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

VANESSA RAMOS PIRES DINARTE

**Associação genética do polimorfismo do receptor
alfa 1 da interleucina 22 à rinossinusite crônica
com e sem polipose nasossinusal**

RIBEIRÃO PRETO

2017

VANESSA RAMOS PIRES DINARTE

**Associação genética do polimorfismo do receptor
alfa 1 da interleucina 22 à rinossinusite crônica
com e sem polipose nasossinusal**

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. Wilma
T. Anselmo-Lima**

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

Dinarte, Vanessa Ramos Pires

Associação genética do polimorfismo do receptor alfa 1 da interleucina 22 à rinossinusite crônica com e sem polipose nasossinusal. Vanessa Ramos Pires Dinarte / Orientadora: Wilma T. Anselmo-Lima. Ribeirão Preto, 2017.

77p.: 5il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Vanessa Ramos Pires Dinarte

Título: Associação genética do polimorfismo do receptor alfa 1 da interleucina 22 à rinosinusite crônica com e sem polipose nasossinusal.

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: ____/____/____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedicatória

*A Deus, por guiar meus passos e me dar forças
para continuar.*

*À minha família: marido, filhos, pais, irmãos,
sogros, cunhados e sobrinhos, pelo apoio e pela
compreensão nos momentos de ausência.*

*Ao amado Rafael, que estará sempre vivo em
nossos corações.*

Agradecimentos

À Profª Drª Wilma T. Anselmo-Lima, modelo de profissional e ser humano em que me espelho. Muito obrigada pela oportunidade do convívio e pela tão valiosa orientação.

Ao Prof. Wilson Araujo da Silva Júnior, por abrir as portas do Ambulatório de Genética Molecular, e por todo conhecimento transmitido.

À minha querida cunhada Anemari, que foi fundamental em todas as etapas.

A todos do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da universidade de São Paulo, pela inestimável contribuição e colaboração.

Ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos docentes, residentes e funcionários da Faculdade de Medicina de Marília, pelo apoio.

Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

Resumo

DINARTE, V. R. P. **Associação genética do polimorfismo do receptor alfa 1 da interleucina 22 à rinossinusite crônica com e sem polipose nasossinusal**. 2017. 77f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: A rinossinusite crônica (RSC), doença multifatorial, na qual podem estar envolvidos fatores genéticos e ambientais, ainda tem muitos aspectos obscuros na sua patogênese. A genética tem se mostrado promissora na elucidação dessa complexa doença. Alguns estudos apontam que a expressão de interleucina (IL) 22 se apresenta reduzida em pacientes com RSC, podendo resultar também na redução da barreira epitelial e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias Th1. **Objetivos:** Pesquisar a frequência dos polimorfismos no gene *IL22RA1* (receptor subunidade alfa um da interleucina 22) em pacientes portadores de RSC com e sem pólipos nasais e em indivíduos normais, utilizando a técnica de sequenciamento, pelo método de Sanger, para análise de mutações; comparar as frequências dos polimorfismos encontrados no gene *IL22RA1* entre os grupos e com a literatura médica e também comparar a técnica de Sanger com outras técnicas convencionais descritas na literatura. **Casuística e Métodos:** Foram avaliados 247 pacientes, no período de maio de 2011 a fevereiro de 2016, subdivididos em três grupos: 122 pacientes portadores de RSC com pólipos nasais (RSCcPN), 21 casos de RSC sem pólipos nasais (RSCsPN) e 104 voluntários sem sintomatologia nasal. Foram colhidas amostras de sangue venoso periférico de todos os casos e controles, e realizada a extração de DNA, com posterior análise das mesmas. Após a exclusão das perdas, restaram 70 casos de RSCcPN, 14 de RSCsPN e 68 controles. **Resultados:** O sequenciamento apontou 10 polimorfismos no gene *IL22RA1*, nos exon 2 (rs10903022, c.113_114insA/Q26Pfs*11, c.74T>A e c.141C>A), exon 4 (rs17852649), exon 5 (rs16829204), exon 6 (rs142356961) e exon 7 (rs17852648, rs34967816 e rs3795299). Os polimorfismos encontrados nos exons 2 (em homozigose), 5 e 6 foram exclusivos do grupo das patologias analisadas (RSC com e sem PN), sendo as duas últimas consideradas variáveis não sinônimas, ou seja, com capacidade de alterar a estrutura da proteína, podendo produzir impacto na patogênese da RSC. A alteração do exon 6 foi a única variante encontrada, com frequência do alelo menor (MAF) inferior a 0,01, exclusiva do grupo RSCcPN. **Conclusões:** Foram detectados três polimorfismos no gene *IL22RA1*, que até o momento não estão descritos na literatura, sendo a inserção c.113_114insA/Q26Pfs*11, possivelmente patogênica, com frequência maior nos grupos com RSC. O polimorfismo rs17852649 em heterozigose no exon 4, foi o único com diferença estatística, com predominância do alelo mutado no grupo controle, podendo conferir proteção contra o fenótipo. Também se destaca o polimorfismo rs142356961, no exon 6, do tipo não sinônimo, ou seja, capaz de alterar a estrutura final da proteína, com índice MAF<0,01, sendo exclusiva de pacientes negros portadores de RSCcPN. Estudos de replicação e com maiores coortes serão necessários para determinar se os achados do presente estudo se deram ao acaso.

Palavras-chave: Rinossinusite crônica. Pólipo nasal. Polimorfismo.

Abstract

DINARTE, V. R. P. **Genetic association of the interleukin 22 alpha 1 receptor polymorphism to chronic rhinosinusitis with and without nasosinusal polyposis**. 2017. 77f. Thesis (Doctoral). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introduction: Chronic rhinosinusitis (CRS), a multifactorial disease, with genetic and environmental factors that may be involved, still have many aspects of its pathogenesis unknown. Genetics has shown itself promising in the elucidation of this complex disease. Some studies have indicated that the expression of IL-22 is reduced in patients with CRS, which may result in reduction of the epithelial barrier and decrease in the production of Th1 proinflammatory cytokines. **Objectives:** To investigate the frequency of polymorphisms in the *IL22RA1* gene in patients with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps and in individuals without these pathologies, using the Sanger sequencing technique for mutation analysis; to compare the frequencies of the polymorphisms found in the *IL22RA1* gene between the groups and the medical literature and also to compare the Sanger technique with other conventional techniques in the medical literature. **Casuistic and Methods:** From May 2011 to February 2016, 247 patients were evaluated, subdivided into three groups: 122 patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), 21 cases of chronic rhinosinusitis without nasal polyps (CRSSNP) and 104 volunteers without nasal symptoms. Samples of peripheral venous blood were collected from all cases and controls, and DNA extraction was performed, with subsequent analysis at the Molecular Genetics Laboratory - Ribeirão Preto Medical School Blood Center - USP. After the loss exclusion, there were 70 cases of CRSwNP, 14 CRSSNP and 68 controls. **Results:** Sequencing indicated 10 polymorphisms in the *IL22RA1* gene, exon 2 (rs10903022, c.113_114insA / Q26Pfs * 11, c.74T> A and c.141C> A), exon 4 (rs17852649), exon 5 (rs16829204), exon 6 (rs142356961) and exon 7 (rs17852648, rs34967816 and rs3795299). Polymorphisms in exons 2 (in homozygosis), 5 and 6 were exclusive from the analyzed pathologies group (RSC with and without NP), the latter two being considered non-synonymous variables, that is, with capacity to alter the protein structure, being able to produce impact on the pathogenesis of CRS. The exon 6 alteration was the only variant found, with the minor allele frequency (MAF) under 0.01, exclusive of the RSCcPN group. **Conclusions:** Three polymorphisms were detected in the *IL22RA1* gene, which until now are not described in the literature, and the possibly pathogenic insert c.113_114insA / Q26Pfs * 11, with a higher frequency in the groups with CRS. The polymorphism rs17852649 in heterozygosis in exon 4 was the only one with a statistical difference, with predominance of the mutated allele in the control group, which could confer protection against the phenotype. Also notable is the polymorphism rs142356961, in exon 6, of the non-synonymous type, that is, capable of altering the final structure of the protein, with MAF index <0.01, being exclusive in black patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Replication studies and larger cohorts are necessary to rule out the findings at random.

Keywords: Chronic rhinosinusitis. Nasal polyps. Polymorphism.

Lista de Figuras

Figura 1: Complexo receptor heterodímero IL-22RA1 - IL-10R2	34
Figura 2: Localização do gene <i>IL22RA1</i> no cromossomo 1	35
Figura 3: Caracterização da amostra.	40
Figura 4: Cromatograma <i>Exon 5</i> : polimorfismo rs16829204 em homozigose	44
Figura 5: Cromatograma <i>Exon 7</i> : polimorfismo rs17852648 em heterozigose	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características dos grupos avaliados na pesquisa de polimorfismos das metaloproteinases de matriz 2 (<i>MMP2</i>)	26
Tabela 2 -	Valores de p na análise dos quatro blocos de haplótipos formados pelos 17 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) das metaloproteinases de matriz 2 (<i>MMP2</i>)	26
Tabela 3 -	Polimorfismos analisados da metaloproteinases de matriz 9 (<i>MMP9</i>), e seus respectivos valores de p, em diferentes modelos genéticos (.....)	27
Tabela 4 -	Resultados da avaliação imuno-histoquímica na expressão dos polimorfismos dos genes das metaloproteinases de matriz 9 (<i>MMP9</i>) e metaloproteinases de matriz 2 (<i>MMP2</i>)	28
Tabela 5 -	Associação dos polimorfismos dos genes <i>LTC4S</i> , <i>NOS2A</i> e <i>PTGDR</i> com PN, PN e atopia, PN e asma, Tríade Aspirina e intolerância a AINEs	29
Tabela 6 -	Associação dos fenótipos PN, com e sem alergia ou asma, com polimorfismos nos genes <i>COX2</i> e <i>MET</i>	30
Tabela 7 -	Associação dos fenótipos PN, com e sem alergia ou asma, com os polimorfismos nos genes <i>OSF2</i> (-33C/G e -33G/G) e <i>LF</i>	30
Tabela 8 -	Frequência dos alelos no gene <i>IL6</i> nos grupos pólipos nasal e controle.....	31
Tabela 9 -	Frequência dos alelos no gene <i>IL6</i> nos grupos pólipos nasal, asma, pólipos nasal e asma e controle	32
Tabela 10 -	Expressão da proteína <i>IL22RA1</i> na cultura de células do epitélio nasal.....	32
Tabela 11 -	Polimorfismos no gene <i>IL22RA1</i> com associação significativa na rinosinusite crônica após correção de Bonferroni	33
Tabela 12 -	<i>Primers</i> utilizados para o sequenciamento dos <i>exons</i> do gene <i>IL22RA1</i> e temperatura de <i>annealing</i>	43
Tabela 13 -	Características da população estudada. Número de indivíduos, sexo, idade média, cor, presença de asma, tabagismo, teste alérgico positivo (prick test+) e intolerância ao AAS.....	46
Tabela 14 -	Caracterização dos polimorfismos encontrados no gene <i>IL22RA1</i> , demonstrando a posição no cromossomo 1, nucleotídeo, aminoácido, identificação, seu respectivo exon estudado, tipo de mutação e o índice MAF	47

Tabela 15 - Caracterização dos polimorfismos encontrados no gene <i>IL22RA1</i> , demonstrando o nucleotídeo, a citação na literatura, o impacto e os casos encontrados nos grupos rinosinusite crônica com pólipos e rinosinusite crônica sem pólipos e controle	47
Tabela 16 - Análise estatística comparando as frequências dos alelos nos grupos rinosinusite crônica com pólipos nasais e controle, com os respectivos valores de p	49
Tabela 17 - Análise estatística comparando as frequências dos alelos nos grupos rinosinusite crônica sem pólipos nasais e controle, com os respectivos valores de p	50
Tabela 18 - Análise estatística comparando as frequências dos alelos nos grupos rinosinusite crônica com e sem pólipos nasais, com os respectivos valores de p	51

Lista de Abreviaturas

AAS-	Ácido acetil salicílico
AERD-	Doença respiratória exacerbada pela aspirina
AINE-	Anti-inflamatório não esteroideal
AOAH-	<i>Acyloxyacyl hydrolase</i>
CFTR-	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CGH-	<i>Comparative genomic hybridization</i>
CONEP-	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COX-2-	Ciclooxigenase 2
CYSLTR1-	Receptor de cistenil leucotrieno 1
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
DO-	Densidade óptica
DPTGDR-	Receptor de prostaglandina
eQTL-	Expressão do trato do <i>locus</i> quantitativo
FC-	Fibrose cística
FISH-	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GA2LEN-	<i>Global Allergy and Asthma European Network Project</i>
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HLA-	Antígenos leucocitários humanos
IgE-	Imunoglobulina E
IL-	Interleucina
IL-10R2-	Receptor subunidade beta da IL-10
IL22RA1-	Receptor subunidade alfa um da interleucina 22
JAK/STAT-	<i>Janus Kinase 1/ Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
LD-	Desequilíbrio de ligação

LF-	Lactoferrina
LTC4S-	Leucotrieno C4 sintetase
MMP-	Metaloproteinases
MUC1-	Mucina 1
NGS-	<i>Next Generation Sequencing</i>
NOS2-	Óxido nítrico sintetase
OSF-2-	Fator-2 osteoblasto específico
PCR-	Reação em cadeia da polimerase
PN-	Pólipo nasal
RSC-	Rinossinusite crônica
RSCcPN-	Rinossinusite crônica com pólipos nasais
RSCsPN-	Rinossinusite crônica sem pólipos nasais
SNPs-	do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCLE-	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TNF-	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Polimorfismo genético na rinossinusite crônica	25
2.2. Papel da IL-22 na rinossinusite crônica	33
2.3. Métodos para sequenciamento de DNA	35
3. OBJETIVOS.....	37
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	39
4.1. Pacientes.....	40
4.2. Método	41
4.2.1. Coleta do sangue.....	41
4.2.2. Extração de DNA	41
4.2.3. Amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction)	42
4.2.4. Sequenciamento de DNA.....	43
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXO.....	64
10. APÊNDICES	66

1- Introdução

O último *guideline* europeu em rinossinusite, EPOS 2012, definiu a modalidade crônica dessa patologia, como uma doença inflamatória do nariz e seios paranasais, com duração maior ou igual a doze semanas, devendo apresentar dois ou mais dos seguintes sintomas, um dos quais deve ser bloqueio/congestão/obstrução nasal e/ou descarga nasal anterior ou posterior, associado à dor/pressão facial ou redução/perda de olfato. Em crianças, a tosse deve ser incluída nos critérios clínicos. Em relação aos exames complementares, associam-se os achados da endoscopia nasal, com presença de pólipos e/ou descarga mucopurulenta, proveniente do meato médio e/ou obstrução mucosa ou edema do meato médio. A tomografia computadorizada pode completar o diagnóstico quando evidenciar alterações mucosas no complexo ostiomeatal ou nos seios paranasais (Fokkens et al., 2012).

Segundo o levantamento realizado na Europa pelo *Global Allergy and Asthma European Network Project* (GA2LEN), a prevalência da rinossinusite crônica (RSC) foi de 10% (Hastan et al., 2011). Já Pilan et al. (2012) encontraram índice de 5,51% na cidade de São Paulo. Na população americana, o valor estimado é de 13% (Pleis; Ward; Lucas, 2010). Esses números estão de acordo com a prevalência mundial da doença, que varia de 5 a 15% da população geral (Fokkens et al., 2012). Esta doença tem impacto socioeconômico muito grande, com custos elevados, que incluem consultas a especialistas, exames complementares, tratamento medicamentoso recorrente, além de elevada morbidade, levando ao absenteísmo no trabalho e baixo rendimento escolar.

Fenotipicamente, a RSC pode ser dividida em com pólipos nasais (RSCcPN) ou sem pólipos nasais (RSCsPN), de acordo com os achados endoscópicos. No primeiro caso, a perda ou redução de olfato é sintomatologia comum, já na RSCsPN, a dor ou pressão facial se sobrepõe aos demais sintomas (Anselmo-Lima et al., 2015). Alguns autores ainda dividem a RSCcPN em rinossinusite fúngica alérgica, doença respiratória exacerbada pela aspirina (AERD) e/ou fibrose cística (Bachert et al., 2014).

A necessidade de uma nova subclassificação da doença em subfenótipos ou endótipos poderia redirecionar o tratamento da RSC, na medida em que identificaria

mecanismos fisiopatogênicos distintos (Akdis et al., 2013; Bachert, Akdis, 2016; Cho, Bachert, Lockey, 2016; Lou, et al. 2016).

A etiologia da RSC ainda é pouco esclarecida; sabe-se que é uma doença multifatorial, em que estão envolvidos fatores genéticos, imunológicos, ambientais e da mucosa do próprio hospedeiro. Todavia, ainda não está certa a forma como isso ocorre. Vários possíveis fatores já foram identificados, como respostas alérgicas, *clearance* mucociliar prejudicado, disfunção imune, defesa epitelial alterada, agentes microbianos e exposição ambiental (Zhang et al., 2011). Porém, requer maior esclarecimento sobre a forma como esses fatores interagem entre si, e qual o papel da genética nisso tudo.

A falta de modelos animais adequados, a dificuldade em padronização fenotípica dos indivíduos estudados, a necessidade de grandes coortes de pacientes e controles, os custos e a falta de replicação dos estudos atuais contribuem para a demora na elucidação da sua fisiopatologia. Há fortes indícios da participação de fatores genéticos na fisiopatologia da RSC. Um dos mais estudados é do *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene* (CFTR), conhecido pelas alterações provocadas na fibrose cística (FC). Há elevada prevalência de RSCcPN nos portadores de FC, porém, estudos sugerem alterações do gene CFTR em indivíduos com RSC, que não apresentam FC (Wang et al, 2005). Estudos familiares também indicam um componente hereditário nos casos de RSCcPN, contudo há grande influência de fatores ambientais no desencadeamento dessa doença (Fokkens et al., 2012).

A interleucina (IL) 22 é uma citocina pertencente à família da IL-10, que pode ser produzida, tanto por células de imunidade adquirida (células T CD4, linhagem Th1, Th17, Th 22) quanto por células linfoides de imunidade inata (natural killers e células linfoides do tipo 3) (Dumountier; Louahed; Renauld, 2000; Xie et al., 2000; Chung et al. 2006; Sabat; Ouyang; Wolk, 2014); podendo estar envolvida com resposta inflamatória de fase aguda, ativação do sistema de imunidade inata, indução de migração celular, inibição de células dendríticas e atenuação de respostas alérgicas (Chung et al., 2006; Zhang et al., 2011). Especificamente, nas células epiteliais do trato respiratório, age aumentando a defesa antibacteriana, por meio da produção de proteínas antibacterianas, como as beta-defensinas, e de

proteína associada à muco-mucina 1 (MUC1). Também pode promover a proliferação celular e a produção de quimiocinas que atraem granulócitos (Sabat; Ouyang; Wolk, 2014).

O receptor subunidade alfa 1 da interleucina 22 (IL22RA1) parece desempenhar importante papel na cicatrização e reorganização tecidual. Kotenko et al. (2001) mostraram que níveis desse receptor foram significativamente menores nas células epiteliais de pacientes não responsivos à cirurgia para RSCcPN.

A escolha do gene *IL22RA1* foi baseada em um estudo por agrupamento de DNA (ácido desoxirribonucleico) (pool-based Genome Wide Association Study), que selecionou cinco SNPs (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism) de alta prioridade e mais 18 polimorfismos do projeto internacional *HapMap* (International HapMap Consortium, 2005), totalizando 23 SNPs, que evidenciaram esse gene como forte candidato para o desenvolvimento da RSC (Endam et al., 2009).

Portanto, tendo em vista o impacto da morbidade que a RSC apresenta nos indivíduos afetados, os custos com seu tratamento, e a falta de compreensão dos seus mecanismos fisiopatológicos, tentou-se correlacionar a frequência dos polimorfismos encontrados no gene *IL22RA1* com a RSC com e sem pólipos nasais (PN), em comparação com o grupo controle.

2. Revisão de Literatura

2.1 Polimorfismo genético na rinossinusite crônica

A definição clínica da RSC sugere persistência do padrão inflamatório da mucosa nasossinusal por, no mínimo, doze semanas, complementando o diagnóstico fenotípico com achados ou não de PNs (Fokkens et al., 2012). A subclassificação da doença em RSCcPN e RSCsPN exhibe padrão inflamatório diferente. No primeiro caso, com polarização da resposta T-helper (Th) 2, apresentando eosinofilia, aumento da produção de IL 4, 5 e 13, além de imunoglobulina E (IgE). Já na RSCsPN, não há polarização Th2, mas sim um padrão misto de respostas (Van Zele et al., 2006; Halderman, Lane, 2017).

Há evidências de herança genética familiar, em pacientes com PNs, variando de 13 - 52% (Rugina et al., 2002; Alexiou et al., 2011; Mfunu-Endam, Zhang, Desrosiers, 2011; Fokkens et al. 2012). Porém, estudos com gêmeos idênticos indicaram que nem sempre ambos desenvolvem a doença quando expostos a ambientes diferentes, denotando o fator ambiental na manifestação da RSC (Fokkens et al., 2012). Em uma análise realizada na Universidade da Pensilvânia, por meio de aplicação de questionários para pacientes previamente diagnosticados com RSC, familiares de indivíduos com a doença apresentaram maior incidência de PNs comparados aos controles, e a severidade da patologia foi diretamente proporcional ao número de casos manifestados nos parentes (Cohen et al., 2006).

Até o momento, o gene mais replicado na RSC é o *CFTR* (do inglês cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), mas também foram replicadas SNPs nos genes *IL1A* (interleukin 1 alpha), *TNF* (tumor necrosis fator) e *AOAH* (acyloxyacyl hydrolase). Muitos outros polimorfismos associados à RSC já foram estudados, porém ainda requerem replicação (Fokkens et al. 2012). Há evidências da participação de alelos de antígenos leucocitários humanos - *HLA* (major histocompatibility complex), principalmente do *HLADRB1*, genes da imunidade inata (interleukin 1 receptor associated kinase 4 - *IRAK4*, nitric oxide synthase - *NOS*, proto-oncogene – *MET* e serpin family A member 1 - *SERPINA1*), mediadores inflamatórios (*IL13*, *IL33*, *IL22RA1*), genes envolvidos no metabolismo do ácido aracônico e no remodelamento tecidual (metaloproteinases 9 [*MMP9*], *TGFB1* [transforming growth factor-beta1]) (Hsu et al. 2013).

Wang et al. (2008) avaliaram 17 SNPs dos genes da *MMP2*, utilizando três modelos de herança genética, no desenvolvimento da RSCcPN. Sabe-se que as MMPs são endopeptidase dependentes de zinco e cálcio, e estão envolvidas em processos de remodelamento da via aérea superior, sendo a MMP-2 importante na clivagem do colágeno tipo IV, estrutura fundamental da membrana basal. Foram selecionados 136 pacientes com RSCcPN e 136 controles com rinite crônica hipertrófica, submetidos à turbinectomia (Tabela 1). De todos os polimorfismos analisados, apenas o rs857403 estava associado com RSCcPN ($p=0.03$), porém quando acrescentados 691 controles, esse valor não se confirmou, tratando-se, portanto, de um falso positivo. O estudo também agrupou os 17 SNPs em quatro blocos haplotípicos, contudo a análise dos haplótipos não apresentou resultados significativos (Tabela 2). Dessa forma, não houve associação de nenhum polimorfismo do gene da *MMP2* com PNs.

Tabela 1 - Características dos grupos avaliados na pesquisa de polimorfismos das metaloproteinases de matriz 2 (*MMP2*)

	Número	PN recorrente	PN não recorrente	Idade média	Homem/mulher
casos	136	26	110	42,5	96/40
controles	136	—	—	34,9	108/28

Fonte: (Wang et al., 2008)

PN: polipose nasal.

Tabela 2 - Valores de p na análise dos quatro blocos de haplótipos formados pelos 17 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) das metaloproteinases de matriz 2 (*MMP2*)

	bloco 1	bloco 2	bloco 3	bloco 4
valor p	0.26	0.58	0.44	0.53

Fonte: (Wang et al., 2008)

Em outro estudo, Wang et al. (2010) avaliaram a influência dos polimorfismos do gene da *MMP9* com a presença de PNs em 203 casos de RSCcPN e 730 controles da população geral para analisar um SNP na região promotora do gene *MMP9* (rs3918242) e mais três SNPs ligados a ele (rs2274756, rs3787268 e rs2664538). Os resultados demonstraram que três SNPs estavam associados à presença de PNs, utilizando diferentes modelos genéticos, sendo o mais significativo o polimorfismo na região promotora do gene rs3918242, isto é, -1562 C/T (Tabela 3). Não foi encontrado resultado significativo nos indivíduos com PN recorrente. Ao serem analisados os haplótipos, incluindo os quatro SNPs, foi encontrada associação positiva do haplótipo TGGG ($p=0,00045$), concluindo-se que os polimorfismos nos genes das *MMP9* podem influenciar no desenvolvimento da RSCcPN, mas não na sua recorrência.

Tabela 3 - Polimorfismos analisados da metaloproteinases de matriz 9 (*MMP9*), e seus respectivos valores de p, em diferentes modelos genéticos

SNP	p dominante	p aditivo	p recessivo
rs2664538	0,640	0,752	0,073
rs3787268	0,503	0,345	0,361
rs2274756	0,034	0,020	0,134
rs3918242	0,023	0,012	0,097

Fonte: (Wang et al., 2010)

SNP: *Single nucleotide polymorphism*.

Wang et al. (2013) avaliaram a expressão, por meio de análise imuno-histoquímica das MMP-2 e MMP-9 na RSCcPN, correlacionando com polimorfismos funcionais nas regiões promotoras das MMPs. O fato da asma e dos PNs possuírem características semelhantes na apresentação e na histopatologia levou os pesquisadores a levantarem a hipótese desse estudo. Foram selecionados 30 pacientes com RSCcPN bilateral, sem recorrência da doença no período de seguimento de seis meses, e 32 pacientes com cirurgia revisional para PN. O grupo controle incluiu 31 pacientes com rinite crônica e desvio de septo nasal. Os SNPs

selecionados foram o polimorfismo funcional no promotor da *MMP9* (rs3918242, isto é, -1562 C/T), e o polimorfismo funcional no promotor da *MMP2* (rs243865, isto é -1306 A/G). Apesar do aumento da expressão das MMP-9 e das MMP-2 nos PNs recorrente e nos não recorrentes, quando comparada ao controle não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois primeiros grupos (Tabela 4). Os autores chegaram à conclusão de que tanto as MMP-2 quanto as MMP-9 podem participar da formação dos PNs e do remodelamento da via aérea superior, porém a patogênese da polipose nasal recorrente pode estar relacionada a outros mecanismos, independente de MMPs.

Tabela 4 - Resultados da avaliação imuno-histoquímica na expressão dos polimorfismos dos genes das metaloproteinases de matriz 9 (*MMP9*) e metaloproteinases de matriz 2 (*MMP2*)

	PN recorrentes	PN não recorrentes	Controle
Aumento da expressão MMP-9	sim (p=0,0016)	sim (p=0,005)	não
Aumento da expressão MMP-2	sim (p=0,004)	não	não

Fonte: (Wang et al., 2013)

PN: pólipos nasais, **MMP:** metaloproteinase de matriz.

Benito-Pescador et al. (2012) conduziram um estudo na Espanha, com 241 pacientes com RSCcPN (com e sem asma) e 245 controles, para avaliar se polimorfismos nos genes envolvidos em mecanismos inflamatórios, leucotrieno C4 sintetase (*LTC4S*), receptor de cistenil leucotrieno 1 (*CYSLTR1*), receptor de prostaglandina (*DPTGDR*) e óxido nítrico sintetase (*NOS2*), poderiam estar envolvidos com a presença de PNs. Não houve associação entre PN simples e os SNPs estudados. Porém, resultados positivos foram obtidos quando avaliados os fenótipos atopia, asma, intolerância a anti-inflamatório não esteroide (AINE) e tríade da aspirina. Dessa forma, foram encontradas associações entre o polimorfismo do gene *LTC4S* -444A/C com PN e atopia (p=0.033) e PN e asma atópica (p=0.012); repetições em tandem do gene *NOS2A* estiveram presentes mais de 14 vezes em pacientes com PN e asma (p=0.034), com PN e intolerância a AINEs (p=0.009) e naqueles com tríade da aspirina (p=0.005); o diplotipo *PTGDR* CCCT/CCC foi mais

frequente em pacientes com PN ($p=0.043$), PN e asma ($p=0.013$) e tríade da aspirina ($p=0.041$) (Tabela 5). Os autores concluíram que a PN esteve associada com polimorfismo específico somente quando relacionada aos fenótipos citados.

Tabela 5 - Associação dos polimorfismos dos genes *LTC4S*, *NOS2A* e *PTGDR* com PN, PN e atopia, PN e asma, Tríade Aspirina e intolerância a AINEs

	PN	PN +atopia	PN +asma	Tríade Aspirina	Intolerância a drogas antiinflamatórias não esteroidais
<i>LTC4S</i> -444A/C		+($p=0.033$)	+($p=0.012$)		
<i>NOS2A</i> VNTR: CCTTT			+($p=0.034$)	+($p=0.005$)	+($p=0.009$)
<i>PTGDR</i> CCCT/CCCC	+($p=0.043$)		+($p=0.013$)	+($p=0.041$)	

Fonte: (Benito-Pescador et al., 2012.)

PN: pólio nasal, **AINE:** anti-inflamatório não esteroidal, ***LTC4S*:** leucotrieno C4 sintetase, ***NOS2:*** óxido nítrico sintetase, ***PTGDR:*** receptor de prostaglandina, **A:** guanina, **VNTR:** repetições em tandem, **C:** citosina e **T:** timina.

A associação da PN com as comorbidades, alergia e asma, também foram analisadas em estudo na Polônia, por Sitarek et al. (2012). O objetivo do estudo foi investigar a associação dos polimorfismos -765G/C do gene da isoenzima ciclooxigenase 2 (*COX2*), rs20417, e -14C/G do gene do receptor transmembrana tirosina quinase (*MET*), rs78116323, com o risco de RSCcPN. Para tal, foram selecionados 195 pacientes com PN, dos quais 63 possuíam rinite crônica alérgica e 65 eram portadores de asma; os controles incluíam 200 indivíduos com queixas de perda auditiva, sem patologia nasal. Demonstrou-se forte associação dos polimorfismos estudados com o risco aumentado de PN na população polonesa, mesmo sem asma ou alergia (Tabela 6). Também foram encontrados resultados positivos nos pacientes com asma ou alergia, que apresentavam o polimorfismo -765G/C do gene *COX2* (Tabela 6). Portanto, os polimorfismos dos genes *COX2* e *MET* podem ter grande impacto no desenvolvimento da RSCcPN, o que também pode depender da presença de asma ou alergia.

Tabela 6 - Associação dos fenótipos PN, com e sem alergia ou asma, com polimorfismos nos genes *COX2* e *MET*

	PN	Alergia	Asma	Sem alergia	Sem asma
<i>COX2</i> -765G/C	OR 7,79	OR 5,64	OR 4,74	OR 7,25	OR 7,61
	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%
	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
<i>MET</i> -14C/G	OR 2,83			OR 2,47	OR 2,59
	IC 95%			IC 95%	IC 95%
	p<0,001			p<0,001	p<0,001

Fonte: (Sitarek et al., 2012)

PN: pólio nasal, **COX2:** ciclooxigenase 2, **MET:** receptor transmembrana tirosina quinase, **G:** guanina, **C:** citosina, **OR:** odds ratio, **IC:** intervalo de confiança.

Zielinska-Blizniewska et al. (2012) também avaliaram, nos mesmos grupos anteriormente citados, a associação dos polimorfismos -33C/G no gene fator-2 osteoblasto específico (*OSF2*), e 140 A/G no gene lactoferrina (*LF*), com PN. Foi encontrada associação dos genótipos 140 A/G *LF*, -33 C/G e -33 G/G *OSF2* com aumento do risco de PN na população do estudo. O grupo de pacientes com alergia ou asma demonstrou associação ainda mais forte com o homozigoto -33G/G e com o heterozigoto 140 A/G, com aumento do risco de PN, do que os pacientes sem as morbidades citadas (Tabela 7). Assim, os polimorfismos dos genes do estudo demonstraram aumento no risco de formação de PN, dependendo também da presença de asma e rinite alérgica crônica.

Tabela 7 - Associação dos fenótipos PN, com e sem alergia ou asma, com os polimorfismos nos genes *OSF2* (-33C/G e -33G/G) e *LF*

	PN	Alergia	Asma	Sem alergia	Sem asma
<i>OSF2</i> -33C/G	OR 3,48	OR 2,40	OR 2,40	OR 3,72	OR 15,11
	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%
<i>OSF2</i> -33G/G	OR 16,45	OR 16,01	OR 17,9	OR 3,73	OR 14,07
	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%
<i>LF</i> 140A/G	OR 4,78	OR 3,22	OR 3,25	OR 3,89	OR 3,62
	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%	IC 95%

Fonte: (Zielinska-Blizniewska et al., 2012)

PN: pólio nasal, **OSF2:** fator-2 osteoblasto específico, **LF:** lactoferrina, **C:** citosina, **G:** guanina, **A:** adenina, **OR:** odds ratio, **IC:** intervalo de confiança.

Na população brasileira, Kosugi et al. (2009) pesquisaram a prevalência do polimorfismo -174G/C no gene da interleucina 6 (*IL6*), uma citocina pró-inflamatória, na RSCcPN. Esse estudo transversal contou com dois grupos, o primeiro composto por 32 pacientes portadores de PNs e o segundo, controle, com 55 voluntários sem sintomatologia nasal. Foram excluídos os casos de asma, intolerância ao ácido acetil salicílico (AAS) e atopia. Após a genotipagem da *IL6*, utilizando o método de PCR com *primers* específicos, foram identificados os genótipos -174GG, -174GC e -174CC; sendo o primeiro (GG) mais frequente no grupo PN (65,62%) contra 41,82% no grupo controle (Tabela 8). Dessa forma, foi levantada a hipótese de que o genótipo GG poderia ser o responsável por maior atividade inflamatória, e também um dos desencadeadores da polipose nasal, assim como o alelo C poderia ser protetor contra o fenótipo, devido a sua maior incidência no grupo sem a doença.

Tabela 8 - Frequência dos alelos no gene IL6 nos grupos pólipso nasal e controle

	PN (%)	Controle (%)
GG	65,62	41,82
GC	31,25	52,73
CC	3,13	5,45

Fonte: (Kosugi et al., 2009).

PN: pólipso nasal, **G:** guanina, **C:** citosina.

Kosugi et al. (2013) analisaram o mesmo polimorfismo, -174G/C do gene da interleucina 6 (*IL6*), porém, dessa vez, incluindo pacientes asmáticos com PN. Foram estudados quatro grupos, 45 pacientes com PN e asma, 63 somente PN, 45 somente asma e 81 controles. Foram excluídos os casos de intolerância ao AAS e atopia. Novamente, o fenótipo GG foi o mais frequente em todos os grupos de patologias inflamatórias, em comparação ao controle, porém sem diferença entre os grupos de doenças (Tabela 9). Sugeriu-se que o polimorfismo estudado poderia contribuir para o desenvolvimento das patologias PN e asma, sendo que ambas exibem padrão inflamatório crônico. O genótipo GG poderia aumentar a produção ou

secreção da IL-6 ou até mesmo o alelo C contribuiria para a proteção contra o desenvolvimento de PN e/ou asma, diminuindo a inflamação.

Tabela 9 - Frequência dos alelos no gene *IL6* nos grupos pólio nasal, asma, pólio nasal e asma e controle

	PN (%)	Asma (%)	PN + Asma (%)	Controle
GG	61,91	82,22	71,11	38,27
GC	33,33	17,78	26,67	56,79
CC	4,76	0	2,22	4,94

Fonte: (Kosugi et al., 2013).

PN: pólio nasal, G: guanina, C: citosina.

Ramanathan, Spannahake e Lane (2007) verificaram diminuição da expressão da proteína IL22RA1 na mucosa nasal de pacientes com RSCcPN recalcitrante, quando comparados aos grupos RSCsPN e controle. Estudo prospectivo, que contou com nove controles e 19 casos de RSC, sendo realizada cultura de células do epitélio nasal da mucosa etmoidal. A expressão da proteína IL22RA1 foi avaliada por citometria de fluxo, sendo extraído RNA da mucosa nasal e realizada PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction). Os indivíduos tiveram segmento de seis meses para avaliar recorrência ou persistência dos PNs. Os autores demonstraram a presença de IL22RA1 RNAm e a expressão de proteínas nas células do epitélio nasal e também concluíram que a falência do tratamento médico e cirúrgico na RSCcPN pode estar associado à diminuição da IL22RA1 (Tabela 10).

Tabela 10 - Expressão da proteína IL22RA1 na cultura de células do epitélio nasal

	Frequência (%)
RSCcPN	55
RSCsPN	100
Controles	100

Fonte: (Ramanathan Jr et al., 2007)

Endam et al. (2009) exploraram a associação dos polimorfismos no gene do *IL22RA1* com RSC. A eleição desse gene foi baseada em estudo prévio, por agrupamento de DNA (pGWAS), que o identificou como forte candidato para o desenvolvimento da RSC. Extraíu-se o DNA de 206 casos de RSC severa (com e sem pólipos nasais) e de 196 controles. Vinte e três SNPs foram identificados como prioridade e, posteriormente, genotipados individualmente, cinco do pGWAS e 18 do projeto internacional *HapMap*. Foi observada diferença significativa nas frequências dos alelos, entre os casos e controles, três SNPs, rs4292900, rs4648936 e rs16829225 (Tabela 11). Esse foi o primeiro estudo que mostrou a associação dos polimorfismos do gene *IL22RA1* com RSC, porém sem identificar a forma como isso pode desenvolver a patologia em questão.

Tabela 11 - Polimorfismos no gene *IL22RA1* com associação significativa na rinossinusite crônica após correção de Bonferroni

SNP	p	OR
rs4292900	0,0006	1,757
rs4648936	0,0011	1,716
rs16829225	0,0014	1,977

Fonte: (Endam et al., 2009).

SNP: single nucleotide polymorphism, p: valor de p, OR: odds ratio.

2.2 Papel da IL-22 na rinossinusite crônica

A interleucina 22 (IL-22), foi inicialmente descrita por Xie et al. (2000), como uma citocina produzida por células T ativadas. No trato respiratório, além de induzir elevação dos mecanismos de imunidade inata, pode inibir a diferenciação celular, ou aumentar sua proliferação, produzindo quimiocinas específicas, promovendo mobilidade celular e induzindo expressão de moléculas que amplificam suas ações intra e extracelularmente. Suas ações também estão descritas na pele, no sistema digestivo, pâncreas, fígado, rim e nas articulações (Sabat, Ouyang, Wolk, 2014).

A mediação dos efeitos celulares da IL-22 ocorre via complexo regulador heterodímero, composto por IL-22RA1 e receptor subunidade beta da IL-10 (IL-

10R2). Essa ligação ocorre em duas etapas, primeiro a IL-22 se liga à subunidade de seu receptor de alta afinidade IL-22RA1, e depois, à subunidade IL-10R2, sendo que esta última ligação promove a estabilização da primeira. O IL-22RA1 também pode ser usado como unidade receptora da IL-20 e IL-24 (Figura 1) (Sabat, Ouyang, Wolk, 2014). Por meio da ativação do mecanismo transdutor de sinal e ativador de transcrição *Janus Kinase 1/ Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT), principalmente o STAT 3, a IL-22 atua como citocina mediadora de resposta imune inata.

Figura 1 - Complexo receptor heterodímero IL-22RA1 - IL-10R2

Fonte: (Adaptado de Sabat; Ouyang; Wolk, 2014).

IL-22: Interleucina 22, **IL-20:** Interleucina 20, **IL-24:** Interleucina 24, **IL-22R1:** Receptor 1 da interleucina 22, **IL-10R2:** Receptor 2 da interleucina 10, **IL-20R2:** receptor 2 da interleucina 20, **IL-20R1:** Receptor 1 da interleucina 20, **IL-22BP:** Interleucina 22 binding protein, **JAK1:** Janus Kinase 1, **TYK2:** Tyrosine Kinase 2, **STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription, **MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase.

O *IL22RA1* é um gene codificador de proteína, membro da classe II da família de receptores de citocina, que participa de diversas atividades biológicas, e está localizado no cromossomo 1, na região p36.11 (GeneCards®: The Human Gene Database) (Figura 2).

Figura 2 - Localização do *IL22RA1* no cromossomo 1

Fonte: (GeneCards®: The Human Gene Database)

Até o momento ainda não está clara a forma como os polimorfismos do gene *IL22RA1* podem contribuir para o desenvolvimento da RSC. Sugere-se o envolvimento de mecanismos que levem à diminuição na produção de citocinas, beta defensinas e metaloproteinases (Endam et al., 2009). O aumento de resposta do padrão de resposta inflamatória Th2, em virtude da diminuição do Th1, também é descrito (Wolk et al., 2004). Ainda, pode ser considerada a desregulação do complexo heterodímero, que pela perda do estímulo do receptor de IL-20 e IL-24, poderia levar ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, 8 e TNF- α) e perda de apoptose, padrões estes vistos na RSC (Wang et al., 2002; Endam et al., 2009).

Assim, buscou-se, no presente estudo, identificar um dos fatores que possa contribuir para a fisiopatologia da RSC, verificando como o polimorfismo do *IL22RA1* pode se apresentar na manifestação da RSCcPN e RSCsPN, em comparação com indivíduos normais.

2.3 Métodos para sequenciamento de DNA

O método de Sanger foi desenvolvido na década de 70 por Frederick Sanger e colaboradores, por meio da interrupção controlada da replicação enzimática, e consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados

didesoxirribonucleotídeos, que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pelo DNA polimerase, após sua adição. Quatro misturas de reação são preparadas e os *primers* (iniciadores) utilizados são amplificados por DNA polimerase, e cada mistura de reação produz cadeias prematuramente terminadas, de acordo com toda ocorrência de um didesoxinucleotídeo adicionado. Cada mistura é, então, separada em gel (poliacrilamida desnaturante) de sequenciamento por eletroforese para se detectarem os nucleotídeos presentes na sequência do DNA lido (Berg, Tymoczko, Stryer, 2002). Essa técnica é considerada simples, todavia fica limitada à descoberta de substituições, pequenas inserções e deleções no DNA, sendo que mutações remanescentes necessitam de ensaios direcionados, tipo FISH (fluorescence insitu hybridisation) ou CGH (comparative genomic hybridisation) (Behjati, Tarpey, 2013). Já o método *Next Generation Sequencing* (NGS), pode ser usado para sequenciar genomas completos ou áreas de interesse específico. É um método de sequenciamento não seletivo, que pode descobrir novas mutações e genes causadores de doenças. Apresenta também a vantagem de ser mais rápido, quando comparado ao método de Sanger, podendo sequenciar um genoma inteiro em um único dia. Suas desvantagens estão implicadas na infraestrutura necessária, que exige computadores com alta capacidade e armazenamento, além de expertise dos técnicos para análise e interpretação dos dados, e também seu elevado custo operacional (Behjati, Tarpey, 2013).

3. *Objetivos*

Os objetivos deste estudo foram pesquisar a frequência dos polimorfismos no gene *IL22RA1* em pacientes portadores de RSCcPN e RSCsPN e em indivíduos normais, utilizando a técnica de sequenciamento pelo método de Sanger para análise de mutações, comparando os achados entre os três grupos. Também se buscou comparar as frequências dos polimorfismos encontrados no gene *IL22RA1* com a literatura médica, e ainda comparar a técnica utilizada para a análise de mutações (*Sanger*) com outras técnicas convencionais.

4. Casuística e Métodos

4.1 Pacientes

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Processo nº 5243/2011 (Anexo).

Foram selecionados 152 pacientes e controles no Ambulatório de Otorrinolaringologia do HCFMRP-USP, na faixa etária de 18 a 80 anos. De acordo com os critérios clínicos do *guideline* EPOS 2012, os pacientes foram classificados como portadores de RSC com ou sem PN. O primeiro grupo foi composto por 70 pacientes com diagnóstico de RSCcPN, com nasofibroscopia evidenciando presença de pólipos e classificação de Lund-Mackay maior ou igual a dois. O segundo grupo incluiu 14 indivíduos com RSCsPN, confirmada por nasofibroscopia. O terceiro grupo, controle, contou com 68 voluntários, sem parentesco com os grupos anteriores, ausência de sintomatologia nasal, e com nasofibroscopia normal. Para os dois primeiros grupos, foi aplicado um questionário contendo nome, idade, gênero, procedência atual e remota, histórias da moléstia atual e de tabagismo, de alergia sazonal e perene, asma e intolerância ao AAS (Apêndice A). Excluíram-se, nos três grupos, pacientes portadores de doença de Churg-Strauss, discinesia ciliar primária e fibrose cística.

Figura 3 - Caracterização da amostra

RSCcPN: rinossinusite crônica com pólipos nasais; **RSCsPN:** rinossinusite crônica sem pólipos nasais.

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta do sangue

Todos os casos e controles selecionados foram convidados a participar do estudo após esclarecimento dos procedimentos e objetivos do mesmo, forma de coleta, riscos e possível acesso aos resultados, de acordo o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Apêndice B). Daqueles que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE, foram coletados 5 ml de sangue venoso periférico em tubos estéreis contendo EDTA. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas e transportadas até o Laboratório de Genética Molecular no Hemocentro do HCFMRP-USP, sendo mantidas em geladeira a 8°C, até a extração do DNA.

4.2.2 Extração de DNA

O plasma foi extraído das amostras de sangue periférico, por centrifugação, a 2500 rpm por 10 minutos à 4°C. Após, o DNA também foi extraído das amostras, a partir do “buffy coat”, utilizando o *kit Gentra Puregene Blood Kit* (Quiagen). Inicialmente, foram acrescentados ao “buffy coat” 9 mL do tampão de lise de glóbulos vermelhos gelado (RBC Lysis Solution Buffer). Em seguida, a mistura foi homogeneizada por 15 minutos, em temperatura ambiente, e centrifugada a 3500 rpm durante 20 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ao *pellet* lavado foram adicionados 3 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (Cell Lysis Solution) e 15 µl de RNase A solution, seguidos de homogeneização em vórtex e incubação por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, acrescentou-se 1 ml de solução precipitante de proteínas e submeteu-se à agitação vigorosa por 30 segundos. A reação foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante límpido foi transferido para um tubo cônico Falcon de 15 mL, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e adicionados 3 ml de isopropanol absoluto. Após a homogeneização por inversão, centrifugou-se a 3500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* de DNA foram acrescentados

3 ml de etanol 70%, seguido de centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo com a amostra de DNA permaneceu por 5-10 minutos em temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Após, o DNA foi diluído em 200 mL de água Milli-Q estéril.

Na segunda etapa, o DNA foi avaliado quanto à sua concentração e pureza por meio da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro Nanodrop. O DNA absorve luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas, 280 nm. O DNA foi quantificado, diluído para a obtenção de uma alíquota de trabalho com concentração de 100ng/ul e, posteriormente, armazenado a -20°C. Na sequência, foi verificado quanto à sua qualidade, por meio da análise em gel de agarose 1%.

4.2.3 Amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Os sete exons do gene *IL22RA1* foram amplificados por PCR, sendo o último dividido em cinco sequências, devido ao seu tamanho, para facilitar a análise. A reação de polimerase em cadeia baseia-se na amplificação exponencial *in vitro* de um fragmento de DNA, delimitado por oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Para cada reação foram utilizados 1 µl de DNA (100ng/µl), 2,5 µl de Buffer 10X, 2,5 µl de DNTP, 1,25 mM, 1,0 µl de primer F 2,5 mM, 1,0 µl de primer R 2,5 mM, 1 U da enzima Taq Polimerase e água Milli Q q.s.p. O volume final da reação foi de 25 µl. Na primeira etapa da PCR, a fita dupla de DNA foi desnaturada (95°C). Em seguida, ocorreu o pareamento dos *primers* ao DNA desnaturado. A temperatura de *annealing* variou de acordo com os *primers* utilizados (Tabela 12) e foi otimizada para cada tipo de reação. A última etapa foi a extensão da fita, feita pela enzima DNA polimerase a 72°C. Essas três etapas foram repetidas por cerca de 35 ciclos, até atingir o *plateau* da reação (fase final da reação). O equipamento utilizado para as reações de PCR foi o termociclador Veriti (Life Technologies). Após a amplificação, o produto da reação foi checado em gel de agarose 1,5% para confirmação da amplificação e tamanho esperado do fragmento.

Tabela 12 - *Primers* utilizados para o sequenciamento dos *exons* do gene *IL22RA1* e temperatura de *annealing*

Regiões Amplificadas	Primers	Sequencia 5' - 3'	TA
Exon 1	IL22Ex1F	TCTGTGCACGGGAGAGTAGA	58° C
	IL22Ex1R	GGAGGTCTGACCACAGGGTA	
Exon 2	IL22Ex2F	CATACATGGGCAGGGTGAC	56° C
	IL22Ex2R	AAAGGAGGTGGGGTCAAGAG	
Exon 3	IL22Ex3F	ATCACCACGGTGACTTGGC	59° C
	IL22Ex3R	CACAGGGGCTCCAACTCA	
Exon 4	IL22Ex4F	TCTCCCTATCCCCAGCTACC	57° C
	IL22Ex4R	AGAGAAAGACCAGGGTGCAA	
Exon 5	IL22Ex5F	CTGTCCAATTCAGCACCTTG	56° C
	IL22Ex5R	CACCTTGTTACAGGGAGGA	
Exon 6	IL22Ex6F	AGCCTCACGCTTCCTTCTCT	56° C
	IL22Ex6R	GATGGCTCACCAGGGAGTT	
Exon 7.1	IL22Ex7.1F	ACTGTTGTCGTCCCTGCA	54° C
	IL22Ex7.1R	TGTCTGGCTGCCCTAAGTAG	
Exon 7.2	IL22Ex7.2F	CATAGCCTGTCCGAGATCA	55° C
	IL22Ex7.2R	TTGAGGGGCATAGGAGGAAG	
Exon 7.3	IL22Ex7.3F	AAGCTCAATTCCCATTTCTACGC	58° C
	IL22Ex7.3R	AGAGAAAGGCCACCTAACATG	
Exon 7.4	IL22Ex7.4F	TAAAGGTCAGCTTCAGAAAGAG	56° C
	IL22Ex7.4R	ATGGACGGGAAGGAGGTTG	
Exon 7.5	IL22Ex7.5F	CTCTCCTCAGTCCAGATCGA	59° C
	IL22Ex7.5R	GAAGCACCAAGCCTTTCCCAT	

TA = temperatura de *annealing*; F= Forward; R= Reverse

4.2.4 Sequenciamento de DNA

As amostras foram colocadas no sequenciador automático 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), que usa a metodologia de Sanger. Nas reações de sequenciamento foram utilizados: 1 µL do produto da reação de amplificação; 2 µL de *Big Dye Terminator* v3.1 Cycle; 2 µL de 5X *Sequencing Buffer* (Applied Biosystems); 0,01 µM de *primer* e água em quantidade suficiente para completar 10 µL. Os parâmetros das reações de sequenciamento foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos cada; após esse intervalo as amostras foram mantidas a 4°C. Em seguida o DNA foi precipitado com etanol e acetato de potássio 3M. Após esse procedimento, as amostras foram sequenciadas. O arquivo de saída do sequenciador é um cromatograma que contém a sequência e a qualidade das bases (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Cromatograma *Exon 5*: polimorfismo rs16829204 em homozigose **Figura 5** - Cromatograma *Exon 7*: polimorfismo rs17852648 em heterozigose

Para as análises dos resultados de sequenciamento foi utilizado o *software Mutation tasting*, em que os fragmentos obtidos a partir do sequenciamento capilar foram mapeados contra a sequência referência NM_021258 do *IL22RA1*. Já as análises dos polimorfismos, foram realizadas na base de dados *Ensembl 89*, na qual ao se inserir a identificação do SNP (p. ex. rs10903022), toda a descrição do gene é mostrada, apontando o tipo de variável (sinônima ou não sinônima), o aminoácido, o nucleotídeo, o alelo mutado, a localização no cromossomo, se há ou não citação na literatura e o índice da frequência do alelo menor (minor allele frequency - MAF).

5. Resultados

Foram analisadas 152 amostras, sendo 70 casos de RSCcPN, 14 RSCsPN e 68 controles. As características da população estudada se encontram descritas na Tabela 13. O sequenciamento identificou 10 polimorfismos no gene *IL22RA1*, localizado no cromossomo 1 (Tabelas 14 e 15).

Tabela 13 - Características da população estudada. Número de indivíduos, sexo, idade média, cor, presença de asma, tabagismo, teste alérgico positivo (prick test+) e intolerância ao AAS

	RSCcPN	RSCsPN	CONTROLES	TOTAL
INDIVÍDUOS	70	14	68	152
FEMININO	28	10	45	83
MASCULINO	42	04	23	69
IDADE MÉDIA	50,2	55,9	41,6	46,9
BRANCO	59	12	51	122
PARDO	01	0	13	14
MULATO	06	02	02	10
PRETO/NEGRO	04	0	01	05
AMARELO	0	0	1	1
ASMA	18	02	0	20
TABAGISMO	02	03	0	05
PRICK TEST +	25	04	N/A	29
INTOLERÂNCIA ao AAS	12	01	0	13

RSCcPN: rinossinusite crônica com pólipos nasal, **RSCsPN:** rinossinusite crônica sem pólipos nasal, **AAS:** Ácido Acetil Salicílico, **N/A:** não se aplica.

Tabela 14 - Caracterização dos polimorfismos encontrados no gene *IL22RA1*, demonstrando a posição no cromossomo 1, nucleotídeo, aminoácido, identificação, seu respectivo exon estudado, tipo de mutação e o índice MAF

POSIÇÃO	NUCLEOTÍDEO	AMINOÁCIDO	SNP ID	EXON	TIPO	MAF
24138623	c.135G>A	p.Pro45=	rs10903022	2	sinônima	0,47
24465221	c.113_114insA	p.Gln26Profs*11	não descrito	2	frameshift	N/D
24465218	c.74T>A	p.Leu25His	não descrito	2	não sinônima	N/D
24465165	c.141C>A	p.Gly47=	não descrito	2	sinônima	N/D
24134307	c.435A>C	p.Pro145=	rs17852649	4	sinônima	0,48
24128198	c.613G>A	p.Val205Ile	rs16829204	5	não sinônima	0,15
24123324	c.770C>T	p.Pro257Leu	rs142356961	6	não sinônima	<0,01
24121594	c.936C>T	p.Pro312=	rs17852648	7	sinônima	0,21
24121453	c.1077C>T	p.Val359=	rs34967816	7	sinônima	0,12
24120978	c.1552C>G	p.Arg518Gly	rs3795299	7	não sinônima	0,47

SNP ID: single nucleotide polymorphism identification, **MAF:** minor allele frequency, **G:** guanine, **A:** adenine, **T:** timina, **C:** citosina, **Pro:** prolina, **Gln:** glutamine, **Leu:** leucina, **His:** histidina, **Gly:** glicin, **Val:** valina, **Ile:** isoleucina.

Tabela 15 - Caracterização dos polimorfismos encontrados no gene *IL22RA1*, demonstrando o nucleotídeo, a citação na literatura, o impacto e os casos encontrados nos grupos rinossinusite crônica com pólipos e rinossinusite crônica sem pólipos e controle

NUCLEOTÍDEO	CITAÇÃO	IMPACTO	RSCcPN (70)		RSCsPN (14)		CONTROLE (68)	
			Ht	Ho	Ht	Ho	Ht	Ho
c.135G>A	SIM	SIP	5	4	1		9	
c.113_114insA	NÃO	PATOG.?	13		1		11	
c.74T>A	NÃO	SIP						1
c.141C>A	NÃO	SIP					1	
c.435A>C	SIM	SIP	20	33	5	6	35	21
c.613G>A	SIM	NÃO PAT				1		
c.770C>T	SIM	SIP	2					
c.936C>T	SIM	SIP	3				4	
c.1077C>T	SIM	SIP	1					
c.1552C>G	SIM	NÃO PAT		3			1	3

RSCcPN: rinossinusite crônica com pólipos nasais, **RSCsPN:** rinossinusite crônica sem pólipos nasais, **Ht:** heterozigose, **Ho:** homozigose, **G:** guanine, **A:** adenine, **T:** timina, **C:** citosina, **SIP:** sem informação de patogenicidade, **PATOG.?:** provavelmente patogênica, **NÃO PAT:** não patogênica.

A maioria dos polimorfismos encontrados (148 amostras) foi do tipo sinônima (rs10903022, c.141C>A, rs17582649, rs17852648 e rs34967816), ou seja, a variação na sequência não provoca mudança na codificação do aminoácido. Somente em 11 amostras foram identificadas variações do tipo não sinônima (c.74T>A, rs16829204, rs142356961 e rs3795299), nas quais ocorre troca de uma ou mais bases, resultando em uma sequência diferente do aminoácido, mas com seu comprimento preservado. Destas, apenas uma variante no exon 6, rs142356961, possuía o índice do alelo menor (MAF) inferior a 0,01. Esta alteração foi detectada em dois pacientes negros, portadores de PN. Também foram identificados três polimorfismos, que até o momento não foram descritos nas bases de dados genéticas pesquisadas (NCBI, Ensemble e Gene Cards): c.113_114insA/Q26Pfs*11, c.74T>A e 141C>A. O impacto dos polimorfismos foi pesquisado nos sistemas de predição UMD-Predictor, SIFT e na base de dados Clinvar. Não possuíam informação sobre patogenicidade os polimorfismos rs10903022, c.74T>A, c.141C>A, rs17852649, rs142356961, rs17852648 e rs34967816. Os polimorfismos rs16829204 e rs3795299 foram descritos como não patogênicos. A *frameshift* c.113_114insA/Q 26Pfs*11, provavelmente é patogênica, pois esta é uma característica das inserções.

Foi utilizado o teste exato de Fisher para evidenciar possíveis associações entre as variáveis estudadas. Primeiramente, considerando os grupos RSCcPN e controle em relação aos polimorfismos; em seguida, os grupos RSCsPN e controle, e por fim o RSCcPN e RSCsPN. Valores de p menores do que 0,05 evidenciaram associações entre as variáveis, com nível de significância de 5% (Apêndice C).

Tabela 16 - Análise estatística comparando as frequências dos alelos nos grupos rinossinusite crônica com pólipos nasais e controle, com os respectivos valores de p

		RSCcPN n(%)	Controle n%	Valor p
		70	68	
rs10903022 Ht	C/C	65 (92.9)	59 (86.8)	0.37
	C/T	5 (7.1)	9 (13.2)	
rs10903022 Ho	C/C	66 (94.3)	68 (100.0)	0.14
	T/T	4 (5.7)	0 (0.0)	
c.113_114insA/Q26Pfs*11	WT	57 (81.4)	57 (83.8)	0.88
	Ins A	13 (18.6)	11 (16.2)	
c.74T>A Ho	T/T	70 (100.0)	67 (98.5)	0.99
	A/A	0 (0.0)	1 (1.5)	
c.141C>A Ht	C/C	70 (100.0)	67 (98.5)	0.99
	C/A	0 (0.0)	1 (1.5)	
rs17852649 Ht	T/T	50 (71.4)	33 (48.5)	0.01
	T/G	20 (28.6)	35 (51.5)	
rs17852649 Ho	T/T	37 (52.9)	47 (69.1)	0.07
	G/G	33 (47.1)	21 (30.9)	
rs16829204 Ho	C/C	70 (100)	68 (100)	NA
	T/T	0	0	
rs142356961 Ht	G/G	68 (97.1)	68 (100.0)	0.49
	G/A	2 (2.9)	0 (0.0)	
rs17852648 Ht	G/G	67 (95.7)	64 (94.1)	0.97
	G/A	3 (4.3)	4 (5.9)	
rs34967816	C/C	69 (98.6)	68 (100.0)	1.00
	C/T	1 (1.4)	0 (0.0)	
rs3795299 Ho	G/G	67 (95.7)	65 (95.6)	1.00
	C/C	3 (4.3)	3 (4.4)	
rs3795299 Ht	G/G	70 (100.0)	67 (98.5)	0.99
	G/C	0 (0.0)	1 (1.5)	

RSCcPN: rinossinusite crônica com pólipos nasais, **n:** número de amostras, **Ht:** heterozigose, **Ho:** homozigose, **C:** citosina, **T:** timina, **A:** adenina, **G:** guanina, **WT:** *Wilde Type*.

Tabela 17 - Análise estatística comparando as frequências dos alelos nos grupos rinossinusite crônica sem pólipos nasais e controle, com os respectivos valores de p

		RSCsPN n(%)	Controle n(%)	Valor p
		14	68	
rs10903022 Ht	C/C	13 (92.9)	59 (86.8)	0.85
	C/T	1 (7.1)	9 (13.2)	
rs10903022 Ho	C/C	14 (100.0)	68 (100.0)	NA
	T/T	0	0	
c.113_114insA/Q26Pfs*11	WT	13 (92.9)	57 (83.8)	0.65
	Ins A	1 (7.1)	11 (16.2)	
c.74T>A Ho	T/T	14 (100.0)	67 (98.5)	1.00
	A/A	0 (0.0)	1 (1.5)	
c.141C>A Ht	C/C	14 (100.0)	67 (98.5)	1.00
	C/A	0 (0.0)	1 (1.5)	
rs17852649 Ht	T/T	9 (64.3)	33 (48.5)	0.44
	T/G	5 (35.7)	35 (51.5)	
rs17852649 Ho	T/T	8 (57.1)	47 (69.1)	0.58
	G/G	6 (42.9)	21 (30.9)	
rs16829204 Ho	C/C	13 (92.9)	68 (100.0)	0.38
	T/T	1 (7.1)	0 (0.0)	
rs142356961 Ht	G/G	14 (100.0)	68 (100.0)	NA
	G/A	0	0	
rs17852648 Ht	G/G	14 (100.0)	64 (94.1)	0.80
	G/A	0 (0.0)	4 (5.9)	
rs34967816	G/G	14 (100.0)	68 (100.0)	NA
	G/A	0	0	
rs3795299 Ho	G/G	14 (100.0)	65 (95.6)	0.98
	C/C	0 (0.0)	3 (4.4)	
rs3795299 Ht	G/G	14 (100.0)	67 (98.5)	1.00
	G/C	0 (0.0)	1 (1.5)	

RSCsPN: rinossinusite crônica sem pólipos nasais, **n:** número de amostras, **Ht:** heterozigose, **Ho:** homozigose, **C:** citosina, **T:** timina, **A:** adenina, **G:** guanina, **WT:** *Wilde Type*.

Tabela 18 - Análise estatística comparando as frequências dos alelos nos grupos rinossinusite crônica com e sem pólipos nasais, com os respectivos valores de p

		RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
		70	14	
rs10903022 Ht	C/C	65 (92.9)	13 (92.9)	1.00
	C/T	5 (7.1)	1 (7.1)	
rs10903022 Ho	C/C	66 (94.3)	14 (100.0)	0.82
	T/T	4 (5.7)	0 (0.0)	
c.113_114insA/Q26Pfs*11	WT	57 (81.4)	13 (92.9)	0.51
	Ins A	13 (18.6)	1 (7.1)	
c.74T>A Ho	T/T	70 (100.0)	14 (100.0)	NA
	A /A	0	0	
c.141C>A Ht	C/C	70	14	NA
	C/A	0	0	
rs17852649 Ht	T/T	50 (71.4)	9 (64.3)	0.83
	T/G	20 (28.6)	5 (35.7)	
rs17852649 Ho	T/T	37 (52.9)	8 (57.1)	1.00
	G/G	33 (47.1)	6 (42.9)	
rs16829204 Ho	C/C	70 (100.0)	13 (92.9)	0.37
	T/T	0 (0.0)	1 (7.1)	
rs142356961 Ht	G/G	68 (97.1)	14 (100.0)	1.00
	G/A	2 (2.9)	0 (0.0)	
rs17852648 Ht	G/G	67 (95.7)	14 (100.0)	1.00
	G/A	3 (4.3)	0 (0.0)	
rs34967816	G/G	69 (98.6)	14 (100.0)	1.00
	G/A	1 (1.4)	0 (0.0)	
rs3795299 Ho	G/G	67 (95.7)	14 (100.0)	1.00
	C/C	3 (4.3)	0 (0.0)	
rs3795299 Ht	G/G	70 (100.0)	14 (100.0)	NA
	G/C	0	0	

RSCcPN: rinossinusite crônica com pólipos nasais, **RSCsPN:** rinossinusite crônica sem pólipos nasais, **n:** número de amostras, **Ht:** heterozigose, **Ho:** homozigose, **C:** citosina, **T:** timina, **A:** adenina, **G:** guanina, **WT:** *Wilde Type*.

Na comparação entre os grupos RSCcPN e controle, somente o polimorfismo rs17852649 em heterozigose no exon 4, apresentou diferença estatística com o alelo mutado G, sendo mais frequente no grupo controle. Os polimorfismos rs10903022, c.113_114insA/Q26Pfs*11, rs17852649 em homozigose (G/G) e rs142356961 em heterozigose (G/A) foram mais frequentes no grupo com PNs, porém sem significância estatística (Tabela 16). Já nos grupos RSCsPN e controle, não se observou diferença estatística, somente o SNP rs16829204 em homozigose foi exclusivo do primeiro grupo (Tabela 17). Finalmente, comparando-se os grupos RSCcPN e RSCsPN, a inserção c.113_114insA/Q26Pfs*11 foi mais frequente no grupo com PNs. O mesmo ocorreu nos polimorfismos rs17852649 em homozigose, rs142356961, rs17852648, rs34967816 e rs3795299 em homozigose. Nenhuma das comparações do terceiro grupo atingiu valor de p estatisticamente significativo (Tabela 18).

6. *Discussão*

Grande parte dos estudos de associação em genética abordando RSC foca na imunidade inata agindo na sua fisiopatologia (Fokkens et al., 2012). Assim como este estudo, a maior parte deles é de gene candidato, ou seja, compara as frequências alélicas de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), em genes suspeitos de envolvimento com a doença, com o grupo controle. Porém, esses estudos têm fraco poder de associação, uma vez que os grupos são heterogêneos, e ainda não trazem novas informações, pois a seleção é realizada a partir do que se suspeita da doença (Hsu et al., 2013). Já o estudo de associação genômica ampla, o GWAS, é hipótese-livre, e analisa uma série de polimorfismos espalhados por todo genoma humano. Claro que isto implica em custos elevados e na necessidade de grandes coortes de pacientes (Bachert et al. 2014). A alternativa para reduzir custos seria o estudo por agrupamentos de DNA - *pool-based* GWAS (pGWAS), substituindo a genotipagem individual de DNA por agrupamentos genômicos (Fokkens et al., 2012).

Neste estudo, foram avaliadas 152 amostras, sendo 70 de portadores de RSCcPN, 14 RSCsPN e 68 controles. Houve número significativo de perdas da quantidade inicial, indicando a necessidade de padronização da coleta e do transporte até o laboratório. Devido às altas temperaturas para o pareamento, também ocorreu fragmentação das amostras, fato este que pode ser inerente à técnica empregada.

Em relação às características da população estudada, a idade média foi de 46,9 anos, com predomínio do sexo feminino (54,6%) contra 45,4% do masculino. Em relação à cor, intitularam-se brancos 75,3%, pardos 9,2%, mulatos 6,6%, pretos ou negros 3,3% e amarelo 0,65%. O percentual de pacientes portadores de asma atingiu 13,15%, sendo mais frequente nos portadores de PNs (90% dos asmáticos). Relataram tabagismo 3,3% dos indivíduos, com predominância no grupo RSCsPN. Apresentaram teste cutâneo alérgico positivo (Prick test) 19,1%; destes, 86% eram portadores de PN. Por fim, 8,55% relataram intolerância ao AAS, sendo 92,3% do grupo RSCcPN.

A eleição do gene *IL22RA1*, nesta pesquisa, foi baseada em um estudo que utilizou agrupamentos de DNA na identificação de polimorfismos relevantes no desencadeamento da RSC (Endam et al., 2009). Para o sequenciamento, no

presente estudo, foi utilizado o método de Sanger, pelo fato de ser o único gene elencado para estudo, por seu custo menor quando comparado ao NGS. Foram verificados dez SNPs, quatro no exon 2 (rs10903022, c.113_114insA/Q26Pfs*11, c.74T>A/L25H e c.141C>A), um no exon 4 (rs17852649), um no exon 5 (rs16829204), um no exon 6 (rs142356961) e três no exon 7 (rs17852648, rs34967816 e rs3795299).

O polimorfismo do exon 2 rs10903022 foi observado em 19 amostras, tanto em heterozigose quanto em homozigose. Somente o alelo mutado em homozigose foi mais frequente no grupo RSCcPN, quando comparado aos grupos controle (5,7%, $p=0,14$) e RSCsPN (5,7%, $p=0,82$). Porém, se trata de um polimorfismo do tipo sinônimo, ou seja, apesar de haver troca de bases, não há alteração na sequência do aminoácido. Também no exon 2 foi sequenciada uma variante por inserção de Adenina, a *frameshift* c.113_114insA/Q26Pfs*11, que até o momento não foi descrita na literatura. O alelo inserido foi mais frequente no grupo RSCcPN, quando comparado aos grupos controle (18,6%, $p=0,88$) e RSCsPN (18,6%, $p=0,51$). Este tipo de polimorfismo poderia sintetizar uma proteína não funcional, podendo contribuir para o desenvolvimento da RSC.

Outros polimorfismos, não descritos na literatura, foram encontrados no exon 2, c.74T>A (não sinônima) e c.141C>A (sinônima), porém somente nos controles e em baixa frequência (1,5%). O polimorfismo rs17852649 em heterozigose, presente no exon 4, foi o único que apresentou diferença estatística significativa ($p=0,001$), com predominância do alelo mutado no grupo controle (51,5%), quando comparado ao grupo RSCcPN, podendo indicar proteção contra o fenótipo. Todavia, não constam nas bases de predição UMD Predictor, Clinvar e SIFT, informações sobre patogenicidade deste polimorfismo.

O polimorfismo rs16829204, presente em homozigose no exon 5, foi exclusivo do grupo RSCsPN, tratando-se de uma variável não sinônima, em que a troca de base pode alterar a sequência do aminoácido. Entretanto, ao se pesquisar o impacto dessa variante nas bases de dado de predição, verificou-se que a mesma é descrita como não patogênica, ou seja, dificilmente contribuiria para o desenvolvimento da RSC. No exon 6, o polimorfismo rs142356961, do tipo não sinônimo, foi encontrado somente no grupo RSCcPN, sendo exclusivo na população negra. Os instrumentos

que avaliam a predição de patogenicidade da mutação ainda não demonstraram se ela é ou não patogênica. No exon 7, os SNPs rs17852648 e rs34967816 foram do tipo sinônimo, não apresentando relevância nas frequências em que foram encontrados. O polimorfismo rs3795299, apesar de ser do tipo não sinônimo, é descrito como não patogênico.

O estudo de Ramanathan et al. (2007) foi o primeiro a demonstrar diminuição da expressão do gene *IL22RA1* na RSC, quando comparado aos grupos sem pólipo e controle. Porém, os autores não explicaram a forma como isso ocorria. Somente Endam et al. (2009) identificaram os polimorfismos do gene *IL22RA1* como potenciais mecanismos causadores da RSC. A não concordância dos achados do presente estudo com os do estudo canadense, em que foi baseado (Endam et al., 2009), poderia ser atribuída ao fato de serem populações distintas, expostas a diferentes fatores ambientais e condições socioeconômicas adversas. Talvez os dados mais importantes deste estudo sejam a identificação de novas mutações no gene *IL22RA1*, ainda não descritas na literatura, com destaque para a *frameshift* c.113_114insA/Q26Pfs*11, que possivelmente é patogênica, e foi encontrada, em sua maioria, nos grupos com a doença. Outro achado significativo, o único com diferença estatística relevante, foi o polimorfismo rs17852649 em heterozigose, que poderia ser considerado como fator de proteção, já que o alelo mutado foi mais frequente no grupo controle.

Não há como correlacionar diretamente de que forma as mutações observadas neste estudo poderiam contribuir para o desenvolvimento da RSC com ou sem PNs. Sabe-se que a expressão de IL-22 se apresenta reduzida em pacientes com RSC, o que poderia resultar na redução da barreira epitelial e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias Th1. O desequilíbrio da inflamação entre Th1 e Th2 poderia contribuir para o desenvolvimento da RSC. Variações do gene *IL22RA1* podem prejudicar os mecanismos de imunidade inata, com diminuição de mediadores inflamatórios específicos. Pode haver, também, o comprometimento do complexo heterodímero com IL-10R2, IL-20 e IL-24, prejudicando a transdução de sinal e ativação de transcrição (JAK/STAT), com desregulação das citocinas pró-inflamatórias. Outro fator é que, muitas vezes, o SNP encontrado não está diretamente provocando a alteração procurada na doença, podendo estar em

desequilíbrio de ligação (LD) com a real variante causal. O SNP pode ainda estar associado com alterações na expressão do trato do *locus* quantitativo (eQTL), afetando a transcrição de outro gene envolvido na doença (Hsu et al., 2013).

Apesar do achado de alterações que possam acarretar mudanças na configuração proteica, houve baixa incidência dos polimorfismos encontrados. Estudos de replicação serão necessários, com coorte maior, para diminuir a possibilidade de que estes achados tenham sido ao acaso. Também urge a necessidade de mais pesquisas para definir o impacto dos polimorfismos na patogenia em questão.

7. Conclusões

Após análise dos resultados, concluiu-se que:

1. Os achados mais relevantes deste estudo foram os polimorfismos não descritos na literatura, com destaque para a *frameshift* c.113_114insA/Q26Pfs*11, possivelmente patogênica, e com associação positiva nos casos de RSCcPN. Também vale ressaltar o polimorfismo no exon 4, rs17852649, em heterozigose, com diferença estatística significativa, predomínio no grupo controle em relação ao grupo RSCcPN, podendo significar proteção contra este fenótipo. O polimorfismo rs142356961, no exon 6, do tipo não sinônima, ou seja, capaz de alterar a estrutura final da proteína, apresentou índice de frequência do alelo menor, MAF<0,01, sendo exclusiva em pacientes negros portadores de RSCcPN.
2. O estudo de Ramanathan et al. (2007) foi o primeiro a demonstrar diminuição da expressão do gene *IL22RA1* na RSC, quando comparado aos grupos sem pólipos e controle. Porém, os autores não explicaram a forma como isso ocorria. Somente na pesquisa de Endam et al. (2009), os polimorfismos do gene *IL22RA1* foram identificados como potenciais mecanismos causadores da RSC. A não concordância dos achados do presente estudo com os de Endam et al. (2009), poderia ser atribuída ao fato de serem populações distintas, expostas a diferentes fatores ambientais e a condições socioeconômicas adversas.
3. A técnica utilizada para sequenciamento neste estudo foi o método de Sanger, suficiente por se tratar de um único gen. Em caso de abordagens mais amplas, poderia ser utilizada a técnica *Next-Generation Sequencing* (NGS).

8. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas 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.

- Akdis CA, et al. Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALLdocument of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(6):1479-90.
- Alexiou A, et al. Nasal polyps: heredity, allergies, and environmental and occupational exposure. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;40(1):58-63.
- Anselmo-Lima WT, et al. Rhinosinusitis: evidence and experience. A summary. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;81(1): 8-18.
- Bachert C, et al. ICON: chronic rhinosinusitis. *World Allergy Organ J*. 2014;7(1):25.
- Bachert C, Akdis CA. Phenotypes and Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(4):621-8.
- Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98(6): 236-8.
- Benito Pescador D, et al. Genetic association study in nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012;22(5): 331-40.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002.
- Cho SH, Bachert C, Lockey RF. Chronic Rhinosinusitis Phenotypes: An Approach to Better Medical Care for Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(4):639-42.
- Chung Y, et al. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell Res*. 2006;16(11):902-7.
- Clinvar. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Acesso em: 06/03/2017
- Cohen NA, et al. Familial aggregation of sinonasal polyps correlates with severity of disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(4):601-4.
- Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol*. 2000;164(4):1814-9.
- Endam LM, et al. Polymorphisms in the interleukin-22 receptor alpha-1 gene are associated with severe chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;140(5):741-7.
- Fokkens WJ, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinology Suppl*. 2012;23:1-298.

GeneCards®: The Human Gene Database. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL22RA1>. Acesso em: 06/03/2017.

Halderman A, Lane A. Genetic and immune dysregulation in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Clin North Am*. 2017;50(1):13-28.

Hastan D, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe - an underestimated disease. A GA(2) LEN study. *Allergy*. 2011; 66(9):1216-23.

Hsu J, et al. Genetics of chronic rhinosinusitis: State of the field and directions forward. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):977-93, 993.e1-5.

J. Craig Venter Institute. SIFT. Disponível em: <http://sift.jcvi.org>. Acesso em: 05/07/2017.

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437(7063):1299-320.

Kosugi EM, et al. Interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism and nasal polyposis. *Rhinology*. 2009;47(4):400-4.

Kosugi EM, et al. Interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism in nasal polyposis and asthma. *Rhinology*. 2013;51(1):70-6.

Kotenko SV, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: The IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2725-32.

Lou H, et al. Cellular phenotyping of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology*. 2016;54(2):150-9.

Mfuna-Endam L, Zhang Y, Desrosiers MY. Genetics of rhinosinusitis. *Current allergy and asthma reports*. 2011 Jun;11(3):236-46.

Pilan RR, et al. Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. *Rhinology*. 2012;50(2):129-38.

Pleis JR, Ward BW, Lucas JW. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2009. *Vital Health Stat*. 2010;249:1-207.

Ramanathan M Jr, Spannhake EW, Lane AP. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is associated with decreased expression of mucosal interleukin 22 receptor. *Laryngoscope* 2007;117(10):1839-43.

Rugina M, et al. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. *Rhinology*. 2002;40(2):75-9.

Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22 - IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(1):21-38.

Sitarek P, et al. Association of the -14C/G MET and the -765G/C COX-2 gene polymorphisms with the risk of chronic rhinosinusitis with nasal polyps in a Polish population. *DNA Cell Biol*. 2012;31(7):1258-66.

Van Zele T, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy* 2006;61(11):1280-9.

Wang LF, et al. Matrix Metalloproteinase-2 gene polymorphisms in nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(8):852-6.

Wang LF, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms in nasal polyposis. *BMC Med Genet*. 2010;11:85.

Wang LF, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in recurrent chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Kaohsiung J Med Sci*. 2013;29(1):26-31.

Wang M, et al. Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *J Biol Chem*. 2002;277(9):7341-7.

Wang X, et al. Increased prevalence of chronic rhinosinusitis in carriers of a cystic fibrosis mutation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;131(3):237-40.

Wolk K, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*. 2004;21(2):241-54.

Xie, M H et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31335-9.

Zhang F, et al. Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway. *PLoS One*. 2011;6(5):e20382.

Zielinska-Blizniewska H, et al. Association of the -33C/G OSF-2 and the 140A/G LF gene polymorphisms with the risk of chronic rhinosinusitis with nasal polyps in a Polish population. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):5449-57.

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 31 de agosto de 2011

Ofício nº 3215/2011
CEP/MGV

Prezada Professora,

O trabalho intitulado **“ASSOCIAÇÃO GENÉTICA DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR ALFA 1 DA INTERLEUCINA 22 À RINOSINUSITE CRÔNICA COM POLIPOSE NASOSINUSAL”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 331ª Reunião Ordinária realizada em 29/08/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5243/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS datada de 21 de março de 2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª WILMA TEREZINHA ANSELMO LIMA
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

10. Apêndices

APÊNDICE A

QUESTIONÁRIO

PESQUISA SOBRE A ASSOCIAÇÃO GENÉTICA DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR ALFA- 1 DA INTERLEUCINA 22 À RINOSSINUSITE CRÔNICA COM E SEM POLIPOSE NASOSSINUSAL

Data: _____

I. Identificação

Nome do paciente: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Sexo: () feminino () masculino

Procedência atual: _____

Procedência remota: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

II História da moléstia atual

III. Antecedentes Pessoais

Tabagismo: () não () sim; _____ cigarros/dia, há _____

Alergia: () não () sim: _____

Asma: () não () sim: leve () moderada () grave ()

Patologias de base: () não () sim: _____

Cirurgias prévias: () não () sim: _____

IV. Antecedentes Familiares

V. Exame Físico

Oro:

Rino:

Oto:

VI. Exames complementares

Naso:

TC seios paranasais

Biópsia

Examinador: _____

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Bases genéticas da rinossinusite crônica com e sem polipose nasossinusal

Conforme resolução 196/96 – CNS/MS e o Conselho Nacional de Saúde sobre o termo de consentimento livre e esclarecido, você está sendo convidado a participar de um estudo clínico que envolve pesquisa. Entretanto, se você decidir participar, antes de você dar seu consentimento você deve ler as informações seguintes. Depois de ter lido atentamente as informações, você terá a oportunidade de fazer perguntas e discutir o estudo com seu médico, sua família ou amigos.

Objetivo e Desenho do Estudo:

Este estudo tem por objetivo correlacionar os achados de possíveis alterações genéticas da rinossinusite crônica com polipose nasal. Além disso, comparar estes achados com indivíduos sem esta doença, para um melhor entendimento do quadro e de suas formas de tratamento.

Método de Pesquisa:

Serão avaliadas e descritas todas as alterações decorrentes desta doença, através de aplicação de questionário, análise de exames complementares (tomografia computadorizada e nasofibroscopia), coleta de sangue dos voluntários, com posterior análise genética, bem como a resposta obtida com cada opção terapêutica empregada e os efeitos colaterais de cada tratamento realizado. Estas informações têm como única finalidade o conhecimento científico.

Possíveis danos, riscos e desconfortos pela participação no Estudo:

Os pacientes deste estudo serão submetidos a punção de sangue venoso para retirada do material, porém este procedimento não oferecerá qualquer desconforto, uma vez que o paciente estará sob anestesia geral. Entretanto, poderão surgir no local da punção pequenos hematomas.

Benefícios do Estudo:

Os benefícios aos participantes 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.

Direitos do paciente e retirada do Estudo:

A 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 este documento para comprovar que você deu seu consentimento em participar. 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.

Você receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e poderá pedir qualquer informação adicional, em qualquer momento durante o estudo.

Profª Drª. Wilma Terezinha Anselmo-Lima
Docente Departamento ORL FMRP-USP
Pesquisadora Responsável
Tel. (16) 3602-2863

Dra Vanessa Ramos Pires Dinarte
Médica Otorrinolaringologista
CRM 109244
Tel. (14) 34021704

- 1- Eu li o termo de consentimento livre e esclarecido deste estudo. Eu recebi uma explicação sobre a natureza, o objetivo, a duração e os efeitos e riscos imprevisíveis do estudo e o que se espera fazer. Minhas questões foram respondidas satisfatoriamente.
- 2- Eu entendo que minha participação no estudo é voluntária e que posso retirar-me do estudo em qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios que eu tenho direito.
- 3- Representantes do Comitê de Ética em Pesquisa ou de autoridades locais podem requisitar um exame dos meus registros médicos para verificar as informações coletadas, mantendo sempre o anonimato dos pacientes. Ao assinar este documento, eu dou permissão para esta revisão dos meus registros,

Último nome do Paciente: _____
(letra de forma)

Primeiro nome do Paciente: _____
(letra de forma)

Assinatura do paciente ou responsável

Data: _____
(manuscritos pelo próprio paciente no momento do consentimento)

Investigador/Pessoa que conduziu a Discussão do Consentimento Livre e Esclarecido

Eu confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, o objetivo do estudo ao paciente mencionado acima, respondendo a todas as suas questões relativas ao Estudo,

Último nome: _____ **Primeiro nome:** _____
(letra de forma) (letra de forma)

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE C

TABELAS COM AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Tabela 1 - Controle e rinossinusite crônica com pólipos nasais (RSCcPN)

Exon 2

rs10903022 Ht	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
C/C	59 (86.8)	65 (92.9)	0.37
C/T	9 (13.2)	5 (7.1)	

rs10903022 Ho	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
C/C	68 (100.0)	66 (94.3)	0.14
T/T	0 (0.0)	4 (5.7)	

c.113_114insA/Q26Pfs*11	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
Wild Type (WT)	57 (83.8)	57 (81.4)	0.88
Ins A	11 (16.2)	13 (18.6)	

c.74T>A/L25H Ho	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
T/T	67 (98.5)	70 (100.0)	0.99
A/A	1 (1.5)	0 (0.0)	

c.141C>A Ht	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
C/C	67 (98.5)	70 (100.0)	0.99
C/A	1 (1.5)	0 (0.0)	

Exon 4

rs17852649 Ht	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
T/T	33 (48.5)	50 (71.4)	0.01
T/G	35 (51.5)	20 (28.6)	

rs17852649 Ho	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
T/T	47 (69.1)	37 (52.9)	0.07
G/G	21 (30.9)	33 (47.1)	

Exon 5

rs16829204 Ho	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
C/C	68 (100)	70 (100)	NA
T/T	0	0	

Exon 6

rs142356961 Ht	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
G/G	68 (100.0)	68 (97.1)	0.49
G/A	0 (0.0)	2 (2.9)	

Exon 7

rs17852648 Ht	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
G/G	64 (94.1)	67 (95.7)	0.97
G/A	4 (5.9)	3 (4.3)	

rs34967816	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
C/C	68 (100.0)	69 (98.6)	1.00
C/T	0 (0.0)	1 (1.4)	

rs3795299 Ho	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
G/G	65 (95.6)	67 (95.7)	1.00
C/C	3 (4.4)	3 (4.3)	

rs3795299 Ht	Controle n(%)	RSCcPN n(%)	Valor p
n	68	70	
G/G	67 (98.5)	70 (100.0)	0.99
G/C	1 (1.5)	0 (0.0)	

Tabela 2 - Controle e rinossinusite crônica sem pólipos nasais (RSCsPN)
Exon 2

rs10903022 Ht	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
C/C	59 (86.8)	13 (92.9)	0.85
C/T	9 (13.2)	1 (7.1)	

rs10903022 Ho	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
C/C	68 (100.0)	14 (100.0)	NA
T/T	0	0	

c.113_114insA/Q26Pfs*11	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
WT	57 (83.8)	13 (92.9)	0.65
Ins A	11 (16.2)	1 (7.1)	

c.74T>A/L25H Ho	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
T/T	67 (98.5)	14 (100.0)	1.00
A/A	1 (1.5)	0 (0.0)	

c.141C>A Ht	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
C/C	67 (98.5)	14 (100.0)	1.00
C/A	1 (1.5)	0 (0.0)	

Exon 4

rs17852649 Ht	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
T/T	33 (48.5)	9 (64.3)	0.44
T/G	35 (51.5)	5 (35.7)	

rs17852649 Ho	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
T/T	47 (69.1)	8 (57.1)	0.58
G/G	21 (30.9)	6 (42.9)	

Exon 5

rs16829204 Ho	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
C/C	68 (100.0)	13 (92.9)	0.38
T/T	0 (0.0)	1 (7.1)	

Exon 6

rs142356961 Ht	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
G/G	68 (100.0)	14 (100.0)	NA
G/A	0	0	

Exon 7

rs17852648 Ht	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
G/G	64 (94.1)	14 (100.0)	0.80
G/A	4 (5.9)	0 (0.0)	

rs34967816	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
G/G	68 (100.0)	14 (100.0)	NA
G/A	0	0	

rs3795299 Ho	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
G/G	65 (95.6)	14 (100.0)	0.98
C/C	3 (4.4)	0 (0.0)	

rs3795299 Ht	Controle n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	68	14	
G/G	67 (98.5)	14 (100.0)	1.00
G/C	1 (1.5)	0 (0.0)	

Tabela 3 - Rinossinusite crônica com pólipos nasais (RSCcPN) e sem pólipos nasais (RSCsPN)

Exon 2

rs10903022 Ht	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
C/C	65 (92.9)	13 (92.9)	1.00
C/T	5 (7.1)	1 (7.1)	

rs10903022 Ho	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
C/C	66 (94.3)	14 (100.0)	0.82
T/T	4 (5.7)	0 (0.0)	

c.113_114insA/Q26Pfs*11	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
WT	57 (81.4)	13 (92.9)	0.51
Ins A	13 (18.6)	1 (7.1)	

c.74T>A/L25H Ho	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
T/T	70 (100.0)	14 (100.0)	NA
A /A	0	0	

c.141C>A Ht	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
C/C	70	14	NA
C/A	0	0	

Exon 4

rs17852649 Ht	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
T/T	50 (71.4)	9 (64.3)	0.83
T/G	20 (28.6)	5 (35.7)	

rs17852649 Ho	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
T/T	37 (52.9)	8 (57.1)	1.00
G/G	33 (47.1)	6 (42.9)	

Exon 5

rs16829204 Ho	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
C/C	70 (100.0)	13 (92.9)	0.37
T/T	0 (0.0)	1 (7.1)	

Exon 6

rs142356961 Ht	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
G/G	68 (97.1)	14 (100.0)	1.00
G/A	2 (2.9)	0 (0.0)	

Exon 7

rs17852648 Ht	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
G/G	67 (95.7)	14 (100.0)	1.00
G/A	3 (4.3)	0 (0.0)	

rs34967816	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
G/G	69 (98.6)	14 (100.0)	1.00
G/A	1 (1.4)	0 (0.0)	

rs3795299 Ho	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
G/G	67 (95.7)	14 (100.0)	1.00
C/C	3 (4.3)	0 (0.0)	

rs3795299 Ht	RSCcPN n(%)	RSCsPN n(%)	Valor p
n	70	14	
G/G	70 (100.0)	14 (100.0)	NA
G/C	0	0	