

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

IVNA MOTA PASSOS

**Influência dos inibidores de apoptose na resposta ao
Furoato de Mometasona em pacientes com
Rinossinusite Crônica com Pólipo Nasal**

**RIBEIRÃO PRETO
2022**

IVNA MOTA PASSOS

**Influência dos inibidores de apoptose na resposta ao
Furoato de Mometasona em pacientes com
Rinossinusite Crônica com Pólipo 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

2022

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

Passos, Ivna Mota

Influência dos inibidores de apoptose na resposta ao Furoato de Mometasona em pacientes com Rinossinusite Crônica com Pólipo Nasal. / Ivna Mota Passos; orientadora, Fabiana Cardoso Pereira Valera. - Ribeirão Preto, 2022.

95f.: 5il.

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. 2022.

1. Inibidores da apoptose. 2. Pólipo nasal. 3. Rinossinusite crônica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Ivna Mota Passos

Título: Influência dos inibidores de apoptose na resposta ao Furoato de Mometasona em pacientes com Rinossinusite Crônica com Pólipo Nasal.

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: _____

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família. Meus pais e irmãos, base do que sou hoje, que sempre me incentivaram e sempre estiveram e estarão ao meu lado, independentemente de qual caminho eu seguir.

Ao meu esposo, que me deu todo suporte para que eu pudesse desenvolver esse projeto, sendo um grande parceiro na realização deste sonho.

À minha Cacau, por me fazer companhia em tantas horas de estudo e escrita.

E por último e mais importante, à minha filha Maria Luíza, que é o combustível para minha energia, razão da minha felicidade e o grande motivo de eu estar sempre em busca pela excelência.

Agradecimentos

Agradeço a toda equipe que me auxiliou na elaboração deste estudo. Primeiramente, à Profa. Dra. Fabiana Pereira Cardoso Valera, pelo auxílio em todas as etapas. Sua dedicação, seu comprometimento e sua paciência como educadora, apontando sempre com precisão uma direção a seguir, são virtudes inquestionáveis.

Também agradeço a coorientação dos professores Wilma Terezinha Anselmo-Lima e Edwin Tamashiro, sempre oferecendo o suporte necessário e imprescindível para a realização desta pesquisa. 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 dos laboratórios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que auxiliaram na execução das etapas laboratoriais.

Agradeço aos meus familiares que abdicaram tantas vezes da minha companhia para que esse projeto pudesse acontecer e sempre me ofereceram apoio incondicional.

Apoio Financeiro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, cujo apoio financeiro foi imprescindível para a execução deste projeto.

Resumo

PASSOS, I. M. **Influência dos inibidores de apoptose na resposta ao Furoato de Mometasona em pacientes com Rinossinusite Crônica com Pólipo Nasal.** 95f. 2022. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2022.

Introdução: Os Inibidores da Apoptose (IAPs) podem interferir no processo inflamatório crônico, e auxiliar na formação da Rinossinusite Crônica com Pólipo (RSCcPN), ou interferir a susceptibilidade dos pólipos nasais ao tratamento clínico com corticoide tópico nasal; todavia estudos sobre o tema ainda são escassos na literatura. **Objetivos:** comparar a expressão dos IAPs entre pacientes com RSCcPN e indivíduos livres de doença, comparar a expressão dos IAPs entre pacientes com RSCcPN que obtiveram boa resposta ao corticoide tópico nasal e aqueles com resposta inadequada; e correlacionar a expressão dos IAPs a marcadores inflamatórios (clínicos e laboratoriais) em pacientes com RSCcPN. **Pacientes e Métodos:** Foram coletados dados clínicos dos pacientes com RSCcPN por meio de questionário de qualidade de vida - SNOT-22, realizadas medidas do escore endoscópico (Lund-Kennedy) e do escore tomográfico (Lund-Mackay). Foram colhidas amostras de pólipo nasal de pacientes com RSCcPN (sem vigência de tratamento clínico) e amostras de concha média dos controles para processamento. A expressão gênica dos IAPs (XIAP, BIRC2/IAP1 e BIRC3/IAP2) e das caspases (CASP3, CASP7, CASP9 e BCL2) foram medidos por qRT-PCR. As dosagens das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-5, IL-33, IL-10, IL-17 e TGF- β) foram medidas pelo método *Luminex*. A comparação entre o grupo de pacientes com pólipo nasal e os controles foi realizada por meio de testes paramétricos não-pareados. A análise de Componentes Principais (PCA) foi usada para correlacionar a expressão dos marcadores avaliados com a resposta ao corticoide tópico nasal nos pacientes com RSCcPN. **Resultados:** Foram encontradas menor expressão dos três genes IAPs e expressão significativamente maior das citocinas INF- γ , IL-5 e TGF- β nesses pacientes em comparação aos livres de doença. Ainda, observou-se que pacientes que responderam mal ao corticoide tópico tinham índices significativamente menor de BIRC2/IAP1 quando comparados aos que obtiveram melhor resposta. Ao se associar a expressão dos marcadores à resposta ao corticoide pelo método PCA, identificou-se que os marcadores BIRC2/IAP1, XIAP, BCL2, CASP9, IL-17 e IL-33 estiveram aumentados em pacientes com melhor resposta clínica, enquanto que CASP7 e TGF- β estiveram relacionados com pior resposta ao tratamento. **Conclusões:** Evidenciou-se inflamação com padrão misto (T1, T2 e T3) nos pacientes com RSCcPN, quando comparados aos controles. Estes dados sugerem que a diminuição dos IAPs seja um fator importante na fisiopatogenia da RSCcPN e na suscetibilidade ao tratamento clínico. Considerando que os IAPs modificam a cascata inflamatória inata, estes achados reforçam a importância do processo da imunidade inata como um elo essencial entre o ambiente, o epitélio e a cronificação do processo inflamatório, além de abrir novas perspectivas sobre a importância da barreira epitelial da mucosa nasossinusal na RSCcPN.

Palavras-chave: Inibidores da apoptose. Pólipo nasal. Rinossinusite crônica.

Abstract

PASSOS, I. M. **Influence of apoptosis inhibitors on the response to Mometasone Furoate in patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyp.** 95f. 2022. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2022.

Introduction: Inhibitors of Apoptosis (IAPs) can interfere with the chronic inflammatory process, and help in the formation of CRSwNP, or interfere with the susceptibility of nasal polyps to clinical treatment with nasal topical corticosteroids, however studies on the subject are still scarce in the literature. **Objectives:** to compare the expression of apoptosis inhibitors between patients with CRSwPN and disease-free individuals, compare the expression of apoptosis inhibitors between patients with CRSwPN who had a good response to nasal topical corticosteroids with those who had an inadequate response, and to correlate the expression of the inhibitors from apoptosis to inflammatory markers (clinical and laboratory) in patients with CRSwPN. **Patients and Methods:** Clinical data from patients with CRSwNP were collected through a quality of life questionnaire – SNOT-22, with measurements of the endoscopic score (Lund-Kennedy) and the tomographic score (Lund-Mackay). Nasal polyp samples were collected from patients with CRSwPN (without clinical treatment) and middle turbinate samples from controls for processing. The gene expression of apoptosis inhibitors (XIAP, BIRC2/IAP1 and BIRC3/IAP2) and caspases (CASP3, CASP7, CASP9 and BCL2) were measured by qRT-PCR. The dosages of pro-inflammatory cytokines (IFN- α , IL-5, IL-33, IL-10, IL-17 and TGF- β) were measured by the Luminex method. Comparison between the group of patients with nasal polyps and controls was performed using unpaired parametric tests. Principal Component Analysis (PCA) was used to correlate the expression of the markers evaluated here with the response to nasal topical corticosteroids in patients with CRSwPN. **Results:** We found lower expression of the three apoptosis inhibitor genes and significantly higher expression of the cytokines INF- γ , IL-5 and TGF- β in CRSwPN patients compared to disease-free patients. Furthermore, we observed that patients who responded poorly to topical corticosteroids had significantly lower rates of BIRC2/IAP1 when compared to those who responded better. By associating the expression of the markers with the response to steroids using the PCA method, we identified that the markers BIRC2/IAP1, XIAP, BCL2, CASP9, IL-17 and IL-33 were increased in patients with better clinical response, while CASP7 and TGF- β were related to worse response to treatment. **Conclusions:** Inflammation with a mixed pattern (T1, T2 and T3) was evidenced in patients with CRSwPN, when compared to controls. Our data suggest that the decrease in IAPs is an important factor in the CRSwPN pathophysiology and susceptibility to clinical treatment. Considering that IAPs modify the innate inflammatory cascade, the present findings reinforce the importance of the innate immunity process as an essential link between the environment, the epithelial and the chronification of the inflammatory process, in addition to opening new perspectives on the importance of the epithelial barrier of the inflammatory process nasosinusal mucosa in CRSwPN.

Keywords: Apoptosis inhibitors. Nasal polyp. Chronic Rhinosinusitis

Lista de Figuras

-
- Figura 1** - Fluxograma dos pacientes recrutados..... 45
- Figura 2** - Evolução de resposta clínica dos pacientes com RSCcPN após tratamento com Furoato de Mometasona, apresentando resposta individual de cada participante do estudo. **(A)** SNOT-22 (com diminuição significativa de $49,2 \pm 25,1$ para $33,3 \pm 27,7$, IC95%: -24,17;-7,53, $p < 0,001$); **(B)** escore endoscópico (com diminuição significativa de $7,4 \pm 2,9$ para $5,7 \pm 2,1$, IC95%: -2,3;-0,9, $p < 0,0001$). Análise estatística realizada por teste t de Student pareado..... 47
- Figura 3** - Comparação entre os grupos de pacientes com RSCcPN e controles, em relação aos genes BIRC2 **(A)**, BIRC3 **(B)** e XIAP **(C)**, evidenciando que os três genes foram significativamente menos expressos em pólipos nasais do que na mucosa nasal controle..... 48
- Figura 4** - Dendograma da clusterização e respectivo mapa de calor representado pelos sujeitos na vertical e variáveis na horizontal. Verde: *cluster 1* (sujeitos em destaque representam os controles). Vermelho: *cluster 2* 51
- Figura 5** - **(A)** Distribuição dos pacientes (círculos) e controles (quadrados) na projeção das componentes principais 1 e 2. Divisão dos participantes da pesquisa em dois *clusters*: Verde: *cluster 1* (que incluiu controles e pacientes com RSCcPN); Vermelho; *cluster 2* (composto apenas por pacientes com RSCcPN). **(B)** Análise de Componentes Principais (PCA). O gráfico bidimensional mostra apenas a projeção das variáveis (representadas como setas) nas componentes 1 e 2, destacando-se as relações entre elas. Há evidência de relação entre as variáveis XIAP, BIRC2, CASP 9, BCL2 e IL-17A com a componente 1, enquanto que a componente 2 relacionou-se com CASP3, IFN- γ , IL-5 e IL-10..... 52

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Genes avaliados, e referência de sonda TaqMan correspondente	41
Tabela 2 - Dados demográficos - pacientes do grupo de estudo	46
Tabela 3 - Genes inibidores da apoptose: comparação entre os pacientes com RSCcPN e controles, por meio do teste t de Student não pareado.....	48
Tabela 4 - Genes da caspase. Comparação entre os pacientes com RSCcPN e controles, por meio do teste t de Student não pareado	49
Tabela 5 - Concentração proteica das citocinas pró-inflamatórias. Comparação entre os pacientes com RSCcPN e controles, por meio do teste t de Student não pareado.....	49
Tabela 6 - Genes inibidores da apoptose. Comparação entre os pacientes bons e maus respondedores ao corticoide tópico, por meio do teste t de Student não pareado.....	50
Tabela 7 - Dados clínicos	53
Tabela 8 - Genes inibidores de apoptose, genes da caspase (ambos por PCR quantitativo) e concentração de citocinas (por Luminex). Comparação entre os grupos (<i>Cluster 1 vs. Cluster 2</i>), por meio do teste de Mann-Whitney.....	54

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

AINES-	Anti-inflamatórios não esteroides
CASP-	Caspase
CDC-	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cIAP1-	<i>Cellular IAP1</i>
cIAP2-	<i>Cellular IAP2</i>
DACC-	Doença Atópica do Compartimento Central
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos Intracelulares
DP-	Desvio padrão
DREA-	Doença Respiratória Exacerbada pela Aspirina e Anti-inflamatório não-esteroidal
EMA-	<i>European Medicines Agency</i>
EMT-	Transição epitélio-mesenquimal
EPOS-	<i>European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps</i>
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GA2LEN-	<i>Global Allergy and Asthma Network of Excellence</i>
GAPDH-	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GR-	Receptor de glicocorticoide
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HE-	Hematoxilina e Eosina
IAP-	Proteínas Inibidoras de Apoptose
IC-	Intervalo de confiança
ICAM-1-	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICAR-	<i>International Consensus Statement on Allergy and Rhinology</i>
IFN-γ-	Interferon-gama

IgE-	Imunoglobulina E
IIQ-	Intervalo interquartil
IL-	Interleucina
ILCs-	Células linfoides inatas
IRF-1-	<i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
LPS-	Lipopolissacárides
MAPK-	<i>Mitogen-Activated protein kinase</i>
MCP-1-	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
Med-	Mediana
mRNA-	RNA mensageiro
NF-κB-	<i>Nuclear factor-κB</i>
NO-	Óxido nítrico
NOD-	<i>Nucleotide-binding and oligomerization</i>
<i>P. aeruginosa-</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMPs-	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCA-	Análise de Componentes Principais
PCR-	Reação em Cadeia da Polimerase
pDCs-	Plasmacytoid dendritic cells
PRRs-	Superfamília de reconhecimento de padrões imunes inatos
ROS-	Espécies reativas de oxigênio
RQ-	Quantificação Relativa (<i>do inglês Relative Quantification</i>)
RSC-	Rinossinusite crônica
RSCcPN-	Rinossinusite Crônica com Pólipo Nasal
RSCsPN -	Rinossinusite Crônica sem Pólipo Nasal

RSFA-	Rinossinusite Fúngica Alérgica
S. aureus-	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAE-	<i>Staphylococcus aureus enterotoxin</i>
SNOT-22-	<i>SinoNasal Outcome Test</i>
TGF-β-	Fator de transformação do crescimento beta
TLR-	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-α-	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAF-	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factors</i>
TSLP-	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
XIAP-	<i>X-linked IAP</i>
ZO-1-	<i>Zonula occludens 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Rinossinusite crônica: impacto e classificação.....	21
1.2. Condições associadas	22
1.3. Fisiopatologia da RSCcPN.....	24
1.4. Inibidores de apoptose e RSCcPN.....	29
1.5. Manejo clínico com corticoide nasal.....	31
2. OBJETIVOS.....	35
3. PACIENTES E MÉTODOS	37
3.1. Aspectos éticos	38
3.2. Procedimentos para o grupo de estudo.....	38
3.3. Procedimentos para o grupo controle.....	40
3.4. Avaliação molecular	40
3.5. Análise histopatológica.....	42
3.6. Análise estatística	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Resultados moleculares	48
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8. ANEXOS	78
9. APÊNDICES	84

1- Introdução

1.1 Rinossinusite crônica: impacto e classificação

A Rinossinusite crônica (RSC) é um problema de saúde pública de grande importância e alta prevalência (BACHERT *et al.*, 2014; PILAN *et al.*, 2012). De acordo com o *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps* (EPOS) 2020, a prevalência mundial da RSC é entre 5 e 12% (FOKKENS *et al.*, 2020); e na cidade de São Paulo de 5,51% (PILAN *et al.*, 2012). Estima-se que a rinossinusite, seja ela aguda ou crônica, afete anualmente 12-15,2% da população adulta dos Estados Unidos, o que excede a prevalência de outras condições respiratórias comuns como rinite alérgica (8,9%), asma aguda (3,8%) e bronquite crônica (4,8%) (BHATTACHARYYA, 2010).

O impacto da RSC, muitas vezes, se estende além da região nasossinusal e pode ter efeitos profundos sobre o bem-estar funcional e a qualidade de vida geral (ORLANDI *et al.*, 2021). DeConde e Soler (2016) mencionaram que pacientes com RSC possuem escore de qualidade de vida médio semelhante ao de pacientes com asma moderada e doença renal crônica em hemodiálise, e pior qualidade de vida do que a de pacientes com doença arterial coronariana, doença de Parkinson e doença pulmonar obstrutiva crônica. Ainda, essa pior qualidade de vida acaba levando a alto impacto socioeconômico. São reportadas altas taxas de absenteísmo e presenteísmo por pacientes com RSC, uma vez que há maior prevalência dessa doença na idade produtiva (entre 18-65 anos) (BLACKWELL; COLLINS; COLES, 2002). Outro fator importante para a piora na qualidade de vida é a relação entre a RSC e a depressão. Estudos indicam taxa de prevalência de depressão em pacientes com RSC variando entre 9-26% (DAVIS *et al.*, 2005; WASAN *et al.*, 2007), frequência acima da taxa na população geral, que é de 5-10% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION -CDC, 2010)

Estimativas sugerem que, para a RSC, os custos totais são superiores a US\$ 30 bilhões por ano nos EUA, uma vez que os custos diretos (com assistência médica e medicamentos) variam entre US\$ 10 e 13 bilhões por ano e os custos indiretos (perda de produtividade daqueles que sofrem com a doença em si) estão contabilizados em US\$ 20 bilhões, principalmente devido ao presenteísmo, que é a diminuição da produtividade no trabalho (RUDMIK, 2017). Um estudo americano de

2009, descreveu que os gastos com saúde foram significativamente maiores em rinossinusite quando comparados a outras doenças como úlcera péptica, asma aguda e febre do feno (BHATTACHARYYA, 2010). Na Europa, Lourjisen, Fokkens e Reitsma (2020) encontraram custos diretos anuais de 1.501 euros por ano em um grupo de pacientes com Rinossinusite Crônica com Pólipo Nasal (RSCcPN), sendo especialmente às custas de consultas ambulatoriais, cirurgia endoscópica nasal e custos com hospitalização. Cabe salientar que à época do estudo, os imunobiológicos não haviam sido aprovados pelo EMA (European Medicines Agency). Foram descritos, também, os custos indiretos anuais de 5.659,28 euros devido a perda de produtividade por absenteísmo. Os pacientes faltaram ao trabalho em média $10,55 \pm 44,4$ dias/ano. Foi evidenciada redução na eficácia do trabalho por 34,9% dos pacientes.

Há dois principais consensos publicados recentemente sobre a RSC: o International Consensus Statement on Allergy and Rhinology (ICAR-RS-21) (ORLANDI *et al.*, 2021) e o EPOS 2020 (FOKKENS *et al.*, 2020). De acordo com ambos, a RSC é definida como uma doença inflamatória heterogênea e multifatorial da mucosa nasossinusal e clinicamente definida, em adultos, pela presença de dois ou mais sintomas; um dos quais deve ser bloqueio/obstrução/congestão nasal ou rinorreia (secreção nasal) anterior/posterior; associada à dor/pressão facial e/ou redução ou perda de olfato por mais de 12 semanas (FOKKENS *et al.*, 2020; ORLANDI *et al.*, 2016). Ainda, segundo o ICAR-RS-21, ela é subdividida, principalmente, em duas entidades conhecidas: RSCcPN e a Rinossinusite Crônica sem Pólipo Nasal (RSCsPN) (ORLANDI *et al.*, 2021), que será a classificação adotada no presente estudo.

1.2 Condições associadas

- Asma

A relação entre RSC e a asma é indiscutível. A prevalência de asma em pacientes com RSC é de cerca de 25%, em comparação à população geral, cuja prevalência é de 5% (SEYBT; McMANS; KOUNTAKIS, 2007). O grupo Global

Allergy and Asthma Network of Excellence (GA2LEN) estudou mais de 52.000 adultos entre 18 e 75 anos, concluindo que existe uma forte associação entre asma e RSC, mais forte do que a associação da RSC com a rinite alérgica (JARVIS *et al.*, 2012). A asma foi diagnosticada em 26% dos pacientes com RSCcPN, comparados a 6% dos controles (KLOSSEK *et al.*, 2005). Além disso, 7% dos asmáticos apresentaram pólipos nasais (THOMAS *et al.*, 2008).

A RSCcPN e asma compartilham ainda características semelhantes de inflamação e remodelamento. Esta associação tem sido confirmada por numerosas observações de alterações histopatológicas comuns, com indução da mesma célula efetora primária (eosinófilo) e dos mesmos mediadores inflamatórios comuns (ORLANDI *et al.*, 2021). Além disso, há estudos demonstrando que marcadores como a Interleucina 5 (IL-5) e IgE (Imunoglobulina E) para enterotoxina para *Staphylococcus aureus* (SAE - *Staphylococcus aureus enterotoxin*) no pólipos nasais estejam relacionados com maior coassociação à asma, confirmando a ideia de um distúrbio imunológico comum a uma via aérea unida (BACHERT *et al.*, 2010). Ainda, há evidências de que a presença de asma nos pacientes com RSC está relacionada a pior desfecho e maior chance de recorrência, inclusive com maior necessidade de reabordagem cirúrgica, seja para pacientes com RSCcPN, RSCsPN (SELLA *et al.*, 2020).

- DREA

A Doença Respiratória Exacerbada por Anti-inflamatório não-esteroidal (DREA) é uma doença inflamatória eosinofílica crônica do trato respiratório caracterizada pela presença de asma e RSCcPN e exacerbção dos sintomas por AINES (Anti-inflamatórios não esteroides), incluindo a aspirina (KOWALSKI *et al.*, 2019). De acordo com Makowska *et al.* (2016), a prevalência das reações respiratórias aos AINES foi maior nos pacientes com sintomas de RSC e asma nos últimos 12 meses, mas não foi associada à rinite alérgica. A prevalência da DREA em pacientes com RSCcPN em um centro de referência terciário foi de 16% (STEVENS *et al.*, 2017). Geralmente, os pacientes com DREA apresentam piores sintomas nasossinusais, maior extensão da doença à tomografia e maior recorrência

dos pólipos nasais após a cirurgia (KOWALSKI *et al.*, 2019; SELLA *et al.*, 2020; STEVENS *et al.*, 2017).

-Alergia

Alergia mediada por IgE tem sido uma entre as múltiplas etiologias sugeridas como relacionadas com a RSCcPN, uma vez que ambas as condições são altamente associadas à resposta T2 mediada. Níveis elevados de citocinas T2, como a IL-5 e interleucina 13 (IL-13), foram isolados nos tecidos de pólipos nasais, e a inflamação eosinofílica é comumente encontrada tanto na atopia quanto na RSCcPN. Essa associação indireta, no entanto, não é confirmada pela clínica direta em vários estudos (TANTILIPKORN *et al.*, 2020; WILSON; McMAINS; ORLANDI, 2014). De acordo com o ICAR-RS-21, a conclusão atual é que a associação entre alergia e RSCcPN ainda é contraditória (ORLANDI *et al.*, 2021), exceto para situações em que a alergia seja um fator causal importante, como na Rinossinusite Fúngica Alérgica (RSFA) e na Doença Alérgica do Compartimento Central (DACC) (FOKKENS *et al.*, 2020).

- Tabagismo

O tabagismo é também considerado um fator de risco para RSC, visto que o tabaco é tóxico à mucosa nasal, e que os poluentes e as toxinas da fumaça do cigarro são pró-inflamatórios e criam estresse oxidativo na mucosa (FOKKENS *et al.*, 2020). Hutson *et al.* (2021) estudaram o impacto do tabagismo nos sintomas de pacientes com RSC, baseados na avaliação do questionário de qualidade de vida SNOT-22, e encontraram significativa piora dos sintomas nos pacientes com tabagismo ativo, que apresentaram, em média, 10 pontos quando comparados aos não fumantes.

1.3 Fisiopatologia da RSCcPN

Mecanismos envolvendo clearance mucociliar, barreira epitelial, resposta

imune do hospedeiro (inata e adaptativa) e remodelamento tecidual funcionam de forma orquestrada e contribuem para a homeostase da mucosa nasal. Alterações em uma dessas fases, assim como do microbioma nasal, podem induzir inflamação crônica característica na RSC (STEVENSON *et al.*, 2015).

Atualmente, evidências sugerem que existem vários endótipos da RSC, com diferentes fisiopatologias e diversas formas de inflamação, que terminam em um dos fenótipos (RSCcPN ou RSCsPN) (CAO *et al.*, 2019; KÖENNECKE *et al.*, 2018; STEVENSON *et al.*, 2015). Além disso, diferentes perfis inflamatórios podem ser encontrados na própria RSCcPN, dependendo de doenças relacionadas, como asma brônquica, fibrose cística, discinesia ciliar e DREA (CAO *et al.*, 2019; KÖENNECKE *et al.*, 2018).

A RSCcPN é caracterizada pela desregulação do processo inflamatório, relacionado tanto à imunidade inata como adaptativa (CAO *et al.*, 2019; KÖENNECKE *et al.*, 2018; ORLANDI *et al.*, 2016; STEVENSON *et al.*, 2015). A inflamação por imunidade inata é a primeira resposta do sistema imunológico à infecção ou ao trauma de forma sistemática e padronizada, iniciada por membros dos receptores da superfamília de reconhecimento de padrões imunes inatos (PRRs) (ESTORNES; BERTRAND, 2015). Esses receptores detectam a presença de componentes microbianos conservados, que são comuns a vários organismos, mas diferentes do padrão humano, chamados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e/ou Padrões Moleculares Associados a Danos Intracelulares (DAMPs) (CAO *et al.*, 2019). A ligação desses padrões a seus respectivos receptores ativa as vias de sinalização da MAPK (Mitogen-Activated protein kinase) e do NF- κ B (nuclear factor- κ B) que, coletivamente, induzem a transcrição de genes que codificam vários mediadores de inflamação, tais como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda e peptídeos antimicrobianos. Outros PRRs atuam indiretamente, por meio da ativação de inflamassomas, que são responsáveis pela regulação da maturação proteolítica das citocinas pró-inflamatórias (ESTORNES; BERTRAND, 2015).

No caso da RSCcPN em pacientes caucasianos, células epiteliais produzem citocinas pró-inflamatórias de imunidade inata como TSLP (thymic stromal lymphopoietin), IL-25 e IL-33, que recrutam células linfoides inatas (ILCs) do tipo 2

para a mucosa nasossinusal. Por fim, as ILCs iniciam a produção de citocinas do tipo T2, como IL-5, IL-4 e IL-13 (MJÖSBERG *et al.*, 2011; SHAW *et al.*, 2013). As células ILC2 desempenham papel significativo na RSCcPN eosinofílica, sendo importante fonte produtora de citocinas do tipo T2 (NAGATA *et al.*, 2019). Dessa forma, as células epiteliais são induzidas a promover uma cascata pró-inflamatória que culmina na produção de uma variedade de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Essas moléculas, por sua vez, são capazes de recrutar células como eosinófilos, mastócitos, linfócitos T e neutrófilos (VALERA *et al.*, 2008). A interação de citocinas produzidas por células inflamatórias e estruturais leva ao processo inflamatório crônico e persistente da RSCcPN.

Acredita-se que o epitélio tenha um papel importante na fisiopatogênese da RSCcPN. As células epiteliais nasossinusais, além de secretar produtos antimicrobianos, formam uma barreira física, envolvendo *tight junctions*, *adherens junctions* e desmossomos, protegendo o tecido nasossinusal de danos causados por agentes patogênicos inalados, alérgenos e outros irritantes (KÖENNECKE *et al.*, 2018; STEVENS *et al.*, 2015). No entanto, em pacientes com RSC, estudos sugerem que esta barreira está comprometida, sendo reportadas reduções nos níveis de proteínas das *tight junctions*, ocludina-1 e *zonula occludens 1* (ZO-1) em pacientes com RSCcPN em comparação a controles saudáveis, o que leva à diminuição da resistência elétrica transepitelial (KÖENNECKE *et al.*, 2018; SOYKA *et al.*, 2012; STEVENS *et al.*, 2015) e a alterações no transporte iônico nos pólipos nasais (STEVENS *et al.*, 2015). Além disso, Valera *et al.* (2019) observaram que células basais de pacientes com RSCcPN possuem capacidade diminuída de regeneração epitelial, provavelmente por distúrbios de migração celular, sendo um dos mecanismos envolvidos chamado lamelipodia. Esse resultado sugere que a disfunção epitelial ocorre de forma mais abrangente na mucosa nasossinusal de pacientes com RSCcPN, o que pode, no final, auxiliar na perpetuação do processo inflamatório crônico.

Outro mecanismo que contribui para a fisiopatogênese da RSCcPN é a disfunção ciliar. Estudos histopatológicos evidenciaram que algumas regiões dos pólipos nasais não têm superfícies ciliadas, o que causa interrupção no fluxo de muco nas cavidades nasossinusais (CZERNY *et al.*, 2014). A mucosa nasossinusal

nos pacientes com RSCcPN apresenta metaplasia escamosa, e cílios anormais ou ausentes são frequentemente associados a essa alteração epitelial (LI *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013). A microscopia eletrônica confirmou cílios excessivamente densos, alongados e desordenados nesses pacientes (LI *et al.*, 2014).

Patógenos também podem afetar diretamente a barreira de células epiteliais nasossinusais. Foi demonstrado que o *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) rompe transitoriamente as proteínas das *tight junctions* (occludina e claudina-1) em células epiteliais nasais humanas cultivadas (NOMURA *et al.*, 2014). Além disso, verificou-se que o *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) e alguns fungos secretam substâncias que também podem lesar o epitélio por diminuição da expressão de ZO-1 em células epiteliais nasais humanas *in vitro* (STEVENS *et al.*, 2015). Proteases podem clivar diretamente as proteínas juncionais ou ativar receptores celulares que alterem o epitélio nasossinusal. Malik *et al.* (2015) observaram ruptura do epitélio e diminuição de expressão de ZO-1 em culturas de células nasossinusais diferenciadas após exposição delas a *S. aureus*, enquanto Valera *et al.* (2019) demonstraram diminuição de reparo celular das células basais de pólipos nasais após exposição a exoprodutos do *S. aureus*. A disfunção epitelial induzida por patógenos do epitélio nasossinusal facilita a infecção bacteriana, a colonização ou mesmo a formação de biofilme, potencializando a perpetuação da doença (STEVENS *et al.*, 2015).

Kawakami *et al.* (2021) avaliaram a atividade de células dendríticas e perfis de citocinas de células T no sangue periférico de pacientes com RSC eosinofílica, comparando a indivíduos livres da doença, e encontraram a capacidade diminuída de pDCs (plasmacytoid dendritic cells) (um dos três subtipos de células dendríticas) e proporção aumentada de fenótipos de células T no sangue periférico, sugerindo que esses fatores podem estar relacionados à patogênese da doença.

Atualmente, tem-se na eosinofilia da mucosa nasossinusal um marcador essencial da RSC para prognóstico da doença e um alvo terapêutico importante, a ponto do EPOS 2020 incluir a eosinofilia como critério maior para a classificação da RSCcPN (FOKKENS *et al.*, 2020). O estudo em amostras de tecidos com RSC com e sem pólipo nasal demonstrou que a eosinofilia tecidual era muito maior, em média, nos pólipos nasais, independente da atopia (FOKKENS *et al.*, 2020). Os pólipos

eosinofílicos ou edematosos são a forma mais comum de pólipos nasais na população caucasiana, na frequência de 65-90% dos pólipos totais (CAO *et al.*, 2019; KÖENNECKE *et al.*, 2018). No Brasil, Couto *et al.* (2008) evidenciaram que 73% dos pólipos estudados possuíam o perfil eosinofílico.

É característico dos pólipos eosinofílicos o aumento de citocinas do tipo T1 e T2 e inibição das *Tregs* (STEVENS *et al.*, 2015), o que leva ao aumento de eosinófilos no tecido nasossinusal e da atividade dos mastócitos e basófilos, provocando dano tecidual elevado e remodelamento (CAO *et al.*, 2019; KÖENNECKE *et al.*, 2018; ORLANDI *et al.*, 2016; STEVENS *et al.*, 2015). No entanto, a relação entre RSCcPN e eosinofilia da mucosa não é observada em pólipos asiáticos, em que pacientes com pólipos extensos apresentam franca neutrofilia no tecido (KÖENNECKE *et al.*, 2018; ORLANDI *et al.*, 2016; STEVENS *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2008). Apenas cerca de metade dos pacientes com RSCcPN na China e em outros países da Ásia Oriental mostram infiltrado eosinofílico com resposta imune típica T2 (CAO *et al.*, 2019; KÖENNECKE *et al.*, 2018; STEVENS *et al.*, 2015). Embora os efeitos patológicos da atividade dos eosinófilos na RSC não sejam completamente claros, sabe-se que a sua degranulação causa edema tecidual, descamação epitelial e remodelamento que termina por fibrose, como já foi bem relatado na mucosa pulmonar em pacientes com asma (FOKKENS *et al.*, 2020).

Estudos recentes demonstraram que a eosinofilia do tecido se correlaciona com resultado relativamente ruim, independente da presença ou ausência de pólipos, o que pode sugerir que essa célula seja um biomarcador de doença grave e recalcitrante, ou que medie pior prognóstico. Biomarcadores sistêmicos ou teciduais para RSC eosinofílica, por conseguinte, podem desempenhar papel clínico significativo (FOKKENS *et al.*, 2020), mesmo que na ausência de pólipos nasais (DELEMARRE *et al.*, 2020). Os eosinófilos são responsivos aos corticosteroides, o que pode explicar alguns dos efeitos terapêuticos dos corticoides na RSC. Um estudo recente, porém, utilizou o dexpramipexole, um medicamento anti-eosinófilo, em pacientes com RSCcPN, demonstrando redução em mais de 90% nos eosinófilos sanguíneos e nos pólipos nasais, porém essa redução nos eosinófilos não esteve associada à melhora significativa nos sintomas nasossinusais e nem nos

escores dos pólipos à endoscopia nasal, sugerindo que apesar de ser um marcador preditivo de gravidade da doença, os eosinófilos podem ser responsáveis apenas parcialmente na fisiopatologia da RSCcPN (LAIDLAW *et al.*, 2019).

A remodelamento tecidual é fundamental para a formação do pólipos nasal, histologicamente caracterizado por infiltrado celular inflamatório, formação de pseudocistos e edema em estroma com diminuição dos níveis de colágenos (MENG *et al.*, 2013). O comprometimento da fibrinólise causa deposição excessiva de fibrina no pólipos nasal e esse processo pode levar à retenção de proteínas plasmáticas. O extravasamento e o depósito dessas proteínas provocam o crescimento do pólipos em si. Essa malha de fibrina é estabilizada pelo fator de crescimento XIIIa, cujos níveis encontram-se aumentados em pacientes com RSCcPN (TAKABAYASHI *et al.*, 2013). Foi encontrado também desequilíbrio na formação e degradação da fibrina, que supostamente contribui para a formação do pólipos nasal (STEVENS *et al.*, 2015).

1.4 Inibidores de apoptose e RSCcPN

A RSCcPN tem também um componente proliferativo, portanto o atraso na cascata da apoptose poderia ser um importante fator para o desenvolvimento desta doença (KÜPPER *et al.*, 2014). As caspases desempenham papel importante na regulação da inflamação e da apoptose. Elas são ativadas por clivagem proteolítica de forma precursora (caspases 8 e 9) e efetora (caspases 3 e 7), que, por sua vez, é diretamente responsável pela morte celular. Küpper *et al.* (2014) observaram expressão significativamente menor das caspases 3 e 9 em pacientes com RSCcPN em comparação aos controles. Ainda, Fruth *et al.* (2012) relataram que na RSCcPN há aumento de expressão de survivina, uma proteína inibidora da apoptose, o que diminui a função da apoptose em tecidos da mucosa nasal.

Embora mais conhecido por sua capacidade de suprimir a apoptose por meio da inibição da caspase, estudos recentes têm destacado o papel crítico das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) em outros processos celulares (SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017). Entre as IAPs, a *cellular* IAP1 (cIAP1), *cellular* IAP2 (cIAP2) e a *X-linked* IAP (XIAP) têm sido apontadas como importantes reguladores

da sinalização celular, incluindo a inflamação (ROSCIOLI *et al.*, 2013; SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017). Esta função foi recentemente demonstrada pela capacidade dessas proteínas de ubiquitinação, um mecanismo molecular essencial que permite, não só regular as vias pró-inflamatórias clássicas importantes como o NF- κ B e MAPK, mas também controlar a ativação dos inflamassomas (ROSCIOLI *et al.*, 2013; SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017).

Sabe-se que XIAP, cIAP1 e cIAP2 são reguladoras positivas de respostas imunes mediadas pelos receptores NOD (nucleotide-binding and oligomerization), que são receptores importantes para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017). Estudos com camundongos com macrófagos deficientes de XIAP, cIAP1 e cIAP2 promovem ativação deficiente de NF- κ B e MAPK, e respondem pobremente à estimulação NOD1 e NOD2 em relação à inflamação (DAMGAARD *et al.*, 2012; SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017). Além disso, os IAPs podem permitir translocação do complexo associado ao MyD-88, complexo esse ativado pela TLR-4 (toll-like receptor), receptor que se liga a LPS (lipopolissacárides), e de TLR-2, receptor de lipoproteínas (CHEN *et al.*, 2015; TSENG *et al.*, 2010). As IAPs também regulam a imunidade adaptativa, seja por vias canônicas ou não-canônicas de sinalização de NF- κ B (SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017). Apesar da atuação da XIAP sobre a imunidade adaptativa ser controversa, a inibição de cIAP1 e cIAP2 leva à proliferação e diferenciação de linfócitos B e de células dendríticas (MÜLLER-SIENERTH *et al.*, 2011), e atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias (SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017). Além disso, a survivina exerce função vital no desenvolvimento e na maturação de células T (SHARMA; KAUFMANN; BISWAS, 2017). Essas descobertas abrem perspectivas interessantes para o futuro tratamento de doenças inflamatórias crônicas por meio da regulação dos IAPs. Exemplos são os estudos que demonstram que antagonistas de IAP são capazes de controlar a inflamação na sepse (CONTE *et al.*, 2006), em disfunções de barreiras endoteliais (HORNBURGER *et al.*, 2014) e artrite (MAYER *et al.*, 2011). Ainda, Roscioli *et al.* (2013) demonstraram, em um estudo *in vitro*, que as células epiteliais das vias aéreas inferiores possuem mecanismos endógenos que as tornam altamente resistentes à apoptose, devido às citocinas pró-inflamatórias relacionadas à asma, e

que a atividade da cIAP2 desempenha papel importante nessa resistência.

Em estudos prévios, o presente grupo de estudo demonstrou que o NF- κ B tem expressão aumentada na RSCcPN quando comparada à mucosa controle (VALERA *et al.*, 2008), e que pacientes com maiores níveis de NF- κ B apresentaram pior resposta ao tratamento clínico, com chance 3,5 vezes maior de serem submetidos à cirurgia por falha terapêutica ao tratamento com corticoide tópico (VALERA *et al.*, 2010). Essa base proporcionou um racional sobre a possibilidade de influência dos IAPs sobre a persistência do processo inflamatório crônico na RSCcPN, assim como na resistência da mesma ao corticoide tópico.

1.5 Manejo clínico com corticoide nasal

O objetivo do tratamento da RSC é o controle clínico da doença, alcançado quando os pacientes não apresentam sintomas ou quando estes são pouco incomodativos, mantendo a mucosa nasal saudável e de preferência com o uso da menor dose de medicamentos, para o mínimo de eventos adversos (FOKKENS *et al.*, 2020).

O tratamento padrão da RSCcPN é o uso de corticoide tópico (ORLANDI *et al.*, 2016). Existem evidências de alta qualidade de que essa classe de medicamento é eficaz e, nessa apresentação, segura para o tratamento prolongado da RSC. É comprovado que o corticoide tópico tem impacto nos sintomas nasossinusais e na melhor qualidade de vida dos pacientes, inclusive, reduzindo o tamanho dos pólipos na RSCcPN. No entanto, existe ainda uma significativa parcela de pacientes que persistem com sintomas e sinais de pólipos nasais, mesmo após tratamento otimizado (STJÄRNE *et al.*, 2006). A diferenciação adicional dos endótipos da RSCcPN pode ajudar a desenvolver novas estratégias terapêuticas que sejam adaptadas à respectiva classificação (KÖENNECKE *et al.*, 2018), assim como identificar os pacientes mais sugestivos a obterem boa resposta ao tratamento convencional.

Os corticoides tópicos mais recentes (mometasona, fluticasona e ciclesonida) não se mostraram mais efetivos que os antigos (budesonida, beclometasona, betametasona, triancinolona e dexamentasona) no controle dos sintomas e na

redução do tamanho do pólipo (ORLANDI *et al.*, 2021). Contudo, o risco de efeito sistêmico está relacionado à biodisponibilidade sistêmica do corticoide tópico nasal, sendo que o furoato de mometasona, o propionato de fluticasona e o furoato de fluticasona apresentam absorção sistêmica desprezível, quando comparados aos corticoides mais antigos, citados acima, que apresentam biodisponibilidade variando em 34-49%. Esse fato torna os medicamentos mais novos preferíveis em relação aos antigos (DERENDORF; MELTZER, 2008). Entre os possíveis eventos adversos com esses medicamentos, a epistaxe é o mais comum, juntamente com a irritação nasal, que no geral são bem tolerados pelos pacientes. Biópsias nasais não demonstram dano ao tecido, mesmo após o uso prolongado. Uma recente revisão sistemática sobre o perfil de segurança do uso de corticoides tópicos intranasais demonstrou que pacientes em uso dessa medicação têm maior risco de apresentarem epistaxe do que os do grupo controle (RR 1.56, IC: 95%, p:0,007). O mesmo estudo não encontrou alterações persistentes nos níveis de cortisol e na pressão intraocular (DONALDSON *et al.*, 2020).

Corticoides tópicos nasais inibem o recrutamento e o fluxo de células inflamatórias, pela redução da secreção de mediadores pró-inflamatórios durante a resposta inflamatória. Interferem na produção de leucotrienos e prostaglandinas, reduzem a secreção das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-13, IL-5, IFN- γ (Interferon-gama), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e a produção de proteína catiônica eosinofílica (CHONG NETO; ROSÁRIO; ROSÁRIO, 2010). Exemplos do efeito anti-inflamatório sobre as células incluem a inibição de IL-5, com consequente diminuição da sobrevivência dos eosinófilos e inibição do recrutamento de mastócitos na mucosa nasal (CHONG NETO; ROSÁRIO, C. S.; ROSÁRIO, N. A., 2010).

Ainda, sabe-se que corticoides têm efeitos diretos sobre a apoptose de eosinófilos e neutrófilos humanos (ZHANG *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* revelaram que o Furoato de Mometasona aumenta a apoptose em eosinófilos humanos, e tem efeito contrário sobre os neutrófilos humanos, ambos de forma diretamente dependentes à concentração da mometasona (ZHANG *et al.*, 2002). Esses achados demonstram que os corticoides atuam como importantes moduladores da resposta inflamatória, diminuindo a resposta T2 e direcionando-a para uma resposta inflamatória T1.

Um estudo italiano avaliou a recorrência do pólipó nasal, em longo prazo, e encontrou taxas em 5 e 10 anos de 30,29% e 66,06%, respectivamente, e sobrevida média livre de recorrência de 106 meses. Além disso, asma e DREA representaram preditores de múltiplas recorrências, sendo o corticoide intranasal o principal tratamento para prevenir recidivas. Foi observado também que os pacientes que apresentavam citologia com infiltrado de neutrófilos ou eosinófilos (100% e 88% dos casos, respectivamente) apresentaram maior probabilidade de recidiva em 10 anos do que aqueles com citologia normal (59% dos casos), o que sugere que a citologia nasal pode identificar indivíduos com maior risco de recorrência precoce (RIVA *et al.*, 2022).

Wang, Yang e Chen (2021) estudaram as alterações histopatológicas, comparando pacientes com RSCcPN com recorrência a outros com RSCcPN, mas sem recorrência. Os autores relataram que, no grupo com recorrência da doença, foram observadas contagens médias e proporção significativamente maiores de eosinófilos e neutrófilos, bem como maior contagem de células inflamatórias totais e quantidade significativamente maior de edema subepitelial. Assim, sugeriram que a recorrência está associada ao maior grau inflamatório (principalmente eosinofílico e neutrofílico). Por fim, Brescia *et al.* (2021) avaliaram a contagem de eosinófilos e basófilos no sangue de pacientes com RSCcPN eosinofílica, comparando os pacientes com doença recorrente aos sem recorrência, e encontraram taxas maiores tanto de eosinófilos quanto de basófilos sanguíneos naqueles que apresentaram recorrência.

Os corticoides também são a base para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas em geral, sendo os inalatórios amplamente utilizados em doenças das vias aéreas por seus efeitos anti-inflamatórios, e são considerados padrão-ouro para o tratamento da asma, porém sabe-se que estes fármacos não funcionam bem em algumas populações de pacientes, especialmente em asmáticos graves, sugerindo a existência de susceptibilidade reduzida em alguns grupos. Essa susceptibilidade pode ser influenciada por múltiplos fatores que incluem: nível local de corticoide no tecido, número de subtipos de receptores de corticoide (GR) disponíveis, afinidade do receptor e regulação das vias de sinalização de corticoide, sendo cada um deles possivelmente influenciado por polimorfismos genéticos. Além

desses fatores, já conhecidos, acredita-se que ainda existam mecanismos desconhecidos que contribuem para a resposta final aos corticoides (BOARDMAN *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2015; PAPI *et al.*, 2013; TREVOR; DESHANE, 2014).

Até o momento, sabe-se que a resistência aos corticoides na doença crônica das vias aéreas é, em grande parte, devida à ativação alterada do GR pela atividade da quinase *upstream*, ativação aumentada de AP-1 (proteína ativadora-1), NF- κ B, IRF-1 (Interferon Regulatory Factor 1). Mecanismos independentes da resposta Th2 também tendem a estar envolvidos neste processo (BOARDMAN *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2015; PAPI *et al.*, 2013; TREVOR; DESHANE, 2014)

Valera *et al.* (2009) avaliaram o efeito da budesonida tópica em pacientes com RSCcPN e demonstraram que pacientes que responderam pior ao corticoide tópico, em questão, apresentavam, antes do tratamento, níveis mais altos de IL-1 β , ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) e NF- κ B, o que sugere que esses fatores podem estar associados à resistência primária aos corticoides em pólipos nasais. O mesmo estudo revelou que pacientes respondedores fracos ao corticoide apresentavam maior expressão de IL-1 β e GR- β após o tratamento. Essa maior expressão de GR- β apenas após o tratamento pode representar um mecanismo secundário de resistência da RSCcPN aos corticoides.

Assim, a avaliação de fatores que contribuem para os diferentes padrões inflamatórios da RSCcPN e de mecanismos que induzem a resistência intracelular ao corticoide é altamente desejada, com o intuito de se buscar a melhor estratégia terapêutica. Nesse sentido, os IAPs podem ter uma participação importante tanto na fisiopatogenia da RSCcPN como na resistência ao corticoide em pólipos nasais, embora esse fato nunca tenha sido abordado em literatura. Além disso, o estudo do efeito dos IAPs sobre a resistência ao corticoide em pólipos nasais poderia ter impacto no seu papel sobre o tratamento da RSCcPN, ou permitir espaço para outras modalidades terapêuticas.

2. Objetivos

Foram objetivos do presente estudo:

- Comparar a expressão dos IAPs entre pacientes com RSCcPN e pessoas sem RSC;
- Comparar a expressão dos IAPs entre pacientes com RSCcPN que obtiveram boa resposta ao corticoide tópico e os que apresentaram resposta inadequada ao mesmo;
- Correlacionar a expressão dos IAPs a marcadores inflamatórios (tanto clínicos como laboratoriais) em pacientes com RSCcPN.

3. Pacientes e Métodos

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo 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), Processo nº 62763316.7.0000.5440 (Anexo A).

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos e abaixo de 60 anos, que faziam seguimento no Ambulatório de Rinossinusologia do HCFMRP-USP, com o diagnóstico de RSCcPN. Foram critérios de inclusão a presença de ao menos três meses de sintomas e sinais sugestivos de RSC, entre eles rinorreia anterior e/ou posterior, alterações do olfato, obstrução/congestão nasal e cefaleia/dor em face, além de alterações compatíveis com RSC à endoscopia nasal ou tomografia dos seios da face, de acordo com os critérios do EPOS 2012 (FOKKENS *et al.*, 2012). Foram excluídos pacientes que estivessem em uso de qualquer medicamento para a doença no mês anterior ao recrutamento (incluindo corticoide tópico, corticoide sistêmico, anti-histamínicos e antibióticos do tipo macrolídeos), rinossinusites unilaterais, pacientes com doenças associadas (como discinesia ciliar, fibrose cística ou Churg-Strauss), pacientes com RSCsPN e aqueles com suspeita de tumores nasossinusais. Para o grupo controle, foram incluídos pacientes que não possuíam sintomas nasais e que estavam em seguimento no Ambulatório de Estética Nasal do HCFMRP-USP, para serem submetidos a rinoplastias. Foram excluídos deste grupo pacientes com doenças sistêmicas, principalmente as inflamatórias relacionadas à eosinofilia, como asma, rinite alérgica ou dermatite atópica.

Os pacientes com avaliação clínica compatível com os quadros acima foram convidados para a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) antes de serem submetidos aos procedimentos abaixo.

3.2 Procedimentos para o grupo de estudo

Os pacientes do grupo de estudo - RSCcPN - foram submetidos a:

1. Questionário de qualidade de vida específico para doenças

nasossinusais - SNOT-22 (SinoNasal Outcome Test), validado para o português (KOSUGI *et al.*, 2011). O questionário é composto por 22 perguntas, que envolvem os sintomas da doença e o impacto deles na qualidade de vida (Anexo B). O paciente dá uma nota de 0-5 para cada pergunta, sendo 0 o menor, e 5 o maior impacto possível. O escore final varia de 0 até 110 pontos. Considerando que os pacientes seriam, após, submetidos a tratamento clínico, e que estudos anteriores identificaram como 9 o valor mínimo clinicamente relevante de melhora clínica (CHOWDHURY *et al.*, 2017), indivíduos com escore de SNOT-22 igual ou menor do que 9 foram excluídos do estudo.

2. Exame de endoscopia nasal, durante o qual foram observados os sinais de RSCcPN, seguido da graduação de acordo com o escore de Lund-Kennedy (FOKKENS *et al.*, 2020). Esse escore avalia a presença de pólipos, edema e secreção em cada fossa nasal e atribui a cada alteração dessas uma pontuação. No preparo à endoscopia, foi utilizado algodão embebido com lidocaína e vasoconstrictor tópicos nasais.
3. Durante o exame endoscópico, foram colhidas duas biópsias do pólipo nasal, uma que foi armazenada em formol para confirmação anatomopatológica e contagem de células inflamatórias no tecido, e outra que foi colocada em *RNA later* e mantida a -80°C para posterior processamento e análise de RNA e proteínas. Para a coleta das biópsias, foram utilizadas pinças saca-bocados. Ambos os procedimentos (exame endoscópico e biópsia) foram realizados em caráter ambulatorial, durante a rotina do serviço.
4. Tomografia computadorizada de seios da face, para estadiamento de pacientes com RSCcPN. Foi utilizada a escala de Lund-Mackay (LUND; MACKAY, 1993), pela qual avaliados os achados de comprometimento tomográfico nasossinusal. Essa escala leva em consideração o acometimento de cada seio paranasal e do complexo ostio-meatal,

atribuindo uma nota que varia de 0-2 pontos para cada região em cada fossa nasal. O total da pontuação vai de 0 a 24 pontos, sendo o valor mais alto correspondente à maior extensão da doença. Neste critério não houve pontuação mínima para inclusão no estudo.

Após a avaliação inicial, os pacientes com RSCcPN receberam Furoato de Mometasona e foram orientados a fazer uso desse tratamento na dose de quatro jatos por narina/dia, por 60 dias. No retorno de 60 dias, após confirmação que os pacientes haviam utilizado o medicamento oferecido, eles foram submetidos a novo questionário clínico de SNOT-22 e à nova endoscopia nasal, para novo estadiamento, de acordo com a rotina citada acima.

3.3 Procedimentos para o grupo controle

Os pacientes, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram submetidos à endoscopia nasal durante o procedimento cirúrgico (rinoplastia), sob anestesia geral. Nesse momento, confirmava-se a ausência de alterações e sinais de doenças nasossinusais e era realizada biópsia da região anterior da concha média, com saca-bocados, após vasoconstricção tópica local. A amostra foi colocada em *RNAlater*, armazenada a -80°C e, posteriormente, realizado o estudo de RNA e proteínas.

3.4 Avaliação molecular

Todas as amostras foram colhidas em tubos plásticos estéreis e livres de RNases, submersas em *RNAlater* e enviadas para o Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), onde ficaram armazenadas a -80°C . Para o transporte, as regras de biossegurança e de conservação das amostras foram cumpridas, garantindo a integridade das mesmas.

O RNA e a proteína totais das amostras colhidas foram extraídos com o *kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do

fabricante. Durante o processo de extração, houve tratamento com DNA-free DNA *Removal Kit* (Invitrogen) para eliminar contaminação por DNA genômico. Posteriormente, o RNA total foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop2000c (Thermo Scientific) e armazenado.

O cDNA foi sintetizado com 300 ng de RNA total utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foi realizado o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real no equipamento ViiA7 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) para análise da expressão relativa do mRNA (RNA mensageiro). Os genes avaliados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Genes avaliados, e referência de sonda TaqMan correspondente

Gene	Sonda TaqMan correspondente
<i>BIRC2</i>	Hs01112284_m1
<i>BIRC3</i>	Hs00985031_g1
<i>XIAP</i>	Hs00745222_s1
<i>CASP3</i>	Hs00234387_m1
<i>CASP7</i>	Hs 00169152_m1
<i>CASP9</i>	Hs00962278_m1
<i>BCL2</i>	Hs04986394_s1
<i>GAPDH*</i>	Hs02786624_g1
<i>ACTB*</i>	Hs01060665_g1
<i>B2M*</i>	Hs00187842_m1

*= genes de referência endógenos; **BIRC2**= Baculoviral IAP repeat-containing protein 2; **BIRC3**= Baculoviral IAP repeat-containing protein 3; **XIAP**= E3 ubiquitin-protein ligase XIAP; **CASP3**= Caspase-3; **CASP7**= Caspase-7; **CASP9**= Caspase-9; **Bcl-2**= Apoptosis regulator Bcl-2; **GAPDH**= Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; **B2M**= Actin, cytoplasmic 1; **Beta-2**= microglobulin.

No entanto, o gene GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) não amplificou adequadamente em todas as amostras, e foi excluído por não ter sido considerado um bom gene endógeno para as amostras analisadas. Assim foram usados, como genes de referência para as análises, os genes *ACTB* (Hs01060665_g1) e *B2M* (Hs00187842_m1).

A eficiência das sondas TaqMan foi de 90 a 110%. As reações de amplificação (com volume final 10 μ L) foram realizadas em duplicata, utilizando os seguintes reagentes: 5 μ L TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 μ L sonda de hidrólise TaqMan 20X (Applied Biosystems), 4,5 μ L cDNA diluído 1:5. As duplicatas com desvio padrão maior que 0,21 foram repetidas em experimento subsequente. Cada reação de amplificação ocorreu com os seguintes parâmetros: um ciclo de 50°C por 2 minutos, um ciclo de 95°C por 20 segundos, 40 ciclos de 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos. A quantificação foi calculada pelo programa *Thermo Fisher Cloud Software* (Life Technologies Corporation), utilizando-se o índice “*Quantificação Relativa*” (RQ) (do inglês *Relative Quantification*).

As proteínas totais das amostras foram quantificadas pelo método de Bradford. Foi realizada a análise de Luminex para as citocinas IFN- γ , IL-5, IL-33, IL-10, IL-17 e TGF- β (fator de transformação do crescimento beta), seguindo as normas recomendadas pelo fabricante (Merck®). Foi utilizado o equipamento Luminex 200 para o ensaio, e os resultados foram mensurados nos *Softwares* Luminex Xponent e Miliplex Analyst.

3.5 Análise histopatológica

Cortes histopatológicos de tecido foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e examinados quanto à presença de metaplasia da mucosa, edema, fibrose e infiltrado inflamatório. As áreas representativas foram selecionadas aleatoriamente para a contagem de eosinófilos e expressas em número por campo de ampliação 400x usando um microscópio Zeiss Primo Star. Os dados foram obtidos em exames histopatológicos de rotina. Dois patologistas (um residente e um médico sênior) avaliaram as seções em dois momentos distintos.

3.6 Análise estatística

A expressão dos IAPs e a expressão das caspases foram comparadas entre os dois grupos: pacientes com RSCcPN e controles. Como a distribuição dos

resultados nos dois grupos passou no teste de normalidade, foram aplicados testes paramétricos não pareados para este estágio.

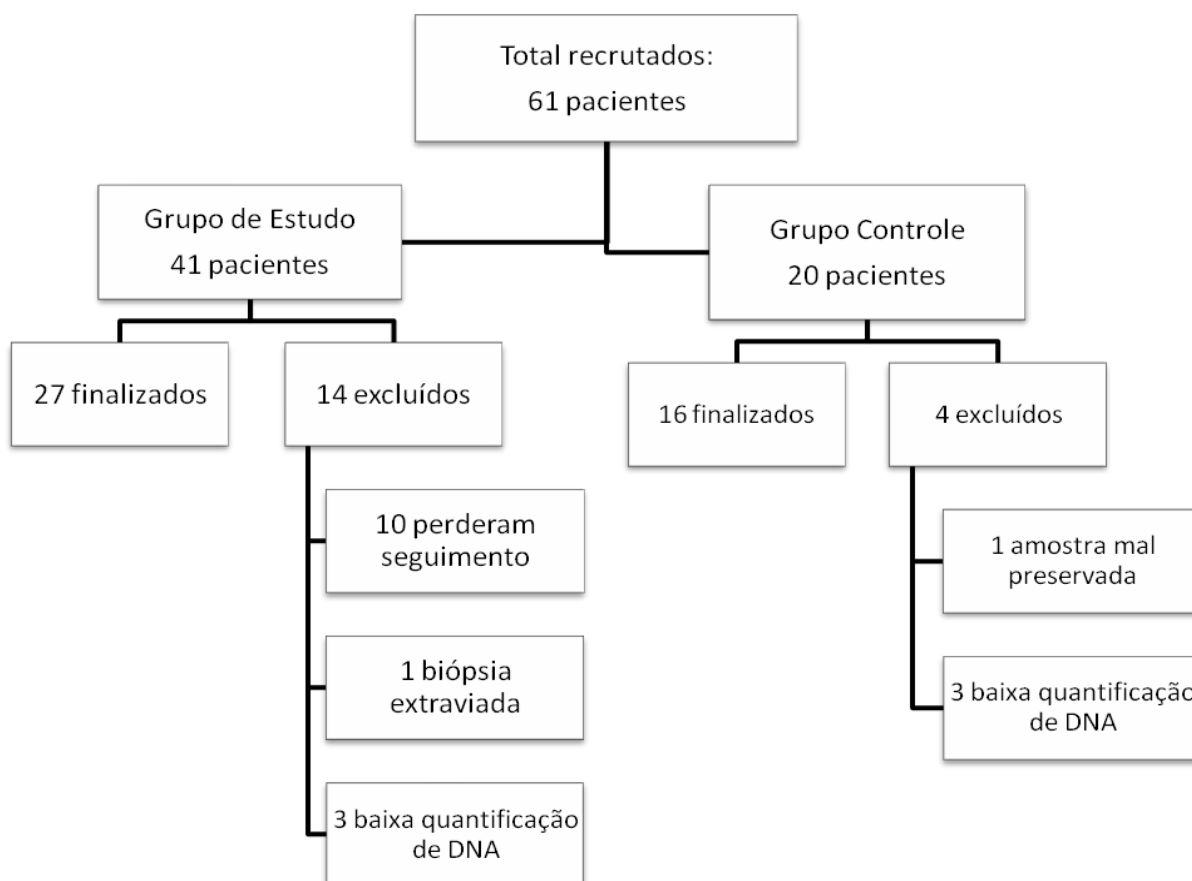
Foi avaliada também a comparação entre a expressão dos IAPs entre pacientes com RSCcPN e boa resposta ao Furoato de Mometasona e aqueles com resposta insatisfatória ao tratamento clínico. Foram considerados bons respondedores os pacientes que apresentaram diferença entre SNOT-22 pré-tratamento e SNOT-22 após o tratamento (chamado aqui de delta SNOT-22) maior do que 9. Foram chamados de maus respondedores aqueles que apresentaram delta SNOT-22 igual ou menor do que 9 (CHOWDHURY *et al.*, 2017). Os resultados de expressão dos genes analisados no estudo foram comparados entre os dois subgrupos por meio de testes paramétricos não pareados.

Ainda, foi aplicada Análise de Componentes Principais (PCA) aos dados de expressão dos genes IAPs, genes da caspase e citocinas, com o objetivo de explorar as relações entre elas. A análise foi realizada por meio do *Software JMP SAS* versão 16.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4. Resultados

Foram, inicialmente, recrutados 61 pacientes, sendo 41 com RSCcPN e 20 controles. Todos os pacientes com RSCcPN relatavam *washout* de tratamento (incluindo corticoide ou antibiótico) há pelo menos um mês. Durante o desenvolvimento do estudo, foram excluídos 14 pacientes do grupo RSCcPN (10 pacientes perderam seguimento, um teve a biópsia extraviada, e três apresentaram baixa quantificação de RNA na amostra) e quatro controles (um por amostra mal preservada e três por baixa quantificação de RNA) (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma dos pacientes recrutados



O estudo foi, então, composto por 27 pacientes com RSCcPN (sendo 17 do sexo feminino e 10 do sexo masculino; idade média $46 \pm 12,2$ anos), e 16 controles (sendo 14 do sexo feminino e dois do sexo masculino; idade média de $29,8 \pm 9,2$ anos). Observou-se diferença significativa entre os dois grupos em relação à idade

pelo teste t de Student não pareado (intervalo de confiança - IC95%: -25,7;-118; $p < 0,001$). Porém, não se considerou este fator clinicamente relevante.

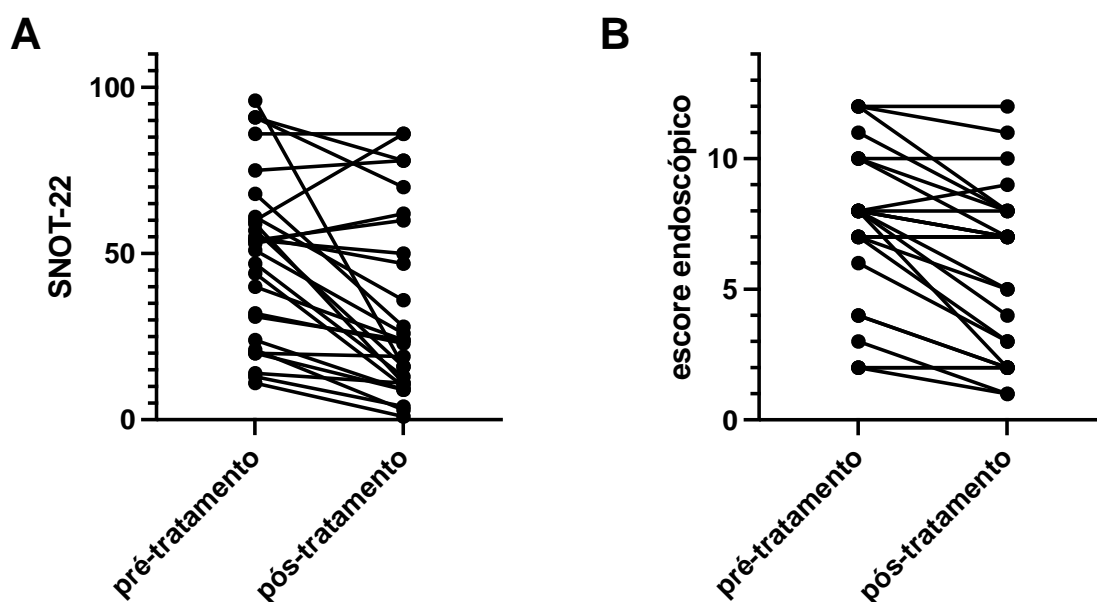
Os 27 pacientes com RSCcPN e que receberam o tratamento de Furoato de Mometasona apresentavam escore médio pré-tratamento de SNOT-22 de $49,2 \pm 25,1$, confirmando terem alto impacto negativo em qualidade de vida associado à doença. Além disso, eles tinham escore endoscópico médio de $7,4 \pm 2,9$ e tomográfico de $14,6 \pm 6,6$, demonstrando considerável extensão e comprometimento nasossinusal com a doença. Cinco pacientes (18%) já haviam realizado cirurgia nasossinusal para RSCcPN anteriormente, 11 (40%) eram asmáticos, quatro (14%) tinham DREA, três (11%) eram diabéticos, quatro (14%) hipertensos e cinco (18%) fumantes (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados demográficos - pacientes do grupo de estudo

Características	Número
Gênero	
Homem	10
Mulher	17
SNOT - 22	
Pré-tratamento	$49,2 \pm 25,1$
Pós-tratamento	$33,3 \pm 27,7$
Escore endoscópico	
Pré-tratamento	$7,4 \pm 2,9$
Pós-tratamento	$5,7 \pm 2,1$
Escore tomográfico pré-tratamento	$14,6 \pm 6,6$
Antecedentes (número de pacientes com história)	
Cirurgias prévias	5 (18%)
Condições associadas	
Asma	11 (40%)
DREA	4 (14%)
Diabete	3 (11%)
Hipertensão Arterial Sistêmica	4 (14%)
Tabagismo	5 (18%)

Após o tratamento clínico, houve diminuição significativa do SNOT-22 (de $49,2 \pm 25,1$ para $33,3 \pm 27,7$, IC95%: -24,17;-7,53, $p < 0,001$); e do escore endoscópico (de $7,4 \pm 2,9$ para $5,7 \pm 2,1$, IC95%: -2,3;-0,9, $p < 0,0001$) (Figura 2).

Figura 2 - Evolução de resposta clínica dos pacientes com RSCcPN após tratamento com Furoato de Mometasona, apresentando resposta individual de cada participante do estudo. **(A)** SNOT-22 (com diminuição significativa de $49,2 \pm 25,1$ para $33,3 \pm 27,7$, IC95%: -24,17;-7,53, $p < 0,001$); **(B)** escore endoscópico (com diminuição significativa de $7,4 \pm 2,9$ para $5,7 \pm 2,1$, IC95%: -2,3;-0,9, $p < 0,0001$). Análise estatística realizada por teste t de Student pareado



No entanto, conforme foi possível observar nos gráficos acima, alguns pacientes obtiveram resposta muito boa ao medicamento, e bom controle da doença com o seu uso, enquanto outros praticamente mantiveram a mesma intensidade dos sintomas e do escore endoscópico. A partir dessa observação, os pacientes foram separados em dois grupos, os com boa resposta ao corticoide tópico (diminuição de mais do que nove pontos do escore SNOT-22 (CHOWDHURY *et al.*, 2017), o que ocorreu em 15 pacientes) e maus respondedores (diferença de SNOT 22 menor que nove pontos, ou piora do escore, o que ocorreu em 12 pacientes). Os grupos tiveram a mesma proporção interna de pacientes portadores de asma e de DREA.

4.1 Resultados moleculares

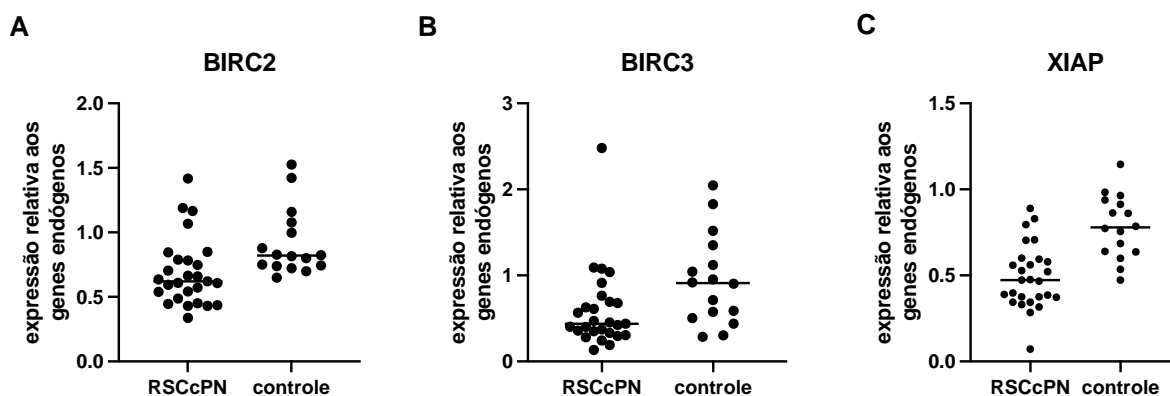
Iniciou-se a análise molecular pela observação de diferença dos genes avaliados entre pacientes com RSCcPN e controles. Por meio da análise de PCR, notou-se que os pacientes com RSCcPN apresentaram menor expressão dos três genes IAPs (BIRC2/IAP1, BIRC3/IAP2 e XIAP) em relação aos controles (Tabela 3 e Figura 3).

Tabela 3 - Genes inibidores da apoptose: comparação entre os pacientes com RSCcPN e controles, por meio do teste t de Student não pareado

Gene	RSCcPN (média ± DP)	Controle (média ± DP)	IC95%	p
BIRC2	0,69 ± 0,26	0,91 ± 0,25	0,05;0,39	<0,01
BIRC3	0,59 ± 0,46	0,94 ± 0,52	0,04;0,66	<0,05
XIAP	0,49 ± 0,18	0,78 ± 0,18	0,17;0,41	<0,0001

RSCcPN= Rinossinusite crônica com pólipos nasais; **DP**= Desvio padrão; **IC**= Intervalo de confiança.

Figura 3 - Comparação entre os grupos de pacientes com RSCcPN e controles, em relação aos genes BIRC2 (A), BIRC3 (B) e XIAP (C), evidenciando que os três genes foram significativamente menos expressos em pólipos nasais do que na mucosa nasal controle



Em contrapartida, a expressão dos genes relacionados às caspases não foi significativamente diferente entre os pacientes com RSCcPN e controles (Tabela 4).

Tabela 4 - Genes da caspase. Comparação entre os pacientes com RSCcPN e controles, por meio do teste t de Student não pareado

Gene	RSCcPN (média ± DP)	Controle (média ± DP)	IC95%	p
BCL2	0,99 ± 1,89	1,59 ± 1,71	-0,57;1,76	NS
CASP3	0,82 ± 0,29	0,76 ± 0,31	-0,24;0,13	NS
CASP7	1,17 ± 0,37	0,91 ± 0,34	-0,49;-0,02	NS
CASP9	1,05 ± 0,66	1,02 ± 0,44	-0,40;0,34	NS

RSCcPN= Rinossinusite crônica com pólipos nasais; **DP=** Desvio padrão; **IC=** Intervalo de confiança.

Quanto às citocinas inflamatórias, observou-se expressão significativamente maior de IFN- γ , IL-5 e TGF- β nos pólipos nasais quando comparada à mucosa dos controles, evidenciando maior inflamação com padrão T1, T2 e de remodelamento em pacientes com RSCcPN, quando comparados a controles (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração proteica das citocinas pró-inflamatórias. Comparação entre os pacientes com RSCcPN e controles, por meio do teste t de Student não pareado

Citocina	RSCcPN (média ± DP)	Controle (média ± DP)	IC95%	p
IFN- γ	2,62 ± 0,50	2,32 ± 0,26	-0,59;-0,03	<0,05
IL-10	0,28 ± 0,06	0,26 ± 0,06	-0,06;0,01	NS
IL-17A	1,80 ± 0,34	1,98 ± 0,15	-0,001;0,37	NS
IL-33	1,31 ± 1,14	2,43 ± 2,70	-0,09;2,36	NS
IL-5	0,58 ± 0,06	0,53 ± 0,05	-0,08;-0,01	<0,05
TGF- β	115,40 ± 157,10	8,48 ± 3,91	-186,7;-27,13	<0,01

RSCcPN= Rinossinusite crônica com pólipos nasais; **DP=** Desvio padrão; **IC=** Intervalo de confiança.

Quando comparada a expressão dos IAPs e dos genes de caspases nos dois subgrupos de pacientes com RSCcPN, bons e maus respondedores, verificou-se que os pacientes que responderam mal ao corticoide tópico nasal obtiveram índices significativamente mais baixos de BIRC2 em comparação aos que responderam melhor ao tratamento (Tabela 6). Não foi encontrada diferença entre esses dois grupos para os genes BIRC3 e XIAP (Tabela 6).

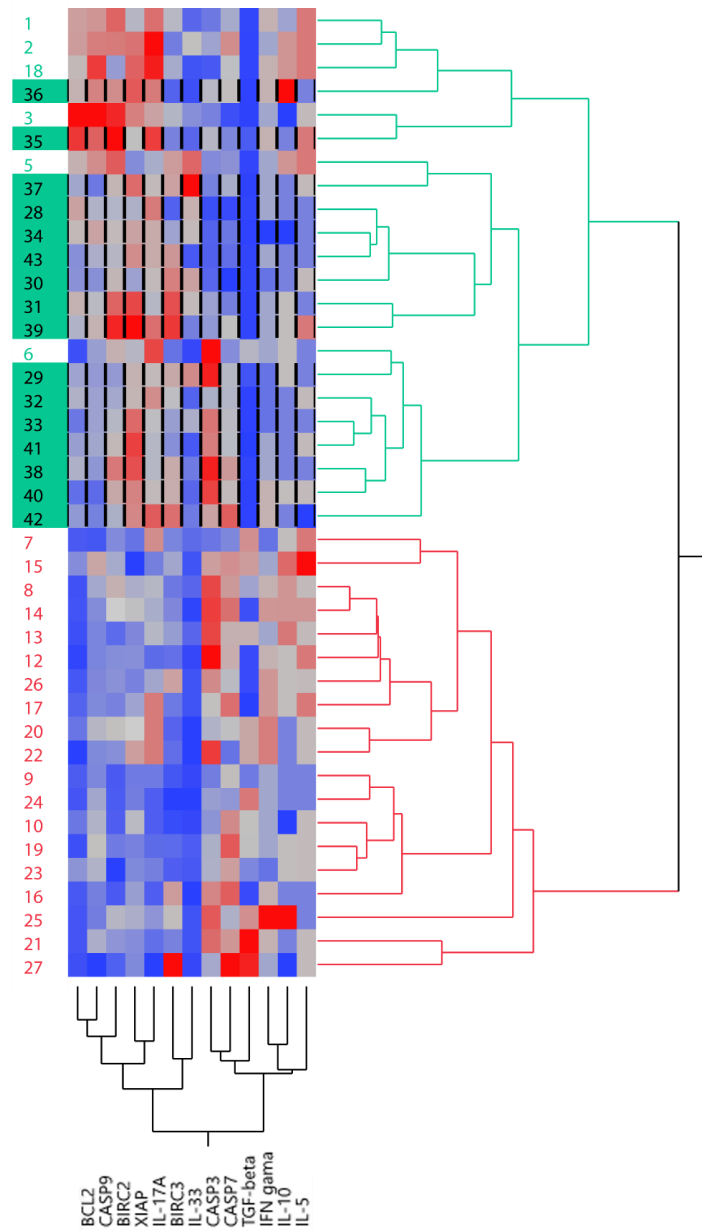
Tabela 6 - Genes inibidores da apoptose. Comparação entre os pacientes bons e maus respondedores ao corticoide tópico, por meio do teste t de Student não pareado

Gene	Bom respondedor (média ± DP)	Mau respondedor (média ± DP)	IC95%	p
BIRC2	0,78 ± 0,30	0,56 ± 0,13	-0,41;-0,02	< 0,05
BIRC3	0,51 ± 0,24	0,68 ± 0,64	-0,19;0,53	NS
XIAP	0,49 ± 0,20	0,48 ± 0,17	-0,16;0,13	NS

DP= Desvio padrão; IC= Intervalo de confiança

Para se observar o efeito dos IAPs sobre os outros marcadores moleculares e sobre os parâmetros clínicos, foi realizada também análise de dendrograma, incluindo todos os genes e citocinas analisados, em ambos os grupos (controles e pacientes com RSCcPN) (Figura 4).

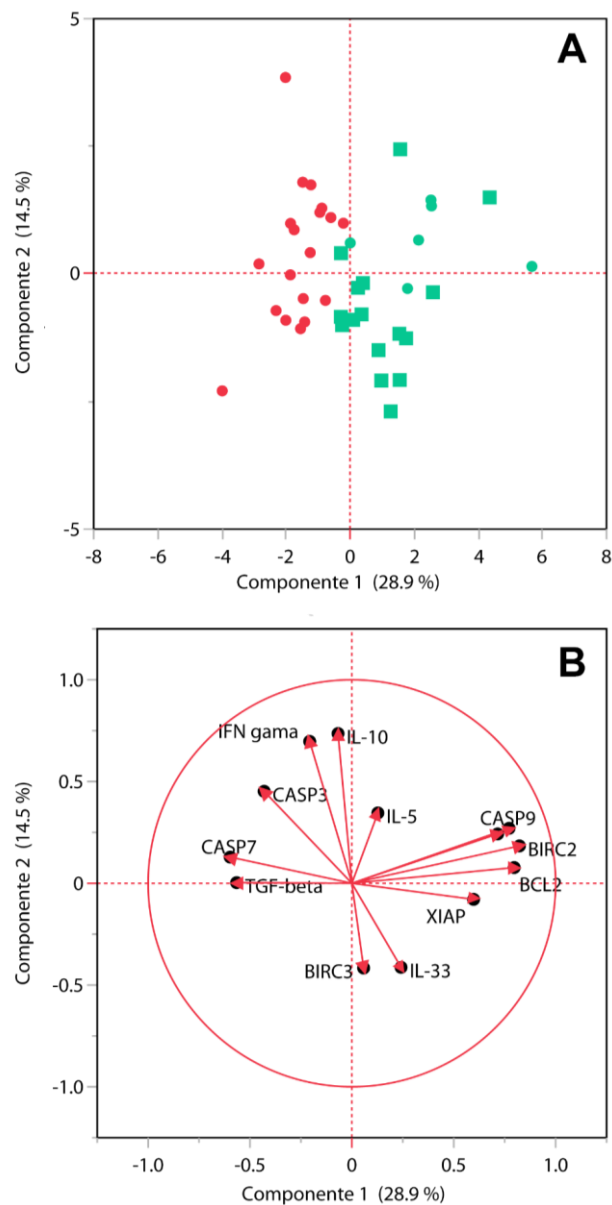
Figura 4 - Dendograma da clusterização e respectivo mapa de calor representado pelos sujeitos na vertical e variáveis na horizontal. Verde: *cluster 1* (sujeitos em destaque representam os controles). Vermelho: *cluster 2*



Na análise de PCA, duas principais componentes explicaram 43,4% da variância, sendo 28,9% pela componente 1 e 14,5% pela componente 2 (Figura 5). As variáveis IL-17A, XIAP, BIRC2, CASP9 e BCL2 se apresentaram positivamente correlacionadas com a componente 1, enquanto que as CASP3, IFN- γ , IL-5 e IL-10 estiveram positivamente correlacionadas com a componente 2. CASP7 e TGF- β e

BIRC3 e IL-33 mostraram-se negativamente correlacionadas com as componentes 1 e 2, respectivamente.

Figura 5 - (A) Distribuição dos pacientes (círculos) e controles (quadrados) na projeção das componentes principais 1 e 2. Divisão dos participantes da pesquisa em dois *clusters*: Verde: *cluster 1* (que incluiu controles e pacientes com RSCcPN); Vermelho; *cluster 2* (composto apenas por pacientes com RSCcPN). **(B)** Análise de Componentes Principais (PCA). O gráfico bidimensional mostra apenas a projeção das variáveis (representadas como setas) nas componentes 1 e 2, destacando-se as relações entre elas. Há evidência de relação entre as variáveis XIAP, BIRC2, CASP 9, BCL2 e IL-17A com a componente 1, enquanto que a componente 2 relacionou-se com CASP3, IFN- γ , IL-5 e IL-10.



A análise de PCA mostrou que seis pacientes com RSCcPN apresentaram padrão molecular semelhante aos controles, ao passo que outros 19 pacientes demonstraram padrão molecular diferente. Curiosamente, quando observados os dados clínicos entre os dois grupos de RSCcPN, verificou-se que os dois *clusters* mostraram perfis semelhantes em todos os critérios, exceto o delta SNOT-22. Para esse parâmetro, o Grupo do *Cluster 1* (com perfil molecular semelhante ao do Grupo controle) obteve melhora substancialmente maior do que o grupo do *Cluster 2*, sendo as médias significativamente diferentes ($37,0 \pm 26,5$ para *Cluster 1* vs. $7,4 \pm 13,5$ para *Cluster 2*, $p < 0,05$, Tamanho de efeito 0,503) (Tabela 7).

Tabela 7 - Dados clínicos

	<i>Cluster 1</i> (n = 6)				<i>Cluster 2</i> (n = 19)				p-valor	Tam. Efeito
	Média	DP	Med.	IIQ	Média	DP	Med.	IIQ		
Endoscopia (pré)	5.3	3.3	5.0	6.5	7.8	2.8	8.0	3.0	0.11	0.318
Delta Endoscopia	1.5	1.4	1.5	3.0	1.7	1.8	1.0	3.0	0.97	0.007
Tomografia	12.0	6.2	15.5	12.3	14.7	6.8	16.0	11.0	0.29	0.211
SNOT-22 (pré)	46.7	32.0	50.5	55.8	48.9	24.7	53.0	37.0	0.82	0.045
Delta SNOT-22	37.0	26.5	37.5	46.3	7.4	13.5	8.0	16.0	0.0119	0.503
eosinófilos/ campo	45.4	43.0	50.0	83.5	57.7	50.4	50.0	83.0	0.67	0.078

DP= desvio padrão; **Med.**= mediana, **IIQ**= intervalo interquartil. Teste Mann-Whitney; Tamanho de efeito (r)= 0.1 a <0.3, pequeno; 0.3 a < 0.5, médio; ≥ 0.5 , grande.

Além da diferença significativa na melhora clínica com o uso de corticoide, os grupos também apresentaram diferenças significativas entre alguns marcadores. O Grupo *Cluster 1* (boa resposta ao corticoide) apresentou expressão significativamente maior de XIAP ($0,67 \pm 0,20$ para *Cluster 1* vs. $0,42 \pm 0,14$ para *Cluster 2*, $p < 0,05$; Tamanho de efeito 0,496) e BIRC2 ($1,06 \pm 0,27$ para *Cluster 1* vs. $0,58 \pm 0,14$ para *Cluster 2*, $p < 0,0005$, Tamanho de efeito 0,662), além de maior expressão de BCL2 ($3,19 \pm 3,30$ para *Cluster 1* vs. $0,33 \pm 0,21$ para *Cluster 2*, $p < 0,05$, Tamanho de efeito 0,522) e CASP9 ($1,98 \pm 0,84$ para *Cluster 1* vs. $0,79 \pm 0,25$ para *Cluster 2*, $p < 0,001$, Tamanho de efeito 0,624). As citocinas IL-17A e IL-33 também estiveram aumentadas neste *Cluster* (IL-17A: $2,19 \pm 2,22$ para *Cluster 1* vs. $1,02 \pm 0,09$

para *Cluster 2*, $p < 0,005$, Tamanho de efeito 0,593; IL-33: $0,61 \pm 0,06$ para *Cluster 1* vs. $0,58 \pm 0,06$ para *Cluster 2*, $p < 0,05$, Tamanho de efeito 0,458). Em contrapartida, o Grupo de pior resposta clínica (*Cluster 2*) apresentou aumento de expressão da CASP7 ($0,90 \pm 0,33$ para *Cluster 1* vs. $1,27 \pm 0,38$ para *Cluster 2*, $p < 0,05$, Tamanho de efeito 0,407) e aumento substancial da citocina TGF- β ($18,2 \pm 24,6$ para *Cluster 1* vs. $146,1 \pm 169,1$ para *Cluster 2*, $p < 0,01$, Tamanho de efeito 0,561) (Tabela 8).

Tabela 8 - Genes inibidores de apoptose, genes da caspase (ambos por PCR quantitativo) e concentração de citocinas (por Luminex). Comparação entre os grupos (*Cluster 1* vs. *Cluster 2*), por meio do teste de Mann-Whitney

	<i>Cluster 1</i> (n = 6)				<i>Cluster 2</i> (n = 19)				P-valor	Tam Efeito
	Média	DP	Med.	IIQ	Média	DP	Med.	IIQ		
Genes inibidores de apoptose										
XIAP	0.67	0.20	0.68	0.33	0.42	0.14	0.39	0.18	0.0143	0.496
BIRC2	1.06	0.27	1.12	0.44	0.58	0.14	0.59	0.26	0.0002	0.662
BIRC3	0.65	0.25	0.65	0.38	0.57	0.53	0.40	0.31	0.16	0.293
Genes de caspase										
BCL2	3.19	3.30	2.42	3.32	0.33	0.21	0.26	0.17	0.0100	0.522
CASP3	0.67	0.34	0.56	0.38	0.90	0.25	0.91	0.44	0.07	0.369
CASP7	0.90	0.33	0.87	0.47	1.27	0.38	1.28	0.52	0.0428	0.407
CASP9	1.98	0.84	1.78	1.38	0.79	0.25	0.72	0.29	0.0007	0.624
Citocinas										
IFN- γ	2.44	0.15	2.34	0.30	2.68	0.57	2.64	0.61	0.40	0.174
IL-5	0.29	0.05	0.31	0.09	0.28	0.07	0.28	0.09	0.19	0.270
IL-10	2.19	0.28	2.23	0.53	1.68	0.27	1.57	0.36	0.63	0.104
IL-17A	2.19	2.22	1.30	2.05	1.02	0.09	1.04	0.13	0.0034	0.593
IL-33	0.61	0.06	0.64	0.09	0.58	0.06	0.57	0.04	0.0240	0.458
TGF- β	18.2	24.6	8.24	16.7	146.1	169.1	78.8	197.5	0.0056	0.561

DP= desvio padrão; **Med.=** mediana, **IIQ=** intervalo interquartil. Teste Mann-Whitney; Tamanho de efeito (r) = 0.1 a <0.3, pequeno; 0.3 a < 0.5, médio; \geq 0.5, grande.

Dessa forma, pode-se dizer que os marcadores BIRC2, XIAP, BCL2, CASP9, IL-17A e IL-33 estiveram associados aos pacientes com RSCcPN e melhora clínica mais importante com o tratamento com corticoide tópico, enquanto que os marcadores CASP7 e TGF- β foram mais marcantes nos pacientes com pior resposta ao corticoide tópico.

5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da expressão dos IAPs para o desenvolvimento da RSCcPN, assim como para a resposta ao corticoide tópico. Para isso, foram comparados pacientes de ambos os sexos, entre 18 e 60 anos, divididos em dois grupos: Grupo 1 composto por pacientes com RSCcPN e Grupo 2 com sujeitos livres da doença.

Foi avaliada também a resposta ao tratamento padrão-ouro otimizado com corticoide tópico nasal entre os pacientes com RSCcPN, para observar o efeito dos IAPs sobre a possível resposta ao tratamento clínico. Entre as comorbidades associadas, havia cinco pacientes (18%) que já haviam realizado cirurgia nasossinusal para RSCcPN anteriormente, 11 (40%) eram asmáticos, quatro (14%) tinham DREA, três (11%) eram diabéticos, quatro (14%) hipertensos e cinco (18%) fumantes.

Para cumprir o segundo objetivo, foram avaliados todos os pacientes sem nenhum tratamento há pelo menos um mês, oferecendo Furoato de Mometasona àqueles com RSCcPN, e reavaliados clinicamente após o fim do tratamento. Foi encontrado padrão de resposta heterogêneo, no qual alguns pacientes responderam bem, com melhora clínica e endoscópica, enquanto outros não melhoraram, ou até pioraram após o tratamento. De maneira interessante, nenhum parâmetro clínico (presença de comorbidades, principalmente asma ou DREA, ou extensão da doença, endoscópica ou tomográfica) influenciou a resposta ao tratamento clínico.

Quanto à análise molecular da presente coorte, observou-se expressão significativamente maior de IFN- γ , IL-5 e TGF- β nos pólipos nasais quando comparada à mucosa dos controles, evidenciando maior inflamação com padrão T1, T2 e de remodelamento em pacientes com RSCcPN. Estudos antigos com tecido de mucosa nasossinusais apontavam maior resposta inflamatória em pólipos nasais, com predomínio de células T2, produtoras de IL-5, em pólipos de pacientes caucasianos. De acordo com Bachert *et al.* (2014), aproximadamente 80% dos pólipos caucasianos apresentam esse padrão inflamatório predominante, com consequente importante eosinofilia tecidual. No entanto, estudos mais recentes, utilizando avaliações com *kits* multiplex, demonstram padrão pró-inflamatório misto e heterogêneo nos pacientes com RSC (STEVENSON *et al.*, 2019; TURNER *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016)

Stevens *et al.* (2019) relataram que 26% dos pacientes com RSCcPN apresentavam combinação de inflamação tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) e tipo 3 (T3), sendo considerados portadores de endótipos mistos, mesmo na população caucasiana. A frequência de inflamação T2 foi significativamente maior nos pacientes com pólipos nasal, quando comparados àqueles com RSCsPN.

Wang *et al.* (2016) estudaram 573 sujeitos (incluindo pacientes com RSC com e sem pólipos nasal e sujeitos livres de doença de seis regiões do mundo, abrangendo a Europa, Ásia e Austrália) e compararam citocinas com padrão TH2, TH1 e TH17 e marcadores inflamatórios eosinofílicos e neutrofílicos. Os autores observaram, em pacientes caucasianos com RSCcPN, padrão T2 dominante com inflamação eosinofílica, enquanto os chineses apresentaram padrões mistos TH2/TH1/TH17 com inflamação neutrofílica, sugerindo a presença de diferenças imunológicas importantes entre essas etnias. Os autores ainda referiram que 85% dos pacientes com RSCcPN apresentaram altas concentrações de IL-5, com predominância dos europeus, mas houve uma percentagem de pacientes que apresentaram padrão misto, sendo encontrado concomitantemente expressão de IL-17 e INF- γ . Ainda, entre os pacientes chineses, eles demonstraram positividade total de IL-5 de 61% no grupo com RSCcPN de Pequim, sendo semelhante ao valor encontrado nos pacientes europeus, sendo padrões mistos TH2/TH1 em 38% e TH2/TH17 em 24%. Em contraste, o grupo de Chengdu apresentou padrão TH2 mais baixo, com 20% de positividade total de IL-5 e 23% de positividade total nos padrões TH17 e TH1.

Turner *et al.* (2018) avaliaram o padrão inflamatório de pacientes com RSC por meio da coleta de muco nasossinusal em 88 pacientes americanos, e obtiveram resultados semelhantes aos encontrados recentemente na população europeia, que sugerem que a inflamação padrão T2 está presente na maioria dos pacientes com RSC, mas é exclusiva somente em pequena minoria (14%). Curiosamente, mais da metade dos pacientes (62%) foram caracterizados por doença com baixa carga inflamatória global, que não correspondeu a um padrão específico associado, evidenciando que os diversos endótipos encontrados confirmam que a RSC é uma doença inflamatória heterogênea que difere substancialmente em relação ao fenótipo e ao comportamento da doença (TURNER *et al.*, 2018).

Como é possível observar, quando utilizadas técnicas mais modernas, de avaliação multiplex de citocinas, o padrão inflamatório é extremamente diversificado. Ainda, os estudos mais recentes, assim como este, indicam que haja um padrão predominantemente inflamatório misto, e que esse padrão pode influenciar o prognóstico do paciente. No presente estudo, foi observada expressão significativamente maior de IFN- γ , IL-5 e TGF- β nos pacientes com RSCcPN do que nos do grupo controle, sugerindo aumento de padrão inflamatório T1, T2 e de remodelamento. Ainda, encontrou-se, nos pólipos nasais, média de 52,3 eosinófilos/por campo e 20 pacientes (74%) tiveram seus pólipos classificados como eosinofílicos, de acordo com a classificação do EPOS 2020 (FOKKENS *et al.*, 2020). Eosinófilos são importantes células que reagem diante de um dano à mucosa e levam em consideração as etapas tardias do reparo tecidual. São produtores, principalmente, de IL-4 e IL-5, além de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), TGF- β e outros mediadores que promovem migração e proliferação de células epiteliais. Por outro lado, a infiltração neutrofílica aumenta a permeabilidade epitelial, e o influxo prolongado de neutrófilos pode prejudicar o reparo tecidual, talvez por manter um meio pró-inflamatório persistente (CROASDELL LUCCHINI *et al.*, 2021).

A IL-5 é uma citocina com capacidade de promover o crescimento e a diferenciação de células B ativadas e a sua superexpressão aumenta significativamente o número de eosinófilos e anticorpos circulantes. Sabe-se que a IL-5 desempenha papel fundamental na resposta imune inata e adquirida e na eosinofilia (TAKATSU; NAKAJIMA, 2008), exercendo também papel fundamental na ativação, quimiotaxia e sobrevivência dos eosinófilos (MORDVINOV; SANDERSON, 2001). Atualmente, a IL-5 é um dos possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da RSCcPN. Han *et al.* (2021) desenvolveram um estudo fase III, randomizado, duplo-cego, controlado, envolvendo 407 sujeitos com RSCcPN refratária ao tratamento padrão-ouro, seguidos por 52 semanas. O grupo que recebeu Mepolizumab (100 mg, via subcutânea a cada quatro semanas), além do tratamento padrão-ouro para a doença com *spray* intranasal de Furoato de Mometasona (n=206) durante o estudo, apresentou melhora do tamanho dos pólipos (com melhora significativa na pontuação total do escore endoscópico dos pólipos nasais),

e também da obstrução nasal, quando comparados aos 201 pacientes que receberam placebo. É importante ressaltar que o estudo acima não avaliou o perfil de citocinas dos pacientes estudados, não sendo possível afirmar se houve diferenças entre a melhora em pacientes com padrão T2 exclusivo ou com padrão misto.

O TGF- β tem particular participação na fisiopatogenia da RSC, por ser uma citocina multifuncional, com importante ação em imunomodulação (pela produção de citocinas Treg), como também no processo de reparação e remodelamento tecidual. Ele ativa o epitélio das vias aéreas para um processo denominado de transição epitélio-mesenquimal (EMT), modificando o fenótipo das células basais do epitélio para um fenótipo mesenquimal (PARK *et al.*, 2016). Könnecke *et al.* (2017) demonstraram, pela primeira vez, que as células epiteliais de pólipos nasais e cornetos inferiores foram capazes de sofrer um processo semelhante à EMT após exposição ao TGF- β *in vitro*, mas que apenas as células epiteliais nasais de pólipos responderam com maior motilidade celular, sugerindo que esse processo estivesse envolvido com a patogênese da RSC. O TGF- β desempenha importante função na formação e crescimento de pólipos nasais, promovendo remodelamento e crescimento celular, que estimulam a fibrose (atraindo células do estoma), angiogênese e o acúmulo de matriz extracelular (LI *et al.*, 2019).

Os resultados do presente estudo corroboram os achados de Li *et al.* (2019), que compararam pacientes com RSC com e sem pólipos nasais a controles por RT-PCR quantitativo e encontraram maior expressão de TGF- β em pacientes com RSCcPN, quando comparados a pacientes com RSCsPN e controles saudáveis. Em contrapartida, Lucas *et al.* (2021) encontraram resultados divergentes quando compararam a expressão de TGF- β em pacientes com RSCcPN. Os autores avaliaram 86 pacientes, divididos em três grupos (RSCsPN, RSCcPN e controles) e analisaram a expressão de TGF- β pelo método ELISA, encontrando dosagem reduzida desta citocina no grupo com RSCcPN e aumentada nos pacientes com RSCsPN, quando comparados com os controles. É importante ressaltar que no presente estudo foi aplicada a técnica Luminex para medir a concentração proteica e não a expressão gênica dessas citocinas. Resultados conflitantes na literatura podem ocorrer devido a técnicas divergentes utilizadas para essa mensuração.

Wang *et al.* (2022) avaliaram a EMT em 85 pacientes, divididos em grupo controle, RSCsPN, RSCcPN eosinofílica e RSCcPN não eosinofílica, e correlacionaram positivamente o grau de infiltrado eosinofílico com a diminuição da E-caderina no tecido epitelial e o aumento da expressão da vimentina, que em conjunto são considerados importantes marcadores para EMT. O aumento da vimentina também foi relacionado com maior escore de Lund & Mackay. Seus resultados sugerem, por fim, que os eosinófilos possam promover a EMT em pacientes com RSCcPN, contribuindo para o processo de inflamação crônica.

As células T1 estimulam a morte mediada por fagócitos de micróbios ingeridos através da secreção de IFN- γ , levando à ativação de macrófagos e melhor apresentação de antígenos, recrutamento de células B e mudança de classe para a produção de subclasses de IgG e inflamação do tecido com ativação de neutrófilos (FOKKENS *et al.*, 2020). Pacientes asiáticos com RSCcPN frequentemente apresentam infiltração neutrofílica e altos níveis de IFN- γ . Baseados nisso, Lee *et al.* (2019) avaliaram a relação de IFN- γ em pacientes com RSC com marcadores de infiltração neutrofílica pelo método ELISA e encontraram aumento da expressão de IFN- γ , particularmente em pacientes com pólipos nasais não eosinofílicos. Além disso, o nível de IFN- γ foi significativamente correlacionado com marcadores da EMT, sugerindo que esta citocina pode induzir a EMT em células epiteliais nasais. No presente estudo, encontrou-se expressão significativamente maior de IFN γ nos pacientes com pólipos nasais, quando comparados aos controles.

O tratamento padrão-ouro para RSCcPN é o corticoide tópico nasal, único com recomendação A1, de acordo com o EPOS 2020 (FOKKENS *et al.*, 2020). Sabe-se que os corticoides tópicos mais recentes (Mometasona e Fluticasona) apresentam absorção sistêmica desprezível, o que minimiza a possibilidade de efeitos colaterais que estão diretamente relacionados a esses efeitos (DERENDORF; MELTZER, 2008). Há evidências de alta qualidade de que essa classe de droga é eficaz e segura para o tratamento prolongado (STJÄRNE *et al.*, 2006). Apesar dos novos tratamentos com drogas alvo-específicos serem promissores, a relação custo-benefício dos corticoides intranasais ainda é extremamente relevante, estando essas novas drogas indicadas apenas a pacientes

que apresentam resposta ruim ao tratamento com corticoide; sendo sempre associadas ao tratamento padrão-ouro e nunca utilizadas como drogas isoladas.

No presente estudo, o efeito positivo do corticoide tópico foi confirmado. Com o uso do Furoato de Mometasona, houve melhora significativa deste escore, de $49,2 \pm 25,1$ para $33,3 \pm 27,7$. A resposta ao corticoide é de extrema importância na RSCcPN, uma doença inflamatória com franca resposta eosinofílica, visto que o corticoide reduz o número e a ativação das células inflamatórias na mucosa das vias aéreas, agindo principalmente em eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos T, mastócitos e células dendríticas (ZHANG *et al.*, 2002)

Os glicocorticoides reduzem a secreção de mediadores pró-inflamatórios durante a fase tardia da resposta inflamatória. Interferem também na produção de leucotrienos e prostaglandinas e reduzem a produção de IL, IFN- γ e TNF- α . Além disso, os corticoides inibem IL-5; diminuindo, conseqüentemente, a sobrevivência dos eosinófilos e inibem o número de mastócitos na mucosa nasal e da ativação das células T (CHONG NETO; ROSÁRIO, C. S.; ROSÁRIO, N. A, 2010). Sabe-se que a Mometasona e a Fluticasona são altamente ativas contra as citocinas de resposta T2, como a IL-4 e IL-5, e que também são capazes de inibir a produção de IFN- γ , uma citocina de resposta T1. Apesar de ter potente ação anti-inflamatória, tanto para resposta T1 como T2, suger-se que haja inibição mais potente para a resposta T2 do que na resposta T1 (GHOGOMU; KERN, 2017; UMLAND *et al.*, 1997).

Apesar de serem considerados padrão-ouro para o tratamento da RSCcPN, a resposta aos corticoides tópicos intranasais não é homogênea, uma vez que ainda existe significativa parcela de pacientes que persiste com sintomas e sinais de pólipos nasais, mesmo após tratamento otimizado (STJÄRNE *et al.*, 2006). Essa informação está de acordo com os achados do presente estudo, visto que observou-se que alguns pacientes responderam bem, enquanto outros responderam mal ou até pioraram os sintomas com o uso do corticoide tópico nasal.

Como objetivo principal este estudo, avaliou-se a influência dos IAPs sobre a presença de pólipos nasais e sobre o efeito do tratamento com corticoide tópico. A justificativa do estudo é que a RSCcPN apresenta um componente proliferativo e, assim, avaliou-se se um eventual atraso na cascata da apoptose poderia estar envolvido no desenvolvimento dessa doença.

Os IAPs foram, inicialmente, reconhecidos como inibidores da morte celular por meio da inibição das caspases, porém avanços recentes na compreensão da função demonstram que os IAPs são potentes moduladores de inflamação; modulando, sobretudo, as respostas imunes inatas (LALAOUI; VAUX, 2018).

Uma vez que a resistência adquirida das células à apoptose é uma das principais características do câncer, os inibidores endógenos da apoptose estão sendo considerados terapias-alvos, possivelmente promissoras no tratamento anticâncer (PHILCHENKOV; MIURA, 2016). Em paralelo a essa citação, observou-se que os IAPs estão altamente expressos em vários tipos de câncer (FULDA, 2015). O reconhecimento de que os IAPs auxiliam a promover a sobrevivência celular, e que a expressão desses agentes encontra-se elevada em muitos tipos de câncer, levou ao desenvolvimento de diversas drogas antagonistas aos IAPs, que foram testadas em animais. A inibição combinada de IAPs e caspases desencadeou necroptose em células de leucemia, câncer de pâncreas, colorretal e de ovário (LALAOUI; VAUX, 2018).

Os primeiros antagonistas de IAPs evidenciaram que, dos três genes, apenas XIAP possui a capacidade de inibir de forma significativa a atividade da caspase-3 e da caspase-9. Ao contrário, cIAP-1 e cIAP-2 são inibidores diretos fracos das caspases e atuam, preferencialmente, na via pro-inflamatória, ligando-se a fatores associados ao receptor do TNF- α (TRAF - *tumor necrosis factor receptor-associated factors*), promovendo a expressão de proteínas que ativam a sobrevivência das células. Entre as vias de sinalização, promovidas pelos IAPs, que inibem a morte celular (caspase dependente ou independente), estão a sinalização da MAPK e a via canônica do NF- κ B. A indução da via canônica do NF- κ B inibe a via não canônica do mesmo gene, regulando, assim, a imunidade inata (LALAOUI; VAUX, 2018).

Alguns estudos sugerem que os genes cIAP1, cIAP2 e XIAP funcionam de maneira sobreposta e parcialmente redundante para garantir o desenvolvimento adequado e a homeostase do tecido. É interessante o fato de que camundongos com codeleções de IAP1/IAP2 ou IAP1/ XIAP resultam em letalidade embrionária precoce, bem como em camundongos com codeleções dos três genes, apesar de que os com codeleção de XIAP/IAP2 sejam viáveis (MOULIN *et al.*, 2012).

O estudo do papel das caspases e dos IAPs no contexto da RSCcPN pode

ser de fundamental importância, tanto para a compreensão da patogênese da doença quanto para avaliar novas possíveis estratégias de tratamento, principalmente para os pacientes que respondem mal ao tratamento padrão-ouro otimizado.

Assim, foram realizados estudos moleculares com PCR em tempo real para os genes dos inibidores das caspases (BIRC2/IAP1, BIRC3/IAP2 e XIAP) e para os genes relacionados às caspases (BCL2, CASP3, CASP7, CASP9), enquanto que as citocinas foram avaliadas pelo método luminex.

Não foi observada diferença significativa na expressão dos genes da apoptose BCL2, CASP3, CASP7 e CASP9, entre os pacientes com RSCcPN e os controles. Este resultado corrobora parcialmente os achados de Küpper *et al.* (2014) que evidenciaram, por meio de PCR em tempo real, diminuição significativa na expressão dos genes das caspases 3 e 9 nos pacientes com RSCcPN em relação aos controles, mas sem diferença significativa da expressão da caspase 7. Lin, H.; Lin, D. e Xiong (2014) também compararam a expressão da caspase 3 por imunohistoquímica nessa população e evidenciaram fraca expressão de caspase 3 nos pacientes com pólipos. A possível diferença entre os achados pode ser explicada por técnicas laboratoriais diferentes, ou pelo uso prévio de tratamento clínico nos estudos anteriores. Cabe aqui reforçar que os pacientes da presente coorte estavam sem uso de nenhum tratamento clínico durante um mês antes da coleta da amostra.

Há claras evidências na literatura sobre o impacto positivo do corticoide tópico nos sintomas nasossinusais dos pacientes com pólipo nasal, porém ainda existe uma parcela desses pacientes que persiste com sintomas, mesmo após o tratamento otimizado (STJÄRNE *et al.*, 2006). Levando em consideração este fato, adicionalmente, avaliou-se se eventualmente a expressão desses genes poderia estar diferente entre os pacientes com RSCcPN, de acordo com a resposta ao corticoide tópico nasal, pelo método PCA, e evidenciou-se que pacientes com melhor resposta ao tratamento apresentaram maior expressão gênica de BCL2 e CASP9, enquanto que os com pior resposta demonstraram maior expressão gênica de CASP7.

É importante salientar o principal achado deste estudo, a expressão significativamente menor dos genes IAPs (BIRC2/IAP1, BIRC3/IAP2 e XIAP) nos

pólipos nasais em relação à mucosa dos pacientes livres da doença. Ainda, na análise de PCA, observou-se que pacientes com boa resposta ao corticoide obtiveram maior expressão de BIRC2 e XIAP do que aqueles com má resposta ao corticoide. Assim, a diminuição de expressão de IAPS, nesta coorte, teve relação com a presença de pólipos nasais, e também com pior resposta ao tratamento clínico com corticoide tópico.

Cho *et al.* (2008) investigaram a expressão dos IAPs e da caspase 3 em pólipos nasais de 20 pacientes e compararam com a mucosa da concha nasal inferior de 20 controles saudáveis, através de RT-PCR semi-quantitativo e encontraram a presença de BIRC2/IAP1, BIRC3/IAP2 e XIAP na mucosa nasal saudável, enquanto, nos pólipos, não foi evidenciado a expressão de BIRC2/IAP1, somente de BIRC3/IAP2 e XIAP. Em relação a caspase 3, foi encontrado a expressão tanto no pólipo, quanto nos controles, não sendo encontrada diferença entre a expressão dos genes citados entre os sujeitos dos 2 grupos avaliados. Os resultados desses autores divergem dos aqui apresentados em relação a BIRC3/IAP2 e XIAP, mas os autores não observaram a expressão de BIRC2/IAP1 na mucosa dos pólipo, ao passo que na concha inferior havia expressão marcante deste gene, sugerindo diminuição marcante na expressão de BIRC2 nos pólipos nasais. No entanto, exatamente porque Cho *et al* (2008) utilizaram métodos semi-quantitativos de PCR, eles não conseguiram quantificar a diferença. Em contrapartida, o nosso estudo utilizou métodos muito mais sensíveis para quantificar a expressão dos genes avaliados.

Quando estudamos a relação dos IAPs com os genes da apoptose e citocinas, encontramos que a maior expressão de BIRC2 e XIAP esteve fortemente associada à maior expressão de BCL2, CASP9 e IL-17A, fracamente associada à maior expressão de IL-5 e IL-33, e fortemente associada à menor expressão de TGF- β . Considerando ainda que pacientes com maior expressão de BIRC2 e XIAP tiveram melhor resposta ao tratamento clínico com corticoide tópico, podemos inferir, ao menos na presente coorte, que esses dois genes possam ter importância central na fisiopatogenia da RSCcPN e na boa resposta ao tratamento clínico.

No presente estudo, a redução dos IAPs (BIRC2 e XIAP) observada teve relação direta com o aumento significativo da expressão de TGF- β e também de

CASP7, e menor expressão de CASP9, BCL2 e IL-17.

Alguns estudos já relacionam a diminuição dos IAPs a processos inflamatórios exacerbados. Anderton *et al.* (2017), com o intuito de investigarem o papel desses IAPs na homeostase da pele, injetaram um pan-antagonista de IAPs na pele de camundongos. O uso dessa droga induziu à necrólise epidérmica tóxica, com importante inflamação local, caracterizado por aumento de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) e recrutamento de células inflamatórias, incluindo mastócitos, macrófagos e células T. O processo inflamatório exacerbado teve como consequência hiperplasia celular epitelial e perda de adesão intercelular nos queratinócitos, seguida de apoptose.

Da mesma forma que no estudo de Anderton *et al.* (2017), outros autores demonstraram que a deficiência de IAPS pode levar a um processo inflamatório crônico (TANG *et al.*, 2020), e alterar a resposta imune inata, bloqueando-a na sinalização da via da proteína NOD (LALAOUI; VAUX, 2018). Inclusive, a deficiência de XIAP em camundongos anula completamente a sinalização NOD1/2 e reduz as respostas à infecção por *Listeria* e *Clamydophila pneumoniae* (BAULER; DUCKETT; O'RIORDAN, 2008; PRAKASH *et al.*, 2010). Por fim, esta deficiência em imunidade inata produz imunotolerância a alguns patógenos, entre eles vírus, bactérias e fungos, com menor resposta inflamatória aguda, mas induzindo um processo crônico pró-inflamatório. Ainda, de acordo com Lalaoui e Vaux, (2018), é plausível que bactérias e fungos que se ligam a TLRs sejam capazes de reduzir os níveis clAP1 e clAP2, ativando toda a cascata de inflamasoma.

Roscioli *et al.* (2017) avaliaram associação da asma com polimorfismos dos genes de BIRC2 e BIRC 3 e encontraram correlação de polimorfismo de BIRC3, mas não de BIRC2, com efeito protetor para susceptibilidade à asma e carga reduzida de eosinófilos e neutrófilos circulantes. Já Tang *et al.* (2020) apresentaram um caso demonstrando colite eosinofílica como manifestação inicial da deficiência de XIAP, sugerindo também associação com alteração da via NOD2 de sinalização inflamatória. Foi encontrada também regulação positiva das citocinas TH2 (IL-4, IL-5, IL-6) e de eosinófilos no tecido gastrointestinal desse paciente. No presente estudo, não houve relação direta entre o grau de eosinofilia e a expressão dos IAPs. Dessa forma, sugere-se que a diminuição de IAPs seja um processo importante na

fisiopatogenia da RSCcPN e na suscetibilidade dos pólipos nasais ao tratamento clínico pela interferência dos mesmos na resposta imune inata, o que acaba por induzir um processo inflamatório crônico exacerbado, e marcado por forte participação do processo de remodelamento (com o aumento do TGF- β e possível indução do processo de EMT).

Considerando que os IAPs modificam a cascata inflamatória em passos anteriores aos da cascata adaptativa, os presentes achados são um elo muito importante no entendimento da RSCcPN, e reforçam a importância da participação do processo da imunidade inata como elo essencial entre o ambiente (via PAMPs/DAMPs/NODs), o epitélio (via remodelamento, EMT e diminuição de adesão intercelular) e a cronificação do processo inflamatório (via ativação de cascatas da própria imunidade inata, assim como da adaptativa). Em conjunto, a interpretação destes achados abre novas perspectivas de entendimento, reforçando a importância da barreira epitelial da mucosa nasossinusal na RSCcPN, não como uma barreira passiva, mas sim como uma entidade extremamente dinâmica de interação com o ambiente, e onde processos incoordenados podem levar a distúrbios crônicos de respostas inflamatórias e de remodelamento.

Estudos adicionais devem ainda reforçar a importância da barreira epitelial e dos IAPs da indução do processo inflamatório crônico da RSCcPN, e podem ser possíveis alvos terapêuticos para novas perspectivas de tratamento dessa doença.

6. Conclusões

Após análise dos resultados, concluiu-se que:

- Pacientes com RSCcPN apresentaram menor expressão dos três genes IAPs estudados (BIRC2/IAP1, BIRC3/IAP2 e XIAP), além de expressão significativamente maior das citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-5 e TGF- β , quando comparados àqueles livres de doença
- A menor expressão de BIRC2/IAP1 e XIAP esteve ainda relacionada à pior resposta ao corticoide tópico nasal.
- Por fim, observou-se que a expressão de BIRC2/IAP1 e XIAP esteve fortemente associada à expressão de IL-17A, CASP9 e CASP3, fracamente associada à expressão de IL-33 e IL-5 e negativamente associada à expressão de TGF- β , reforçando a grande participação dos inibidores na apoptose e no processo inflamatório.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 4ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2020.

ANDERTON, H. *et al.* Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) Limit RIPK1-Mediated Skin Inflammation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 11, p. 2371-9, 2017.

BACHERT, C. *et al.* Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 5, p. 962- 8.e6, 2010.

BACHERT, C. *et al.* ICON: chronic rhinosinusitis. **World Allergy Organization Journal**, v. 7, p. 25, 2014.

BAULER, L. D.; DUCKETT, C. S.; O'RIORDAN, M. X. D. XIAP Regulates Cytosol-Specific Innate Immunity to Listeria Infection. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 8, p. e1000142, 2008.

BHATTACHARYYA, N. Contemporary Assessment of the Disease Burden of Sinusitis. **Allergy & Rhinology**, v. 1, n. 1, p. 8, 2010.

BLACKWELL, D. L.; COLLINS, J. G.; COLES, R. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 1997. **Vital and Health Statistics 10**, n. 205, p. 1-109, 2002.

BOARDMAN, C. *et al.* Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, n. 2, p. 129-43, 2014.

BRESCIA, G. *et al.* Blood eosinophilic and basophilic trends in recurring and non-recurring eosinophilic rhinosinusitis with nasal polyps. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 35, n. 3, p. 296-301, 2021.

CAO, P.-P. *et al.* Pathophysiologic mechanisms of chronic rhinosinusitis and their roles in emerging disease endotypes. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 122, n. 1, p. 33-40, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Current depression among adults---United States, 2006 and 2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, n. 38, p. 1229-35, 2010.

CHANG, P.-J. *et al.* Impaired nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in corticosteroid-insensitive airway smooth muscle in severe asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 1, p. 54-62, 2015.

CHEN, I.-T. *et al.* Polyubiquitination of Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1 (TAK1) at Lysine 562 Residue Regulates TLR4-mediated JNK and p38 MAPK Activation. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12300, 2015.

CHO, S. H. *et al.* Expression and distributional patterns of the inhibitor of apoptosis protein family and caspase 3 in nasal polyps. **Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery**, v. 134, n. 3, p. 316-21, 2008.

CHONG NETO, H. J.; ROSÁRIO, C. S.; ROSÁRIO, N. A. Corticoides intranasais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 33, p. 51-7, 2010.

CHOWDHURY, N. I. *et al.* Investigating the minimal clinically important difference for SNOT-22 symptom domains in surgically managed chronic rhinosinusitis. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 7, n. 12, p. 1149-55, 2017.

CONTE, D. *et al.* Inhibitor of Apoptosis Protein cIAP2 Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Survival. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 2, p. 699-708, 2006.

COUTO, L. G. F. *et al.* Histological Aspects of Rhinosinusal Polyps. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 2, p. 207-12, 2008.

CROASDELL LUCCHINI, A. *et al.* Epithelial Cells and Inflammation in Pulmonary Wound Repair. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 339, 2021.

CZERNY, M. S. *et al.* Histopathological and clinical analysis of chronic rhinosinusitis by subtype. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 4, n. 6, p. 4639, 2014.

DAMGAARD, R. B. *et al.* The Ubiquitin Ligase XIAP Recruits LUBAC for NOD2 Signaling in Inflammation and Innate Immunity. **Molecular Cell**, v. 46, n. 6, p. 746-58, 2012.

DAVIS, G. E. *et al.* Psychiatric distress amplifies symptoms after surgery for chronic rhinosinusitis. **Otolaryngology--Head and Neck Surgery**, v. 132, n. 2, p. 189-96, 2005.

DECONDE, A. S.; SOLER, Z. M. Chronic Rhinosinusitis: Epidemiology and Burden of Disease. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 30, n. 2, p. 134-9, 2016.

DELEMARRE, T. *et al.* Type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis without nasal polyps: Another relevant endotype. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 2, p. 337- 343.E6, 2020.

DERENDORF, H.; MELTZER, E. O. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: clinical and therapeutic implications. **Allergy**, v. 63, n. 10, p. 1292-300, 2008.

DONALDSON, A. M. *et al.* Intranasal Corticosteroid Therapy: Systematic Review and Meta-analysis of Reported Safety and Adverse Effects in Adults. **Otolaryngology--Head and Neck Surgery**, v. 163, n. 6, p. 1097-108, 2020.

ESTORNES, Y.; BERTRAND, M. J. M. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p. 106-14, 2015.

FOKKENS, W. J. *et al.* EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. **Rhinology**, v. 50, n. 1, p. 1-12, 2012.

FOKKENS, W. J. *et al.* European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. **Rhinology Journal**, v. 0, n. 0, p. 1-464, 2020.

FRUTH, K. *et al.* Dysregulated Survivin Expression in Nasal Polyps of Individuals with Aspirin Exacerbated Respiratory Disease. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 26, n. 5, p. 380-4, 2012.

FULDA, S. Smac mimetics as IAP antagonists. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p. 132-8, 2015.

GHOOGOMU, N.; KERN, R. Chronic rhinosinusitis: the rationale for current treatments. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 13, n. 3, p. 259-70, 2017.

HAN, J. K. *et al.* Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (SYNAPSE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1141-53, 2021.

HORNBURGER, M. C. *et al.* A novel role for inhibitor of apoptosis (IAP) proteins as regulators of endothelial barrier function by mediating RhoA activation. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 4, p. 1938-46, 2014.

HUTSON, K. *et al.* Evaluation of Smoking as a Modifying Factor in Chronic Rhinosinusitis. **JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 147, n. 2, p. 159, 2021.

JARVIS, D. *et al.* Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: The GA2LEN survey in Europe. **Allergy**, v. 67, n. 1, p. 91-8, 2012.

KAWAKAMI, K. *et al.* Altered Immune Regulation of Dendritic Cells and Enhanced Cytokine Production of T Cells in the Pathogenesis of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 182, n. 6, p. 535-45, 2021.

KLOSSEK, JM. *et al.* Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study. **Allergy**, v. 60, n. 2, p. 233-7, 2005.

KÖNNECKE, M. *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition in Chronic Rhinosinusitis: Differences Revealed Between Epithelial Cells from Nasal Polyps and Inferior Turbinates. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 2, p. 157-73, 2017.

- KÖENNECKE, M. *et al.* Subtyping of polyposis nasi: phenotypes, endotypes and comorbidities. **Allergo Journal International**, v. 27, n. 2, p. 56-65, 2018.
- KOSUGI, E. M. *et al.* Translation, cross-cultural adaptation and validation of SinoNasal Outcome Test (SNOT): 22 to Brazilian Portuguese. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 5, p. 663-9, 2011.
- KOWALSKI, M. L. *et al.* Diagnosis and management of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (N-ERD)-a EAACI position paper. **Allergy**, v. 74, n. 1, p. 28-39, 2019.
- KÜPPER, D. S. *et al.* Expression of Apoptosis Mediators p53 and Caspase 3, 7, and 9 in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 28, n. 3, p. 187-91, 2014.
- LAIDLAW, T. M. *et al.* Dexamipexole depletes blood and tissue eosinophils in nasal polyps with no change in polyp size. **The Laryngoscope**, v. 129, n. 2, p. E61-E66, 2019.
- LALAOUI, N.; VAUX, D. L. Recent advances in understanding inhibitor of apoptosis proteins. **F1000Research**, v. 7, n. F1000 Faculty Rev, p. 1889, 2018.
- LEE, M. *et al.* The IFN- γ -p38, ERK kinase axis exacerbates neutrophilic chronic rhinosinusitis by inducing the epithelial-to-mesenchymal transition. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 3, p. 601-11, 2019.
- LI, C. W. *et al.* Expression profiles of regulatory and helper T-cell-associated genes in nasal polyposis. **Allergy**, v. 67, n. 6, p. 732-40, 2012.
- LI, X. *et al.* TGF- β 1 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition of Chronic Sinusitis with Nasal Polyps through MicroRNA-21. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 179, n. 4, p. 304-19, 2019.
- LI, Y. Y. *et al.* Impairment of cilia architecture and ciliogenesis in hyperplastic nasal epithelium from nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 6, p. 1282-92, 2014.
- LIN, H.; LIN, D.; XIONG, X. Differential Expression of Livin, Caspase-3, and Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 151, n. 6, p. 1067-72, 2014.
- LOURIJSEN, E. S.; FOKKENS, W. J.; REITSMA, S. Direct and indirect costs of adult patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Rhinology**, v. 58, n. 3, p. 213-7, 2020.
- LUCAS, B. R. *et al.* BMP-7, MMP-9, and TGF- β tissue remodeling proteins and their correlations with interleukins 6 and 10 in chronic rhinosinusitis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 278, n. 11, p. 4335-43, 2021.

LUND, V. J.; MACKAY, I. S. Staging in rhinosinusitis. **Rhinology**, v. 31, n. 4, p. 183-4, 1993.

MAKOWSKA, J. S. *et al.* Respiratory hypersensitivity reactions to NSAIDs in Europe: the global allergy and asthma network (GA² LEN) survey. **Allergy**, v. 71, n. 11, p. 1603-11, 2016.

MALIK, Z. *et al.* *Staphylococcus aureus* impairs the airway epithelial barrier in vitro. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 5, n. 6, p. 551-6, 2015.

MAYER, B. A. *et al.* Inhibitor of Apoptosis Proteins as Novel Targets in Inflammatory Processes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 10, p. 2240-50, 2011.

MENG, J. *et al.* The Development of Nasal Polyp Disease Involves Early Nasal Mucosal Inflammation and Remodelling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82373, 2013.

MJÖSBERG, J. M. *et al.* Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. **Nature Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1055-62, 2011.

MORDVINOV, V. A.; SANDERSON, C. J. Regulation of IL-5 expression. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 49, n. 5, p. 345-51, 2001.

MOULIN, M. *et al.* IAPs limit activation of RIP kinases by TNF receptor 1 during development. **EMBO Journal**, v. 31, n. 7, p. 1679-91, 2012.

MÜLLER-SIENERTH, N. *et al.* SMAC Mimetic BV6 Induces Cell Death in Monocytes and Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21556, 2011.

NAGATA, Y. *et al.* Expression of IL-25, IL-33, and Thymic Stromal Lymphopoietin in Nasal Polyp Gland Duct Epithelium in Patients With Chronic Rhinosinusitis. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 33, n. 4, p. 378-87, 2019.

NOMURA, K. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. **Respiratory Research**, v. 15, n. 1, p. 21, 2014.

ORLANDI, R. R. *et al.* International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 6, n. S1, p. S22-S209, 2016.

ORLANDI, R. R. *et al.* International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis 2021. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 11, n. 3, p. 213-739, 2021.

PAPI, A. *et al.* Rhinovirus infection causes steroid resistance in airway epithelium through nuclear factor κ B and c-Jun N-terminal kinase activation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, p. 1075-85.e6, 2013.

PARK, I.-H. *et al.* Trichostatin A Inhibits Epithelial Mesenchymal Transition Induced by TGF- β 1 in Airway Epithelium. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0162058, 2016.

PHILCHENKOV, A.; MIURA, K. The IAP Protein Family, SMAC Mimetics and Cancer Treatment. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 21, n. 3-4, p. 185-202, 2016.

PILAN, R. R. *et al.* Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. **Rhinology**, v. 50, n. 2, p. 129-38, 2012.

PRAKASH, H. *et al.* Deficiency of XIAP Leads to Sensitization for Chlamydomphila pneumoniae Pulmonary Infection and Dysregulation of Innate Immune Response in Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 26, p. 20291302, 2010.

RIVA, G. *et al.* Long-term evaluation of nasal polyposis recurrence: A focus on multiple relapses and nasal cytology. **American Journal of Otolaryngology**, v. 43, n. 2, p. 103325, 2022.

ROSCIOLI, E. *et al.* BIRC3 single nucleotide polymorphism associate with asthma susceptibility and the abundance of eosinophils and neutrophils. **Journal of Asthma**, v. 54, n. 2, p. 116-24, 7 2017.

ROSCIOLI, E. *et al.* Cellular inhibitor of apoptosis-2 is a critical regulator of apoptosis in airway epithelial cells treated with asthma-related inflammatory cytokines. **Physiological Reports**, v. 1, n. 5, p. e00123, 2013.

RUDMIK, L. Economics of Chronic Rhinosinusitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, n. 4, p. 20, 2017.

SELLA, G. C. P. *et al.* Asthma Is the Dominant Factor for Recurrence in Chronic Rhinosinusitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 8, n. 1, p. 3029, 2020.

SEYBT, M. W.; McMANS, K. C.; KOUNTAKIS, S. E. The prevalence and effect of asthma on adults with chronic rhinosinusitis. **Ear, Nose, & Throat Journal**, v. 86, n. 7, p. 409-11, 2007.

SHARMA, S.; KAUFMANN, T.; BISWAS, S. Impact of inhibitor of apoptosis proteins on immune modulation and inflammation. **Immunology & Cell Biology**, v. 95, n. 3, p. 236-43, 2017.

SHAW, J. L. *et al.* IL-33–Responsive Innate Lymphoid Cells Are an Important Source of IL-13 in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 188, n. 4, p. 432-9, 2013.

SOYKA, M. B. *et al.* Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: The regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 5, p. 108796.e10, 2012.

STEVENS, W. W. *et al.* Associations Between Inflammatory Endotypes and Clinical Presentations in Chronic Rhinosinusitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 7, n. 8, p. 2812-20.e3, 2019.

STEVENS, W. W. *et al.* Chronic rhinosinusitis pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 6, p. 1442-53, 2015.

STEVENS, W. W. *et al.* Clinical Characteristics of Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps, Asthma, and Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 5, n. 4, p. 1061-70.e3, 2017.

STJÄRNE, P. *et al.* A Randomized Controlled Trial of Mometasone Furoate Nasal Spray for the Treatment of Nasal Polyposis. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 132, n. 2, p. 179, 2006.

TAKABAYASHI, T. *et al.* Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 3, p. 584-92.e4, 2013.

TAKATSU, K.; NAKAJIMA, H. IL-5 and eosinophilia. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 3, p. 288-94, 2008.

TANG, J. *et al.* Eosinophilic colitis in a boy with a novel XIAP mutation: a case report. **BMC Pediatrics**, v. 20, n. 1, p. 171, 2020.

TANTILIPKORN, P. *et al.* Chronic Rhinosinusitis and Allergy: Increased Allergen Sensitization Versus Real Allergic Rhinitis Multimorbidity: a Systematic Review. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 20, n. 7, p. 19, 2020.

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. **Primary Care Respiratory Journal**, v. 17, n. 2, p. 79-89, 2008.

TREVOR, J. L.; DESHANE, J. S. Refractory asthma: mechanisms, targets, and therapy. **Allergy**, v. 69, n. 7, p. 817-27, 2014.

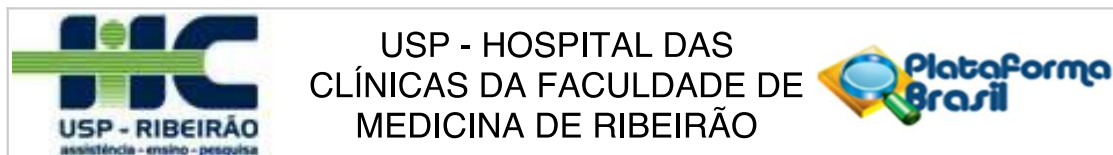
TSENG, P.-H. *et al.* Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 70-5, 2010.

TURNER, J. H. *et al.* Identification of clinically relevant chronic rhinosinusitis endotypes using cluster analysis of mucus cytokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 5, p. 1895-7.e7, 2018.

- UMLAND, S. P. *et al.* The inhibitory effects of topically active glucocorticoids on IL-4, IL-5, and interferon-gamma production by cultured primary CD4+ T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, n. 4, p. 511-9, 1997.
- VALERA, F. C. P. *et al.* Expression of transcription factors NF- κ B and AP-1 in nasal polyposis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 4, p. 579-85, 2008.
- VALERA, F. C. P. *et al.* Evaluating budesonide efficacy in nasal polyposis and predicting the resistance to treatment. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 1, p. 81-8, 2009.
- VALERA, F. C. P. *et al.* NF-kappaB expression predicts clinical outcome for nasal polyposis. **Rhinology**, v. 48, n. 4, p. 408-41, 2010.
- VALERA, F. C. P. *et al.* Staphylococcus aureus impairs sinonasal epithelial repair: Effects in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and control subjects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. 591-603.e3, 2019.
- WANG, F.; YANG, Y.; CHEN, H. Alteration of Histopathology in Recurrent Nasal Polyps. **ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and its Related Specialties**, v. 84, n. 3, p. 255-61, 2022.
- WANG, M. *et al.* Eosinophils Correlate with Epithelial-Mesenchymal Transition in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. **ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and its Related Specialties**, v. 84, n. 1, p. 70-80, 2022.
- WANG, X. *et al.* Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 5, p. 1344-53, 2016.
- WASAN, A. *et al.* Association of Anxiety and Depression with Reported Disease Severity in Patients Undergoing Evaluation for Chronic Rhinosinusitis. **Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology**, v. 116, n. 7, p. 491-7, 2007.
- WILSON, K. F.; McMANS, K. C.; ORLANDI, R. R. The association between allergy and chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: an evidence-based review with recommendations. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 4, n. 2, p. 93-103, 2014.
- YU, X. M. *et al.* Down-regulation of EMP1 is associated with epithelial hyperplasia and metaplasia in nasal polyps. **Histopathology**, v. 63, n. 5, p. 686-95, 2013.
- ZHANG, N. *et al.* Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 5, p. 961-8, 2008.
- ZHANG, X. *et al.* Divergent effect of mometasone on human eosinophil and neutrophil apoptosis. **Life Sciences**, v. 71, n. 13, p. 1523-34, 2002.

8. Anexos

ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência dos inibidores das caspases na resposta ao Furoato de Mometasona em pacientes com Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal

Pesquisador: IVNA MOTA PASSOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62763316.7.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.996.136

Apresentação do Projeto:

As enzimas inibidoras das caspases (cIAP1, cIAP2 e XIAP) têm se destacado recentemente como tendo um papel importante como reguladoras da inflamação. Sabendo da importância da inflamação no desenvolvimento da Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal (RSCcPN), o presente estudo tem como finalidade avaliar o potencial envolvimento dessas enzimas na fisiopatogenia da RSCcPN, assim como o efeito delas sobre a resistência ao corticosteroide tópico, um dos tratamentos considerados padrão ouro para RSCcPN.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivo avaliar a presença dos inibidores da apoptose na RSCcPN e controles normais, além de investigar seu potencial envolvimento no processo inflamatório dessa doença. Ainda, pretendemos avaliar o efeito da expressão dos inibidores de caspases sobre a resistência clínica ao corticoide tópico (furoato de mometasona).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os principais riscos estariam relacionados a dor e sangramento, durante a biópsia.

Benefícios: Avaliar as possíveis causas de resistência ao principal tratamento clínico disponível para a doença.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

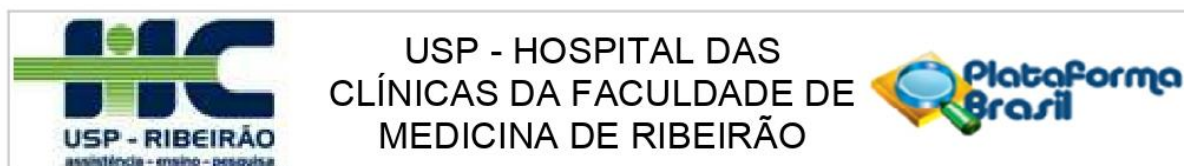
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.996.136

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo Caso-controle. Serão selecionados um total de sessenta pacientes que serão divididos em dois grupos. Quarenta pacientes com RSCcPN e 20 pacientes controles, de ambos os sexos. Os pacientes de ambos os grupos deverão primeiramente assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e após serão avaliados clinicamente quanto a presença de sinais e sintomas de RSCcPN, em seguida: Os pacientes com sinais e sintomas RSCcPN serão submetidos a: 1. Um questionário de qualidade de vida, específico para doenças nasossinusais, o SNOT-22. 2. O exame endoscópico, exame já de rotina a todos os pacientes avaliados rotineiramente no serviço. Durante o exame, serão consideradas a presença de sinais de RSCcPN e graduação de acordo com o escore de Fokkens. Ainda, durante o exame, é colhida uma biópsia do pólipos nasal, conforme rotina do serviço para confirmação anátomo-patológica. Especificamente para o estudo, a amostra será dividida em 3 pedaços: uma deverá ser mantida em formol (para encaminhamento à patologia, como rotina do serviço) e as outras amostras mantidas a -70oC para posterior processamento e análise de RNA e proteínas. 3. Tomografia computadorizada de seios da face, exame também rotina para estadiamento de pacientes com RSCcPN. Será utilizada a escala de Lund-Mackay, pela qual avaliaremos os achados de comprometimento nasossinusal. O total da pontuação vai de 0 a 24 pontos, sendo o valor mais alto correspondente a maior gravidade da doença. Os pacientes do grupo controle, serão, durante o procedimento cirúrgico (rinoplastia), submetidos a endoscopia nasal e biópsia de concha média. A amostra deverá ser dividida em duas, e mantidas a -70oC para posterior processamento e estudo de PCR. As amostras de pólipos nasais serão coletadas no ambulatório de Rinologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e as de epitélio nasal do grupo controle serão coletadas no Centro Cirúrgico do mesmo hospital e enviadas para o Laboratório do Departamento de Otorrinolaringologia, Oftalmologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço – HCFMRP-USP. Para o transporte, as regras de biossegurança e de conservação das amostras serão cumpridas, pois a integridade destas devem ser mantidas durante todo o transporte, a fim de que se tenha precisão nos resultados obtidos. Após a avaliação inicial, os pacientes com RSCcPNS serão submetidos a tratamento com furoato de mometasona tópico nasal (tratamento considerado padrão ouro para RSCcPN, na dose de 4 jatos por narina/dia) por um período de 60 dias e serão reavaliados com nova endoscopia, conforme já é preconizado para avaliação destes pacientes na rotina do serviço. Nesse mesmo momento, será novamente aplicado o questionário SNOT-22. Para extração de ácidos nucleicos e das proteínas dos tecidos, as amostras deverão ser congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, em tubos plásticos estéreis e livres de RNAses. Será extraído o RNA total da amostra conforme especificação do

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



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 1.996.136

fabricante (Qiagen) e após isso, será realizada a quantificação do RNA total em NanoDrop. Os RNAs extraídos por biópsia serão processados para avaliação dos inibidores das caspases (IAP1, IAP2 e Bcl2), através de PCR quantitativo em tempo real, com uso de sondas Taq-Man específicas, de acordo com a especificação do fabricante (Applied Biosystems). Os mesmos inibidores de caspases, e as caspases 3, 7 e 9, serão analisadas por ELISA, confirmando assim sua expressão proteica. Para isso, kits específicos de ELISA serão adquiridos, e seguir-se-á a especificação do fabricante. Por fim, será avaliada a expressão das citocinas pró-inflamatórias como INF alfa e gama, IL-5, IL-10, IL-33, IL-17 e TGF beta. Para análise será utilizado o Ensaio Luminex, onde também serão seguidas as normas de protocolo especificadas pelo fabricante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios foram apresentados. A pesquisadora atendeu adequadamente as pendências solicitadas no parecer anterior.

Recomendações:

não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o Projeto de pesquisa Versão 2 – mod em 21/03/2017, a solicitação de criação de biorrepositório assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2 – mod em 21/03/2017 (grupo de estudo e grupo controle) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico (grupo de estudo e grupo controle), podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

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.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_827627.pdf	23/03/2017 20:15:29		Aceito
Outros	Pedido_biorrepositorio.docx	23/03/2017	IVNA MOTA	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.996.136

Outros	Pedido_biorrepositorio.docx	20:14:58	IVNA MOTA	Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	21/03/2017 23:35:53	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Outros	TCLE_Grupo_de_Estudo_versao2.docx	21/03/2017 23:34:40	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Outros	TCLE_Grupo_Controlado_versao2.docx	21/03/2017 23:33:35	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Outros	TCLE_biorrepositorio_Grupo_de_Estudo.docx	21/03/2017 23:31:25	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Outros	TCLE_biorrepositorio_grupo_controlado.docx	21/03/2017 23:29:59	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_completo_versao2.docx	21/03/2017 23:24:00	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	06/12/2016 10:07:27	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Outros	Aprovacao_UPC.docx	02/12/2016 19:56:00	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.docx	02/12/2016 19:54:07	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_completo.docx	17/11/2016 12:23:53	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Outros	Cronograma.docx	17/11/2016 12:21:13	IVNA MOTA PASSOS	Aceito
Outros	Orcamento.docx	17/11/2016 12:15:00	IVNA MOTA PASSOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 03 de Abril de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

ANEXO B - QUESTIONÁRIO SNOTT-22 - VERSÃO EM PORTUGUÊS

Quadro 1. Versão em Língua Portuguesa do SNOT-22.

QUESTIONÁRIO SNOT-22 (Português-BR)

Abaixo, você encontrará uma lista de sintomas e problemas sociais/emocionais que afetam os pacientes que sofrem de rinosinusite. Nós gostaríamos de saber mais sobre esses problemas e ficaríamos gratos por responder as seguintes perguntas sobre os seus sintomas. Não há nenhuma resposta certa ou errada e somente você pode nos fornecer esta informação. Avalie por favor como foram seus problemas nas duas últimas semanas. Obrigado pela sua participação. Caso tenha alguma dúvida no preenchimento do questionário solicite auxílio ao médico.

Considerando a gravidade dos problemas, classifique a intensidade dos sintomas circulando o número correspondente da escala →	Nenhum problema	Problema muito leve	Problema leve	Problema moderado	Problema grave	Pior problema possível
1. Necessidade de "assoar" o nariz	0	1	2	3	4	5
2. Espirros	0	1	2	3	4	5
3. Nariz "escorrendo"	0	1	2	3	4	5
4. Tosse	0	1	2	3	4	5
5. Secreção do nariz indo para a garganta	0	1	2	3	4	5
6. Secreção grossa saindo do nariz	0	1	2	3	4	5
7. Sensação de ouvido cheio ou tampado	0	1	2	3	4	5
8. Tontura ou vertigem	0	1	2	3	4	5
9. Dor de ouvido	0	1	2	3	4	5
10. Dor ou pressão no rosto	0	1	2	3	4	5
11. Dificuldade para conseguir dormir	0	1	2	3	4	5
12. Acorda no meio da noite	0	1	2	3	4	5
13. Falta de uma boa noite de sono	0	1	2	3	4	5
14. Acorda cansado	0	1	2	3	4	5
15. Fadiga ou cansaço durante o dia	0	1	2	3	4	5
16. Diminuição do seu rendimento para realizar atividades do seu dia a dia	0	1	2	3	4	5
17. Diminuição da sua concentração para realizar atividades do seu dia a dia	0	1	2	3	4	5
18. Frustrado, agitado ou irritado	0	1	2	3	4	5
19. Tristeza	0	1	2	3	4	5
20. Sensação de vergonha	0	1	2	3	4	5
21. Dificuldade para sentir "cheiros" ou "gostos"	0	1	2	3	4	5
22. Nariz entupido	0	1	2	3	4	5

TOTAL: _____

Fonte: Adaptado de Kosugi *et al.* (2011).

9. Apêndices

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO DE ESTUDO

Pesquisadoras responsáveis: Fabiana Cardoso Pereira Valera

Ivna Mota Passos

Copesquisador: Edwin Tamashiro

Telefones: 16 3602-2321 / 16 3602-2863 / 16 98232-8888

Você está sendo convidado para participar do estudo:

Influência dos inibidores das caspases na resistência ao Furoato de Mometasona em pacientes com Rinossinusite Crônica com Pólipo 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 corticoide 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 e sua resposta ao tratamento clínico atual mais comum. Avaliando fatores que, se presentes, poderiam diminuir a eficácia desses medicamentos. Isso poderá ajudar a desenvolver novas drogas no futuro para o tratamento da sua doença.

Você será avaliado, na primeira etapa da pesquisa, durante uma consulta de rotina do ambulatório. Além das perguntas clínicas de rotina, você responderá algumas perguntas específicas sobre qualidade de vida (que leva em torno de 5 a 10 minutos para ser preenchido).

Além disso, como rotina de toda primeira consulta no ambulatório, você será submetido a endoscopia nasal. Esse exame é realizado para avaliar melhor o interior do seu nariz, e é rotina o encaminhamento de um pedaço da mucosa nasal alterada para análise de patologia. Especificamente para a pesquisa, a amostra coletada será dividida, de forma que

um pedaço será encaminhado para a patologia, e outra será armazenado para a pesquisa. Por fim, você realizará também a tomografia dos seios da face; esse exame também é rotina para avaliar a extensão da sua doença, e utilizaremos essa informação na pesquisa.

Os principais riscos relacionados ao exame de endoscopia e biópsia são dor e sangramento nasal de pequena monta, aos quais serão oferecidos prontamente assistência médica. É importante ressaltar que você não será exposto a risco adicional de qualquer espécie, já que os exames já são realizados de rotina em qualquer paciente com a sua doença.

Após você ter aceitado participar da pesquisa e ter realizado a avaliação inicial, você receberá o furoato de mometasona (tratamento considerado padrão para a sua doença), para um tratamento por um período de 60 dias. Você receberá a orientação de como utilizar adequadamente o medicamento. Após o período de tratamento, você será reavaliado, sendo que você deverá responder o mesmo questionário aplicado anteriormente, e será realizada nova endoscopia (também conforme rotina para seguimento da rinossinusite crônica).

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 você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, uma vez que todas as etapas da pesquisa serão realizadas em atendimento médico pré-estabelecidos. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação, nem ressarcimento de despesas decorrentes da participação na pesquisa, tais como alimentação e transporte. Despesas adicionais serão excepcionais, mas se existirem, você será reembolsado com o orçamento da pesquisa. Caso decida participar e caso ocorra dano decorrente de sua participação na pesquisa, você terá direito à indenização, conforme as leis vigentes no país.

Reforçamos que os dados colhidos serão usados somente para esta pesquisa, e que em nenhum momento você será exposto. Os dados do estudo poderão ser usados para divulgação em eventos médicos ou publicações em revistas científicas, garantindo sempre o anonimato dos pacientes. E estarão disponíveis quando solicitados pelos pacientes e/ou responsáveis.

A sua participação neste estudo será 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. Você também estará livre para retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, nem prejuízo ao seu cuidado nesta instituição.

Se você decidir fazer parte da pesquisa, você precisará assinar duas vias deste documento para comprovar que você deu seu consentimento em participar, sendo que você fica com uma via.

Caso ainda tenha dúvidas, os pesquisadores estarão a sua disposição para esclarecimentos de qualquer dúvida relacionada à pesquisa, antes e durante sua realização, pelos telefones (3602-2863, 3202-2321 ou 98232-8888, sendo, este último, disponível 24 horas), ou o Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital (telefone de contato: 3602-2228 e-mail: cep@hcrp.usp.br), que estará disponível para dúvidas éticas relacionadas à pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com o Dra. Ivna Mota Passos, 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: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO CONTROLE

Pesquisadoras responsáveis: Fabiana Cardoso Pereira Valera
Ivna Mota Passos

Copesquisador: Edwin Tamashiro

Telefones: 16 3602-2321 / 16 3602-2863 / 16 98232-8888

Você está sendo convidado para participar do estudo:
Influência dos inibidores das caspases na resistência ao Furoato de Mometasona em pacientes com Rinossinusite Crônica com Pólipo 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 corticoide 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 e sua resposta ao tratamento clínico atual mais comum. Avaliando fatores que, se presentes, poderiam diminuir a eficácia desses medicamentos. Isso poderá ajudar a desenvolver novas drogas no futuro para o tratamento da sua doença.

Você está sendo convidado para participar do grupo controle, ou seja, daquele grupo que não possui a doença e que será comparado ao grupo de estudo, dos que possuem a doença. Sua participação é imprescindível para que possamos identificar as diferenças entre os dois grupos e, assim, aumentarmos nosso conhecimento sobre essa doença tão comum no nosso meio.

Estamos convidando você porque você será indicado para uma cirurgia nasal, rinoplastia. A sua participação na pesquisa se dará em apenas uma etapa: durante a cirurgia, você será submetido à endoscopia nasal, que avaliará o interior do seu nariz. Durante esse exame, será retirado um pedaço da mucosa nasal que será enviado para estudo genético. O pequeno risco de sangramento local durante o procedimento pode

ocorrer, e caso presente terá assistência imediata por nossa equipe. Não haverá risco ou dor adicional, pois o procedimento será realizado quando você estiver sob anestesia.

Os seus benefícios serão indiretos, pois este estudo ajudará a promover uma melhor compreensão doença, bem como do tratamento. Não haverá benefícios diretos neste estudo.

Não haverá despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, uma vez que sua participação na pesquisa será apenas durante a cirurgia. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação, nem ressarcimento de despesas decorrentes da participação na pesquisa, tais como alimentação e transporte. Despesas adicionais serão excepcionais, mas se existirem, você será reembolsado com o orçamento da pesquisa. Caso decida participar e caso ocorra dano decorrente de sua participação na pesquisa, você terá direito à indenização, conforme as leis vigentes no país.

Reforçamos que os dados colhidos serão usados somente para esta pesquisa, e que em nenhum momento você será exposto. Os dados do estudo poderão ser usados para divulgação em eventos médicos ou publicações em revistas científicas, garantindo sempre o anonimato dos pacientes. E estarão disponíveis quando solicitados pelos pacientes e/ou responsáveis.

A sua participação neste estudo será 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. Você também está livre para retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, nem prejuízo ao seu cuidado nesta instituição.

Se você decidir fazer parte da pesquisa, você precisará assinar duas vias deste documento para comprovar que você deu seu consentimento em participar, sendo que você fica com uma via.

Caso ainda tenha dúvidas, os pesquisadores estarão a sua disposição para esclarecimentos de qualquer dúvida relacionada à pesquisa, antes e durante sua realização, pelos telefones (3602-2863, 3202-2321 ou 98232-8888, sendo, este último, disponível 24 horas), ou o Comitê de Ética em Pesquisa deste Hospital (telefone de contato: 3602-2228 e-mail: cep@hcrp.usp.br), que estará disponível para dúvidas éticas relacionadas à pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com o Dra. Ivna Mota Passos, 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 ____ / ____ / ____

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO GRUPO DE ESTUDO

Eu, *Fabiana Cardoso Pereira Valera*, sou responsável pelo biorrepositório ligado ao projeto “*Influenciadores dos inibidores das caspases na resposta ao Furoato de Mometasona em pacientes com rinossinusite crônica com pólipos nasossinusal*” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Esse biorrepositório tem como objetivo guardar amostras de mucosa nasal para avaliar existem fatores específicos nessa mucosa que sejam marcadores para o sucesso no tratamento com corticoide tópico. Eu gostaria de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização da sua mucosa nasal para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Este material será coletado durante a endoscopia nasal rotina à qual você será submetido durante a consulta no ambulatório. Após coletada, a mucosa nasal será guardada em biorrepositório por 10 anos no laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (*Av. Bandeirantes, 3900, telefone 16 3315-0579*), onde as amostras serão armazenadas até o final deste estudo.

Eu, como o responsável pela pesquisa, me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de mucosa nasal será identificada por meio de códigos.

Quanto à coleta de material, será coletado uma amostra do tamanho da cabeça de um cotonete. Em decorrência da coleta, pequena quantidade de sangramento ou discreta dor podem ocorrer. Serão tomadas medidas para evitar ao máximo esses desconfortos, e para revertê-los, caso eles ocorram.

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos autorização, caso seja necessário, para o descarte do material armazenado após finalização do projeto.

Declaramos para os devidos fins que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Dados do doador:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____, bairro _____, cidade _____,
telefone _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua amostra de material biológico seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade de Fabiana Cardoso Pereira Valera / Ivna Mota Passos, para fins de pesquisa e análise científica. **Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhor (a).**

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que aprovou este biorrepositório, pelo telefone (16) 3602-2228.

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: _____
Telefone para contato: _____
Assinatura: _____
Data: _____

Dados do participante (doador):

Nome legível: _____
Assinatura: _____
Data: _____

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____
Assinatura: _____
Data: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO GRUPO CONTROLE

Eu, *Fabiana Cardoso Pereira Valera*, sou responsável pelo biorrepositório ligado ao projeto “*Influenciadores dos inibidores das caspases na resposta ao Furoato de Mometasona em pacientes com rinosinusite crônica com pólipos nasossinusal*” criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Esse biorrepositório tem como objetivo guardar amostras de mucosa nasal para avaliar existem fatores específicos nessa mucosa que sejam marcadores para o sucesso no tratamento com corticoide tópico. Eu gostaria de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização da sua mucosa nasal para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Como participante do grupo controle, o seu material será coletado durante a rinosseptoplastia à qual você será submetido. Após coletada, a mucosa nasal será guardada em biorrepositório por 10 anos no laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (*Av. Bandeirantes, 3900, telefone 16 3315-0579*), onde as amostras serão armazenadas até o final deste estudo.

Eu, como o responsável pela pesquisa, me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de mucosa nasal será identificada por meio de códigos.

Quanto à coleta de material, será coletado uma amostra do tamanho da cabeça de um cotonete. Em decorrência da coleta, pequena quantidade de sangramento pode ocorrer. Serão tomadas medidas para evitar ao máximo esse desconforto, e para revertê-lo, caso ele ocorra.

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos autorização, caso seja necessário, para o descarte do material armazenado após finalização do projeto.

Declaramos para os devidos fins que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Dados do doador:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____, bairro _____, cidade _____,
telefone _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua amostra de material biológico seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade de Fabiana Cardoso Pereira Valera / Ivna Mota Passos, para fins de pesquisa e análise científica. **Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhor (a).**

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, o(a) senhor(a) também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, que aprovou este biorrepositório, pelo telefone (16) 3602-2228.

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: _____
Telefone para contato: _____
Assinatura: _____
Data: _____

Dados do participante (doador):

Nome legível: _____
Assinatura: _____
Data: _____

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____
Assinatura: _____
Data: _____

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO DE ESTUDO

Endoscopia Nasal:

Característica	Avaliação pré	Avaliação pós
Pólipo D (0,1,2)		
Pólipo E (0,1,2)		
Edema D (0,1,2)		
Edema E (0,1,2)		
Descarga D (0,1,2)		
Descarga E (0,1,2)		
Total		

Pólipo:

- 0- ausência
- 1- meatos médio somente
- 2- além do meato médio

Edema: 0 - ausência/ 1- moderado/ 2 - severo

Descarga: 0 - ausência/ 1- fina, hialina/ 2 - espessa, purulenta

Tomografia:

Seio	Direito	Esquerdo	Total
Maxilar			
Etmoide anterior			
Etmoide posterior			
Esfenoide			
Frontal			
Complexo óstio meatal			
Total			

Seios: 0 - normal / 1 - opacificado parcialmente / 2 - opacificado completamente

COM: 0 - sem obstrução / 2 - obstruído