstica de imagem de escolha, para confirmar a doença, sobretudo nos casos refratários ao tratamento clínico (56). No entanto, a exposição à radiação se mostra como contraponto a esse benefício. A TC também fornece informações importantes para o preparo cirúrgico, como particularidade anatômica, localização e extensão da doença, e presença de neo-osteogênese.

O objetivo do tratamento da RSC é alcançar e manter o controle clínico. O controle é definido como um estado de doença em que os pacientes não apresentam sintomas ou os sintomas não são incomodativos, se possível combinados com uma mucosa nasal saudável e, de preferência, com o uso apenas de medicação local (1).

A irrigação nasal com solução fisiológica é parte importante do tratamento. O seu perfil favorável de segurança e a sua aceitação por parte do paciente fazem da irrigação nasal uma estratégia terapêutica tópica atraente em longo prazo (57). Existe uma variabilidade enorme na sua forma de uso, desde soluções isotônicas ou hipertônicas, baixo ou alto volume, pressão passiva ou ativa. Os efeitos adversos são raros, mas incluem: irritação local, dor de ouvido e cefaleia, hemorragias nasais, drenagem nasal e contaminação, tanto a partir do frasco de aplicação quanto da solução utilizada. A última revisão da literatura, baseada em evidências, verificou que a irrigação nasal de baixa pressão e grande volume otimiza a distribuição e o poder de limpeza da solução na cavidade nasal (58), sendo a forma preferencialmente indicada na atualidade.

O tratamento com corticoesteroides intranasais (INCS), na forma de aerosol ou *spray*, já foi amplamente estudado. Os resultados pontuam melhora tanto em avaliações subjetivas quanto objetivas. As meta-análises publicadas demonstraram benefício significativo em favor do corticosteroide tópico quando comparado ao placebo (59,60). No entanto, os corticosteroides modernos (mometasona, fluticasona e ciclesonida) não se mostraram mais eficazes que as versões anteriores (budesonida, beclometasona, betametasona, triamcinolona e dexametasona) para a pontuação final dos sintomas ou redução do tamanho do pólipos (2). Não foram

relatados efeitos colaterais graves com nenhum desses medicamentos, sendo a epistaxe o evento mais comum. Biópsias não mostram evidências de danos à mucosa nasal (61). No entanto, o risco de efeitos adversos sistêmicos está relacionado à biodisponibilidade sistêmica do INCS, que varia de <1% a 50%, sendo que o furoato de mometasona, o propionato de fluticasona e sua modificação, o furoato de fluticasona, demonstram absorção sistêmica desprezível. As taxas de absorção sistêmica são mais altas entre os corticosteroides mais antigos (budesonida, beclometasona, betametasona, triancinolona), que apresentam biodisponibilidades na faixa de 34 a 49%. O uso de furoato de mometasona ou propionato de fluticasona em crianças não evidenciou efeitos adversos no crescimento ou na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Portanto, os dados clínicos não sugerem diferenças significativas na eficácia entre os INCS, no entanto, os novos medicamentos, com menor biodisponibilidade sistêmica são preferíveis, por apresentarem critérios farmacocinéticos e farmacológicos ideais (62).

Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais comum o uso de ampola de corticosteroide tópico em irrigação nasal de alto volume. Estudos demonstram que há penetração significativamente maior nas cavidades nasossinusais quando corticosteroides são usados em irrigação em comparação aos *sprays* ou atomizadores nasais. A budesonida tem sido comumente adicionada a essas irrigações de alto volume, em doses que variam de 0,25 mg a 2 mg por dia. Essa prática agrada os rinologistas, uma vez que oferece melhor controle da doença e minimiza o uso de terapia sistêmica, com os seus potenciais efeitos adversos. No entanto, pacientes em tratamento prolongado (acima de seis meses) e que estão recebendo outras formas de terapia com corticosteroides, como os inalatórios na asma, devem ser monitorados laboratorialmente para avaliação de supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (63).

Assim como os INCS, os estudos sobre corticosteroides orais no tratamento da RSCcPN, independentemente dos diversos regimes posológicos, mostram mudanças positivas na maioria dos parâmetros avaliados. Existe redução significativa do tamanho dos pólipos na endoscopia nasal, na congestão nasal e na melhora do olfato, além de redução significativa também na contagem de eosinófilos no sangue (64). Os corticosteroides habitualmente utilizados são: hidrocortisona,

prednisolona, metilprednisolona e dexametasona. Possuem boa biodisponibilidade oral e são eliminados pelo metabolismo hepático e excreção renal dos metabólitos. Os efeitos são mediados por mecanismos genômicos e não genômicos. Os mecanismos genômicos incluem a ativação do receptor de glicocorticoide levando à ativação ou à repressão da síntese de proteínas, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Assim, os mecanismos de inflamação e resposta imune podem ser modificados. Os mecanismos não genômicos podem desempenhar papel adicional na pulsoterapia, como o efeito inibitório rápido (<5 minutos) da dexametasona na ativação da fosfolipase A citosólica (cPLA); e a interação direta dos corticosteroides orais com as membranas celulares. Sugeriu-se que os esteroides lipofílicos se dissolvem fisicamente nas membranas lipídicas e modificam suas propriedades físico-químicas, que por sua vez, afetam a atividade das proteínas de membrana, sobretudo a estabilização das membranas lisossômicas (65).

Contudo, apesar de seu uso comum, os corticosteroides orais estão associados, em relativa alta frequência, a diversos efeitos adversos, que podem ser extensos e afetar muitos sistemas orgânicos diferentes, como: indução ou agravamento do diabetes mellitus e da hipertensão arterial; regulação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e consequente inibição da secreção adrenal de cortisol; aumento do risco de infecção; reações psiquiátricas, alterações na pele, úlceras gastrointestinais, catarata, dislipidemia, perda de densidade óssea e necrose avascular do osso. Muitos desses efeitos são dependentes da dose/duração do tratamento (66). Nesse contexto, uma meta-análise para examinar os efeitos dos corticosteroides orais na densidade mineral óssea encontrou forte correlação entre risco de fratura e dose acumulada (67). Além disso, o risco de repetidos ciclos curtos de corticosteroides não é conhecido. Não está claro se vários cursos têm efeitos aditivos ou se cada curso curto apresenta o mesmo risco isolado para o indivíduo. Dessa forma, o uso de corticosteroides orais sempre será reservado apenas aos pacientes com doença refratária para quem os benefícios superam os potenciais efeitos colaterais.

1.4 microRNAs

A RSC pode ser considerada um espectro de doença, estando a RSCsPN numa extremidade e a RSCcPN na outra. Ainda, dentro do fenótipo RSCcPN existem vários outros perfis, a depender de outros fatores como: asma, eosinofilia tecidual e sérica, e intolerância a salicilatos e anti-inflamatórios não esteroidais. Nos pacientes, podem se apresentar em diferentes pontos ao longo deste *continuum* e com diferentes graus de eosinofilia tecidual e sintomas clínicos, dependendo de variações genéticas e epigenéticas particulares. Os padrões de diferenciação das células T parecem correlacionar com o fenótipo, com a RSCsPN inclinando-se para Th1 e a RSCcPN para Th2 (35). Além da remodelação epigenética e dos fatores de transcrição, os microRNAs (miRNAs) são reconhecidos por modularem significativamente a expressão gênica Th e os resultados funcionais relacionados às citocinas (68). No entanto, estudos dessas moléculas na RSC ainda são escassos.

Os miRNAs são uma classe de RNA de sequência curta e cadeia simples (com 20 a 22 nucleotídeos), não codificantes, comuns a todos os eucariotos e altamente conservados. Sua descoberta expandiu a compreensão da regulação da expressão gênica mediada por RNA, revelando um sistema substancialmente mais complexo. Eles não são transcritos para proteínas, mas estão envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica, e agem para reduzir a quantidade de proteína que o gene é estimulado a produzir, mas sem desligá-lo de uma vez, diminuindo os transcritos indesejados. A repressão da tradução ou a degradação do mRNA ocorre por emparelhamento nos miRNAs com o gene alvo na região 3' não traduzida (UTR), por complementaridade completa e/ou parcial. O domínio na extremidade 5' dos miRNAs, que se estende da posição 2 até a posição 7 dos nucleotídeos, também é crucial para o reconhecimento do alvo, sendo denominada região “seed” (69). Mais de 60% dos genes codificadores de proteínas contêm pelo menos um local de ligação ao miRNA conservado. Portanto, a biogênese e a função dos miRNAs são fortemente coordenadas e a sua desregulação está frequentemente associada a doenças humanas como câncer, desordens inflamatórias e imunológicas como dermatite atópica, retocolite ulcerativa, rinite

alérgica, asma, doenças pulmonares e cardiovasculares e, recentemente, foi descrita nas diferentes formas de RSC, (70,71) (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Processos patológicos associados aos miRNAs

Fonte: Tomankova et al. (2012) (72).

Figura 3 - miRNAs diferentemente expressos em RSCcPN

Fonte: Zhang et al. (2012) (73).

A produção e a função do miRNA envolvem uma série de proteínas, que coletivamente são chamadas “maquinário miRNA”. Os miRNAs codificados no genoma são transcritos pela polimerase RNAII para miRNAs primários. O miRNA primário é processado, no núcleo, pela Drosha RNase III endonuclease, e seu cofator síndrome de DiGeorge. Esse precursor miRNA é transportado para o citoplasma e clivado pela enzima Dicer RNaseIII, terminando como um filamento único de miRNA, que é carregado para o complexo de silenciamento RNA-induzido (*RNA-Induced Silencing Complex* - RISC). Para liberação do miRNA maduro, *in vivo*, é necessário quantidade suficiente de proteína quinase ativadora de interferon (PACT), que associada ao Dicer estimula a clivagem do miRNA precursor (9). Para a

formação do RISC, os miRNAs se associam às proteínas da família Argonaute (AGO). O *loop* de especificidade no domínio MID da AGO2 entra em contato com a região 5' do RNA alvo. A *seed* do miRNA é pré-arranjada numa conformação em hélice para que ocorra uma varredura eficiente de sequências complementares mRNAs alvos. Em humanos, apenas AGO2 é cataliticamente ativa (69). Apesar da riqueza de informações moleculares, o estudo do RISC permanece desafiador. Existem múltiplas interações, ora combinatórias e redundantes, ora excludentes entre os fatores envolvidos, fornecendo ampla plasticidade funcional. Essa redundância oferece maneiras alternativas de montar complexos de silenciamento que, aliado ao controle epigenético, como metilação do DNA e modificações de histonas, podem diferir em seus resultados funcionais (74). A maquinaria miRNA está resumidamente detalhada na Figura 4.

Figura 4 - Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs

Fonte: Zhang XH, Zhang YN e Liu. (2014) (9).

Uma versão recente do banco de dados miRNA (miRBase) catalogou 2.588 miRNAs em humanos. As regras de classificação ainda não foram unificadas, mas geralmente considera-se que os miRNAs da mesma família são os que possuem sequências idênticas nos nucleotídeos 2-8 do gene maduro. Alguns genes compartilham uma origem evolutiva comum, mas divergem na região *seed*. Mesmo em famílias conservadas, a alteração num único nucleotídeo da região *seed* pode gerar alvos finais diferentes, mostrando a importância desta região. Os miRNAs que possuem a mesma região *seed* se agrupam em *clusters* formando aglomerados homólogos. Apesar de serem transcritos por um promotor comum, podem gerar um transcrito policistrônico, que é então processado para gerar múltiplos miRNAs maduros indicando, mais uma vez, um sistema complexo de regulação (69).

A nomenclatura dos genes do miRNA é um tanto inconsistente. Os genes encontrados nos primeiros estudos genéticos receberam o nome a partir de seus fenótipos (por exemplo, *lin-4*, *let-7* e *Isy-6*), enquanto que a maioria dos miRNAs encontrados por sequenciamento recebeu denominações numéricas (por exemplo, *mir-125*). Cada *locus* produz dois miRNAs maduros de seu precursor: um da cadeia 5' e um da cadeia 3' (por exemplo, *miR-125a-5p* e *miR-125a-3p*). No entanto, um braço geralmente é muito mais prevalente e ativo biologicamente do que o outro braço (69).

A literatura mostra que a ablação da maquinaria de biogênese do miRNA, durante a ativação de células Th, tem efeitos devastadores, demonstrando o papel crítico desses genes na reprogramação da expressão gênica. Deleções de *Dicer* ou *Drosha* em células Th murinas resultam em produção de citocinas aberrantes. Por exemplo, células Th deficientes em *Dicer* possuem expressão diferente de IFN- γ , indicando comprometimento e diferenciação de células Th para o padrão Th1. Na maioria dos casos, um único miRNA tem como alvo diferentes conjuntos de mRNAs e dependendo do contexto celular e da coexpressão de outros miRNAs resulta em diferentes saídas funcionais (68).

1.5 miRNA e RSC

A literatura descreve alguns miRNAs que desempenham papel importante na alergia, nas doenças pulmonares inflamatórias e na RSC (71). O miR-21 e miR-126 foram associados à inflamação pulmonar alérgica por meio da regulação positiva da citocina IL-12p3 que induz a diferenciação celular Th2. O miR-133a está envolvido na regulação negativa da expressão de RhoA, uma proteína chave do músculo brônquico, que contribui para a hiperreatividade das vias aéreas em indivíduos com asma (75). Em RSC, apenas um estudo foi encontrado na literatura. Zhang et al. observaram que cerca de 35 miRNAs tiveram sua expressão diferenciada na RSC, sendo 32 com expressão diminuída e três com expressão aumentada. O MiR125-b foi um desses miRNAs descritos com expressão aumentada em pacientes com RSCcPN associado à eosinofilia. Este miRNA regula positivamente a produção de IFN-1 via 4E-BP1, e tem sido implicado em várias atividades biológicas, por estimular resposta inflamatória, tanto Th1 quanto Th2, além de ativar linfócitos B via BAFF e a produção de imunoglobulinas. Na RSCcPN, o aumento do BAFF induz a produção de IgA, e contribui para a ativação local de eosinófilos (Figura 5). Os autores ainda demonstraram que culturas de células nasossinusais têm expressão aumentada de miR125-b quando estimuladas por dsRNA, LPS e IL-10, e concluíram que existe uma importante associação entre miR125-b, resposta imune inata antiviral e padrão inflamatório das vias aéreas (73).

Figura 5 - miR125-b e RSCcPN

Fonte: Zhang et al. (2012) (73).

A escassez de estudos sobre o tema, avaliando a importância dos miRNAs na indução inflamatória da RSCcPN, e na repercussão clínica, foi a principal justificativa para a execução do presente estudo.

2. Objetivos

O estudo foi delineado com os objetivos de:

- comparar a presença de miRNAs em pacientes com RSCcPN a indivíduos sem doença inflamatória nasossinusal;
- associar os miRNAs diferentemente expressos aos diversos padrões inflamatórios (Th1, Th-2, Th-17 e Treg), de acordo com a expressão das respectivas citocinas;
- associar os miRNAs diferentemente expressos a parâmetros clínicos.

A hipótese é a de que os miRNAs desresregulados podem influenciar a expressão proteica de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com RSCcPN, e os aspectos clínicos como extensão da doença e a intensidade de sinais e sintomas.

3. Casuística e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Ambulatório de Rinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) local Processo nº CAAE: 35905314.4.0000.5440 (Anexo A).

Para critérios de elegibilidade, os pacientes encaminhados ao ambulatório, no período de 2014 a 2017, com queixas nasossinusais, foram submetidos a entrevista e exame clínico. Foram recrutados, portanto, pacientes com o diagnóstico de RSCcPN, de acordo com o critério do EPOS 2012 (1) e que estivessem sem uso de medicamentos para a doença há pelo menos um mês, dentre eles, corticoide tópico, corticoide sistêmico, anti-histamínicos e antibióticos do tipo macrolídeos. Foram ainda critérios de não elegibilidade: pacientes abaixo de 20 anos e acima de 75 anos, com doença unilateral, com sinais ou sintomas de doença agudizada, suspeita ou confirmação de RSC secundária a imunodeficiências, fibrose cística ou discinesia ciliar primária, e ainda aqueles com potencial de risco de sangramento (hepatopatas, em uso de anticoagulantes orais ou com discrasias sanguíneas).

Após compreensão e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice) os pacientes foram submetidos à avaliação clínica, que compreendeu a aplicação do questionário SNOT-22 (Anexo B), validado para a língua portuguesa (7). O paciente foi orientado a preencher o questionário tal qual o protocolo original. Esse é um instrumento fácil de ser respondido, em curto espaço de tempo, e que permite a obtenção de modo sistemático de pontos chave da história da doença, além de proporcionar educação ao doente, pois convida o mesmo a prestar atenção aos sinais e sintomas mais comuns da doença, bem como reconhecer a sua intensidade. O instrumento ainda se mostra capaz de diferenciar grupos de pacientes com doenças nasossinusais de indivíduos saudáveis, considerando-se 8 o limiar de normalidade (76).

Na sequência, os pacientes foram encaminhados para endoscopia nasal, utilizando fibra óptica rígida de 3,2 mm, acoplada a um sistema de microcâmera e vídeo. Todos os exames foram realizados e analisados pelo mesmo examinador. Nesse momento foi aplicado o sistema de Lund-Kennedy (LK) (Anexo C) para graduação do escore (77). O LK continua sendo o sistema de pontuação endoscópica mais utilizado e referido nos estudos em rinologia e se propõe a ser

uma ferramenta que auxilia na tomada de decisões. Avalia os seguintes parâmetros: edema da mucosa nasal, presença de secreção e de pólipos. Para cada um desses parâmetros, pontua-se de 0 a 2, de acordo com a intensidade de alterações. Assim, o escore final, considerando-se os dois lados, pode variar de 0 a 12. Imediatamente antes da endoscopia, era introduzido algodão com vasoconstritor (nafazolina) e anestésico (Xylocaína 10% spray). Após a graduação pelo escore de LK, o paciente era submetido à biópsia do pólipo nasal, processada conforme descrição a seguir.

A TC dos seios paranasais foi realizada em todos os pacientes no Setor de Radiologia da instituição e analisada pelo mesmo examinador. Avaliados os cortes nos planos coronal e axial com seções contínuas, com 1 mm de espessura. Foi aplicada a escala de Lund-Mackay (LM) (78), em que cada grupo de seio paranasal é graduado de 0 (nenhuma anormalidade), 1 (opacificação parcial) ou 2 (opacificação total). A pontuação total pode variar de 0 a 24 pontos, e o maior valor corresponde à maior gravidade da doença (Anexo D). As variações anatômicas podem ser descritas, mas não contribuem para o escore.

Os participantes do grupo controle foram recrutados antes da rinoplastia estética. O critério de exclusão foi presença de sintomas nasais, persistentes ou agudos, previamente à cirurgia. Após os pacientes assinarem o TCLE, uma biópsia da concha média foi obtida durante o procedimento cirúrgico. Os tecidos colhidos por biópsia do grupo com RSCcPN foram divididos em duas partes: uma fixada em formalina tamponada 10% e processada para avaliação anatomopatológica convencional, e outra congelada em nitrogênio líquido e enviada ao Centro de Medicina Genômica. As biópsias de concha média foram apenas processadas para envio ao mesmo Centro de Medicina Genômica.

3.1 Avaliação anátomo-patológica

As biópsias enviadas ao Setor de Patologia do HCFMRP-USP foram processadas da seguinte forma: fixadas logo após a coleta em formalina tamponada 10%, elas foram clivadas, desidratadas em álcool etílico e clarificadas em xilol para inclusão de parafina. A microtomia foi realizada para obtenção dos cortes histológicos, que foram corados com hematoxilina-eosina, onde os núcleos são

corados pela hematoxilina, em roxo, enquanto que o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, em rosa. As lâminas, já seladas, foram analisadas quanto ao tipo de epitélio apresentado, ao grau de espessamento da membrana basal, ao tipo de infiltrado inflamatório e a contagem de eosinófilos por campo de grande aumento (CGA) na sua área mais representativa, com ampliação de 40x. Os eosinófilos foram considerados as células inflamatórias com núcleo com segmentações bilobuladas (em geral duas) e citoplasma rosa intenso e granular. Eles foram expressos aqui como o número por campo, na ampliação de 400x, utilizando-se um microscópio Zeiss Primo Star. Todas as lâminas foram analisadas pela mesma pessoa, médica assistente patologista do Setor.

3.2 Extração de miRNAs e proteínas

Para a extração de ácidos nucleicos e proteínas foram utilizados os *kits*: Allprep DNA/RNA/Protein (para extração de DNA, RNA e proteínas) e miRNeasy (para extração específica de miRNAs), ambos da Qiagen Germany®, e compatíveis para pequenas amostras, sem a necessidade de divisão da mesma e com a vantagem de não utilizar eluentes tóxicos. De forma sintética, o protocolo de extração conta com as quatro etapas básicas: lise das membranas lipídicas, purificação dos ácidos nucleicos, precipitação e reidratação dos mesmos. Para otimização das amostras, após maceração com nitrogênio líquido, elas foram lisadas e homogeneizadas utilizando a coluna QIAshredder homogenizers (Qiagen Germany®), com tecnologia de microcentrífuga, biopolímeros e tampão RLT contendo guanidina-isotiocianato mais β -mercaptoethanol (β -ME), que inativa imediatamente DNases e RNases para garantir o isolamento do DNA e RNA intacto. Após, as amostras foram centrifugadas por dois minutos em velocidade máxima. Após as amostras serem centrifugadas, 600 μ L do lisado foram transferidos para DNA *spin* coluna, onde o tampão possui alto teor de sal, cloridrato de guanidina e Proteinase K (AW1 e AW2), com alta propriedade para ligação seletiva do DNA. Depois, o DNA foi eluído (buffer EB), ficando pronto para uso, e estocado em *freezer* na temperatura -80°C.

Adicionou-se à amostra 600 μL de etanol para proporcionar condições adequadas de ligação de RNA e miRNA, e a mesma foi então transferida para a RNA *spin* coluna, onde o RNA foi fixado na membrana e os contaminantes foram eficientemente lavados, utilizando uma sequência de *buffers* oferecidos pela empresa. Para recuperação de miRNA foi utilizada a coluna miRneasy MinElute, proporcionando 14 μL de miRNA eluído, que também foi estocado em *freezer* na temperatura -80°C . Para a precipitação de proteínas, foi adicionado tampão APP e a solução foi centrifugada em velocidade máxima (13200rpm), obtendo-se assim a quantidade de 1300 μL de proteínas (Figura 6). Essa solução foi estocada a -80°C para futura análise por Luminex.

Figura 6 - Protocolo preconizado para extração de ácidos nucleicos e proteínas

Fonte: User Guide Allprep DNA/RNA/Protein - Qiagen Germany®.

3.3 Microarray

A qualidade do RNA foi verificada utilizando Agilent-2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®). A limpeza dos eletrodos foi realizada conforme orientação da empresa e a leitura realizada utilizando-se o *software* Agilent 2100 Bioanalyzer. O RNA foi detectado e medido por sinal de fluorescência, através de sete canais e com uso de um microlitro da amostra. A análise compreende uma corrida de eletroforese que evidencia bandas de 6 a 150 nucleotídeos (nt) e é calculada a porcentagem de fragmentos com tamanho dentro da faixa adequada para o sequenciamento (bandas de 10 a 40 nt). Foram consideradas as amostras com concentração de miRNA $\geq 35\%$ (Figura 7).

Figura 7 - Resultados obtidos no Agilent-2100 Bioanalyzer. **(A)** O *software* traça a intensidade de fluorescência *versus* tamanho / tempo de migração e produz um eletroforegrama para cada amostra. **(B)** Os dados podem ser exibidos como um gráfico de densitometria, criando uma imagem similar a um gel. A análise compreende uma corrida de eletroforese que evidencia bandas de 6 a 150 nt e é calculada a porcentagem de fragmentos com tamanho dentro da faixa adequada para o sequenciamento (bandas de 10 a 40 nt). São consideradas as amostras com concentração de miRNA $\geq 35\%$

O perfil de expressão gênica foi obtido realizando o ensaio de *microarray* comercialmente disponível através da plataforma Affymetrix miRNA geneChip 4.0. Esta matriz oferece conteúdo atualizado e de alto desempenho, possuindo 100%

dos miRNAs da plataforma miRbase V20. O *array* analisado possui 30424 probes multiespécies, 3770 probes para ratos, camundongos, humanos e pre-miRNAs hairspin, e 1996 probes para miRNA maduros humanos. Além disso, possui eficiência para detectar 80% dos transcritos em amostras com apenas 130 ng de RNA total. Cada amostra, póliplo ou controle, foram avaliados por um *genechip* exclusivo.

As amostras foram preparadas com Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit. Esse preparo não envolve enzimologia complexa, amplificação ou etapas de purificação que podem reduzir o rendimento, ou que influenciam os resultados através da introdução de falsos positivos ou falsos negativos. As amostras foram aplicadas ao GeneRipiMatrix® miRNA Array (Affymetrix®), e em seguida, foram adicionados 8 µL das amostras e 2 µL de oligonucleotídeos de detecção em cada poço. Por fim, foram adicionados ATPmix (5 µL), Poly A Tailing Master Mix (5 µL) e FlashTag Biotin HSR Ligation Mix (4 µL). As amostras foram então transferidas ao cartucho de *genechip* para incubação a 48°C por 18 horas. Consecutivas lavagens foram realizadas para remoção dos contaminantes. A representação esquemática do ensaio de hibridização por *microarray* está apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática do ensaio de hibridização por *microarray*

Fonte: User Guide FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit for Affymetrix® GeneChip® miRNA Assays.

Após o escaneamento das lâminas Affymetrix miRNA geneChip 4.0, os dados brutos foram quantificados por meio do *software* Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC). Com a ajuda de bioinformatas, apenas *probes* direcionadas para genes humanos foram avaliados.

Na primeira etapa, foi feito o ajuste de *background* pela subtração dos valores de *background* de cada miRNA pelos valores de expressão, e transformados em escala logarítmica ($\log_2$). Os miRNAs diferentemente expressos foram identificados pelo teste ANOVA (paramétrico por análise de variância), que fornece uma lista ranqueada por *fold change*. Os miRNAs de pólipos foram considerados como diferentemente expressos dos controles quando os parâmetros de p-valor corrigido (FDR) estavam abaixo de 0.05 e o *fold change* acima de 2. Os resultados completos dessa análise foram depositados nas plataformas www.mirbase.org e www.genecards.org para sua localização no genoma e pesquisa de genes-alvo.

3.4 qRT-PCR

As amostras de miRNA foram quantificadas por NanoDrop ND-2000 espectrofotômetro (*NanoDrop Products*, Wilmington, DE, USA) e preparadas de forma que apresentassem 10ng de RNA total em um volume máximo de 3,7µL, para que atendessem as especificações do *kit* TaqMan® Advanced miRNA Assays para realização de *qRT-PCR*. Para as reações de *qRT-PCR*, foram utilizados os equipamentos: GeneAmp® 9700 PCR System e ViiA™ 7 Real-Time PCR System.

Para normalização dos dados optou-se por três genes de miRNAs endógenos (miR-26a-5p, miR-191-5p e miR-186-5p), que se comportam de maneira uniforme em tecidos do trato respiratório, em dados obtidos da literatura. A seleção dos melhores endógenos para controle interno foi feita utilizando-se o programa *Cloud* (<https://apps.thermofisher.com/editor-web>) selecionando o menor escore entre os três miRNAs endógenos candidatos. Este escore evidencia quais são os genes endógenos com a menor variabilidade entre as amostras (79). Normalizar os resultados com dois genes endógenos é recomendado pela empresa, para que haja um cálculo de CT válido, em que as eficiências das amplificações, dos genes alvo e endógenos, sejam aproximadamente iguais. As amostras foram descongeladas em gelo e ressuspendidas por rápida centrifugação para reação de amplificação dos cDNAs (reação miR-Amp). Foi adicionado a cada amostra o seguinte volume: 5 µL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix; 0,5µL de Taqman® Gene Expression Assay; 1,0 µL de cDNA template; 3,5 µL de água *RNAse free*. Como se optou pelo

método *Fast*, as amostras permaneceram a 50°C durante dois minutos (um ciclo), depois a 95°C durante 20 segundos (um ciclo), e por fim 40 ciclos de um segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C. As reações foram realizadas no termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR System. Após a reação de transcrição reversa e a reação miR-Amp, cada tubo continha um volume de 50µL de cDNA, que foi estocado em *freezer* a -20°C para posterior reação de *qRT-PCR*. As primeiras reações de *qRT-PCR* foram realizadas para identificar curvas de eficiência para cada miRNA endógeno e para cada miRNA alvo, respeitando as seguintes diluições: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256. Esta primeira etapa é importante para se diminuir ao máximo a variabilidade técnica, em que curvas de amplificação artificial ou não exponencial são removidas, assim como, é feita a identificação de miRNAs estáveis nas amostras (Figura 9).

Figura 9 - Curvas de eficiência dos miRNAs analisados

As reações seguintes foram realizadas com abordagem do tipo maximização de amostras em duplicata na diluição 1:16. Enquanto que na reação tradicional, cada placa constituiu-se de um miRNA e diferentes amostras, de ambos os grupos. A configuração do tipo maximização de genes analisa vários genes na mesma corrida e avalia as amostras por meio de várias corridas. O método de maximização de amostras é, atualmente, o mais recomendado, porque não sofre variação técnica (corrida a corrida) entre as amostras, o que é altamente desejado num estudo de quantificação relativa (80). A Figura 10 exemplifica duas placas com abordagem tipo maximização de amostras.

Figura 10 - Exemplo de *layout* de placas com abordagem tipo maximização de amostras. (A) controle; (B) pólip

Por fim, a análise de dados foi realizada utilizando-se o *software Cloud* disponibilizado *online* pela ThermoFisher Scientific®. A expressão relativa de cada miRNA foi calculada pela análise comparativa do gene alvo com os genes endógenos aplicando-se o método comparativo $\Delta\Delta^{CT}$. Este método é o recomendável na validação de dados obtidos por ensaio de microarray. Permite verificar por meio do valor de RQ (*Relative Quantification*), quanto a mais ou a menos o gene alvo está sendo expresso em relação ao gene controle. Cada alvo normalizado é dividido pelo valor do calibrador (*pool control*), para criar níveis de expressão relativa (81). Finalmente, para melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em escala logarítmica de base 2 (Log2).

3.5 Tratamento bioinformático dos resultados de miRNAs

Após os ensaios de *microarray* e *qRT-PCR*, analisou-se quais genes e vias de sinalização eram os principais alvos dos miRNAs diferentemente expressos pela Enciclopédia de Kyoto de genes e genomas, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), utilizando-se o programa miRWalk 2.0 (Centro de Pesquisa Médica - Faculdade de Medicina da Universidade de Heidelberg). O miRWalk é um banco de dados abrangente sobre miRNAs, que hospeda os genes alvos e vias de sinalização previstos e validados, além de informações sobre todos os genes conhecidos. Utiliza algorítmico próprio, chamado 'miRWalk', além de outros

programas já estabelecidos. Informações validadas e extraídas do PubMed e as combinadas são colocadas em banco de dados MySQL. Esse recurso permite que os pesquisadores validem novos alvos de miRNA, não apenas na “seed” 3'-UTR, mas também nas outras regiões de todos os genes conhecidos. O miRWalk está disponível gratuitamente em <http://mirwalk.uni-hd.de/>.

A análise consiste em dois módulos: alvo previsto e alvo validado. Inicialmente, pesquisa as correspondências complementares mais longas entre os miRNAs e todas as sequências baixadas. Posteriormente, classifica todos os achados, identificados na codificação de proteínas, nas quatro regiões (promotora, 5'-UTR, sequência de codificação - CD e 3'-UTR) e nos genes mitocondriais. Em seguida, o programa calcula a distribuição de probabilidade de correspondências aleatórias, utilizando a distribuição de Poisson, e compara os locais de ligação ao miRNA identificados com os resultados obtidos em oito programas estabelecidos de previsão de alvo de miRNA. Finalmente, as informações previstas e validadas são armazenadas no banco de dados do próprio programa (Figura 11) (82).

Figura 11 - miRWalk 2.0 - Faculdade de Medicina da Universidade de Heidelberg

Fonte: Dweep et al. (2011) (82).

A associação entre miRNAs e vias metabólicas foi realizada tendo como base a plataforma KEGG. Essa é uma plataforma *online* e gratuita (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>), a partir de uma base de conhecimentos prévios de análise sistemática das funções gênicas, vinculando informações genômicas (banco GENES) às informações funcionais (banco PATHWAY). A plataforma, assim, informatiza e padroniza o conhecimento atual sobre processos celulares, e fornece ferramentas gráficas dos processos celulares como: metabolismo, transporte de membrana, transdução de sinal e ciclo celular, bem como ferramentas computacionais para comparação de sequências (83). O produto final desse processamento é, portanto, o mapeamento de cada proteína, classificada em um grupo ortólogo (KO-KEGG Orthology) nas respectivas vias metabólicas em que atuam. O resultado desse mapeamento é inserido no arquivo de anotação em formato XML do Egene, e isto permite o download da imagem de uma via metabólica, em que o grupo ortólogo especificado encontra-se destacado em relação aos demais, e de uma página HTML contendo um mapeamento da imagem (image map). Nesta imagem, cada um dos grupos ortólogos possui um *link* para sua página de descrição no KEGG. Na literatura, esta plataforma é a preferida para o mapeamento de proteínas em vias metabólicas (Figura 12).

Figura 12 - KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Fonte: Başoglu Tunç e Tarsuslu Şimşek (2011) (83).

3.6 Luminex das proteínas

Foram estudadas as citocinas IL-5, IL-10, IL-17, IL-33, INF- α , INF- γ e TGF- β . Assim, analisou-se um conjunto de citocinas que indiretamente indicam qual resposta imunológica está sendo estimulada, sendo que INF- γ está associado a uma resposta adaptativa Th1; IL-5 e IL-33 estão associados a uma resposta adaptativa Th2; IL-17 está associado a uma resposta adaptativa Th17; IL-10 e TGF- β estão

associados a uma resposta adaptativa Treg; e por fim, INF- α está associado à imunidade inata.

Para avaliação qualitativa e quantitativa de proteínas foi utilizado o *kit* de imunoensaio ProcartaPlex™ (eBioscience), baseado na tecnologia Luminex®. Os imunoensaios ProcartaPlex™ utilizam a tecnologia xMAP®, que permite a detecção e quantificação de múltiplas proteínas alvos simultaneamente. O sistema xMAP® combina uma citometria de fluxo, microsferas fluorescentes (beads), *design* a laser e processamento de sinal digital para permitir a multiplicação de até 100 ensaios em uma única amostra. Ele possui a vantagem de mensurar diversas citocinas ao mesmo tempo, em amostras diminutas, otimizando os resultados.

O conceito de ensaios multiplex de esferas (MBAA) foi introduzido pela primeira vez por Horan e Wheelless, em 1977, e estudos atestam que os testes de MBAA são fáceis de serem realizados, reproduzíveis e comparáveis a métodos tradicionais como ELISA (84). As *beads* (microesferas superparamagnéticas de 6,5 micron, Luminex® MagPlex®) são codificadas por cores, com combinações de fluoróforos vermelho e infravermelho, identificados pelos sistemas de detecção Luminex xMAP®. Cada conjunto de esferas é revestido por um anticorpo monoclonal específico para um bioensaio específico. Assim, os anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados nas microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura, localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita por um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligado ao anticorpo de detecção.

Para o ensaio, as amostras foram centrifugadas para homogeneização e adicionados 50 μ L de cada amostra às esferas magnéticas preparadas, seguidas pelos *kits* Simplex de Anticorpos de Detecção (25 μ L) e Streptavidin-PE (5 μ L). As reações foram realizadas em duplicata para confirmação dos resultados. As amostras foram, então, preparadas para leitura (120 μ L de Reading Buffer), que foi realizada pelo equipamento MAGPIX®, e a análise utilizando-se o *software* xPonent/Analyst versão 4.2 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), mostrando o resultado da concentração em pg/mL, em duplicatas. Foram calculados média e desvio-padrão para cada amostra, e aplicado teste t não pareado para sua estatística (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática do método Luminex®

Fonte: User Guide Luminex - © Luminex Corporation, 2011-2016.

3.7 Análise estatística

Para a análise estatística do ensaio de *microarray*, foi realizada a análise hierárquica de agrupamentos e aplicado o teste ANOVA (análise paramétrica de variância). Os miRNAs foram considerados expressos de maneira diferente entre os grupos (RSCcPN e controle), considerando os parâmetros de p-valor corrigido (FDR) abaixo de 0,05 e *fold change* acima de 2. Os miRNAs considerados com diferença significativa entre os grupos no ensaio de *microarray* tiveram os resultados validados no *qRT-PCR*. Nesse estágio, os genes foram relativamente quantificados por $\Delta\Delta^{\text{CT}}$, e os resultados entre os grupos foram considerados diferentemente expressos quando o p-valor corrigido ficou abaixo de 0,05, sendo empregado o teste t-Student não pareado para essa análise. O miRNA expresso de maneira diferente em ambos os ensaios de *microarray* e *qRT-PCR* foi, então, correlacionado com: concentração de cada citocina medida pelo Luminex, contagem de eosinófilos no tecido de biópsia de pólipó nasal e os escores clínicos SNOT-22, LK e LM. Para todas essas associações foram utilizados testes de regressão linear paramétrica ou não paramétrica, a depender da variável.

4. *Resultados*

4.1 Dados demográficos

Foram colhidas 36 amostras de pólipos de pacientes com RSCcPN (13 mulheres e 23 homens com idade média de $48 \pm 2,5$ anos) e 41 amostras de concha média de pacientes controles (22 mulheres e 19 homens com idade média de $37 \pm 2,1$ anos). A diferença de idade foi significativa, sendo menor no grupo controle ($p < 0,005$).

Dos pacientes com RSCcPN, oito possuíam asma associada (20,5%), sendo um paciente portador de Doença Respiratória Exacerbada pela Aspirina (DREA), e cinco pacientes tabagistas (12,8%). O *prick test* foi realizado apenas naqueles com RSCcPN, considerando-se que os controles não apresentavam sintomas nasais. Quinze pacientes com RSCcPN (38,4%) apresentaram *prick-test* positivo, sendo que seis eram sensibilizados a apenas um alérgeno, enquanto que os outros nove possuíam sensibilização a dois ($n=8$) ou a três ($n=1$) alérgenos. Sensibilização ao ácaro esteve presente em 14 pacientes (35,9%), barata e fungo em cinco pacientes cada (12,8%), e grama em um paciente (2,5%).

O exame endoscópico (LK) demonstrou que os pacientes tinham pólipos em ambas as fossas nasais, e variou de 2 a 12 pontos, sendo que a média foi de $7,2 \pm 3,2$. O escore tomográfico de LM variou de 2 a 22 pontos (pontuação mínima possível de 0 e máxima de 24), sendo que a média foi de $15,1 \pm 6,8$. A comparação entre subgrupos por meio do teste estatístico de Mann-Whitney não demonstrou diferença estatística entre pacientes tabagistas e não-tabagistas (escore endoscópico $9,6 \pm 3,8$ em tabagistas e $6,9 \pm 2,5$ em não-tabagistas, $p=0,08$; escore tomográfico $16,0 \pm 9,3$ em tabagistas e $15,1 \pm 5,9$ em não-tabagistas, $p=0,63$). Já nos pacientes com asma, encontrou-se diferença estatística de escore endoscópico nos pacientes asmáticos ($9,25 \pm 3,1$) comparados aos não-asmáticos ($6,7 \pm 2,5$; $p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre subgrupos pelo teste estatístico de Mann-Whitney

		Sim	Não	p-valor
SNOT-22	Tabagista	60,2 ± 25,1	49,1 ± 21,6	0,35
	Asma	50,6 ± 24,9	50,6 ± 21,6	0,97
Eosinófilo por campo	Tabagista	43 ± 42,8	53,9 ± 49,7	0,71
	Asma	52,1 ± 41,3	52,6 ± 51,5	0,79
Escore CT (Lund-Mackay)	Tabagista	16 ± 9,3	15,1 ± 5,9	0,63
	Asma	16,5 ± 5,8	14,8 ± 6,5	0,72
Escore endoscopia (Lund-Kennedy)	Tabagista	9,6 ± 3,8	6,9 ± 2,5	0,08
	Asma	9,25 ± 3,1	6,7 ± 2,5	0,04*

*: $p < 0,05$.

4.2 Microarray

Considerando os parâmetros estatísticos descritos no item 3.5, o resultado dos miRNAs diferentemente expressos entre os grupos foi expresso e representado em formato de *Heatmap* e *Volcano plot* (Figura 14). Nesta análise, todas as sondas, humanas e não humanas, foram computadas. Após a análise conjunta da bioinformática, selecionando apenas os miRNAs humanos maduros (1996 probes), observou-se 16 miRNAs com expressão diferente de forma significativa, estando todos com expressão aumentada nos pólipos nasais em comparação aos controles (Tabela 2).

Figura 14 - Heatmap e Volcano Plot. (A) Heatmap representando a expressão diferencial de miRNAs entre os pólipos nasais (em cor verde) e amostras controles (em cor laranja); **(B)** volcano plot representando a diferença de expressão entre pólipos e controles - observou-se uma série de miRNAs com expressão aumentada em pólipos (pontos vermelho) e apenas um gene com expressão diminuída (ponto azul); em cinza estão os genes com diferença de expressão entre os grupos menor que dois logaritmos

Tabela 2 - miRNA com expressão diferente entre pólipos nasais e mucosas controles no microarray. Descrição do transcrito, valores individuais e comparativos e valores estatísticos

<i>Cluster</i> Transcrito ID	ID do Transcrito	Sinal Controle (log2)	Sinal Pólipo (log2)	<i>Fold Change</i> (Controle vs. Pólipo)	ANOVA p-valor	FDR p-valor
20501176	hsa-miR-99b-5p	2,45	5,06	-6,12	0,000086	0,021669*
20500462	hsa-miR-205-5p	4,36	7,25	-7,41	0,000035	0,019034*
20500484	hsa-miR-221-3p	1,57	5,18	-12,25	0,000036	0,019034*
20500486	hsa-miR-222-3p	3,52	6,18	-6,32	0,000032	0,019034*
20509070	hsa-miR-320d	2,94	4,89	-3,87	0,000006	0,008461*
20501243	hsa-miR-378a-3p	0,74	3,15	-5,32	0,000228	0,027961*
20502367	hsa-miR-449a	0,6	2,46	-3,64	0,000097	0,022249*
20504414	hsa-miR-449b-5p	0,55	2,09	-2,9	0,000223	0,027961*
20504577	hsa-miR-449c-5p	0,65	2,54	-3,72	0,000376	0,037551*
20503803	hsa-miR-494-3p	1,63	2,85	-2,34	0,000198	0,027961*
20506837	hsa-miR-1246	1,02	4,18	-8,98	0,000268	0,029957*
20510800	hsa-miR-1973	0,58	1,77	-2,29	0,000047	0,019426*
20518801	hsa-miR-4429	1,8	3,18	-2,6	0,000085	0,021669*
20524036	hsa-miR-6126	2,49	4,83	-5,08	0,000166	0,025001*
20525635	hsa-miR-6836-5p	2,19	4,64	-5,46	0,000009	0,008694*
20528493	hsa-miR-7641	4,64	7,11	-5,53	0,000091	0,021669*

*: $p < 0,05$.

4.3 qRT-PCR

A seleção dos melhores endógenos para controle interno foi feita utilizando-se o programa *Cloud* (<https://apps.thermofisher.com/editor-web>), selecionando o de menor escore entre os três miRNAs endógenos candidatos. Este escore evidencia quais foram os genes endógenos com a menor variabilidade entre as amostras. Desta forma, optou-se pelos seguintes genes: hsa-miR-26a-5p (eficiência=105.6%) e hsa-miR-191-5p (eficiência = 110.7%), ambos com escore de 1.29. O endógeno candidato hsa-miR-186-5p não apresentou eficiência e escore adequados (respectivamente, 117.570% e 1.65), e foi descartado (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Curvas de eficiência dos três endógenos candidatos **Figura 16** - Curvas de amplificação no qRT-PCR dos endógenos selecionados. **(A)** hsa-miR-26a-5p; **(B)** hsa-miR-191-5p, no qRT-PCR

Após análise pelo *microarray*, que identificou diferença de expressão em 16 miRNAs, foram adquiridas sondas TaqMan correspondentes aos seguintes miRNAs,

para validação por *qRT-PCR*: hsa-miR-222-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR221-3p, hsa-miR-1973, hsa-miR-4429, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR7641, hsa-miR-449a, hsa-miR-6126, hsa-miR-494,3p, hsa-miR-449b-5p, hsa-miR-378a-3p e hsa-miR-1246. Três miRNAs (hsa-miR-320d; hsa-miR-6836-5p; e hsa-miR-449c-5p) não foram avaliados por não haver sondas TaqMan específicas para eles. Dos 13 miRNAs analisados, os resultados do *qRT-PCR* confirmaram que a expressão de seis miRNAs (hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-449a e hsa-miR-449b-5p) esteve aumentada de forma significativa na RSCcPN em comparação aos controles (Tabela 3). Os dados dos genes hsa-miR-6126 e hsa-miR-4429 não foram demonstrados porque não realizaram curvas adequadas de amplificação. Na Figura 23 há a demonstração gráfica da curva de amplificação no *qRT-PCR* do hsa-miR-205-5p.

Tabela 3 - Diferença de expressão de miRNAs entre pólipos nasais e mucosas controles confirmados por *qRT-PCR*

Cluster Transcrito ID	ID do Transcrito	RSCcPN (média±DP)	Controles (média ±DP)	IC 95%	p-valor
20501176	hsa-miR-99b-5p	3,92±0,76	2,40±0,97	-4,04;0,99	0,23
20500462	hsa-miR-205-5p	2,37±0,36	1,49±0,17	-1,66;-0,08	0.03*
20500484	hsa-miR-221-3p	2,37±0,36	1,49±0,17	-1,66;-0,08	0.03*
20500486	hsa-miR-222-3p	4,86±0,86	1,12±0,17	-5,46;-2,02	<0.0001*
20501243	hsa-miR-378a-3p	5,05±1,13	2,33±0,75	-5,39;-0,06	0.04*
20502367	hsa-miR-449a	1,72±0,33	0,82±0,27	-1,76;-0,02	0.04*
20504414	hsa-miR-449b-5p	0,62±0,13	0,30±0,05	-1,73;-2,21	0.02*
20503803	hsa-miR-494-3p	1,96±0,90	2,2±0,46	-1,73;2,21	0,80
20506837	hsa-miR-1246	0,32±0,10	0,11±0,04	-0,43;0,01	0,06
20510800	hsa-miR-1973	2,18±0,60	1,32±0,46	-2,38;0,64	0,25
20528493	hsa-miR-7641	7,12±2,31	2,80±0,50	-9,01;0,38	0,07

*: $p < 0,05$

Figura 17 - Curva de amplificação no qRT-PCR do hsa-miR-205-5p

Os resultados gráficos dos miRNAs, diferentemente expressos entre pólipos e controles no *qRT-PCR*, estão visualizados na Figura 18.

Figura 18 - Confirmação dos dados de *microarray* por qRT-PCR para os miRNAs diferentemente expressos

*: $p \leq 0,0$; **: $p < 0,0001$)

Não se observou correlação significativa entre a idade e nenhum miRNA, em nenhum grupo. Com o auxílio do programa miRWalk 2.0, analisou-se quais genes e vias de sinalização eram os principais alvos desses seis miRNAs expressos de forma diferente, pela via KEGG (Figura 19). Conforme relatado pela via KEGG, o hsa-miR-205-5p está especialmente relacionado à via de junção estreita; hsa-miR-221-3p está associado à via de sinalização ErbB, orientação axonal e carcinoma de células renais; hsa-miR-222-3p também está associado à via de sinalização de ErbB e à orientação axonal; hsa-miR-378a-3p está principalmente relacionado ao câncer; hsa-miR-449a está associado à endocitose, orientação axonal e junção aderente; e hsa-miR-449b-5p está relacionado à endocitose e orientação do axonal (Tabela 4). Todas as demais associações estão apresentadas na Tabela 5.

Figura 19 - Vias de sinalização e os seis miRNAs expressos de forma diferente entre RSCcPN e controles: hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-449a e hsa-miR-449b-5p

Tabela 4 - As principais vias relacionadas aos miRNAs expressos de forma diferente entre RSCcPN e controles, de acordo com a via KEGG (programa fonte miRWalk 2.0), após o ajuste de p-valor

miRNA diferentemente expresso	Via de sinalização	p-valor ajustado (BH)
hsa-miR-205-5p	Tight junction	0.0310
hsa-miR-221-3p	ErbB signaling pathway	0.0004
hsa-miR-221-3p	Axon guidance	0.0256
hsa-miR-221-3p	Renal cell carcinoma	0.0441
hsa-miR-222-3p	ErbB signaling pathway	0.0005
hsa-miR-222-3p	Axon guidance	0.0080
hsa-miR-378a-3p	Pathways in cancer	0.0016
hsa-miR-378a-3p	Colorectal cancer	0.0087
hsa-miR-449a	Endocytosis	1.11E+09
hsa-miR-449a	Axon guidance	0.0090
hsa-miR-449a	Adherens junction	0.0409
hsa-miR-449b-5p	Axon guidance	1.36E+08
hsa-miR-449b-5p	Endocytosis	0.0001

Tabela 5 - Todas as demais vias relacionadas aos miRNAs expressos de forma diferente entre RSCcPN e controles, de acordo com a via KEGG (programa fonte miRWalk 2.0), após o ajuste de p-valor

miRNA	Via de sinalização	p-valor	p-valor ajustado (BH)
hsa-miR-205-5p	Tight junction	0.00020164220504626	0.031052899577124
hsa-miR-205-5p	Melanoma	0.000546753188850113	0.0825597315163671
hsa-miR-205-5p	Ubiquitin mediated proteolysis	0.000719049470031097	0.108576469974696
hsa-miR-205-5p	Phosphatidylinositol signaling system	0.000983251247943184	0.148470938439421
hsa-miR-205-5p	Pathways in cancer	0.00518380225899728	0.736099920777614
hsa-miR-205-5p	Fc gamma R mediated phagocytosis	0.00686997355704111	0.947895918953075
hsa-miR-205-5p	Small cell lung cancer	0.00695509459732491	0.950344208024843
hsa-miR-205-5p	TGF beta signaling pathway	0.00818816121501764	0.992862882608404
hsa-miR-205-5p	Adherens junction	0.0105371364351582	0.99758830087571
hsa-miR-205-5p	Non small cell lung cancer	0.0443244664887198	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	Inositol phosphate metabolism	0.014391239909734	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	SNARE interactions in vesicular transport	0.0378986245346846	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	Cell adhesion molecules CAMs	0.0560565407319178	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	Wnt signaling pathway	0.0150380589288511	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	Prostate cancer	0.0272035408509597	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	Glycosphingolipid biosynthesis lacto and neolacto series	0.0342236421190589	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	Regulation of actin cytoskeleton	0.0141638268570893	0.999999995951168
hsa-miR-205-5p	Glioma	0.0124084504081073	0.999999995951168
hsa-miR-221-3p	ErbB signaling pathway	3,86E+07	0.00048666739802683
hsa-miR-221-3p	Axon guidance	0.000206781767562281	0.0256409391777228
hsa-miR-221-3p	Renal cell carcinoma	0.000358773213577912	0.0441291052700832
hsa-miR-221-3p	T cell receptor signaling pathway	0.000667164543408538	0.0813940742958417
hsa-miR-221-3p	p53 signaling pathway	0.00124492293225853	0.149390751871024
hsa-miR-221-3p	Wnt signaling pathway	0.00302436785737936	0.33268046431173
hsa-miR-221-3p	Focal adhesion	0.00487191301221035	0.511550866282087
hsa-miR-221-3p	MAPK signaling pathway	0.00553348133927856	0.57548205928497
hsa-miR-221-3p	Adipocytokine signaling pathway	0.00619556171557556	0.638142856704283
hsa-miR-221-3p	Melanoma	0.00669259698900193	0.689337489867199
hsa-miR-221-3p	Gap junction	0.00719020445467722	0.732789164535147
hsa-miR-221-3p	Chronic myeloid leukemia	0.00898074515502822	0.847485027682529
hsa-miR-221-3p	Insulin signaling pathway	0.0121463191052197	0.952447540803963
hsa-miR-221-3p	Glioma	0.0159014102982927	0.974045415701016
hsa-miR-221-3p	Pathways in cancer	0.0164836997680925	0.976289759976825
hsa-miR-221-3p	Type II diabetes mellitus	0.0181321413262411	0.982670738800203
hsa-miR-221-3p	Neurotrophin signaling pathway	0.0202020634793438	0.990438886933011
hsa-miR-221-3p	Prostate cancer	0.0215301201805383	0.993914761227693
hsa-miR-221-3p	RIG I like receptor signaling pathway	0.0282596174000209	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	B cell receptor signaling pathway	0.0299360410734981	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Pancreatic cancer	0.0299360410734981	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	VEGF signaling pathway	0.0353513900873365	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Melanogenesis	0.0410404232641342	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Phosphatidylinositol signaling system	0.03167633012918	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Colorectal cancer	0.0527283902827796	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Dorso ventral axis formation	0.0378920594612102	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Chemokine signaling pathway	0.0359633379092467	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Endocytosis	0.0336786308973304	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Cell cycle	0.0411555589796141	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Calcium signaling pathway	0.0537603712742496	0.999630902790066
hsa-miR-221-3p	Fc gamma R mediated phagocytosis	0.0325356433439901	0.999630902790066
hsa-miR-222-3p	ErbB signaling pathway	4,68E+08	0.000589423179586435
hsa-miR-222-3p	Axon guidance	6,42E+09	0.00802907451374901
hsa-miR-222-3p	Renal cell carcinoma	0.000407945737677107	0.0501773257342841
hsa-miR-222-3p	T cell receptor signaling pathway	0.000771097694880707	0.0940739187754462
hsa-miR-222-3p	Wnt signaling pathway	0.00117543099413209	0.142227150289983
hsa-miR-222-3p	MAPK signaling pathway	0.00289251133187152	0.335531314497096
hsa-miR-222-3p	Insulin signaling pathway	0.00495851021934857	0.545436124128342

continua

continuação

miRNA	Via de sinalização	p-valor	p-valor ajustado (BH)
hsa-miR-222-3p	Focal adhesion	0.00566940743676492	0.608756977018281
hsa-miR-222-3p	p53 signaling pathway	0.00580811710834128	0.621468530592517
hsa-miR-222-3p	Melanoma	0.00734525835120303	0.749216351822709
hsa-miR-222-3p	Gap junction	0.00795905524638707	0.795905524638707
hsa-miR-222-3p	Type II diabetes mellitus	0.0194137555265322	0.995171405323066
hsa-miR-222-3p	Pathways in cancer	0.0193164706652676	0.995171405323066
hsa-miR-222-3p	Colorectal cancer	0.0565063875951489	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Glioma	0.0559091933913004	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Pancreatic cancer	0.0322349857203033	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	VEGF signaling pathway	0.0380160779191394	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Fc gamma R mediated phagocytosis	0.0352875121134321	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Adipocytokine signaling pathway	0.023932194795068	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Dorso ventral axis formation	0.0396097791040151	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Melanogenesis	0.0444129676684617	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	B cell receptor signaling pathway	0.0322349857203033	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Chronic myeloid leukemia	0.0322349857203033	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Neurotrophin signaling pathway	0.0223407056815258	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Regulation of actin cytoskeleton	0.0394476441957794	0.999956627559655
hsa-miR-222-3p	Chemokine signaling pathway	0.0400154056553125	0.999956627559655
hsa-miR-378a-3p	Pathways in cancer	1,16E+09	0.00163532401630284
hsa-miR-378a-3p	Colorectal cancer	6,22E+09	0.00870129406701281
hsa-miR-378a-3p	Endometrial cancer	0.000989467738281458	
hsa-miR-378a-3p	mTOR signaling pathway	0.0011104144128663	0.147685116911218
hsa-miR-378a-3p	Prostate cancer	0.00161238701278332	0.211222698674615
hsa-miR-378a-3p	Endocytosis	0.00191859965839392	0.249417955591209
hsa-miR-378a-3p	Chronic myeloid leukemia	0.00205864368598763	0.267623679178391
hsa-miR-378a-3p	Glioma	0.00366047889476839	0.468541298530354
hsa-miR-378a-3p	Insulin signaling pathway	0.00371309508174766	0.475276170463701
hsa-miR-378a-3p	Melanoma	0.00597835957736725	0.71740314928407
hsa-miR-378a-3p	Renal cell carcinoma	0.00597835957736725	0.71740314928407
hsa-miR-378a-3p	Non small cell lung cancer	0.00598536112592796	0.718243335111355
hsa-miR-378a-3p	Basal cell carcinoma	0.00654843579014452	0.765997303955835
hsa-miR-378a-3p	Hedgehog signaling pathway	0.00714897728010366	0.814983409931818
hsa-miR-378a-3p	Neurotrophin signaling pathway	0.0178710194379667	0.986522468173567
hsa-miR-378a-3p	Progesterone mediated oocyte maturation	0.0531470092504104	0.999931671616013
hsa-miR-378a-3p	Dorso ventral axis formation	0.0359136353879573	0.999931671616013
hsa-miR-378a-3p	Nicotinate and nicotinamide metabolism	0.0359136353879573	0.999931671616013
hsa-miR-378a-3p	Lysine degradation	0.0483679844916214	0.999931671616013
hsa-miR-378a-3p	ErbB signaling pathway	0.0555849916124551	0.999931671616013
hsa-miR-378a-3p	Small cell lung cancer	0.0440554121364314	0.999931671616013
hsa-miR-449a	Endocytosis	6,69E+06	1,11E+09
hsa-miR-449a	Axon guidance	5,48E+09	0.00904887253198372
hsa-miR-449a	Adherens junction	0.000249823456529796	0.0409710468708866
hsa-miR-449a	Notch signaling pathway	0.00057701102108243	0.0934757854153536
hsa-miR-449a	Melanogenesis	0.00177791992880327	0.280911348750917
hsa-miR-449a	MAPK signaling pathway	0.00204054497340345	0.320365560824341
hsa-miR-449a	Vascular smooth muscle contraction	0.00250116007783929	0.39018097214293
hsa-miR-449a	SNARE interactions in vesicular transport	0.00258522953112528	0.403295806855543
hsa-miR-449a	Heparan sulfate biosynthesis	0.0047748412975801	0.706676512041855
hsa-miR-449a	Type II diabetes mellitus	0.0327862487498107	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Prostate cancer	0.0238536188824814	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Circadian rhythm mammal	0.04434755259878	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Colorectal cancer	0.00750957009091424	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy ARVC	0.0423236351521036	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Long term potentiation	0.0336435953550981	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Melanoma	0.0131552191469991	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Chondroitin sulfate biosynthesis	0.0105326093681782	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Keratan sulfate biosynthesis	0.0122179035068843	0.99999996806149
hsa-miR-449a	Regulation of actin cytoskeleton	0.026779761546106	0.99999996806149

continua

conclusão

miRNA	Via de sinalização	p-valor	p-valor ajustado (BH)
hsa-miR-449a	Pathways in cancer	0.00781641710656733	0.999999996806149
hsa-miR-449a	Methane metabolism	0.0501887208169574	0.999999996806149
hsa-miR-449a	Fc gamma R mediated phagocytosis	0.0186737691833497	0.999999996806149
hsa-miR-449a	Gap junction	0.0256854541066778	0.999999996806149
hsa-miR-449a	Wnt signaling pathway	0.0563284389778084	0.999999996806149
hsa-miR-449a	Chronic myeloid leukemia	0.0455228326815943	0.999999996806149
hsa-miR-449a	N Glycan biosynthesis	0.0240134356628372	0.999999996806149
hsa-miR-449a	Hypertrophic cardiomyopathy HCM	0.0436115063936624	0.999999996806149
hsa-miR-449b-5p	Axon guidance	8,06E+04	1,36E+08
hsa-miR-449b-5p	Endocytosis	7,11E+07	0.000119439131950116
hsa-miR-449b-5p	Phosphatidylinositol signaling system	0.000429298599173289	0.0704049702644194
hsa-miR-449b-5p	MAPK signaling pathway	0.000598134930065664	0.0974959936007032
hsa-miR-449b-5p	Prostate cancer	0.000727167666671358	0.11780116200076
hsa-miR-449b-5p	Notch signaling pathway	0.000872720148433315	0.140507943897764
hsa-miR-449b-5p	Pathways in cancer	0.0012765699618138	0.20169805396658
hsa-miR-449b-5p	Adherens junction	0.00139596652869545	0.220562711533881
hsa-miR-449b-5p	Chondroitin sulfate biosynthesis	0.00251837524430698	0.37523791140174
hsa-miR-449b-5p	Chronic myeloid leukemia	0.00373275905516635	0.530051785833621
hsa-miR-449b-5p	Vascular smooth muscle contraction	0.00421582182775693	0.590249907095455
hsa-miR-449b-5p	Colorectal cancer	0.00430795051513311	0.603113072118635
hsa-miR-449b-5p	Heparan sulfate biosynthesis	0.00618711331963173	0.841447411469916
hsa-miR-449b-5p	Melanoma	0.0068878835696311	0.929864281900199
hsa-miR-449b-5p	Melanogenesis	0.00747305287848465	0.993254149842151
hsa-miR-449b-5p	Non small cell lung cancer	0.00867293295565386	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Circadian rhythm mammal	0.00853861057533534	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	VEGF signaling pathway	0.0332934946829765	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	B cell receptor signaling pathway	0.0261773999285652	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Acute myeloid leukemia	0.0370143179736843	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Aldosterone regulated sodium reabsorption	0.0575129115741253	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Thyroid cancer	0.0402370958585975	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Adipocytokine signaling pathway	0.016843870018625	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Methane metabolism	0.0553040573666933	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Calcium signaling pathway	0.0495399437957216	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Dorso ventral axis formation	0.0189130067237194	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Gap junction	0.035930269176333	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Galactose metabolism	0.0262377200438845	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Cell cycle	0.035850760191478	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy ARVC	0.0559144076005228	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Fc gamma R mediated phagocytosis	0.011798267823407	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Wnt signaling pathway	0.0242844713480386	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	SNARE interactions in vesicular transport	0.0132797611037964	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Keratan sulfate biosynthesis	0.0146563413923184	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Inositol phosphate metabolism	0.0253083461186731	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Hypertrophic cardiomyopathy HCM	0.0586063737541587	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Pancreatic cancer	0.0261773999285652	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Long term potentiation	0.0448320546847096	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Long term depression	0.0220840812354373	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Type II diabetes mellitus	0.0419280602029918	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	N Glycan biosynthesis	0.0309730953871761	0.99999999942265
hsa-miR-449b-5p	Glioma	0.027297708219753	0.99999999942265

4.4 Luminex

Foram estudadas as citocinas IL-5, IL-10, IL-17, IL-33, INF- α , INF- γ e TGF- β . Para avaliar se houve influência da idade sobre a expressão proteica, iniciou-se com o teste de correlação entre idade e a expressão das diferentes citocinas, dentro de cada grupo. Novamente, não se observou nenhuma correlação significativa entre idade e nenhuma citocina, em nenhum dos grupos. A comparação de expressão entre os grupos também não foi significativa em nenhuma citocina (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados do Luminex observados entre os pacientes com RSCcPN e controles

Proteína	RSCcPN (média $\pm$ DP)	Controles (média $\pm$ DP)	IC 95%	p-valor
IL-5	29269 $\pm$ 1039	28521 $\pm$ 1244	-4039;2542	0,6470
IL-10	10742 $\pm$ 300,6	10996 $\pm$ 426	-807,5;1314	0,6304
IL-17	11267 $\pm$ 495,1	12287 $\pm$ 574,4	-517,1;2557	0,1868
INF- α	819 $\pm$ 103,4	650,3 $\pm$ 124,5	-496,8;159,6	0,3043
INF- γ	37004 $\pm$ 1698	35943 $\pm$ 1819	-6107;3984	0,6722
IL-33	10916 $\pm$ 2769	12668 $\pm$ 2689	-6159;9663	0,6540
TGF- β	4601 $\pm$ 741,3	4827 $\pm$ 870,2	-2125;2578	0,8458

4.5 Relação entre miRNAs e citocinas / parâmetros clínicos

Em outra fase da análise, todos os seis miRNAs diferentemente expressos em pacientes com RSCcPN (hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-449a e hsa-miR-449b-5p) foram relacionados, individualmente, a cada citocina mensurada por Luminex, por análise de regressão linear (Tabela 7). De todas as associações possíveis, duas foram estatisticamente relevantes: uma associação positiva entre hsa-miR-205-5p e IL-5 (R^2 : 0,25; valor de $p < 0,05$) e uma associação negativa entre hsa-miR-449a e INF- α (R^2 : 0,20; valor de $p < 0,05$) (Figura 20). Todas as outras associações não foram significativas.

Tabela 7 - miRNAs com associação de expressão significativa com a expressão de citocinas. Descrição do transcrito, valores individuais e valores estatísticos

ID do Transcrito	Citocina	Slope	Intercept	R ²	p-valor
hsa-miR-205-5p	IL-5	974,2±460,2	27252±1294	0,2563	0,0487*
hsa-miR-449a	INF-α	-163,5±86,19	1023±230,6	0,2044	0,0441*

*: $p < 0,05$.

Figura 20 - Regressão linear evidenciando associação positiva entre **(A)** hsa-miR-205-5p e IL-5; e **(B)** hsa-miR-449a e INF-α

Embora as principais vias-alvo não estivessem primordialmente relacionadas à inflamação, também se verificou se havia alguma associação entre a expressão diferenciada de miRNA e eosinofilia tecidual (Tabela 8). Encontrou-se associação positiva entre o número de eosinófilos por campo e a expressão de hsa-miR-205-5p (R^2 : 0,16; valor de $p < 0,05$). Todas as outras associações não foram significativas.

Tabela 8 - Correlação entre os miRNAs com expressão diferente entre os grupos e o grau de eosinofilia Descrição do transcrito, valores individuais e valores estatísticos

ID do Transcrito	Slope	Intercept	R ²	p-valor
hsa-miR-205-5p	14,7±7,3	31,6±18,1	0,16	0,04*
hsa-miR-221-3p	6,2±5,7	46,2±18,0	0,05	0,29
hsa-miR-222-3p	2,8±3,2	48,8±18,4	0,03	0,39
hsa-miR-378a-3p	2,6±3,0	50,2±17,2	0,03	0,40
hsa-miR-449a	-1,2±6,6	63,7±16	0,001	0,85
hsa-miR-449b-5p	12,7±19,9	54,8±15,5	0,02	0,52

De acordo com a Tabela acima, foi possível observar que houve correlação direta significativa e positiva entre o grau de eosinofilia e a expressão de miR-205-5p (Figura 21).

Figura 21 - Regressão linear evidenciando associação positiva entre hsa-miR-205-5p e eosinofilia tecidual

Ainda, os seis miRNAs avaliados por *qRT-PCR* foram também correlacionados com dados objetivos clínicos (como o questionário clínico SNOT-22, o escore endoscópico LK e o escore tomográfico LM). Não foi encontrada

associação entre os miRNAs e a extensão tomográfica ou endoscópica. Já em relação ao escore de sintomas, os dados, apresentados na Tabela 9, evidenciam que o SNOT-22 correlacionou-se positivamente de forma significativa com a expressão, tanto de miR-221-3p como de 205-5p (Figura 22).

Tabela 9 - Correlação entre os miRNAs com expressão diferente entre os grupos, e o escore SNOT-22. Descrição do transcrito, valores individuais e valores estatísticos

ID do Transcrito	Slope	Intercept	R ²	p-valor
hsa-miR-205-5p	6,8±2,7	42,0±6,7	0,20	0,02*
hsa-miR-221-3p	6,0±2,0	41,4±6,0	0,05	0,0065*
hsa-miR-222-3p	0,3±0,9	52,8±6,4	0,0046	0,73
hsa-miR-378a-3p	-0,2±0,7	55,8±5,8	0,0052	0,72
hsa-miR-449a	2,1±2,5	52,1±6,1	0,02	0,41
hsa-miR-449b-5p	-1,6±6,6	54,2±6,1	0,002	0,80

*: $p < 0,05$

Figura 22 - Regressão linear evidenciando associação positiva entre SNOT-22 e: **(A)** hsa-miR-205-5p; e **(B)** hsa-miR-221-3p

5. *Discussão*

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos miRNAs na fisiopatologia da RSCcPN, comparando sua expressão nas amostras de pólipos nasais em relação às amostras controle. Além disso, avaliou-se a influência dos miRNAs diferentemente expressos em importantes vias de sinalização descritas na literatura e em alguns parâmetros clínicos e biológicos.

Como mencionado anteriormente, os miRNAs não são transcritos para proteínas, mas estão envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica, e agem para reduzir a quantidade de proteína que o gene é estimulado a produzir, diminuindo os transcritos indesejados. Desta forma, controlam a expressão de citocinas, que por sua vez, regulam positiva ou negativamente vários pontos da fisiopatologia da RSC.

Várias evidências indicam que miRNAs estão envolvidos nos diferentes tipos de resposta inflamatória, influenciando o perfil das células inflamatórias recrutadas e modulando a sua intensidade (85). Isso é realizado de duas maneiras principais: primeira, impactando o desenvolvimento de subconjuntos de células inflamatórias (por exemplo, Th2 versus Th17) e, segunda, estabelecendo o nível da resposta celular imune (por exemplo, controlando a quantidade de citocina produzida pelas células dendríticas). No entanto, como em outros sistemas regulados por miRNAs, o sistema imunológico utiliza vários desses genes para equilibrar adequadamente sua capacidade funcional, criando equilíbrio entre ativação e repressão, que podem ser ajustados com precisão. Portanto, aprimorar o entendimento de como os miRNAs colaboram para equilibrar adequadamente as respostas inflamatórias possibilitará melhor compreensão de como esta rede pode trabalhar em conjunto para otimizar as respostas. É interessante pensar que os miRNAs extracelulares podem funcionar de maneira semelhante a citocinas, sendo capazes de direcionar e regular células inflamatórias por meio de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos. Por fim, a compreensão mais profunda de como os miRNAs podem afetar a plasticidade celular, moldando a população de células inflamatórias, amenizando respostas indesejadas e danos teciduais (85).

Isto sugere que a expressão adequada da maquinaria miRNA é crucial para o metabolismo e a homeostase da mucosa nasosinusal, tanto em condições normais quanto patológicas. Por exemplo, quantidade inadequada de PACT está associada à

disfunção das células plasmáticas e inflamação eosinofílica no RSCcPN (70). Está cada vez mais claro que a RSC compreende um grupo heterogêneo de desordens nasosinusais sendo a RSCcPN um subtipo de difícil tratamento e, portanto, alguns estudos se concentram no papel dos miRNAs nesse tipo de doença. Assim, o presente estudo se justifica na hipótese de que esses genes desregulados podem influenciar a expressão proteica de citocinas pró e anti-inflamatórias nos pacientes portadores de RSCcPN.

Para esse fim, utilizou-se um dos mais amplos ensaios de *microarray* disponível no momento. Os dados resultantes do *microarray*, e confirmados pelo *qRT-PCR*, evidenciaram que seis miRNAs (hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-449a e hsa-miR-449b-5p) apresentaram maior expressão nas amostras de pólipos nasais em comparação aos controles. Com o auxílio do programa miRWalk 2.0, analisou-se quais genes e vias de sinalização eram os principais alvos desses seis miRNAs hiperexpressos (82).

5.1 Via da integridade epitelial

De acordo com o banco de dados KEGG (83), uma das vias mais influenciadas por esses miRNAs é a integridade epitelial: as junções apertadas e aderentes (respectivamente, em inglês, *tight junctions* e *adherens junctions*) são influenciadas, respectivamente, por hsa-miR-205-5p e hsa-miR-449a (Figuras 23 e 24). As TJs são essenciais para estabelecer uma barreira seletivamente permeável à difusão, através do espaço paracelular, entre as células vizinhas. São compostas por pelo menos três tipos de proteínas transmembranas: ocludina, claudina e JAMs; e uma "placa" citoplasmática que consiste em diversas proteínas que formam grandes complexos, que estão envolvidos na montagem das junções, na regulação da barreira, na polaridade celular, na transcrição de genes e em outras vias (83).

Fonte: Plataforma KEGG (Anexo E).

Figura 24 - KEGG - via da integridade epitelial: junções aderentes

Fonte: Plataforma KEGG (Anexo E).

A barreira epitelial é descrita como defeituosa nos pólipos nasais, e isto está associado à expressão diminuída de TJs (86). Soyka et al. avaliaram a expressão de proteínas TJ usando imunofluorescência, *western blotting* e PCR em tempo real em amostras de pólipos nasais; além de medirem a resistência transepitelial (TER) na cultura de células epiteliais, tanto de doentes quanto de controles. Foi encontrada uma TER diminuída em amostras de pólipo nasal, juntamente com a expressão irregular e reduzida de proteínas TJ como: occludina e ZO-1 (43). Além disso, estudos já evidenciaram que citocinas Th2 e Th17 diminuem a expressão das TJs

de forma muito intensa, prejudicando a função da barreira mucosa e alterando sua composição e estrutura (87,88). Culturas epiteliais nasosinusais expostas a IL-4 e IL-13 demonstraram diminuição de TER e da expressão de moléculas juncionais como JAM-A e E-caderina, e que o aumento de permeabilidade epitelial está associado a manifestações fenotípicas como edema e secreção nasal (87). A associação de citocinas Th17 como IL-17, IL-22 e IL-26 à cultura de células epiteliais nasais diferenciadas também mostraram dano significativo da barreira epitelial, evidenciada por diminuição de TER, aumento da permeabilidade paracelular de FITC-dextranos e descontinuidade da imunolocalização de ZO-1, promovendo uma barreira mucosa com “vazamento” (88).

Assim como as citocinas, produtos bacterianos, principalmente relacionados ao *S. aureus*, demonstraram alterar a barreira epitelial das vias aéreas. Autores avaliaram as ações de algumas proteases (V8, Staphopain A, Staphopain B, toxina esfoliativa A e A-F do tipo serina) em culturas de células epiteliais da mucosa nasal humana (HNEC-ALI), observando diminuição significativa do TER (em 22,67%). Além disso, a imunolocalização de ZO-1 esteve em descontinuidade quando comparada ao controle, evidenciando uma disfunção da morfologia estrutural da barreira mucosa (89). Finalmente, alérgenos e vírus como o rinovírus também se mostraram como agentes que levam à alteração da barreira epitelial, com menor expressão de ocludina e ZO-1 (90,91).

As AJs são proteínas de aderência intercelulares, importantes para manter a adesão célula a célula, orientar a migração e diferenciação celular e, por fim, a cicatrização de feridas. Estudos recentes sugerem que a interrupção das junções célula-célula é necessária para iniciar respostas imunes epiteliais (92-94). Quando expostos a citocinas Th2, os pólipos nasais apresentam diminuição da expressão de E-caderina, uma proteína essencial AJ (87), levando à ruptura da barreira epitelial, com crescente gravidade do remodelamento. Como consequência, estão reportados transporte iônico anormal, hiperplasia das células caliciformes, proliferação celular basal e acantólise, todos associados ao crescimento epitelial e à transição mesenquimal (93,95,96). Esta desdiferenciação epitelial em direção a um fenótipo mesenquimal correlaciona-se com fibrose e inflamação das vias aéreas (97). A E-caderina é regulada negativamente pelo seu repressor transcricional denominado

zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2). Autores relatam que o ZEB2 é um alvo de miR-205, portanto a expressão adequada de miR-205 é a garantia de expressão adequada de E-caderina para manutenção do fenótipo epitelial (96). Desse modo, o aumento de expressão de miR-205 está relacionado à diminuição de expressão de E-caderina, levando a alterações no epitélio nasal mencionadas acima.

Além disso, as TJs e AJs estão ligadas ao citoesqueleto de actina para fortalecer a adesão célula a célula (98). O citoesqueleto de actina, a lamelipodia (processo importante para a migração celular) e a cicatrização de feridas estão todos comprometidos nos pólipos nasais e são altamente influenciados pela presença de exoprodutos de *S. aureus* (44). *Os filamentos de actina se organizam em uma rede dinâmica*, e são um importante meio de interação entre células e agentes externos. Entre as respostas celulares, o citoesqueleto é capaz de promover a protrusão de membrana, conhecida como lamelipodia, para otimizar o processo de cicatrização. Portanto, a deficiência nesse processo pode estar relacionada ao reparo ineficiente do epitélio. Em estudo anterior culturas de pólipos nasais apresentaram porcentagens significativamente reduzidas de células com lamelipódios na borda da ferida nos pólipos nasais quando comparados ao epitélio nasal controle, alterando significativamente o reparar epitelial. Esse processo foi observado sob condições basais, mas foi acentuado diante da presença de exoprodutos de *S. aureus* (44). Os vírus também podem influenciar a barreira epitelial de diferentes maneiras. O rinovírus interrompe a AJ levando à superprodução de muco, ao aumento da permeabilidade vascular e à infecção bacteriana secundária. Em estudo das proteínas TJs e AJs por meio de PCR em tempo real, *western blotting* e avaliação da resistência epitelial por medição do TER, verificou-se que a infecção pelo rinovírus diminuiu significativamente os níveis de mRNA de ZO-1, ocludina, claudina-1 e E-caderina, além de reduzir o TER médio, exercendo um efeito prejudicial na função de barreira epitelial (99). O vírus sincicial respiratório destrutura os complexos juncionais alterando a remodelação e a fosforilação da actina (100).

5.2 Via da sinalização ErbB

A via de sinalização ErbB (Figura 25) é influenciada pelo hsa-miR-221-3p e hsa-miR-222-3p (dois miRNAs intimamente relacionados, codificados em aglomerados a partir de uma região genômica no cromossomo X), e está relacionada ao crescimento celular, proliferação e diferenciação nos pólipos nasais por ligação ao receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) (83). As células basais são consideradas células-tronco adultas nas vias aéreas, e desempenham papel crítico no reparo tecidual. Em resposta à lesão, as células basais podem proliferar e migrar para locais danificados e, posteriormente, diferenciar-se para restaurar todos os tipos celulares presentes no epitélio, em específico. Portanto, para que ocorra esta via de reparo e remodelação do epitélio nasal, os fatores de crescimento e receptores de tirosina-quinase como ERBB1 (conhecido como EGFR), ERBB2, ERBB3 e ERBB4 são fundamentais. Estudos *in vitro* demonstraram que o EGF e o EGFR promovem o fechamento de feridas nas células epiteliais das vias aéreas, tanto pela migração quanto pela proliferação celular. Há uma regulação positiva do EGFR nos pólipos nasais, associada à hiperplasia das células caliciformes e ao aumento na produção de mucina (101). Essa associação resulta na fosforilação e ativação de várias vias de sinalização, como a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e as vias fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3K) (102) e, finalmente, regula diversas respostas biológicas, incluindo: proliferação, diferenciação, motilidade celular e sobrevivência. Além disso, o EGFR está relacionado à degranulação de células caliciformes (101). Diferentes estudos demonstraram que o *cluster* hsa-miR-221/222 pode regular a patogênese de distúrbios inflamatórios das vias aéreas, regulando as citocinas pró-inflamatórias induzidas por macrófagos, estimulando vias de sinalização pró-inflamatórias, como NF- κ B e MAPKs, agravando lesões inflamatórias pulmonares através da produção de TNF- α e IL-6 (103,104). Zhao et al. demonstraram que o miR-221 suprime a regulação da A20 (uma proteína que tem papel crucial na manutenção da homeostase tecidual e na prevenção de distúrbios inflamatórios e alérgicos) nos macrófagos induzidos por LPS. Além disso, a capacidade do miR-221 de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias foi inibida quando a A20 foi restaurada em

macrófagos murinos. A A20 (também conhecida como TNFAIP3) é uma enzima de edição da ubiquitina e está envolvida na regulação e na sinalização da via NF- κ B, atuando de forma a remover as cadeias de poliubiquitina ligadas a K63 do RIP1, peptídeos TRAF2, TRAF6 e NEMO, resultando na supressão da via. Sua supressão leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α . Esse achado indica que o miR-221 está diretamente relacionado à atividade de NF- κ B e que esse mecanismo depende, em grande parte, da supressão seletiva de A20 (103).

Figura 25 - KEGG - via da sinalização ErbB

Fonte: Plataforma KEGG (Anexo E).

5.3 Via da orientação axonal

A via de orientação axonal (Figura 26) é uma via relevante para hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-449a e hsa-miR-449b-5p. A orientação do axônio representa um estágio fundamental na formação da rede neuronal e é um caminho para a inflamação neurogênica da mucosa. Os axônios precisam ser adequadamente direcionados para seus alvos a fim de formar conexões sinápticas, e isto requer interações entre ligantes extracelulares e transmembranares, altamente conservados, e seus receptores de superfície celular. Favorece a reorganização do citoesqueleto da membrana plasmática em cones de crescimento, e também agindo de maneira não canônica para controlar a proliferação celular, migração celular e orientação do axônio, regulando a expressão gênica por meio de mecanismos de tradução ou transcrição. A maioria dos receptores de orientação do axônio converge para regular as GTPases da família Rho (GTPases Rho), que modulam a dinâmica citoesquelética (83,105). Recentemente, verificou-se que as proteínas que integram a via de orientação do axônio são reguladas de maneira negativa nos pólipos nasais. Wu et al. demonstraram que a orientação do axônio representa um estágio chave na formação da rede neuronal e é um caminho fundamental para a inflamação neurogênica da mucosa. Comparadas ao controle, as proteínas associadas à esta via de sinalização, como fator de crescimento beta do nervo, semaforina 3A, substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionada com Ras 1, Bcl-2, proteína quinase tipo C delta e Fyn são significativamente diminuídas em pacientes com RSCcPN e, por outro lado, o receptor reticulon-4, um fator inibitório, é significativamente aumentado nos pólipos nasais. Os autores concluíram que as proteínas das vias de sinalização de orientação axonal e dos fatores de crescimento neural são significativamente suprimidas no pólipos nasal eosinofílico (106).

Figura 26 - KEGG - via da orientação axonal

Fonte: Plataforma KEGG (Anexo E).

5.4 Via da endocitose

Finalmente, o miR-449a e miR-449b-5p foram relacionados à via da endocitose (Figura 27). A endocitose é um mecanismo que permite as células internalizarem ligantes como nutrientes, proteínas da membrana plasmática e lipídios da superfície celular, transportando-os para o interior da célula. Sabe-se que a B-adaptina, uma das proteínas relacionadas à endocitose, está aumentada nos pólipos nasais de pacientes sensíveis à aspirina, quando comparados aos indivíduos tolerantes à aspirina. Essa alteração pode representar uma resposta adaptativa alterada que, por sua vez, pode contribuir para a proliferação celular e, finalmente, uma forma mais agressiva de RSCcPN refratária ao tratamento, caracteristicamente observada em pacientes com sensibilidade à aspirina (107).

Figura 27 - KEGG - via da endocitose

Fonte: Plataforma KEGG (Anexo E).

5.5 Relações finais

Como se observou, os miRNAs diferentemente expressos no presente estudo não estiveram diretamente relacionados ao processo inflamatório. Em vez disso, estão essencialmente ligados à integridade da barreira epitelial, crescimento e proliferação celular, organização citoesquelética e endocitose. Assim, foi notável encontrar associação positiva do miR-205 com os níveis de IL-5, eosinofilia tecidual e maior intensidade dos sintomas, medidos pelo SNOT-22. Além disso, observou-se que pacientes com níveis mais altos de miR-221-3p apresentaram piores escores clínicos medidos pelo SNOT-22.

Suojalehto et al. (108) também observaram essa relação entre a expressão de miR-205 e IL-5 em pacientes com rinite alérgica. A rinite e a asma, geralmente coexistem e são consideradas “doenças das vias aéreas unificadas”. No presente estudo foram observadas regulação positiva das citocinas Th2 e tendência de elevação dos níveis de óxido nítrico em pacientes com rinite alérgica, quando comparados aos controles. Além disso, os pacientes com reações positivas no teste cutâneo exibiram aumento da expressão de alguns miRNAs (miR-155, miR-205, miR-498 e let-7e), dentre eles o miR-205, sugerindo que podem ser importantes na inflamação alérgica presente na mucosa nasal. Assim, considerando os dois estudos, é possível sugerir que o miR-205 está relacionado à IL-5 e à eosinofilia tecidual, independentemente de o processo ser alérgico ou não.

Wise et al. (87) demonstraram que as citocinas Th2 comprometem a barreira epitelial. No presente estudo, sugeriu-se que este pode ser um ciclo reverberante, no qual o miR-205, relacionado a danos epiteliais, também pode levar ao aumento de citocinas Th2 e eosinofilia tecidual. Uma possível explicação seria a diminuição de E-caderina, que tem sido implicada na indução da resposta Th2 nas células epiteliais das vias aéreas inferiores (109,110). Observou-se, ainda, que a expressão de miR-449a teve relação inversamente significativa com a expressão de IFN- α . O aumento dos níveis de miR-449a está relacionado à exposição do epitélio das vias aéreas à fumaça do tabaco, concluindo que o miR-449a é regulado pelo estresse genotóxico, para induzir a regeneração epitelial. Além da diferenciação, o miR-449a também é capaz de induzir apoptose, e essa atividade fornece a primeira linha de defesa

contra o estresse genotóxico, infecção viral ou asma (111). Curiosamente, em estudo recente, Lewandowska-Polak et al. avaliaram qual seria o efeito de diferentes estímulos no reparo de feridas, em células epiteliais brônquicas, e observaram que independentemente dos estímulos aplicados, os níveis mais baixos de expressão de IFN- α e IFN- β estavam relacionados à menor taxa de regeneração epitelial (112). Outro estudo informa que a família miR-34/449 está envolvida na regulação das respostas imunológicas a infecções virais, através de duas vias de sinalização: NF- κ B e p53; além de regular a proliferação celular e apoptose (113).

Callejas-Diaz et al., avaliando células-tronco obtidas de pólipos nasais, revelaram que a ciliogênese do epitélio disfuncional é significativamente prejudicada quando expressões alteradas de miRNAs estão presentes, particularmente os miRNAs pertencentes às famílias miR-34 e miR-449 (114).

Tomados em conjunto, esses resultados mostram que os miRNAs diferencialmente expressos na RSCcPN têm uma ação muito mais influente na migração, diferenciação, mitose e apoptose celular do que na inflamação, propriamente dita. Embora a via inflamatória não tenha sido o principal alvo desses genes, o miRNA 205-5p foi importante na polarização da resposta Th2 em pacientes com RSCcPN. O miRNA 205-5p parece correlacionar-se com o aumento da IL-5 e da eosinofilia tecidual, além do agravamento dos sintomas nasosinusais.

Por fim, os achados do presente estudo reforçam a participação do miRNA 205-5p na fisiopatologia da RSCcPN e sugerem que essa molécula pode ser uma terapia alvo interessante no futuro (Figura 28).

Figura 28 - Resumo gráfico das principais vias de sinalização associadas aos miRNAs diferentemente expressos

6. Conclusões

O presente estudo evidenciou seis miRNAs com expressão diferenciada na RSCcPN (hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-449a e hsa-miR-449b-5p). Esses miRNAs estão, principalmente, relacionados à integridade celular, cicatrização, migração, ao crescimento e à diferenciação celular, além de organização do citoesqueleto.

Embora a via inflamatória não tenha sido o principal alvo desses genes, o miRNA 205-5p foi importante na polarização da resposta Th2 em pacientes com RSCcPN. O miRNA 205-5p parece correlacionar-se com o aumento da IL-5 e da eosinofilia tecidual, além do agravamento dos sintomas nasosinusais. Além disso, observou-se associação negativa entre hsa-miR-449a e INF- α . E por fim o escore de sintomas SNOT-22 também se correlacionou positivamente, de forma significativa, com a expressão de miR-221-3p-e miRNA 205-5p.

7. Referências Bibliográficas¹

¹ Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

1. Fokkens WJ et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012;50(1):1-12.
2. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis Executive Summary. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(Suppl 1):S3-21.
3. Hastan D et al. Chronic rhinosinusitis in Europe - An underestimated disease. A GA 2LEN study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2011;66(9):1216-23.
4. Pilan RRM. Prevalência da rinossinusite crônica através de inquéritos domiciliares na cidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014.
5. Soler ZM et al. Health state utility values in patients undergoing endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope*. 2011;121(12):2672-8.
6. Alt JA et al. Sleep quality and disease severity in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2013;123(10):2364-70.
7. Kosugi EM et al. Translation, cross-cultural adaptation and validation of sinonasal outcome test (SNOT)-22 to Brazilian Portuguese. *Braz J Otorhinolaryngol* 2011;77(5):663-9.
8. Sella GCP et al. Asthma Is the Dominant Factor for Recurrence in Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(1):302-309
9. Zhang XH, Zhang YN, Liu Z. MicroRNA in chronic rhinosinusitis and allergic rhinitis topical collection on rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(2):415.
10. Emanuel IA, Shah SB. Chronic rhinosinusitis: Allergy and sinus computed tomography relationships. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;123(6):687-91.
11. Karlsson G, Holmberg K. Does Allergic Rhinitis Predispose to Sinusitis? *Acta Otolaryngol*. 1994;114(Sup. 515):26-9.
12. Wilson KF, McMains KC, Orlandi RR. The association between allergy and chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: An evidence-based review with recommendations. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014;4(2):93-103.
13. Pang YT, Eskici O, Wilson JA. Nasal polyposis: Role of subclinical delayed food hypersensitivity. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;122(2):298-301.
14. Bousquet J et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63(Supl. 86):8-160.

15. Jiang X. The emerging role of microRNAs in asthma. *Mol Cell Biochem.* 2011;353(1-2):35-40.
16. Klossek JM et al. Prevalence of nasal polyposis in France: A cross-sectional, case-control study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2005;60(2):233-7.
17. Thomas M et al. EPOS primary care guidelines: European Position Paper on the primary care diagnosis and management of Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007 - A summary. *Prim Care Respir J.* 2008;17(2):79-89.
18. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: Advances in pathogenesis and management. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(1):5-13.
19. Awad OG et al. Asthma outcomes after endoscopic sinus surgery in aspirin-tolerant versus aspirin-induced asthmatic patients. *Am J Rhinol.* 2008;22(2):197-203.
20. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:107-31.
21. Zi Z et al. Biofilms and mucosal healing in postsurgical patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23(5):506-11.
22. Zhang Z et al. Clinical factors associated with bacterial biofilm formation in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2011;144(3):457-62.
23. Seiberling KA, Grammer LC, Kern RC. Chronic rhinosinusitis and superantigens. *Rhinol Facial Plast Surg.* 2009;38:231-9.
24. Zhang N et al. An update on the impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. *Rhinology.* 2005;43(3):162-8.
25. Foreman A, Wormald PJ. Different biofilms, different disease? A clinical outcomes study. *Laryngoscope.* 2010;120(8):1701-6.
26. Vaezi MF et al. Proton pump inhibitor therapy improves symptoms in postnasal drainage. *Gastroenterology.* 2010;139(6):1887-93.e1.
27. Pincus RL et al. A study of the link between gastric reflux and chronic sinusitis in adults. *Ear Nose Throat J.* 2006;85(3):174-8.
28. DiBaise JK et al. Role of GERD in chronic resistant sinusitis: a prospective, open label, pilot trial. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(4):843-50.
29. Durmus R et al. Does reflux have an effect on nasal mucociliary transport. *Acta Otolaryngol.* 2010;130(9):1053-7

-
30. Sella GCP et al. Relação entre rinossinusite crônica e refluxo gastroesofágico em adultos: revisão sistemática. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2017;83(3):356-63.
 31. Peterson J et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317-23.
 32. Yan M et al. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. *Cell Host Microbe*. 2013;14(6):631-40.
 33. Lee JT, Frank DN, Ramakrishnan V. Microbiome of the paranasal sinuses: Update and literature review. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(1):3-16.
 34. Liu CM et al. Medical therapy reduces microbiota diversity and evenness in surgically recalcitrant chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(10):775-81.
 35. Kern RC et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: An immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol*. 2008;22(6):549-59.
 36. Zhang Q et al. Differential expression of Toll-like receptor pathway genes in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps. *Acta Otolaryngol*. 2013;133(2):165-73.
 37. Hirschberg A et al. Different activations of toll-like receptors and antimicrobial peptides in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyposis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2016;273(7):1779-88.
 38. Romagnani S. Regulatory T cells: Which role in the pathogenesis and treatment allergic disorders? *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2006;61(1):3-14.
 39. Stevens WW et al. Cytokines in chronic rhinosinusitis role in eosinophilia and aspirin-exacerbated respiratory disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(6):682-94.
 40. Stevens WW et al. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1442-53.
 41. Ravensberg AJ et al. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(4):779-85.
 42. Nomura K et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir Res*. 2014;15(1):1-13.

-
43. Soyka MB et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: The regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(5):1087-1096.e10.
 44. Valera FCP et al. Staphylococcus aureus impairs sinonasal epithelial repair: Effects in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and control subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(2):591-603.e3.
 45. Richer SL et al. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Am J Rhinol*. 2008;22(3):228-34.
 46. Den Beste KA et al. Epithelial permeability alterations in an in vitro air-liquid interface model of allergic fungal rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(1):19-25.
 47. Berdnikovs S et al. Meta-Analysis of gene expression microarrays reveals novel biomarkers consistent with altered functionality of mucosal barrier in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):AB236.
 48. Lee RJ et al. Słodki smak nauki czyli sieć pozaustnych receptorów gorzkiego smaku Sweet taste of research: extraoral bitter taste receptors network. 2012;122(11):4145-59.
 49. Hansel TT, Johnston SL, Openshaw PJ. Microbes and mucosal immune responses in asthma. *Lancet*. 2013;381(9869):861-73.
 50. Derycke L et al. Mixed T helper cell signatures in chronic rhinosinusitis with and without polyps. *PLoS One*. 2014;9(6):1-8.
 51. Pant H et al. CD4+and CD8+ regulatory T cells in chronic rhinosinusitis mucosa. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(2):83-9.
 52. Hulse KE et al. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by B-cell inflammation and EBV-induced protein 2 expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1075-1083.e7.
 53. Meng J et al. The development of nasal polyp disease involves early nasal mucosal inflammation and remodelling. *PLoS One*. 2013;8(12):1-13.
 54. Takabayashi T et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):584-592.e4.
 55. Bhattacharyya N, Lee LN. Evaluating the diagnosis of chronic rhinosinusitis based on clinical guidelines and endoscopy. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2010;143(1):147-51.

-
56. Cornelius RS et al. ACR appropriateness criteria sinonasal disease. *J Am Coll Radiol*. 2013;10(4):241-6.
 57. Rabago D et al. Qualitative aspects of nasal irrigation use by patients with chronic sinus disease in a multimethod study. *Ann Fam Med*. 2006;4(4):295-301.
 58. Bastier P-L et al. Nasal irrigation: From empiricism to evidence-based medicine. A review. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2015;132(5):281-5.
 59. Kalish L et al. Topical steroids for nasal polyps. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;12:CD006549.
 60. Fandinõ M et al. The use of postoperative topical corticosteroids in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: A systematic review and meta-analysis. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27(5):146-57.
 61. Minshall E et al. Assessment by nasal biopsy of long-term use of mometasone furoate aqueous nasal spray (Nasonex) in the treatment of perennial rhinitis. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1998;118(5):648-54.
 62. Derendorf H, Meltzer EO. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: Clinical and therapeutic implications. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2008;63(10):1292-300.
 63. Soudry E et al. Safety analysis of long-term budesonide nasal irrigations in patients with chronic rhinosinusitis post endoscopic sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(6):568-72.
 64. Kirtsreesakul V, Wongsritrang K, Ruttanaphol S. Clinical efficacy of a short course of systemic steroids in nasal polyposis. *Rhinology*. 2011;49(5):525-32.
 65. Czock D, Keller F, Rasche FM, Häussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(1):61-98.
 66. Poetker DM, Smith TL. What rhinologists and allergists should know about the medico-legal implications of corticosteroid use: A review of the literature. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2012;2(2):95-103.
 67. Van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: A meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2002;13(10):777-87.
 68. Garavelli S, De Rosa V, de Candia P. The Multifaceted Interface Between Cytokines and microRNAs: An Ancient Mechanism to Regulate the Good and the Bad of Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:3012.

-
69. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509-24.
 70. Zhang YN et al. Expression of MicroRNA machinery proteins in different types of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2012;122(12):2621-7.
 71. Maes T, Tournoy KG, Joos GF. Gene therapy for allergic airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011;11(2):163-72.
 72. Tomankova T et al. microRNAs: emerging regulators of immune-mediated diseases. *Scand J Immunol.* 2012;75(2):129-41.
 73. Zhang XH et al. Overexpression of miR-125b, a novel regulator of innate immunity, in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(2):140-51.
 74. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(7):421-33.
 75. Miller RL, Ho SM. Environmental epigenetics and asthma: Current concepts and call for studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(6):567-73.
 76. Toma S, Hopkins C. Stratification of SNOT-22 scores into mild, moderate or severe and relationship with other subjective instruments. *Rhinology.* 2016;54(2):129-133.
 77. Lund VJ, Kennedy DW. Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1995;167:17-21.
 78. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology.* 1993;31(4):183-4.
 79. Marabita F et al. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 2016;17(2):204-12.
 80. Hellemans J et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2):R19.
 81. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
 82. Dweep H et al. MiRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011;44(5):839-47.
 83. Başoğlu Tunç G, Tarsuslu Şimşek T. Serebral palsili çocuklarda sosyo-demografik özellikler ile beden kitle indeksi arasındaki ilişkinin incelenmesi. *Türkiye Klin Pediatr.* 2011;20(4):289-96.

-
84. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006;38(4):317-23.
 85. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA Regulation of Inflammatory Responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):295-312.
 86. Jiao J, Wang C, Zhang L. Epithelial physical barrier defects in chronic rhinosinusitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019 Jun 3;15(6):679-88.
 87. Wise SK et al. Interleukin-4 and interleukin-13 compromise the sinonasal epithelial barrier and perturb intercellular junction protein expression. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014;4(5):361-70.
 88. Ramezani M et al. Th17 cytokines disrupt the airway mucosal barrier in chronic rhinosinusitis. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016:9798206.
 89. Murphy J et al. Staphylococcus Aureus V8 protease disrupts the integrity of the airway epithelial barrier and impairs IL-6 production in vitro. *Laryngoscope*. 2018;128(1):E8-15.
 90. Steelant B et al. Impaired barrier function in patients with house dust mite-induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(4):1043-1053.e5.
 91. Sajjan U et al. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(12):1271-81.
 92. Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(3):509-20.
 93. Kim B et al. Effect of matrix metalloproteinase inhibitor on disrupted E-cadherin after acid exposure in the human nasal epithelium. *Laryngoscope*. 2018;128(1):E1-7.
 94. Giannessi D et al. Localization of ZO-1 and E-cadherin in the nasal polyp epithelium. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2002;259(9):465-9.
 95. Kim B et al. Decreased expression of CCL17 in the disrupted nasal polyp epithelium and its regulation by IL-4 and IL-5. *PLoS One*. 2018;13(5):1-14.
 96. Gregory PA et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):593-601.
 97. Soler ZM et al. Relationship between clinical measures and histopathologic findings in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;141(4):454-61.

-
98. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-7.
 99. Yeo NK, Jang YJ. Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope*. 2010;120(2):346-52.
 100. Shahriari S, Wei KJ, Ghildyal R. Respiratory syncytial virus matrix (M) protein interacts with actin in vitro and in cell culture. *Viruses*. 2018;10(10):7-12.
 101. Duan C et al. Differential expression patterns of egf, egfr, and erbb4 in nasal polyp epithelium. *PLoS One*. 2016;11(6):1-14.
 102. Markopoulos GS et al. Senescence-associated microRNAs target cell cycle regulatory genes in normal human lung fibroblasts. *Exp Gerontol*. 2017;96:110-22.
 103. Zhao D et al. MiR-221 activates the NF- κ B pathway by targeting A20. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;472(1):11-8.
 104. Galardi S et al. NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(9):3892-902.
 105. Russell SA, Bashaw GJ. Axon guidance pathways and the control of gene expression. *Dev Dyn*. 2018;247(4):571-80.
 106. Wu D et al. Axonal Guidance Signaling Pathway Is Suppressed in Human Nasal Polyps. *Am J Rhinol Allergy*. 2018;32(4):208-16.
 107. Zander KA et al. Protein microarray analysis of nasal polyps from aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(3):268-72.
 108. Suojalehto H et al. MicroRNA profiles in nasal mucosa of patients with allergic and nonallergic rhinitis and asthma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(8):612-20.
 109. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity. *Immunity*. 2015;43(1):29-40.
 110. Heijink IH et al. Down-regulation of E-Cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependent Th2 cell-promoting activity. *J Immunol*. 2007;178(12):7678-85.
 111. Lizé M et al. MicroRNA-449a levels increase by several orders of magnitude during mucociliary differentiation of airway epithelia. *Cell Cycle*. 2010;9(22):4579-83.

112. Lewandowska-Polak A et al. Toll-like receptor agonists modulate wound regeneration in airway epithelial cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8). pii: E2456.
113. Lv J et al. MicroRNA-34/449 family and viral infections. *Virus Res.* 2019;260:1-6.
114. Callejas-Diaz B et al. Integrated mRNA and microRNA transcriptome profiling during Differentiation of Human Nasal Polyp Epithelium reveals an altered Ciliogenesis. *Allergy.* 2020 Apr 6. doi: 10.1111/all.14307. [Epub ahead of print]

8. *Anexos*

ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de microRNA em pacientes com Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal

Pesquisador: Mariana Lima Coelho Silveira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 35905314.4.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.011.968

Data da Relatoria: 26/02/2015

Apresentação do Projeto:

A expressão alterada de microRNAs (miRNAs) tem sido recentemente demonstrada em pacientes com Rinossinusite Crônica (RSC) e outras doenças inflamatórias das vias aéreas como a asma. Porém a correta relação entre a expressão diferenciada de miRNAs e a produção alterada de proteínas (anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias) na RSC é pouco entendida. Este estudo busca avaliar o potencial envolvimento dos miRNAs na fisiopatogenia da RSC. Para tanto serão coletadas amostras de pólipos nasais e epitélio nasal no Ambulatório de Rinologia (também do HC não fica claro) e enviadas para o Centro de Medicina Genômica – HCFMRP-USP. Serão selecionados um total de sessenta pacientes que serão divididos em dois grupos: 30 pacientes com RSCcPN e 30 pacientes controles. Serão critérios de exclusão para todos os grupos: pacientes abaixo de 20 anos e acima de 75 anos, que tenham alguma doença sistêmica de origem genética e ainda pacientes com potencial de risco de sangramento. Serão incluídos apenas pacientes com história de sintomas sugestivos de RSC ao menos por 3 meses e que estejam sem uso de medicamentos para a doença há pelo menos um mês (em ambos os grupos??). Os pacientes serão submetidos a diferentes exames que já compõe o protocolo do

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.011.968

serviço, sendo durante esses exames coletada uma biópsia do pólipó nasal. Quanto aos pacientes do controle não fica claro se passarão ou não pelos mesmos exames, já que é mencionado que será durante a cirurgia de rinoplastia coletada a biópsia. Após os exames e coletas serão analisados os materiais segundo objetivos do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo é o de avaliar a presença de microRNAs em pacientes com RSC, com ou sem pólipó nasal, e associá-los, de acordo com a citocinas expressas, nos diversos padrões inflamatórios, como Th-1, Th-2, Th-17, T-reg e imunidade inata.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores não existem os riscos adicionais aos que já são relacionados aos exames de rotina do serviço (descrevê-los), no que tange um dos grupo, no entanto, não apresentam os riscos do grupo controle. No que tange aos benefícios mencionam que serão indiretos, pois este estudo ajudará a promover uma melhor compreensão da doença, bem como do seu tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa mostra-se bastante relevante, no entanto, necessita uma descrição mais pormenorizada dos procedimentos de coleta de dados, desde contato com os participantes até o posterior seguimento dos mesmos após as intervenções.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta toda documentação necessária.

Recomendações:

Todas as recomendações sugeridas anteriormente foram realizadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2 de 24/02/2015, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.011.968

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRÃO PRETO, 06 de Abril de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO B - QUESTIONÁRIO SNOT-22, VALIDADO PARA A LÍNGUA PORTUGUESA

Considerando a gravidade dos problemas, classifique a intensidade dos sintomas assinalando:

- 0: nenhum problema
- 1: problema muito leve
- 2: problema leve
- 3: problema moderado
- 4: problema grave
- 5: pior problema possível

	Nota
Necessidade de assoar o nariz	
Espirros	
Nariz escorrendo	
Tosse	
Secreção do nariz indo para garganta	
Sensação de ouvido cheio ou tampado	
Tontura ou vertigem	
Dor de ouvido	
Dor ou pressão no rosto	
Dificuldade de conseguir dormir	
Acorda no meio da noite	
Falta de uma boa noite de sono	
Acorda cansado	
Fadiga ou cansaço durante o dia	
Diminuição do seu rendimento para realizar atividades do seu dia a dia	
Diminuição da sua concentração para realizar atividades do seu dia a dia	
Frustrado, agitado ou irritado	
Tristeza	
Sensação de vergonha	
Dificuldades de sentir cheiros ou gosto	
Nariz entupido	
Nota final	

ANEXO C - ESCORE ENDOSCÓPICO LUND-KENNEDY

Pólipo: 0 - ausente / 1 - pólipos que não obstruem completamente as fossas nasais /
2 - pólipos que obstruem as fossas nasais

Edema: 0 - ausente / 1 - leve / 2 - grave

Secreção: 0 - ausente / 1 - secreção leve e pouco viscosa / 2 - secreção viscosa e
purulenta

Característica	Lado esquerdo	Lado direito
Pólipo		
Edema		
Secreção		
Nota final		

ANEXO D - ESCORE TOMOGRÁFICO LUND-MACKAY

Considerar para a classificação abaixo:

0: sem alterações

1: opacificação parcial

2: opacificação completa

Para complexo óstiomeatal, considerar apenas notas 0 (sem alterações) ou 2 (com velamento)

Característica	Lado esquerdo	Lado direito
Maxilar		
Etmoide anterior		
Etmóide posterior		
Esfenoide		
Frontal		
Complexo óstio-meatal		
Nota final		

ANEXO E - COPYRIGHT PERMISSION OF KEGG

03/09/2020

E-mail de Universidade de São Paulo - ENC: [KEGG Copyright Permission] 200523

ppg.fmrpocp USP <ppg.fmrpocp@usp.br>

ENC: [KEGG Copyright Permission] 200523

1 mensagem

Mariana de Lima <dramacoelho@hotmail.com>
 Para: "ppg.fmrpocp@usp.br" <ppg.fmrpocp@usp.br>

3 de setembro de 2020 19:39

De: permission <permission@genome.ad.jp>
 Enviado: quarta-feira, 26 de agosto de 2020 01:59
 Para: Mariana Lima Coelho Silveira <dramacoelho@hotmail.com>
 Assunto: Re: [KEGG Copyright Permission] 200523

Dear Mariana Lima Coelho Silveira,

Thank you for contacting us for copyright permission of KEGG.

Permission is granted to you to publish the following KEGG pathway map image in your doctoral thesis "MicroRNA research in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyp" written by Mariana Lima Coelho Silveira:

- map04530 Tight junction
- map04520 Adherens junction
- map04012 ErbB signaling pathway
- map04360 Axon guidance
- map04144 Endocytosis

subject to the condition that the original source is properly acknowledged.

Please see more details in <http://www.kegg.jp/kegg/kegg1.html>.

Sincerely,
 Junko Takigawa
 Kanehisa Laboratories

On 2020-08-25 23:08, Mariana Lima Coelho Silveira wrote:

- > Name : Mariana Lima Coelho Silveira
- > Email address : dramacoelho@hotmail.com
- > Affiliation : Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo
- > Paulo
- >
- >
- > Journal/Book name : doctoral thesis
- > Article title : MicroRNA research in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyp
- > Corresponding author : Mariana Lima Coelho Silveira
- > Accepted for publication : no
- > Material to be used :
- > map04530 Tight junction
- > map04520 Adherens junction
- > map04012 ErbB signaling pathway
- > map04360 Axon guidance
- > map04144 Endocytosis

03/09/2020

E-mail de Universidade de São Paulo - ENC: [KEGG Copyright Permission] 200523

>
>
>
> I would like to include these figures in my doctoral thesis entitled
> microRNA research in patients with chronic rhinosinusitis with nasal
> polyp, since the studied genes are associated with these metabolic
> pathways.
> I appreciate the collaboration.
> Best Regards,
> Mariana.
>
>
> Name : Mariana Lima Coelho Silveira<dramacoelho@hotmail.com>
> Affil : Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo
> Date : 2020/08/25(Tue) 23:08:04
> Host : 187.183.45.162 ()
> Agent : Mozilla/5.0 (Macintosh; Intel Mac OS X 10_15_5)
> AppleWebKit/605.1.15 (KHTML, like Gecko) Version/13.1.1
> Safari/605.1.15

9. *Apêndice*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Pesquisa de microRNA em pacientes com Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal

Pesquisadoras responsáveis: Fabiana Cardoso Pereira Valera
Mariana Lima Coelho Silveira

Copesquisadores: Wilma T. Anselmo-Lima
Edwin Tamashiro
Wilson Araújo da Silva Júnior

Telefones: 16 3602-2321 / 16 3602-2526

Você está sendo convidado para participar do estudo: *Pesquisa de microRNA em pacientes com Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal.*

A sinusite é uma doença inflamatória que acomete a cavidade nasal e os seios da face. Os principais sintomas são: a obstrução nasal, a perda do olfato, o catarro nasal abundante e as sinusites de repetição. Seu tratamento é limitado ainda nos dias de hoje. O uso de corticóide tópico, medicação utilizada para o tratamento clínico atual, controla apenas 60% dos casos. As cirurgias também não oferecem cura da sinusite pois podem falhar em 30% dos casos.

O objetivo do estudo é o de avaliar possíveis alterações genéticas que estão associadas com a presença de sinusite crônica.

Como rotina do ambulatório, você será submetido a avaliações clínicas, e de endoscopia nasal. A nasofibroscopia ou endoscopia nasal é essencial para avaliação do nariz e consiste na passagem, pelo nariz, de uma fibra óptica acoplada a uma câmera. Durante este exame você pode sentir desconforto leve, geralmente não há dor e vontade de espirrar. Durante esse exame, é rotina o encaminhamento de um pedaço da mucosa nasal alterada para análise de patologia (biópsia). Durante a biópsia do pólipó também podem ocorrer desconforto leve e sangramento de leve intensidade. A quantidade de material retirado durante a biópsia é a mesma que geralmente se faz, só será redividido para o exame de patologia e para o estudo. A sua participação será a de ajudar no preenchimento do questionário clínico (que leva em torno de 5 a 10 minutos para ser preenchido), fazer os

exames de tomografia e endoscopia nasal (já feitos de rotina) e fornecer material (mucosa alterada) para o estudo genético.

Você não será exposto a risco adicional de qualquer espécie, já que os exames (endoscopia nasal e biópsia do pólip) já são realizados de rotina em qualquer paciente com a sua doença. Portanto, participar do estudo não mudará a rotina de exames e tratamento da sua doença. Os seus benefícios serão indiretos, pois este estudo ajudará a promover uma melhor compreensão da sua doença, bem como do seu tratamento. Não haverá benefícios diretos neste estudo.

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa, sendo de compromisso do pesquisador a utilização dos dados somente para esta pesquisa.

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária, você não é obrigado(a) a fazer parte. Seu tratamento e a atitude de seu médico do estudo não serão afetados se você decidir não fazer parte deste estudo. A recusa em participar não afetará qualquer benefício que você tenha direito, inclusive sem que isso implique no atendimento atual e futuro nesta Instituição. Se você decidir fazer parte, você precisará assinar duas vias deste documento para comprovar que você deu seu consentimento em participar, sendo que você fica com uma cópia. Caso ainda tenha dúvidas, você poderá contactar os pesquisadores em qualquer momento, ou o Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital (telefone de contacto: 36022228 ou 36331144 – e-mail: cep@hcrp.usp.br). Mesmo se você concordar em participar, você pode retirar-se do estudo a qualquer momento.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para esclarecimentos de qualquer dúvida relacionada à pesquisa. Os dados do estudo poderão ser usados para divulgação em eventos médicos ou publicações em revistas científicas, garantindo sempre o anonimato dos pacientes. Estarão disponíveis quando solicitados pelos pacientes e/ou responsáveis.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com o Dra. Mariana de Lima Coelho, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome do paciente/ representante legal: _____

Assinatura do paciente/representante legal:

Data ____/____/____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador:

Data ____/____/____

Título da Pesquisa: Pesquisa de microRNA em pacientes com Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal

Pesquisadoras responsáveis: Fabiana Cardoso Pereira Valera
Mariana Lima Coelho Silveira

Copesquisadores: Wilma T. Anselmo-Lima
Edwin Tamashiro
Wilson Araújo da Silva Júnior

Telefones: 16 3602-2321 / 16 3602-2526

Você está sendo convidado para participar do estudo: *Pesquisa de microRNA em pacientes com Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal.*

A sinusite é uma doença inflamatória que acomete a cavidade nasal e os seios da face. Os principais sintomas são: a obstrução nasal, a perda do olfato, o catarro nasal abundante e as sinusites de repetição. Seu tratamento é limitado ainda nos dias de hoje. O uso de corticóide tópico, medicação utilizada para o tratamento clínico atual, controla apenas 60% dos casos. As cirurgias também não oferecem cura da sinusite, pois podem falhar em 30% dos casos.

O objetivo do estudo é o de avaliar possíveis alterações genéticas que estão associadas com a presença de sinusite crônica.

Você está sendo convidado a participar como voluntário deste estudo, no grupo controle, ou seja, você não tem a doença pesquisada, mas os resultados encontrados com o seu material ajudarão a confirmar as alterações genéticas de quem possui a doença. Portanto, você que irá realizar uma cirurgia para corrigir sua deformidade nasal, estamos solicitando que você ajude a pesquisa com um pedaço da mucosa da concha média (tecido que tem por dentro do nariz) que será colhido durante sua cirurgia. Portanto, você não sentirá dor e este procedimento não irá alterar o resultado da sua cirurgia, como também não trará nenhum tipo de risco.

Não haverá despesas pessoais para. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária, você não é obrigado(a) a fazer parte. Seu tratamento e a atitude de seu médico do estudo não serão afetados se você decidir não fazer parte deste estudo. A recusa em participar não afetará qualquer benefício que você tenha direito, inclusive sem que isso implique no atendimento atual e futuro nesta

Instituição. Se você decidir fazer parte, você precisará assinar duas vias deste documento para comprovar que você deu seu consentimento em participar, sendo que você fica com uma cópia. Caso ainda tenha dúvidas, você poderá contactar os pesquisadores em qualquer momento, ou o Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital (telefone de contacto: 36022228 ou 36331144 – e-mail: cep@hcrp.usp.br). Mesmo se você concordar em participar, você pode retirar-se do estudo a qualquer momento.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para esclarecimentos de qualquer dúvida relacionada à pesquisa. Os dados do estudo poderão ser usados para divulgação em eventos médicos ou publicações em revistas científicas, garantindo sempre o anonimato dos pacientes. Estarão disponíveis quando solicitados pelos pacientes e/ou responsáveis.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com o Dra. Mariana de Lima Coelho, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome do paciente/ representante legal: _____

Assinatura do paciente/representante legal:

Data ____ / ____ / ____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador:

Data ____ / ____ / ____