

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Renata Loss Drummond

**Avaliação do dano do DNA em células do
epitélio nasal de pacientes com rinossinusite
crônica com polipose nasossinusal.**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2016

Renata Loss Drummond

Avaliação do dano do DNA em células do epitélio nasal de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Sérgio Luis Amantéa
Co-orientadores: Dr. José Faibes Lubianca Neto
Dra. Cláudia Ramos Rhoden

**Porto Alegre
2016**

Catalogação na Publicação

Drummond, Renata Loss
Avaliação do dano do DNA em células do epitélio nasal
de pacientes com rinossinusite crônica com polipose
nasossinusal / Renata Loss Drummond. -- 2016.
88 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Sérgio Luís Amantéa ; coorientador(a):
Cláudia Ramos Rhoden, José Faibes Lubianca Neto.

1. Micronúcleo. 2. Polipose Nasossinusal. 3.
Rinossinusite Crônica. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Por ser, talvez, a única parte extremamente pessoal da tese, os agradecimentos acabam sendo postergados em muitos momentos, mas não poderia deixar de agradecer:

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e paciência sempre demonstrados, em todas as etapas da minha vida pessoal e profissional; são, certamente, o meu exemplo diariamente.

À minha irmã, Marta, por ser um exemplo de vida, pelo companheirismo, amizade e auxílios desde a inscrição no Mestrado.

Ao meu namorado, Vagner, pela paciência em todos os momentos de ausência, sempre me incentivando, mesmo quando a tese parecia nunca chegar ao fim.

Ao meu orientador, Dr. Sérgio, pela disponibilidade, generosidade, educação e paciência, por não me deixar desanimar mesmo nos momentos mais difíceis no decorrer da tese.

À Dra Rita, por não me deixar desistir e por me ajudar, sempre, em assuntos pessoais e profissionais, sendo um exemplo diário de boa profissional e amiga.

Ao Dr. Lubianca por me incentivar a manter a pesquisa institucional, mas principalmente por me ensinar, diariamente, otorrinolaringologia.

À Dra Claudia e sua equipe do Laboratório de Estresse Oxidativo e ao Laboratório 303 por me receberem sempre muito bem em seus locais de trabalho.

Ao Serviço de Otorrinolaringologia da Santa Casa de Porto Alegre, que me ensinou a especialidade, me acolheu e me proporciona o contato diário com grupo extremamente qualificado de colegas otorrinolaringologistas e residentes.

Aos meus amigos que compreenderam as minhas ausências e as minhas necessidades, em especial às minhas queridas Raquel e Carol.

Por fim, ao Mestre Alan, que demonstrou profissionalismo e paciência ímpares, e possibilitou que este trabalho fosse realizado; o meu sincero agradecimento, pois, poucas pessoas teriam a capacidade de ensinar, com maestria, a arte do laboratório a uma médica; não existem palavras para agradecer o esforço que fizeste pelo meu trabalho.

Resumo

A rinossinusite crônica com polipose nasossinusal (RSCcPN) caracteriza-se por inflamação sintomática da mucosa nasal e é uma doença bastante prevalente, atingindo até 2% da população mundial, afetando consideravelmente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Atualmente, entende-se que diferentes fatores estão envolvidos na sua etiologia, sendo que características do hospedeiro também são fundamentais para o seu desenvolvimento; estudos recentes propõem que modelos moleculares inflamatórios que caracterizam a RSCcPN poderão auxiliar na determinação da fisiopatologia da doença, guiando a terapêutica adequada. Para a avaliação de risco individual é importante estimar as alterações funcionais das células ou tecidos, assim, podemos determinar as alterações moleculares em nível de DNA. Técnicas, como os micronúcleos (MNs), que utilizam a avaliação de danos no DNA de células esfoliativas, como as encontradas no epitélio nasal, tem sido utilizadas como uma forma não invasiva de monitorar populações humanas, tendo a capacidade de indicar eventos celulares e moleculares importantes para esclarecer sobre as relações entre a exposição a agentes causadores de doenças e os efeitos sobre a saúde. Assim, a análise de danos no DNA de células epiteliais pode ajudar a melhor compreender a etiologia e a patogênese das doenças, permitindo o planejamento de estratégias de prevenção e tratamento. O presente estudo tem por objetivo avaliar a presença de danos ao DNA de células do epitélio nasal em pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal. Desenvolveu-se estudo transversal, onde foram analisadas amostras coletadas da mucosa nasal de 40 pacientes (21 com polipose e 19 sem polipose nasossinusal); foram excluídos pacientes tabagistas. Encontrou-se média de 3,690 micronúcleos por 1000 células analisadas ($\pm 2,165$) em pacientes com RSCcPN, enquanto os pacientes do grupo controle apresentam média de 1,237 ($\pm 0,806$); (teste $t=4,653$, $p < 0,001$). Houve aumento de número de MNs em pacientes com RSCcPN, com significância estatística ($p < 0,001$), no entanto devemos considerar a possibilidade de viés relacionado ao fato de o grupo controle ser jovem que o grupo de pacientes com polipose; assim, mais estudos são necessários para complementação de resultados.

Palavras-chave: polipose nasossinusal, micronúcleos, dano no DNA

Abstract

Chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (CRSwNP) is characterized by a symptomatic inflammation of the nasal mucosa. This is a widely prevalent disease, reaching up to 2% of the world population, considerably affecting the quality of life of the affected individuals. Currently, it is understood that different factors are involved in its etiology, including the characteristics of the host. Thus, inflammatory molecular models may assist in determining the physiopathology of the disease, and guide the appropriate therapy. The micronucleus technique (MNs) was used to indicate cellular and molecular events; this way, the analysis of DNA damage of epithelial cells can help better understand the etiology and pathogenesis of diseases, enabling the planning of strategies for prevention and treatment. For individual risk assessment is important to estimate the functional changes of cells or tissues, so we can determine the molecular changes in DNA level. Techniques such as micronuclei (MNs), that use the assessment of DNA damage in exfoliated cells, such as found in the nasal epithelium, has been used as a noninvasive way of monitoring human populations; this technique could indicate the molecular and cellular events important to clarify the relationship between exposure to disease-causing agents and the effects on health. Thus, the analysis of DNA damage in this cells can help us to understand the etiology and pathogenesis of diseases, enabling the planning of strategies for prevention and treatment. This study aims to evaluate the presence of damage to the nasal epithelium cell DNA in patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps; we developed a cross-sectional study, which collected samples of nasal mucosa of 40 non-smoker patients (21 with polyps and 19 without nasal polyposis). An average of 3,690 micronuclei per 1000 cells analyzed ($\pm 2,165$) in patients with RSCcPN, while control patients showed an average of 1,237 (± 0.806); ($t = 4.653$ test, $p < 0.001$). We observed an increase of MN number in patients with RSCcPN, with statistical significance ($p < 0.001$), however we must consider the possibility of bias related to the fact that the control group is younger than patients with polyposis; thus more studies are needed to complement our results.

Keywords: nasal polyposis, micronuclei, DNA damage

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAS	Ácido Acetilsalicílico
AERD	Aspirin Exacerbated Respiratory Disease - Doença Respiratória Exacerbada pela Asspirina
BAFF	do inglês, B-cell activating factor, fator ativador de células B
BUDs	Brotos nucleares
CE	Corticoesteroides
CSF	do inglês, colony-stimulating factor fator de estimulação de colônia
DAPI	do inglês, 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-diamidino-2-fenilidone
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrao
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EP3OS	European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyposis 2012
EUA	Estados Unidos da América
GM-CSF	do inglês, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, fator de estimulação de colônia de granulócitos-mastócitos
HCl	Ácido clorídrico
HUMN	do inglês, <i>The International Human Micronucleus</i> , Projeto Internacional de Micronúcleo Humano
IFN α	Interferon α
IFN β	Interferon β
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-25	Interleucina 25
IL-32	Interleucina 32
IL-33	Interleucina 33
MEC	Matriz extracelular
MMG	coloração May-Grünwald/Giemsa
MNs	Micronúcleos
NIH	do inglês, <i>National Institute of Health</i>
NO	óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
PGE	Prostaglandinas
p53	proteína p53
RANTES	do inglês, Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RSC	Rinossinusite crônica
RSCcPN	Rinossinusite crônica com polipose nasossinusal
RSCsPN	Rinossinusite crônica sem polipose nasossinusal
TGF-β	do inglês, Transforming Growth Factor-β
Th2	Linfócitos T helper do tipo 2
TLR	do inglês, <i>Toll-like receptors</i>
TNF-α	inglês, Transforming Growth Factor- α
Treg	do inglês, T regulatory cell, Linfócito T regulatório
TSLP	do inglês, Thymic stromal lymphopoietin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Sumário

1. Rinossinusite crônica -----	12
1.1 Diagnóstico -----	12
1.1.1 Exame físico e complementar -----	13
1.2 Epidemiologia -----	14
1.3 Etiologia e Patogenia da Rinossinusite Crônica -----	15
1.3.1 Fatores inflamatórios -----	16
1.3.1.1 Bactérias -----	16
1.3.1.2. Fungos -----	17
1.3.1.3 Atopia -----	17
1.3.1.4. Vírus -----	17
1.3.1.5. Toxinas ambientais -----	17
1.3.2 Cascata inflamatória do hospedeiro na Rinossinusite Crônica -----	18
1.3.2.1 Barreira mecânica -----	18
1.3.2.2. Células Epiteliais -----	19
1.3.2.3. Células dendríticas -----	20
1.3.2.4. Macrófagos -----	20
1.3.2.5. Eosinófilos -----	20
1.3.2.6. Neutrófilos -----	21
1.3.2.7 Mastócitos -----	21
1.3.2.8. Plasmócitos e Imunoglobulinas -----	21
1.3.2.9. Células T e Citocinas -----	21

1.3.2.10. Remodelamento	22
1.3.2.11. Cascata do Ácido Aracdônico	22
1.3.2.12. Proteína p53	23
1.3.3. Fatores associados à Rinossinusite Crônica	23
1.3.3.1. Fatores locais do hospedeiro	23
1.3.3.2. Fatores ambientais e cigarro	23
1.3.3.3. Fatores iatrogênicos	23
1.3.3.4. Refluxo laringo- faríngeo	23
1.4 Complicações de Rinossinusite Crônica	24
1.4.1. Mucocele	24
1.4.2. Osteíte	24
1.4.3. Erosão e expansão ósseas	24
1.4.4. Metaplasia óssea	24
1.4.5. Neuropatia óptica	24
1.5. Genética e Rinossinusite Crônica	24
1.6. Qualidade de Vida e Rinossinusite Crônica	25
1.7. Tratamento	26
1.7.1 Clínico	26
1.7.1.1. Corticoesteroides	26
1.7.1.2. Antimicrobianos	27
1.7.1.3. Outros tratamento clínicos	28
1.7.2. Cirúrgico	29
1.7.2.1. Complicações do Tratamento Cirúrgico	30
2. Avaliação de dano no DNA - Técnica dos Micronúcleos	31
2.1. Biomarcadores e Avaliação de dano no DNA	31

2.2. Técnica dos Micronúcleos -----	32
2.2.1.Histórico dos Micronúcleos -----	34
2.2.2.Causas de formação de MN -----	34
2.2.3. Uso do MN para monitorização ambiental e ocupacional -----	36
2.3. Ensaio de genotoxicidade em células nasais -----	37
2.3.1. Anatomia, morfofisiologia e histologia do nariz e mucosa humanos -----	37
2.3.2. Técnica de micronúcleos em células nasais -----	38
2.4. As alterações nucleares -----	40
2.4.1.Micronúcleos (MNs) -----	40
2.4.2. Brotos nucleares (BUDs) -----	40
2.4.3. Células binucleadas -----	40
2.4.4. Núcleos com cromatina condensada -----	40
2.4.5. Células em processo de cariorrexe -----	41
2.4.6. Células com núcleo picnótico -----	41
2.4.7. Células em cariólise -----	41
3. Referências Bibliográficas da Revisão -----	43
4. Argumentos -----	58
5. Objetivos -----	59
6. Materiais e métodos -----	60
6.1. Participantes -----	60
6.2. Coleta das amostras -----	60

a6.3. Processamento e análise das amostras-----
 --- 60

6.4. Análise estatística ----- 61

7. Artigo científico ----- 62

Evaluation of DNA damage in the nasal epithelial cells of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: cross sectional study

Anexos

Anexo A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido----- 71

Anexo B Questionário ----- 73

Anexo C Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/ISCMPA) ----- 74

Anexo D Norma para autores do *Clinical Otolaryngology* ----- 78

Revisão de Literatura

1- Rinossinusite crônica

A rinossinusite caracteriza-se por inflamação sintomática da mucosa nasal e dos seios paranasais, é uma doença bastante prevalente e pode ser dividida em aguda ou crônica. A doença crônica caracteriza-se por sintomas por mais de 12 semanas e pode se apresentar com (RSCcPN) ou sem (RSCsPN) a presença de pólipos nasais. Embora ainda existam controvérsias em classificar ambas entidades no mesmo grupo, não está bem estabelecido se a RSCcPN é o resultado final de rinossinusites agudas recorrentes que produzem pólipos ou se tem fisiopatogenia diferente, desenvolvendo-se independentemente (1).

1.1 Diagnóstico

Segundo os Guidelines Europeu (1) e Americano (2), rinossinusite crônica em adultos é definida como inflamação nasal e paranasal, caracterizada por dois ou mais sintomas: um dos quais deve ser obstrução/congestão nasal ou secreção nasal (anterior ou posterior) e/ou dor/pressão facial e/ou hiposmia ou anosmia por mais de 12 semanas. Os sintomas devem ser demonstrados ou endoscopicamente (pólipos nasais, e/ou secreção purulenta do meato médio, e/ou edema /obstrução mucosa do meato médio) e/ou tomograficamente (alterações mucosas nos seios e/ou no complexo óstio-meatal). Assim, observa-se que a documentação de inflamação dos seios paranasais é fundamental para o diagnóstico de rinossinusite crônica (RSC), não podendo o mesmo ser concluído apenas com a presença de sintomas persistentes.

A obstrução nasal é o sintoma mais comumente reportado (81-95% dos pacientes), seguida pela congestão facial (70-85%), secreção nasal hialina (51-83%) e hiposmia (61-69%) (3,4); a secreção nasal pode ser anterior ou posterior, podendo variar de hialina à purulenta. A hiposmia é usualmente vista em pacientes com polipose, podendo ser atribuída à inflamação, com restrição do fluxo aéreo na fenda olfatória (mecanismo condutivo) ou ao dano neuroepitelial pela inflamação crônica (mecanismo neurossensorial) (5,6).

Alguns sintomas não são necessários para o diagnóstico, mas devem ser considerados durante a anamnese, sendo chamados de sintomas menores: otalgia ou plenitude auricular, tontura, halitose, dor dentária, irritação traqueal, laríngea ou nasal, disfonia, tosse, astenia, mal-estar, alterações do sono (7). Na concomitância de atopia, encontramos aumento de tosse, irritação e astenia, resultando em significativa redução da qualidade de vida. Os principais diagnósticos diferenciais da RSC são rinite (alérgica e não-alérgica), deformidades septais e causas não rinogênicas de dor facial (cefaleia vascular, neuralgia do trigêmeo, entre outras) (8-10).

1.1.1 Exame físico e complementar

O diagnóstico é direcionado pela história clínica e complementado pelo exame do paciente. A rinoscopia anterior, apesar de visualizar apenas o terço anterior da cavidade, é indispensável, sendo o primeiro passo do exame físico. A oroscopia pode ser extremamente válida, principalmente quando evidenciamos gota pós-nasal. Ambos são complementados pela endoscopia nasal (com aparelho rígido ou flexível), que permite visualização da fossa nasal em sua totalidade. Exames de citologia e bacteriologia normalmente são utilizados em pesquisas, não trazendo benefícios para o dia-a-dia; as biópsias podem ser utilizadas para excluir outras doenças, como tumores.

A radiografia de seios da face tem valor limitado para o diagnóstico de rinosinusite, não devendo ser realizada; o método de escolha para imagem de seios paranasais é a tomografia, que permite adequada análise óssea. É extremamente importante ressaltar que o uso indiscriminado de tomografia traz prejuízos para o paciente e geralmente não altera a conduta, devendo ser reservado a pacientes com complicações, recidivas ou em pré-operatórios. A ressonância magnética nuclear, apesar de não expor o paciente à radiação, pode não ser muito útil em RSC, pois é utilizada para visualização de tecidos moles, sendo, assim, utilizada em suspeitas tumorais ou em complicações intracranianas, complementando as imagens tomográficas.

Alguns teste diagnósticos podem ser utilizados em casos selecionados, mas não são rotineiramente realizados, entre eles, citam-se avaliação da função mucociliar,

peak flow inspiratório nasal, rinomanometria, rinometria acústica, testes de olfatos, testes cutâneos de sensibilidade.

1.2 Epidemiologia

A revisão de estudos tem dificuldade de avaliar a real prevalência da RSC. Isso deve-se não apenas ao fato de a doença ser bastante heterogênea, mas também pela escassez de trabalhos com esta preocupação (1). Enquanto diversos estudos buscam orientar sobre microbiologia, diagnóstico e tratamento, poucos se preocupam em avaliar a epidemiologia. Segundo dados de entrevistas americanas, 15,5-16% da população americana refere sofrer de "problemas no seios da face" (*sinus trouble*) por mais de 3 meses no ano anterior (11,12); no entanto, quando consideramos o diagnóstico médico, apenas 2% tem RSC. (13) Estima-se que, anualmente, 18 a 22 milhões de consultas nos EUA devam-se à RSC (14). Os dados são bastante conflitantes; em questionários no Canadá, encontramos 3,4% dos homens e 5,7% das mulheres considerando que tem RSC (15); enquanto na Coreia, a prevalência é de 1,01%; na Bélgica, 6% (16); na Escócia, 9,6%; no Caribe, 9,3%(17); 10,6% na Europa (18) e 5,5 % em São Paulo (19). Quando falamos de RSCcPN, observamos mais dificuldade estatística, uma vez que diversos pacientes com polipose nasal são assintomáticos (20), acredita-se que 20% dos pacientes com RSC tem pólipos (21), mas apenas um terço dos pacientes com pólipos não procura atendimento médico por sintomas nasossinusais (20). Estima-se que 2-5% da população mundial seja portador da doença (22). Johansson *et al.*, na Suíça, reportou a prevalência de 2.7%, sendo mais frequentes em homens (2,2:1), idosos (5% em pacientes com mais de 60 anos) e asmáticos (20); na Coreia, encontrou-se prevalência de 0,5%; na Finlândia, 4,3%(23) e na França, 2,1% (22). Estudos com autópsia encontram dados também variáveis, entre 2% (diagnóstico apenas com rinoscopia anterior) e 42% (diagnóstico com endoscopia e/ou cirurgia endoscópica).

Apesar de dados pouco claros sobre a epidemiologia, diversos estudos avaliaram o impacto da rinosinusite na economia global. Nos anos 2000, o tratamento clínico-cirúrgico de RSC custava entre U\$ 200 e U\$ 6,000 por paciente. Além disso, devemos considerar os custos indiretos, como queda no rendimento e afastamento do

trabalho. Em 2003, a rinossinusite foi classificada entre as dez doenças mais dispendiosas para os trabalhadores americanos (24).

1.3 Etiologia e Patogenia da Rinossinusite Crônica

A Rinossinusite Crônica (RSC) era atribuída a tratamento incompleto/inadequado de rinossinusite aguda (RSCsPN) ou a atopia severa (RSCcPN); mas, atualmente, entende-se que a doença é multifatorial.

A primeira tentativa de explicar a RSC foi a "hipótese fúngica", que sustentava que todas as RSC decorriam da resposta exacerbada do hospedeiro a fungos (25); atualmente, embora muitos rejeitem absolutamente tal afirmação, alguns casos podem ser enquadrados na teoria fúngica. Além disso, outras suposições são consideradas: defeitos na cascata dos eicosanoides, com aumento de produção de leucotrienos pró-inflamatórios e diminuição de prostaglandinas anti-inflamatórias; os superantígenos produzidos pelo *Staphylococcus aureus* associada à "hipótese da barreira imune", onde falhas na barreira imune permitiriam colonização e proliferação de superantígenos; a descoberta recente de biofilmes ainda necessitando de mais estudos para avaliar a sua relação com RSC; na formação de pólipos, acredita-se que a produção de autoanticorpos locais poderia aumentar o dano tecidual. No entanto, em muitos estudos, encontramos a união de partes de diversas teorias. Atualmente, aceita-se que o dano epitelial ou a disfunção na barreira imune resulte na colonização do *S. aureus*, que provocaria secreção de superantígenos com efeito em diversas células, como linfócitos, eosinófilos, fibroblastos, células epiteliais e mastócitos, o que acarretaria alteração na resposta dos Th2, gerando IgE policlonal, alterações em mastócitos e eosinófilos, modificando o metabolismo de eicosanoides; a soma destes efeitos locais poderia originar os pólipos nasais (1). Estudos recentes mostram que a RSCsPN caracteriza-se por fibrose, altos níveis de TGF- β e aumento da atividade Treg, enquanto a RSCcPN, edema, baixos níveis de TGF- β e baixa atividade Treg. (26,27) Os fatores da suscetibilidade do hospedeiro não podem ser esquecidos, as pesquisas mostram diferentes rotas na imunologia da mucosa nasal, algumas geneticamente adquiridas (28); o maior exemplo é a fibrose cística, no entanto, acredita-se que exista envolvimento de múltiplos *loci* e

múltiplos fenótipos, onde, provavelmente, associam-se fatores do hospedeiro e da exposição ambiental. Dessa maneira, admite-se que a RSC seja uma doença multifatorial, com persistência de inflamação, pela disfunção da relação hospedeiro-ambiente, associada a diversos fatores exógenos.

Avaliaremos os fatores exógenos separadamente, por motivos didáticos, lembrando que há sobreposição na maioria dos casos:

1.3.1 Fatores inflamatórios:

1.3.1.1 Bactérias: o papel das bactérias é bem estabelecido na rinossinusite aguda, no entanto, na RSC, a sua função ainda é incerta. Acreditava-se que os seios eram estéreis, contudo Brok *et al* demonstrou que até 58% dos seios normais apresentam colonização bacteriana mista (29). Diversos autores mostraram que em casos de RSC unilateral, encontramos flora similar bilateralmente antes e depois do procedimento cirúrgico (8,30); no entanto, considerando apenas RSCcPN, nos últimos anos diferentes estudos mostraram a relação entre a presença de *S.aureus* e a formação de pólipos. (31,32). A colonização de *S. aureus* secreta superantígenos, que amplificam a inflamação eosinofílica local, culminando na formação de pólipos; tal hipótese tem sido sustentada também por estudos de cultura (33). Trabalhos com ensaios *in vitro* evidenciaram que os superantígenos podem modificar também a cadeia pró-inflamatória do Th2, aumentando IL-4, IL-5 e IL-17 (34) e diminuindo TGF- β e IL-10 (35-37). Heymans *et al* demonstrou que a presença de genes de exotoxinas de estafilocócicas pode estar relacionada à severidade da doença (38,39). Além disso, não há nenhuma evidência do papel dos superantígenos na etiopatogenia da RSCsPN, sugerindo diferentes etiologia e patogênese das doenças. A formação de biofilmes é um importante mecanismo de sobrevivência de micro-organismos. Toxinas bacterianas encontradas em biofilmes são consideradas responsáveis pelo desenvolvimento de RSC com e sem pólipos (40). Sabe-se que a colonização de bactérias nos pólipos está relacionada a formas mais graves, sintomática e radiologicamente, e pior prognóstico pós-operatório(41). O papel dos biofilmes bacterianos ainda não está bem estabelecido, mas acredita-se que seja responsável por

alterar a resposta da doença a tratamento padrão e por aumentar as recidivas pós-operatórias (42).

1.2.1.2. Fungos: o papel dos fungos permanece incerto na RSC; alguns autores ainda sustentam que parte da "hipótese fúngica" deva ser considerada, propondo que uma resposta excessiva não-mediada por IgE do hospedeiro a fungos do ambiente seria a desencadeante primária da maioria das RSC, com e sem pólipos. (43,44) Diversos trabalhos tentaram utilizar antifúngicos tópicos no tratamento de RSC, no entanto, nenhum obteve êxito. Os dados recentes mostram que há dificuldade em provar a "hipótese fúngica", sendo necessários mais estudos (45).

1.2.1.3 Atopia: a função dos alergenos inalados na RSC é controversa, inclusive, não há correlação bem estabelecida entre rinite alérgica e RSC, no entanto, sabemos que as células e mediadores envolvidos em ambas doenças se sobrepõem em diversos momentos (46). Dados epidemiológicos sugerem que a atopia seja fator predisponente para RSC, 0,5 a 4,5% dos pacientes atópicos tem polipose nasal (47,48); mas não se sabe o exato papel da alergia (49-51). Estudos mostraram não haver aumento da prevalência de RSCcPN em pacientes atópicos (46, 52). A correlação entre asma e RSCcPN ainda não esta bem estabelecida (53), mas as doenças estão frequentemente associadas; inclusive havendo melhora dos sintomas da asma com o tratamento clínico e/ou cirúrgico da RSC (54). Quanto à sensibilidade ao Ácido Acetilsalicílico, 35-95% dos pacientes com alergia a AAS tem pólipos nasais (55).

1.2.1.4. Vírus: a relação entre vírus e RSC é pouco estudada na literatura; sabemos que a infecção viral destrói a barreira imune do epitélio, o que poderia predispor a RSC (56), contudo, novos estudos são necessários para melhor elucidar a relação de causalidade (1).

1.2.1.5. Toxinas ambientais: embora existam muitos trabalhos avaliando a relação entre tabaco e RSC, evidenciando que esses pacientes apresentam maior prevalência de RSC e pior resultado cirúrgico, evidências sobre o real papel do tabagismo ainda são escassas. Outras toxinas como ozônio, dióxido sulfúrico, dióxido de nitrogênio e poluentes particulados ainda são pouco estudados (1, 57),

1.3.2. Cascata inflamatória do hospedeiro na Rinossinusite Crônica

A mucosa nasossinusal é o primeiro contato entre substâncias exógenas e o organismo, necessitando funcionamento adequado dos mecanismos de defesa para proteção do hospedeiro; assim, acredita-se que alterações na resposta imune inata do hospedeiro predispõem ao desenvolvimento de RSC (28,58). Pelo fato de não serem encontradas associações de pacientes com RSC e outras doenças crônicas, exceto asma, acredita-se que as alterações imunes em pacientes com RSC, se presentes, são centradas apenas na via aérea. A inflamação mucosa em pacientes crônicos apresenta grande variabilidade, o que pode estar evidenciando amplo espectro da doença. Apesar das descobertas das últimas décadas, a descrição da totalidade das vias moleculares é fundamental, pois espera-se que possa determinar a patofisiologia da doença, guiando novas possibilidades terapêuticas, clínicas ou cirúrgicas (59).

Abaixo, os mecanismos de defesa do organismo didaticamente divididos, sendo importante ressaltar que tais mecanismos agem de forma conjunta:

1.3.2.1 Barreira mecânica: formada por muco, cílios e células epiteliais. O transporte mucociliar é considerado a primeira linha de defesa do organismo, levando materiais em direção à nasofaringe. O muco é produzido por glândulas submucosas, células caliciformes (*globet cells*), proteínas epiteliais, secreção lacrimal e transudato vascular; a mucina é responsável pela adesão de moléculas ao epitélio, facilitando o transporte, as glicoproteínas auxiliam na interação hospedeiro-micro-organismo. A função ciliar normal é importante para o adequado *clearance* nasal, no entanto ainda há dados conflitantes na literatura (60); pacientes com RSC podem apresentar discinesia ciliar primária (por exemplo, fibrose cística) causando RSC ou discinesia secundária à própria doença, sendo as últimas geralmente reversíveis (54). A associação com fibrose cística é bem conhecida, sendo que 43% dos pacientes apresentam pólipos (61); no entanto, Hamilos não encontrou evidências de defeito primário no clearance mucociliar na maioria dos pacientes com RSC (62). As alterações mucociliares secundárias à doença geralmente normalizam após o tratamento da infecção e restauração da drenagem usual dos seios (63).

A quebra mecânica da barreira permite que proteínas estimulem a resposta imune, sendo proposta como o principal fator predisponente à asma, motivo pelo qual alguns autores extrapolam tal teoria para a RSC. O conhecimento das moléculas de adesão celular, como *tight junctions*, desmossomos e hemidesmossomos pode ser importante na RSC; Zuckerman *et al* (63) e Rogers *et al* (64), mostraram que pacientes com RSCcPN apresentam diminuição dos níveis de proteínas dos desmossomos e de *tight junctions*. Além disso, baixos níveis de inibidores de proteases em pacientes com polipose, aumentam a suscetibilidade a proteases endógenas e exógenas (58), presentes em fungos, bactérias e alérgenos, resultando em maior vulnerabilidade mucosa. A alteração mecânica também aumenta a permeabilidade iônica da mucosa, mecanismo que vem sendo proposto como um dos fatores para o edema tecidual em RSCcPN (65).

1.3.2.2. Células Epiteliais: possuem mecanismos moleculares de reconhecimento de danos à mucosa, sejam eles físicos ou causados por micro-organismos (66); algumas glicoproteínas de reconhecimento de patógenos, como os receptores *Toll-like* (TLR, *Toll-like receptors*) estão numericamente modificados em pacientes com fibrose cística, RSCcPN e RSCsPN (67). Tais resultados não foram totalmente elucidados, mas entende-se que sejam causados por inflamação crônica da mucosa.

O epitélio nasal secreta grande quantidade de moléculas antimicrobianas, como enzimas (lisozima, peroxidase, lactoferrina), opsoninas (complemento e pentraxina-3), proteínas de permeabilidade (A defensina, B defensina), colectinas (surfactante) e proteínas de ligação (lactoferrina e mucina); diversos autores vem estudando a relação entre alterações em tais moléculas e RSC, sem observar algum padrão absoluto. Entretanto, sugere-se que a diminuição de moléculas de defesa predisponha à proliferação microbiológica e ao desenvolvimento de RSC em alguns pacientes. (58)

As células epiteliais produzem grande variedade de citocinas inflamatórias, em resposta à presença de patógenos, entre elas, IL-1, TNF- α , IFN α/β , GM-CSF, eotaxinas, RANTES, IL-10, IL-6, IL-8, CSF, IL-25, IL-32, IL-33 e BAFF. Além de estimularem dor, secreção e dilatação vascular, as citocinas também tem a propriedade de atrair células, como eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos e células dendríticas.

Em pacientes com RSCcPN, encontramos aumento de GM-CSF, eotaxinas, RANTES, IL-4, IL-5, IL-6 IL-13 e BAFF (68,69), apesar de nem todas moléculas terem seus efeitos bem elucidados, sabemos que IL-5 é fator chave para o desenvolvimento de eosinofilia e IL-4 e IL-13 contribuem para ativação de macrófagos e remodelamento tecidual (70). Estudos *in vitro* em pólipos, mostraram que as alterações nas citocinas podem regular a cascata para produção de inflamação do tipo 2 (71). Outras moléculas coestimuladoras também são secretadas no epitélio, como as da família B7, que possuem a capacidade de diminuir as respostas das células T; essas moléculas estão aumentadas em pacientes com RSC, mas o seu papel continua incerto (72).

A produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio pela mucosa nasal é importante para o reparo celular e para a resposta a toxinas ambientais; o óxido nítrico (NO) ainda é responsável por regular o batimento ciliar. Em pacientes com RSCcPN, encontram-se níveis muito baixos de NO, com aumento após tratamento adequado; no entanto, a função do NO na mucosa saudável e doente de pacientes com RSC ainda não é totalmente compreendida (75).

1.3.2.3 Células dendríticas: participam na imunidade inata e adquirida, capturando antígenos, fazendo sua apresentação a células T e secretando mediadores inflamatórios; são encontradas em número aumentado em pacientes com RSC, especialmente naqueles com polipose (70). Alguns autores sugerem que tratamento voltado às células dendríticas poderá ser bastante efetivo (76).

1.3.2.4. Macrófagos: são células da imunidade inata, com diversas funções, como homeostase, fagocitose e reparo tissular; pacientes com polipose apresentam alterações em macrófagos, que prejudicaria a sua habilidade de fagocitose, contribuindo para a patofisiologia da doença (1)

1.3.2.5. Eosinófilos: atuam na mucosa contra parasitas multicelulares, podendo apresentar também funções de remodelamento tecidual; produzem dano tecidual pela degranulação e liberação de toxinas, causando edema. A presença em grande número na via aérea tem sido associada a pacientes com asma. Algumas RSCs são consideradas puramente eosinofílicas, mostrando o papel central de tais células na patofisiologia. A eosinofilia tecidual é mais proeminente na RSCcPN, podendo ser

associada a pior prognóstico (77); dados asiáticos mostram-se controversos, pois não encontram eosinofilia em pacientes com polipose, fato que pode estar relacionada a diferenças de metodologia (78). A boa resposta de eosinófilos a corticoides pode explicar o bom resultado do tratamento com tal medicamentos. O aumento de IL-5 induz aumento do número de eosinófilos, assim, estudos utilizando anticorpos anti-IL-5 mostraram diminuição nos pólipos e melhora clínica (79).

1.3.2.6. Neutrófilos: são responsáveis por fagocitose de micro-organismos extracelulares; são recrutados por citocinas, salientando-se a IL-8. O seu papel na RSC permanece controverso, mas observa-se aumento de infiltração tecidual. Sugere-se que a RSCsPN é uma doença neutrofílica enquanto a RSCcPN é eosinofílica, baseado no grau de infiltração.

1.3.2.7 Mastócitos: atuam na imunidade inata, liberando grânulos pré-formados, entre eles, histamina, serotonina e proteases. São bem estudados em doenças como asma e rinite, ultimamente sendo relacionados à polipose nasal, pois são capazes de sustentar a inflamação eosinofílica mediada ou não por IgE (1). O papel dos mastócitos persiste incerto, mas pode estar relacionado à degranulação induzida por *S. aureus*, aumento da sensibilidade a antígenos ou à ativação direta de Th2 (80,81).

1.3.2.8. Plasmócitos e Imunoglobulinas: Os linfócitos B secretam imunoglobulinas, fazendo parte da imunidade adaptativa. Pacientes com RSCcPN apresentam, no tecido polipoide, aumento do nível de imunoglobulinas, principalmente IgA, IgE e IgG, com níveis séricos permanecendo normais; tais fatos, associados à formação de centros germinativos tissulares, sugerem que a produção seja local (82.). A presença de autoanticorpos nos pólipos está relacionada a pior prognóstico da doença. O aumento de IgE nos pólipos independe da atopia e se relaciona a presença de superantígenos estafilocócicos (70). Alterações do sistema imune são mais comumente encontradas em pacientes com RSCcPN (1); em pacientes com polipose de difícil tratamento, 10% apresentam imunodeficiência comum variável e 6% apresenta deficiência seletiva de IgA.

1.3.2.9. Células T e Citocinas: as células T apresentam em número elevado em pacientes com pólipos, acredita-se que a RSCcPN seja relacionada a desordens de

Th2, enquanto RSCsPN seja relacionada a Th1 (1). Os linfócitos inatos associados a RSCcPN respondem principalmente a citocinas IL-25, IL-33 e TSLP, culminando na produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (83), que promovem ativação alternativa de macrófagos, ativação de eosinófilos e aumento do muco, respectivamente.

1.3.2.10. Remodelamento: as alterações teciduais vistas em epitélios de pacientes com rinite e RSC geralmente incluem fibrose, alterações epiteliais, espessamento da membrana basal, hiperplasia de células caliciformes, edema subepitelial e infiltrado inflamatório (84); em pacientes com polipose, encontramos, também, fraqueza da barreira mecânica, diminuição de secreção, piora da cicatrização e edema da matriz extracelular (MEC), tais características contribuem para o aumento da vulnerabilidade mucosa. (28,85). Van Bruaene *et al* (86) demonstraram que, na doença incipiente, existe alteração dos níveis de TGF- β , o que sugere que a RSC inicia com alteração do remodelamento tecidual e não com inflamação. Diversos grupos vem estudando a alteração das metaloproteinases da matriz extracelular, encontrando modificações importantes que podem estar relacionadas ao remodelamento da MEC (70). Fatores angiogênicos também são relacionados ao remodelamento em pacientes com polipose, com aumento da expressão do VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), o que pode estar relacionado com o intenso edema, pelo aumento da permeabilidade vascular (87).

A hiperplasia glandular e de células caliciformes, relacionada à viscosidade do muco, são características da RSC mediadas principalmente por TNF- α , IL-8 e IL-13. Também foi encontrada alteração na expressão dos genes produtores de mucina em pacientes com RSC (88).

1.3.2.11. Cascata do Ácido Aracdônico: os eicosanoides (por exemplo, prostaglandinas - PGE, leucotrienos, prostaciclina, tramboxano e ciclooxigenases) são moléculas geradas pelo metabolismo do ácido aracdônico; alterações na rota são associadas à polipose em pacientes sensíveis ao ácido acetilsalicílico (AAS). Em geral, as lipoxantinas e a PGE2 são anti-inflamatórias, enquanto as demais são pró-inflamatórias. Diferentes alterações no metabolismo do ácido aracdônico, que usualmente causam

aumento de leucotrienos e diminuição de PGE2, podem predispor à formação de pólipos nasais (89).

1.3.2.12. Proteína p53: a p53 regula a divisão celular, prevenindo proliferações descontroladas, motivo pelo qual o seu mecanismo de estudo é a apoptose. Sabe-se que pacientes com RSCcPN apresentam alteração no padrão de apoptose; ainda que a doença seja eminentemente inflamatória, o atraso da morte celular programada tem papel importante no surgimento de pólipos (90). Estudos mostram diminuição da expressão da p53 em RSCcPN, mostrando alteração na cascata e possível causa para a perpetuação de células e do processo inflamatório (91, 92). Essas evidências sugerem que a melhor compreensão de tais mecanismos pode auxiliar no desenvolvimento de drogas, facilitando o controle e prevenção da doença (91).

1.3.3. Fatores associados à Rinossinusite Crônica

Existem outros fatores que devem ser considerados e podem predispor à RSC:

1.3.3.1. Fatores locais do hospedeiro: apesar do postulado de que variações anatômicas (por exemplo, desvio septal) acarretam a RSC, não há evidências que conseguem confirmar tal afirmação. (93)

1.3.3.2. Fatores ambientais e cigarro: a relação de fatores ambientais e cigarro e RSCcPN ainda não foi bem estabelecida.

1.3.3.3. Fatores iatrogênicos: são consideradas as cirurgias mal executadas / incompletas.

1.3.3.4. Refluxo laringo-faríngeo: os estudos não conseguiram provar que os danos causados pelo refluxo produzem RSC (94).

1.4. Complicações de Rinossinusite Crônica

As complicações da RSC são raras e pouco documentadas, pois geralmente relacionam-se às alterações ósseas, podendo ser consideradas como parte da evolução natural da doença.

1.4.1. Mucocele: é resultante da obstrução de óstio de drenagem de um seio, que causa acúmulo de muco e eventual expansão do seio, apresenta crescimento lento. É um evento raro que acomete principalmente a região fronto-etmoidal (86%);

1.4.2. Osteíte: geralmente considerado como evolução natural da doença, pois está presente em até 92% dos modelos em coelhos (95); a extensão do remodelamento ósseo está relacionada com a severidade da doença;

1.4.3. Erosão e expansão ósseas: formas mais agressivas de RSCcPN podem acarretar erosão óssea. Geralmente ocorre em doenças etmoidal, afetando a lâmina papirácea. Alguns pacientes podem apresentar algumas áreas com osteíte entremeadas com erosão.

1.4.4. Metaplasia óssea: raramente encontrada, mas pode ocupar toda a cavidade nasal, devendo ser diferenciado de lesões tumorais.

1.4.5. Neuropatia óptica: pode ocorrer quando a doença acomete o esfenoide ou etmoide posterior, geralmente quando há erosão óssea no ápice orbitário.

1.5. Genética e Rinossinusite Crônica

A RSC é uma doença causada por múltiplos fatores genéticos e ambientais; diversos estudos avaliam alterações genéticas que podem ser acarretar RSC.

O aumento da frequência de pólipos em indivíduos da mesma família orientou alguns estudos, que comprovaram essa afirmação; no entanto, gêmeos univitelinos podem ou não desenvolver RSCcPN, o que mostra haver necessidade de somatória de fatores genéticos e ambientais para o desenvolvimento de polipose (96). Alterações de genes específicos foram relacionadas à RSCcPN, geralmente sugerindo

alteração funcional da barreira epitelial (1). Diversas mutações genéticas já foram encontradas em pacientes com polipose, no entanto, ainda não estão bem estabelecidos quais desses genes tem relação com o desenvolvimento de pólipos ou com o prognóstico da doença. Pacientes heterozigotos para a fibrose cística apresentam maior probabilidade de desenvolver RSC (97). Em pacientes com Tríade de Samter (sensibilidade ao AAS, asma e polipose), estão sendo encontradas algumas alterações genéticas características, contudo, mais estudos ainda são necessários. Acredita-se que com o desenvolvimento de pesquisas genômicas relacionadas a RSC, poderá haver estratificação dos subtipos da doença, com tratamento dirigidos ao desencadeante. (1)

1.6. Qualidade de Vida e Rinossinusite Crônica

Diversos métodos são utilizados para a avaliação da qualidade de vida em pacientes com RSC, podendo ser específicos ou não específicos para a doença. Na avaliação global, segundo o Consenso Brasileiro de Rinossinusites, a RSC apresenta grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, pior do que a artrite reumatoide, a diabetes tipo I e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); o questionário não específico SF-36 mostrou diferença significativa nos oito domínios estudados (limitação física, estado de saúde, dor corporal, limitação em todas as atividades, vitalidade, limitação social, saúde mental e limitação emocional).

A avaliação de métodos específicos para sintomas nasais mostrou que os sintomas com maior impacto na qualidade de vida dos pacientes são: secreção nasal espessa, gota pós-nasal, fadiga, má qualidade do sono e fadiga ao acordar; sendo que 74% dos pacientes consideram os sintomas graves ou intolerantes (98). A associação com a asma piora a vitalidade, a dor e a função física. É importante salientar que não há correlação entre os escores de qualidade de vida e as alterações tomográficas ou endoscópicas. (46,99.)

O tratamento adequado, clínico e/ou cirúrgico, melhora os parâmetros avaliados, trazendo melhora importante na qualidade de vida (100). Contudo, vale ressaltar que pacientes com menores escores no pré-operatório mantiveram os menores

escores no pós-operatório, demonstrando menor impacto da cirurgia quando o paciente tem poucos sintomas (101).

1.7. Tratamento

O objetivo do tratamento em pacientes com RSC é alcançar e manter controle clínico, ou seja, pacientes assintomáticos ou com sintomas que não causem incômodo importante, se possível combinados com mucosa saudável e necessidade apenas de medicação local; atualmente, não se sabe qual o percentual de pacientes com RSC atinge tal estado, necessitando de mais estudos para elucidação. O tratamento de RSCcPN depende dos sintomas do paciente, baseia-se inicialmente no manejo clínico, com objetivo de reduzir sintomas e melhorar a qualidade de vida (46). A cirurgia é reservada para os casos de recidiva ou de complicações; mesmo que não existam evidências da diferença de efetividade entre tratamento clínico e cirurgia para pacientes com polipose (102). Alguns pacientes apresentam sintomas persistentes apesar de tratamento otimizado clínico-cirúrgico; assim, consideramos rinosinusite de difícil controle (*difficult to treat rhinosinusitis*) quando há persistência dos sintomas após cirurgia adequada, corticoterapia tópica e até dois cursos curtos de antibioticoterapia. (1)

Abordaremos apenas o tratamento em pacientes adultos imunocompetentes.

1.7.1 Clínico

1.7.1.1. Corticoesteroides

O objetivo do tratamento clínico é a diminuição do processo inflamatório; assim, opta-se, como primeira escolha, pelos corticoesteroides (103). Os CEs atuam diminuindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a ativação de eosinófilos, assim, modificando a resposta imune inata e adquirida (104). A ação anti-inflamatória produz diminuição do edema, facilita a drenagem e a manutenção da permeabilidade dos óstios dos seios paranasais. Utilizam-se as formas sistêmicas e tópicas para o tratamento, ambas com eficácia grau Ib, evitando-se o uso prolongado

sistêmico devido aos efeitos colaterais existentes (1). O CE mais utilizado é a prednisolona, na dose de 50-60 mg/dia, por 15 dias. O CE de uso sistêmico é o medicamento que apresenta melhor resultado em relação a hiposmia/anosmia; podem postergar o procedimento cirúrgico, sendo extremamente útil quando utilizados no pré-operatório, facilitando o ato cirúrgico (54) e no pós-operatório, diminuindo a recorrência.

O tratamento tópico é o preferido para o uso crônico, possui efeito comprovado na melhora dos sintomas, inclusive a hiposmia e a diminuição de pólipos (1), com mais eficácia após 4 semanas de uso. A sua utilização é fácil e segura, já que estudos não evidenciaram alterações mucosas com tratamento de mais de 1 ano. A taxa de sucesso varia de 60-80%, o insucesso geralmente está relacionado a má adesão e a pólipos extensos (105, 106). A utilização de CE tópico no pós-operatório já está bem consolidada na literatura, trazendo aumento do intervalo livre de doença. O principal efeito colateral local é o sangramento, mas acredita-se que se deva ao posicionamento errôneo iônico do spray na cavidade, tocando no septo. Os efeitos colaterais sistêmicos são relacionados à biodisponibilidade da droga: glaucoma, osteoporose, inibição do crescimento e supressão do eixo hipotálamo -hipofisário; devendo-se atentar para a prescrição de drogas de baixa biodisponibilidade em pacientes suscetíveis, como asmáticos, idosos, hipertensos, diabéticos e crianças.

A associação de CE oral e tópico reduz a congestão nasal, a eosinofilia tecidual, o tamanho do pólipo, a opacificação tomográfica e melhora o olfato. (103)

1.7.1.2. Antimicrobianos

No tratamento de agudizações da RSC podem ser utilizados antibióticos, no entanto, segundo EP3OS, tal conduta apresenta nível de evidência grau 4 (1). Idealmente, espera-se realizar terapia dirigida ao germe responsável pela infecção, contudo, a cultura de seios não é realizada rotineiramente (46), ainda que saibamos que o tratamento empírico pode resultar em aumento da resistência bacteriana e da virulência (107). Segundo o Consenso Brasileiro de Rinossinusites (54), a terapia antimicrobiana é coadjuvante e deve considerar que, além dos germes comuns (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo

e associações de bactérias podem ser os causadores da agudização. Dessa maneira, a clindamicina ou a associação amoxicilina com clavulanato de potássio são consideradas boas escolhas, sendo o tempo de tratamento de três a seis semanas.

O uso prolongado de macrolídeos em baixas doses vem crescendo nos últimos anos, acreditando-se no poder de imunomodulação de tais drogas, diminuindo o processo inflamatório (inibindo a formação de IL-6 e IL-8 e o recrutamento de células inflamatórias) e aumentando o batimento ciliar (108). Eritromicina, Claritromicina, Doxiciclina e Roxitromicina são as substâncias que tem eficácia comprovada, com melhora dos sintomas entre 60 % e 80% (54); baseado no estudo de Ragab (109), o EP3OS (1) classifica este tratamento em nível de evidência Ib. No entanto, o uso indiscriminado como anti-inflamatório, pode levar ao crescimento da resistência bacteriana, como no Japão. O uso de macrolídeos ainda necessita de evidências com estudos melhor sistematizados, principalmente para avaliar resultados a longo prazo e recorrência (110), sendo considerado, atualmente, como tratamento adjuvantes em casos difíceis.

O uso de antimicrobianos tópicos pode ser considerado (111), autores mostram melhora importante em até 82% dos pacientes, com melhora na endoscopia e no tempo livre de doença. Mupirocina e tobramicina (112) podem ser utilizados, usualmente com poucos efeitos adversos, a gentamicina deve ser utilizada com cautela pelo risco de perda auditiva já reportado (113).

O uso de antifúngicos tópicos ou sistêmicos não demonstraram eficácia no tratamento de RSCcPN (114).

1.7.1.3. Outros tratamento clínicos

A solução salina isotônica melhora o batimento ciliar e hidrata a mucosa, sendo recomendada em revisão Cochrane(115). A solução salina hipertônica (3%) tem os mesmos benefícios da isotônica, acrescentando-se a diminuição do edema e da obstrução nasal.

Pacientes com Doença Respiratória Exacerbada pela Aspirina (do inglês, *Aspirin Exacerbated Respiratory Disease*, AERD) podem apresentar melhora dos sintomas

com uso de antileucotrienos, já que estudos moleculares evidenciaram número aumentado de leucotrienos nos pólipos desses pacientes; no entanto, não há estudos randomizados para tal droga. Indivíduos com AERD também podem apresentar benefícios com a dessensibilização com AAS, tópica ou sistêmica; devendo-se atentar para os grandes riscos de efeitos colaterais. (116,117).

Novas terapias vem sendo desenvolvidas considerando os estudos moleculares, como, por exemplo, a reslizumabe, um medicamentos anti-IL-5 (118).

O uso de anti-histamínicos no tratamento da RSCcPN não tem evidências na diminuição dos pólipos, mas pode melhorar a qualidade de vida, principalmente em pacientes atópicos, diminuindo a coriza, a obstrução e os espirros (54).

Os descongestionantes e mucolíticos não devem ser utilizados para o tratamento da RSC.

1.7.2. Cirúrgico

O tratamento cirúrgico é reservado a pacientes que não respondem ao tratamento clínico. Tem como objetivo restaurar a fisiologia nasossinusal e remover os pólipos, preservado ao máximo a mucosa sadia, sendo indicado nas seguintes situações (54): 1) falha no tratamento medicamentoso por 3 meses; 2) efeitos adversos do tratamento clínico; 3) baixa adesão; 4) queixa primária de obstrução, hipersecreção e/ou alteração do olfato sem melhora com o tratamento clínico (vale ressaltar que os resultados cirúrgicos em relação a alterações do olfato são conflitantes); 5) sintomas persistentes de via aérea inferior; 6) complicações da RSC. Não há consenso na literatura sobre qual o momento correto de operar o paciente, alguns autores acreditam que a RSC sem tratamento é uma doença progressiva, podendo causar danos irreversíveis na mucosa com o passar do tempo (119), diminuindo a resposta aos tratamentos clínico e cirúrgico; assim, Hopkins *et al* (120) consideram que a cirurgia não deve ser postergada após má resposta ao tratamento clínico.

A cirurgia funcional endoscópica nasossinusal é padrão-ouro quando os medicamentos falham (121); a técnica foi descrita inicialmente por Messerklinger e

Stammberger (122, 123) e vem sendo aperfeiçoada até os dias de hoje. As técnicas cirúrgicas variam desde minimamente invasivas até esfeno-etmoidectomia radical, podendo ser associadas técnicas externas; a indicação varia conforme a doença nasossinusal e a doença de base, ainda são necessários ensaios clínicos randomizados para melhor avaliar se cirurgias extensa realmente beneficiam o paciente (124) A cirurgia apresenta melhora dos sintomas em 75-95% dos casos; com 1,4% de complicações; sendo necessárias revisões em 3,6% no primeiro ano e em 11,8% nos primeiros 36 meses; no entanto, alguns apresentam recidiva de pólipos em até 60% dos casos em dois anos, os quais nem sempre necessitarão de nova cirurgia, enquanto outros autores afirmaram que 98% dos pacientes apresentam melhora da qualidade de vida em 2 anos (125). Os dados por vezes conflitantes podem ser compreendidos quando avaliamos os variáveis desenhos dos estudos associados com a heterogeneidade da RSC. Diversos fatores influenciam o resultado cirúrgico, entre eles, destacam-se: 1- idade, extensão e duração da doença; 2- cirurgia prévia ; 3- comorbidades (intolerância ao AAS, asma, fibrose cística) (54); 4- eosinofilia (100), que podem piorar o prognóstico. Pacientes com asma costumam se beneficiar do tratamento cirúrgico com melhora do quadro pulmonar, uma vez que os fatores nasais costumam desencadear crises (alergia e colonização). Ramakrishnan *et al.* (126) demonstrou que a microbiota do seio pode influenciar no resultado pós-operatório.

1.7.2.1. Complicações do Tratamento Cirúrgico

A relação entre os seios paranasais, a órbita e a fossa craniana pode resultar em complicações serias no pós-operatórios; tais complicações, felizmente, são raras. Estima-se que as complicações maiores (como amaurose, diplopia, fístula líquórica complicada, pneumoencéfalo, hemorragia intracraniana, lesão cerebral, hemorragia grave, toxemia e morte) ocorrem em 1% dos casos, enquanto as complicações menores (como enfisema orbitário, fistula líquórica não complicada, hemorragia leve, hiposmia, sinéquia) em 5 a 6% dos casos (116).

2. Avaliação de dano no DNA - Técnica dos Micronúcleos

2.1 Biomarcadores e Avaliação de dano no DNA

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é um polímero de formado por quatro unidades (adenosina, citosina, guanina e timina) e está presente no núcleo de todas as células dos seres vivos. O DNA contém as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e fisiologia dos seres vivos, transmitindo-os aos seus descendentes. Sabe-se que diferentes hábitos de vida associados a formação genética do indivíduo causam diversos efeitos à molécula de DNA, tais alterações podem demorar décadas para serem expressas fenotipicamente (127). A mutação é a alteração no material genético que, quando não reparada em tempo apropriado, é transmitida às células -filhas. Fatores físicos, químicos e biológicos podem ser responsáveis pelas mutações no DNA; alguns deles são inexoráveis, como o passar dos anos, as radiações naturais, a presença de O₂; entretanto, o conhecimento atual permite que outros precipitantes sejam evitados, como a exposição ao tabaco (128). Acredita-se que com o passar dos anos, exista acúmulo de DNA lesado e não reparado, motivo pelo qual apresentamos aumento de mutações em indivíduos mais idosos (129).

Biomarcadores são parâmetros biológicos que informam sobre o estado fisiopatológico de um indivíduo ou população, sendo muito úteis na avaliação de doenças, podendo ser utilizados para *screening*, monitorização de tratamento ou de recorrência de doenças específicas, segundo consenso de 2001 do *National Institute of Health* (NIH) (130). Idealmente, os biomarcadores devem ser seguros, específicos, baratos, existindo tratamento comprovado capaz de modificá-los. Os biomarcadores mostram eventos celulares e moleculares, podendo ajudar a melhorar compreensão da etiologia e patogêneses das doenças, e, conseqüentemente, nas estratégias de prevenção (131).

Na avaliação de risco individual é importante estimar as alterações funcionais das células ou tecido, pois a predisposição genética, estado nutricional e estilo de vida podem modificar os prejuízos causados pelos fatores ambientais. Assim, a determinação das alterações moleculares em nível de DNA pode se tornar um marcador de suscetibilidade de risco individual (132).

Diversas técnicas vem sendo desenvolvidas, nas últimas décadas, para avaliação dos danos no DNA; objetiva-se, cada vez mais, que tais métodos sejam menos invasivos, sem perder a eficácia no diagnóstico.

O aprimoramento de técnicas que utilizam células esfoliativas permitem resultados fidedignos com baixo custo e rapidez. As células esfoliativas são encontradas em epitélio do tipo estratificado, ou seja, composto por várias camadas celulares com origem na camada mais profunda chamada camada basal ou germinativa e permitem monitorar populações humanas expostas a agentes mutagênicos. Por esse epitélio apresenta renovação celular contínua com a migração das células-filhas para a superfície, mesmo as células da camada basal expressando os danos no DNA, as filhas podem ou não apresentá-los (133).

2.2. Técnica de Micronúcleos

A técnica de micronúcleos (MNs) em células epiteliais é considerada como biomarcador de lesões ao DNA, representados pela frequência de anomalias ou ausência do núcleo das células. Através da técnica, é possível avaliar diversas alterações cromossômicas que ocorreram durante a divisão celular (134).

Existem dois mecanismos principais que levam a formação de MN: 1- quebra cromossômica e 2- disfunção do aparato mitótico, na anáfase pela falha da ligação ao fuso mitótico (135), assim, os fragmentos cromossômicos são incluídos em micronúcleos nas células -filhas. A formação de MN pode ser induzida por substâncias que causam quebra no material genético ou por agentes que afetam a formação do fuso. (136)

O aumento da frequência de MN está relacionado com os primeiros eventos da carcinogênese (137).

Na análise microscópica, visualiza-se um pequeno núcleo que pode ter um diâmetro entre 1/16 e 1/3 do diâmetro dos núcleos principais, podendo ser facilmente distinto de células binucleadas (138).

A frequência de MNs em células esfoliativas vem sendo usada para investigar genotoxicidade localmente induzida; podendo ser avaliados em eritrócitos, linfócitos e células epiteliais oral, urotelial e nasal (139).

Os dados epidemiológicos disponíveis para o teste MNs são bastante limitados, estima-se que a presença de MNs em células esfoliativas é um evento relativamente raro, com uma frequência média de um micronúcleo para cada 1000 células, havendo grande variabilidade individual (139).

Assim, o impacto de idade, gênero, estilo de vida, dieta e tabagismo não estão bem estabelecidos na formação de MN nasais(133). Atualmente, acredita-se que, com o aumento da idade, exista diminuição da regeneração celular, com diminuição do número de células da camada basal, por esse motivo, quando avaliados indivíduos com idades discrepantes, devemos levar esses dados em consideração (140); uma vez que, em linfócitos, encontramos aumento do número de MN com a idade (141). No entanto, alguns autores não encontram diferenças.

Quanto ao tabagismo, o Projeto Internacional de Micronúcleo Humano (*The International Human Micronucleus* -HUMN) mostrou, em 2011, na avaliação de mucosa oral e linfócitos, que há diminuição de MN em tabagistas ativos ou ex-tabagistas recentes; no entanto quando há exposição ocupacional a genotoxinas, os tabagistas pesados apresentam aumento importante na formação de MN (142). Nenhum estudo avaliou como desfecho primário os efeitos do cigarro na formação de MN, mas alguns pesquisadores encontraram aumento de frequência dos MN em pacientes tabagistas expostos à sílica e a formaldeído comparados aos não-tabagistas. Em relação a estudos com mucosa oral, observa-se aumento de MN em pacientes que mastigam o fumo em relação àqueles que tragam (143). Quanto à idade, também há controvérsias na literatura; enquanto algumas pesquisas mostram aumento de MN, outras não encontram diferenças.

2.2.1. Histórico dos Micronúcleos

Os ensaios com MN foram utilizados pela primeira vez em 1959, por Evans *et al* (144), em experimentos de radiação de raízes, no início da década de setenta, após, Schmid e colaboradores utilizaram em estudos com medula óssea *in vivo*. Desde os anos oitenta, utiliza-se a formação de MN na medula óssea para identificar contaminações por agentes químicos. (145) e em plantas para monitorização ambiental (146). Em 1982, Stich *et al* (147) utilizaram pela primeira vez a técnica em humanos, esfoliando células da mucosa oral; tais autores postularam que a técnica pode ser usada para avaliação de efeitos da genotoxicidade em qualquer tecido onde há esfoliação; com esse objetivo, desenvolveram-se estudos com células provenientes de vários órgãos, entre eles, fígado, bexiga, cervice, brônquios e esôfago (136). Por muitos anos, MNs foram usados para biomonitorização de genotoxicidade de agentes carcinogênicos; nas últimas décadas vem sendo considerado como biomarcador de dano cromossômico, instabilidade genômica e risco de câncer (148,149).

2.2.2. Causas de formação de MN

Existem diversas causas para formação de micronúcleo, como podemos observar na Tabela I. A formação espontânea em indivíduos saudáveis geralmente deve-se à exposição ambiental; as outras causas relacionam-se principalmente a presença de inflamação crônica, quimioterapia ou condições pré-neoplásicas; infecções e deficiências nutricionais também podem levar a formação de MN.

Diversos estudos vem sendo realizados em grupos com lesões paraneoplásicas ou neoplásicas; geralmente utilizando células coletadas diretamente dos tecidos afetados. Desai *et al* (150) compararam a taxa de MN em pacientes com diferentes lesões orais pré-cancerígenas, encontrando aumento aproximado de 6 vezes no número de MN; Mandard *et al* (151) examinaram células da mucosa oral de pacientes com câncer de trato digestivo alto, os quais apresentavam o dobro de MN; Chakrabarti e Dutra (152) examinaram células do colo uterino de pacientes com displasia, que também

evidenciou aumento do número de MN; em diferentes graus de lesões de mama observou-se aumento de MN proporcionalmente à gravidade da lesão, podendo utilizar a técnica para biomonitoramento de alterações pré-malignas (153); Ramirez *et al* (154) avaliaram células orais de pacientes em tratamento para câncer de tireoide e encontraram aumento de MN não estatisticamente significativo, mas novos estudos vem sendo realizados com base nesses dados; Hofseth *et al* (155) demonstraram pequeno aumento não significativo estatisticamente do número de MN em pacientes com cistite, no entanto, os autores consideram que o uso concomitante de anti-inflamatórios prejudicou os resultados. Alguns autores também utilizam MN para monitorização pós-radioterapia de carcinoma de nasofaringe (153). A relação entre a carcinogênese e a função de MN é sustentada por diversos autores, principalmente após haver a comprovação de que o uso de agentes protetores (como por exemplo, vitamina A e betacaroteno) mostrou diminuição do número de MN. (156)

Tabela 1 - Causas de formação de micronúcleos de MN

Categoria	Etiologia	Explicação possível
Espontâneo	Pessoas saudáveis	Exposição ambiental, alimentação
Inflamação crônica	Cigarro, formaldeído, doença de Crohn	Alteração mitótica, dano de radicais livres
Genotoxicidade	Pesticidas, anti-neoplásicos	Dano direto ao DNA
Quimioterapia	Pacientes com câncer	Dano direto ao DNA
Radiação	Pacientes pós -radioterapia	Dano direto ao DNA
Doença pré -neoplásica	Fibrose oral, neoplasia intra-epitelial cervical	Aberrações cromossômicas, instabilidade genética
Neoplasia	Carcinomas (cervical, oral, mama, cólon)	Danos ao DNA, instabilidade genética
Doença genética	Síndrome de Down, Xeroderma pigmentoso	Aberrações cromossômicas, instabilidade genética
Infecioso	Infecção por HPV, clamídia	Mecanismo desconhecido
Metabólico	Deficiência de vitamina, anemia megaloblástica	Alteração na síntese do DNA

Traduzido de *Micronucleus and Its Applications* (138)

Estudos com células da bexiga em pacientes com esquistossomose mostraram aumento de MN, o que deve-se ao fato de o parasita causar intensa inflamação vesical; além disso, a eliminação do parasita com praziquantel reduziu o número de MN (157).

Devemos, contudo, ser cautelosos no diagnóstico baseado apenas na presença de MN, já que indivíduos saudáveis podem apresentá-los, motivo pelo qual diversos estudos buscam quantificar qual seria o número basal de MN. (138)

Alguns autores avaliaram doenças causadas por deficiência no reparo do DNA, como ataxia-telangiectasia, síndrome Bloom, xeroderma pigmentoso; em todos eles, indivíduos com defeito homozigótico apresentavam taxas maiores de MN.

2.2.3. Uso do MN para monitorização ambiental e ocupacional

O teste de MN é simples e rápido, podendo facilmente ser utilizado para monitorização *in situ* de trabalhadores expostos a substâncias genotóxicas e para avaliar o efeito ambiental das genotoxinas; podendo também ser útil para estabelecer os limites humanos de exposição a tais substâncias (136). O primeiro relato do uso de MN para tal fim data do final da década de noventa, quando Loomis *et al* (158) avaliaram células do epitélio brônquico de trabalhadores expostos a urânio, mas não encontraram diferença entre expostos e não -expostos. Após os primeiros estudos, começou-se a utilizar linfócitos, células do epitélio vesical, oral e nasal ainda com resultados pouco elucidativos; com o aprimoramento da técnica e crescente número de pesquisas, iniciaram os achados positivos, que correlacionavam o tempo de exposição e as substâncias genotóxicas com o aumento de formação de MN no epitélio (159). Assim, atualmente, utiliza-se a técnica para avaliação de diversas substâncias, entre elas, formaldeído, arsênico, urânio, cromo (indústria couro calçadista), pesticidas, quimioterápicos (136).

2.3. Ensaio de genotoxicidade em células nasais

O uso de células nasais para detecção de genotoxinas no ar é promissor, uma vez que essas são o primeiro contato do organismo com os agentes tóxicos.

Nos estudos com células nasais, utilizam-se, principalmente, duas técnicas: cometa e micronúcleo. A técnica cometa (*single cell gel electrophoresis*) baseia-se na

determinação da migração do DNA no campo elétrico, é cara e despende muito tempo para ser realizada. (160). Os micronúcleos são corpos extracelulares contendo DNA, que podem ser avaliados microscopicamente (133). Enquanto o cometa reflete a mudança no DNA, que desaparece após processos de reparo, os MNs representam a persistência de aberrações cromossômicas, provenientes de defeitos na segregação ou no reparo do DNA. Ao contrário da técnica cometa, o MN é um ensaio rápido e fácil de ser realizado. A realização das duas técnicas na mesma amostra permite potencializar os resultados de avaliação da genotoxicidade e carcinogênese (161). As consequências dos achados de ambos ensaios ainda não estão totalmente elucidadas; no entanto, estudos recentes mostram que o aumento de MN em linfócitos são associados a aumento do risco de câncer. Contudo, alguns autores não encontraram associação de MN em células esfoliativas e câncer. (162)

Estudos com a técnica cometa, comparando a migração entre células do corneto médio e do corneto inferior, mostrou que as primeiras são mais sensíveis para a avaliação (163).

Atualmente, encontramos alguns estudos com cometa avaliando o dano de DNA por poluentes em tecido nasal em humanos (144); em trabalhos com asmáticos e não asmáticos, o dano aparece na célula nasal, mas não nos leucócitos (164). Dessa maneira, especula-se que a hiperreatividade do epitélio nasal possa prevenir efeitos sistêmicos dos poluentes, sendo as células de pacientes asmáticos mais suscetíveis a danos genéticos.

2.3.1. Anatomia, morfofisiologia e histologia do nariz e mucosa humanos

O conhecimento anatomofisiológico nasal permite a melhora compreensão da utilização da técnica de micronúcleo em células da mucosa nasal.

O nariz é a porção inicial das vias aéreas. A conformação das fossas nasais, ladeadas pelos cornetos, promove turbilhonamento do ar, permitindo que o mesmo seja aquecido e umidificado, a filtração é papel das vibrissas vestibulares; aproximadamente 20% do ar inspirado é deslocado para a área olfatória na porção superior do nariz, possibilitando que o indivíduo reconheça os odores. As cavidades nasais, exceto no vestibulo, são cobertas por mucosa que se liga firmemente ao periósteo e ao pericôndrio e se continua revestindo os seios paranasais. O epitélio da mucosa nasal varia de acordo

com a região analisada, sendo estratificado pavimentoso na região anterior e cilíndrico com células vibráteis na região posterior. O vestíbulo é coberto por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado sobre a lamina própria que contem glândulas sebáceas, sudoríparas e vibrissas; tal epitélio estende-se até a extremidade anterior da concha inferior, onde inicia gradual transformação até apresentar-se como epitélio respiratório (pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes).

A produção do muco nasal é feita por: 1- glândulas nasais: serosas, mucosas e mistas, as serosas produzem glicoproteínas que, quando em contato com a água, formam o muco; 2- células caliciformes: responsáveis pela produção da maior parte das secreções dos seios paranasais. A proporção de células ciliadas e caliciformes aumenta quanto menor o contato com ar, portanto são encontradas em maior número em direção à rinofaringe.

A região olfatória corresponde ao terço superior da cavidade nasal, onde encontramos as células receptoras olfatórias, cujos axônios constituem o nervo olfatório.

A cavidade nasal é o sítio inicial de injúrias induzidas por irritantes gasosos. A camada de muco tem uma importante função promovendo uma cobertura viscosa que permite a deposição de partículas inaladas. No muco também existem importantes mecanismos imunológicos de defesa: IgA é encontrada em quantidades abundantes, atuando como primeira linha de defesa contra agentes infecciosos do trato respiratório, inibindo a adesão de microrganismos à superfície celular; IgG atua em conjunto com a IgA contra infecções bacterianas; lisozima destrói membranas celulares de organismos Gram-positivos; lactoferrina inibe o crescimento bacteriano por depleção do ferro; interferon inibe a replicação viral e estimula a atividade de macrófagos. Além disso, na mucosa também encontramos grande número de outros agentes imunológicos não específicos, como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. (116)

2.3.2. Técnica de micronúcleos em células nasais

A utilização de técnicas de MNs a partir do raspado de mucosas é uma técnica barata e simples, quando comparada a técnica original que utiliza culturas celulares. A aplicação da técnica é considerada como forma de medir os danos em tecidos específicos através da observação da frequência de anormalidades nucleares, uma vez que o epitélio está em constante contato com agentes ambientais. As células

epiteliais refletem as anormalidades citogenéticas das células da camada basal (162); no entanto ainda não temos total conhecimentos destes efeitos na carcinogênese (148).

Ao se avaliar os estudos com MN em humanos, observa-se que a técnica ainda é pouco utilizada; a maioria deles estuda os efeitos de substâncias tóxicas, principalmente o formaldeído. É importante salientar que as condições experimentais entre os estudos são bastante variáveis., inclusive com diversidade quanto ao número de células observadas: de 50 (147) até 3.000 células observadas por lâmina. (136). Existem também diferenças nas formas de armazenamento, processamento e coloração. A maioria dos ensaios utilizam corantes específicos de DNA, como por exemplo, Feulgen, Laranja de Acridina e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), outros utilizam Giemsa ou Papanicolaou, corantes DNA-não-específicos (133,162).

Feulgen é uma técnica de coloração que identifica seletivamente o DNA em amostras celulares, sendo a mais indicada quando se objetiva a quantificação de DNA (165) . A amostra é submetida à hidrólise com ácido clorídrico, reagente de Schiff, desidratação com etanol e xileno; o DNA mostra-se vermelho e o fundo, esverdeado em microespectrofotômetro (166).

Laranja de acridina é um corante DNA-seletivo fluorescente útil para a determinação do ciclo celular, necessitando o uso de microscopia de epifluorescência. DAPI é um corante fluorescente que se liga fortemente a regiões específicas do DNA, utilizado na microscopia de fluorescência.

O corante Giemsa é utilizado em citogenética, principalmente para análise de cariótipo e aberrações cromossômicas; é específico para o grupo fosfato do DNA (162). A coloração de May-Grünwald/Giemsa (MGG) vem sendo bastante utilizada para a identificação de MNs, pois tem custo mais baixo que a técnica de Feulgen e possibilita boa visualização do núcleo. (167). Contudo, por não ser DNA específica, esta coloração implica um risco elevado de falso-positivo, exigindo avaliação de lâminas bastante criteriosa e análise em duplicata.

O Papanicolaou também permite a visualização dos MNs, ainda que seja uma coloração menos específica.

Por ser uma técnica usada há poucos anos, alguns autores apresentam taxas variáveis de MN mesmo em indivíduos do grupo controle (168).

2.4 As alterações nucleares

Através da técnica de MN é possível avaliar diversas alterações cromossômicas que ocorreram durante a divisão nuclear pela presença de MNs, brotos nucleares (BUDs ou *broken eggs*) (133), células binucleadas, células cariorréticas e células cariolíticas. (Figura 1)

2.4.1. Micronúcleos (MNs)

Caracterizam-se pela presença de núcleo principal e pequena estrutura denominada micronúcleo, que tem diâmetro menor que um terço do diâmetro do núcleo principal, com a mesma intensidade de coloração. (147)

2.4.2. Brotos nucleares (BUDs)

As células com brotos nucleares (BUDs) contêm um núcleo apresentando uma constrição fortemente aparente, apresentam a mesma forma e coloração do núcleo principal, entretanto, seu diâmetro pode variar da metade a um quarto do tamanho do núcleo principal (170).

Os mecanismos que levam a formação de BUDs ainda não são completamente elucidados, mas sugere-se que represente um processo ativo de eliminação do DNA resultado de amplificação gênica ou ainda, envolvido em mecanismos de reparo; podendo ser considerados marcadores de instabilidade genômica, assim como os MN (147).

2.4.3. Células binucleadas

Células binucleadas apresentam dois núcleos principais, geralmente com o mesmo tamanho e coloração, sugere-se que indique falhas na atuação do fuso mitótico durante o processo de divisão celular (134, 170).

2.4.4. Núcleos com cromatina condensada

Os núcleos apresentam padrão grosseiramente estriado no qual a cromatina apresenta-se intensamente corada; é possível observar que a cromatina está agregada em algumas regiões do núcleo (169). Acredita-se que representem estágios precoces de apoptose.

2.4.5. Células em processo de cariorrexe

Cariorrexe (do grego, *karyon* = "kernel, semente ou núcleo", e *capsulorrexe* = "rebetamento") é a fragmentação nuclear, como resultado, principalmente, de necrose celular; apresentam núcleos com agregação da cromatina. Sugere-se que estas células podem estar passando por uma fase tardia de apoptose; geralmente precedido por picnose e seguido por cariólise, pode ocorrer como um resultado de apoptose, senescência, ou necrose (134).

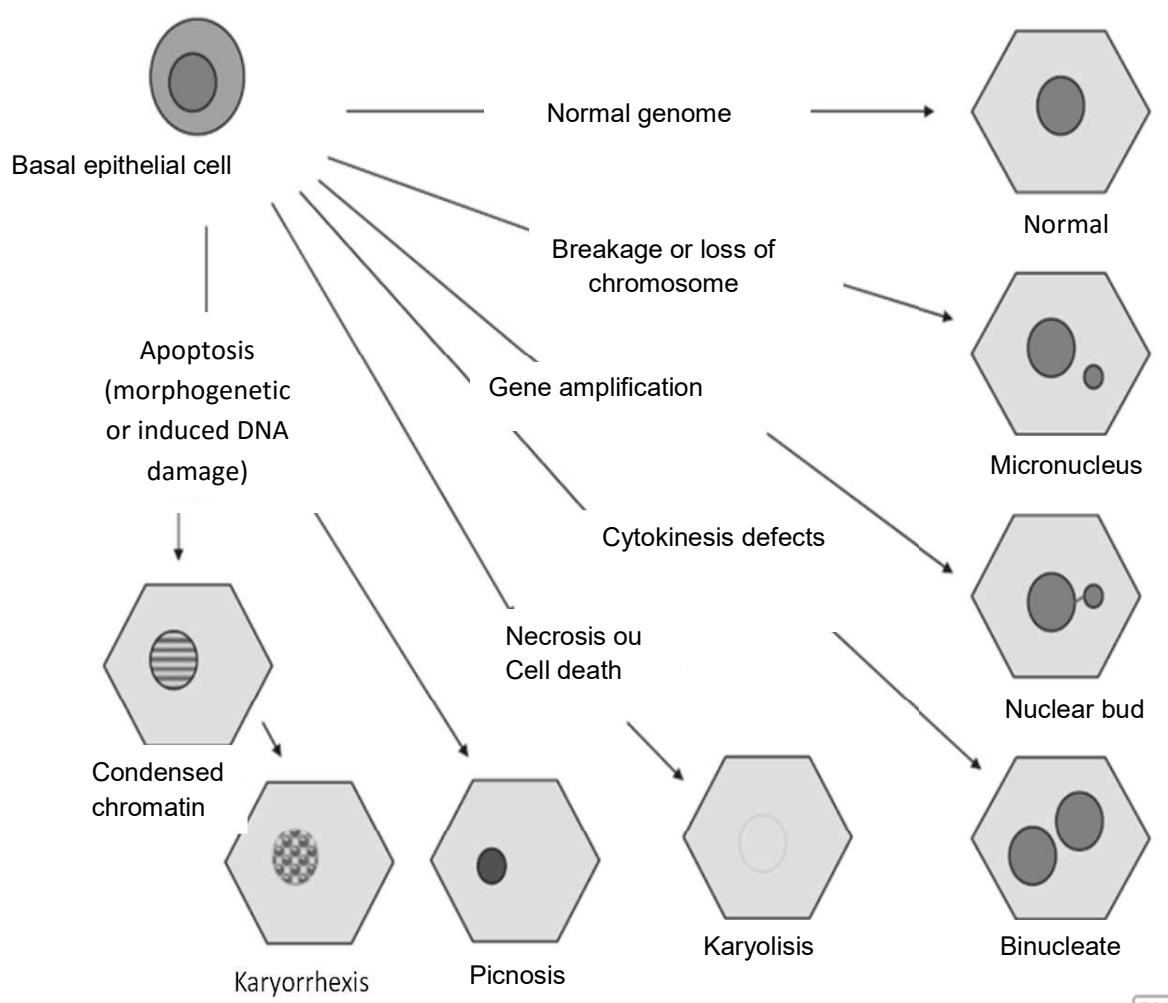
2.4.6. Células com núcleo picnótico

Picnose (*pyknono*, do grego, "engrossar ou condensar"), ou cariopicnose, é a condensação de cromatina irreversível de uma célula ao sofrer necrose ou apoptose; as células apresentam apenas um pequeno núcleo com alta densidade, corado de forma uniforme, com diâmetro de um a dois terços do tamanho de um núcleo de células diferenciadas normais. O significado biológico e o mecanismo de sua formação são desconhecidos (170).

2.4.7. Células em cariólise

Células cariolíticas são aquelas em que os núcleos não apresentam DNA, o núcleo dissolve-se em corpos apoptóticos, visualmente mostrando-se com pouca ou nenhuma coloração, geralmente precedido por cariorrexe; como resultado de necrose e de apoptose. (170). Provavelmente representam estágio avançado de morte celular (162).

Figure 1 - Nuclear abnormalities that may be found in the basal epithelial cell

Adapted from Thomas *et al.*(170)

3. Referências Bibliográficas da Revisão

1- Fokkens WJ et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyposis (EPPOS). *Rhinology*. 2012 (5); Supl 23

2- Rosenfeld, RM et al. Clinical practice guideline: Adult sinusitis *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* (2007) 137, S1-S31

3- Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, et al. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community- acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:229–46.

4- Orlandi RR, Terrell JE. Analysis of the adult chronic rhinosinusitis working definition. *Am J Rhinol* 2002;16:7–10.

- 5- Doty RL, Mishra A. Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2001;111:409–423
- 6- Kern RC. Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope* 2000;110:1071–77
- 7- Dykewicz MS. 7. Rhinitis and sinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003, Feb;111(2 Suppl):S520-9.
- 8- Bhattacharyya N. Symptom and disease severity differences between nasal septal deviation and chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;133:173–7.
- 9- Cady RK, Dodick DW, Levine HL, et al. Sinus headache: a neurology, otolaryngology, allergy, and primary care consensus on diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005;80:908–16.
- 10- Pynnonen MA, Terrell JE. Conditions that masquerade as chronic rhinosinusitis: a medical record review. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:748–51.
- 11- Collins JG, Blackwell DL, Tonthat L, Shashy RG, Moore EJ, Weaver A, et al. Prevalence of selected chronic conditions: United States, Summary health statistics for the U.S. population: National Health Interview Survey
- 12- Blackwell DL, Collins JG, Coles R. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 1997. *Vital Health Stat* 10. 2002 May(205):1-109.
- 13- Shashy RG, Moore EJ, Weaver A. Prevalence of the chronic sinusitis diagnosis in Olmsted County, Minnesota. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2004 Mar;130(3):320-3
- 14- Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 3 Suppl S1-32 (2003)
- 15- Chen Y, Dales R, Lin M. The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *The Laryngoscope*. 2003 Jul;113(7):1199-205.
- 16- Gordts F, Clement PA, Buisseret T. Prevalence of sinusitis signs in a non-ENT population. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1996 Nov-Dec;58(6):315-9.
- 17- Ahsan SF, Jumans S, Nunez DA. Chronic rhinosinusitis: a comparative study of disease occurrence in North of Scotland and Southern Caribbean otolaryngology outpatient clinics over a two month period. *Scott Med J*. 2004 Nov;49(4):130-3.

- 18- Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in European underestimated disease. A GA(2)LEN study. *Allergy*. 2011 Sep;66(9):1216-23
- 19- Pilan RR, Pinna F, Bezerra TFP, Renata Lopes Mori RL, Voegels R. Prevalence of Chronic Rhinosinusitis in Sao Paulo. *Rhinology*. 2012
- 20- Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melen I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skovde populationbased study. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 2003 Jul;112(7):625-9.
- 21- Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 1996;17:231-6
- 22- Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Serrano E, Chanal I, et al. Prevalence of nasal polyposis in France: A crosssectional, case-control study. *Allergy*. 2005;60(2):233-7
- 23- Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol*. 1999 Aug;28(4):717-22.
- 24- Goetzel RZ, Hawkings K, Ozminkowski RJ, Wang S: The health and productivity cost burden of the "top 10" physical and mental health conditions affecting six large employers in 1999. *J Occup Environ Med*. 2003;45:5-14
- 25- Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 1999 Sep;74(9):877-84
- 26- Van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: Inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011.
- 27- Van Bruaene N, Bacher t C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011 Feb;11(1):8-11.
- 28- Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *American journal of rhinology*. 2008 Nov-Dec;22(6):549-59
- 29- Brook I, *Rev InfectDis*, 3 (1981) 470
- 30 - Bhattacharyya N, Gopal HV, Lee KH. Bacterial Infection after Endoscopic Sinus Surgery: A Controlled Prospective Study. *The Laryngoscope*. 2004;114(4):765-7.

- 31- Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001 Apr;107(4):607-14.
- 32- Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 eb;8(1):34-8.
- 33- Van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, et al. *Staphylococcus aureus* colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004 Oct;114(4):981-3.
- 34- Jun Jin ,Young Hoon Yoon, Seo Young Kwak, Ki-Sang Rha, Yong Min Kim. Staphylococcal enterotoxin B induced expression of IL-17A in nasal epithelial cells and its association with pathogenesis of nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2014) 271:525–534
- 35- Patou J, Gevaert P, Van Zele T, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008 Jan;121(1):110-5.
- 36- Perez Novo CA, Jedrzejczak-Czechowicz M, Lewandowska-Polak A, Claeys C, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. T cell inflammatory response, Foxp3 and TNFRS18-L regulation of peripheral blood mononuclear cells from patients with nasal polyps-asthma after staphylococcal superantigen stimulation. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010 Sep;40(9):1323-32.
- 37- Langier S, Landsberg R, Sade K, Kivity S. Anti-IL-5 immunomodulates the effect of *Staphylococcus aureus* enterotoxin on T cell response in nasal polyps. *Rhinology*. 2011;49(5):570-6.
- 38- Heymans F, Fischer A, Stow NW et al (2010) Screening for staphylococcal superantigen genes shows no correlation with the presence or the severity of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *PLoS ONE* 5:e9525
- 39- Ou J, Wang J, Xu Y, Tao ZZ, Kong YG, Chen SM, Shi WD *Staphylococcus aureus* superantigens are associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014 Oct;271(10):2729-36. doi: 10.1007/s00405-014-2955-0. Epub 2014 Mar 7.
- 40- LIH, WANG D, SUN X, HU L, YU H, WANG J, *European Archives of Oto--Rhino-Laryngology*, 269 (2012) 155.

- 41- Singhal D, Psaltis AJ, Foreman A, Wormald PJ. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy* 2010;24:169-74. 35. Psaltis AJ, Weitzel EK, Ha KR, Wormald PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol* 2008;22:1-6.
- 42 Foreman A, Jervis-Bardy J, Wormald PJ. Do Biofilms Contribute to the Initiation and Recalcitrance of Chronic Rhinosinusitis? *The Laryngoscope*. 2011(121):1085-91
- 43- Sasama J, Sherris DA, Shin SH, Kephart GM, Kern EB, Ponikau JU. New paradigm for the roles of fungi and eosinophils in chronic rhinosinusitis. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*. 2005 Feb;13(1):2-8.
- 44- Davis LJ, Kita H. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: role of airborne fungi and bacteria. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2004 Feb;24(1):59-73
- 45- Luong A, Davis LS, Marple BF. Peripheral blood mononuclear cells from allergic fungal rhinosinusitis adults express a Th2 cytokine response to fungal antigens. *American journal of rhinology & allergy*. 2009 May-Jun;23(3):281-7.
- 46 Hrvoje Mihalj, Mirela Baus Lonar, Martina Mihalj, eljko Zub, Andrijana Veva, Maro Bujak, Josip Male and Anjela Mari. Influence of Allergy and Bacterial Colonization on the Quality of Life in Nasal Polyposis Patients. *Coll. Antropol.* 37 (2013) 4: 1139–1146
- 47- Larsen K. The clinical relationship of nasal polyps to asthma. Settupane G LV, Bernstein JM, Tos M, editor. Rhode Island: Oceanside Publications; 1997
- 48- Bunnag C, Pacharee P, Vipulakom P, Siriyananda C. A study of allergic factor in nasal polyp patients. *Ann Allergy*. 1983 Feb;50(2):126-32.
- 49- Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Cunningham L, Bean DK, Yasruel Z, et al. Evidence for distinct cytokine expression in allergic versus nonallergic chronic sinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1995 Oct;96(4):537-44.
- 50- Slavin RG. Sinusitis in adults and its relation to allergic rhinitis, asthma, and nasal polyps. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1988 Nov;82(5 Pt 2):950-6.
- 51- Hamilos DL, Leung DY, Wood R, Meyers A, Stephens JK, Barkans J, et al. Chronic hyperplastic sinusitis: association of tissue eosinophilia with mRNA expression of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1993 Jul;92(1 Pt 1):39-48.
- 52 - Bunnag C, Pacharee P, Vipulakom P, Ann Allergy, 50 (1983)126 Robinson S, Douglas R, Wormald PJ. The relationship between atopy and chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2006;20:625-8.

- 53- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, et al. Allergic rhinitis and its Impact on Asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(5 Suppl):S147-334
- 54- Diretrizes Brasileiras de Rinossinusite. *Rev Bras Otorrinolaringol* vol 74. Sao Paulo, 2008
- 55-Ogino S Aspirin-induced asthma and nasal polyps. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1986(430):21-7
- 56 - Roberta Rizzo, Nicola Malagutti, Daria Bortolotti, Valentina Gentili, Antonella Rotola, Enrico Fainardi, Teresa Pezzolo, Claudia Aimoni, Stefano Pelucchi, Dario Di Luca, and Antonio Pastore. Infection and HLA-G Molecules in Nasal Polyposis. *Journal of Immunology Research* Volume 2014, 1-9.
- 57- Lieu JE, Feinstein AR. Confirmations and surprises in the association of tobacco use with sinusitis. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2000 Aug;126(8):940
- 58 - Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009 jul; 124 (1):37-42
- 59- Bachert C, Van Bruaene N, Toskala E, Zhang N, Olze H, Scadding G, et al. Important research questions in allergy and related diseases: 3-chronic rhinosinusitis and nasal polyposis - a GALEN study. *Allergy*. 2009 Apr;64(4)
- 60- Braverman I, Wright ED, Wang CG, et al. Human nasal ciliary-beat frequency in normal and chronic sinusitis subjects. *J Otolaryngol* 1998;27:145–52.
- 61- Slavin RG. Resistant rhinosinusitis: what to do when usual measures fail. *Allergy Asthma Proc* 2003;24:303– 6
- 62 - Hamilos, DL. Host-microbial interactions in patients with chronic rhinosinusitis MDJ *Allergy Clin Immunol* 2014;133:640-53
- 63- (Passali D, Ferri R, Becchini G, Passali GC, Bellussi L. Alterations of nasal mucociliary transport in patients with hypertrophy of the inferior turbinates, deviations of the nasal septum and chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256:335-7
- 63- Zuckerman JD, Lee WY, DeGaudio JM, Moore CE, Nava P, Nusrat A, et al. Pathophysiology of nasal polyposis: the role of desmosomal junctions. *American journal of rhinology*. 2008 Nov-Dec;22(6):589-97.

- 64- Rogers G, Beste, K.E. H, Parkos CA, Nusrat A, DelGaudio JM, et al. Epithelial tight junction alterations in nasal polyposis. *International forum of allergy & rhinology*. 2011;1(1):50-4.
- 65- Bernstein JM, Gorfien J, Noble B, Yankaskas JR. Nasal polyposis: immunohistochemistry and bioelectrical findings (a hypothesis for the development of nasal polyps). *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997Feb;99(2):165-75.
- 66- Schleimer RP, Lane AP, Kim J. Innate and acquired immunity and epithelial cell function in chronic rhinosinusitis. *Clin Allergy Immunol*. 2007;20:51-78
- 67- Lane AP, Truong-Tran QA, Schleimer RP. Altered expression of genes associated with innate immunity and inflammation in recalcitrant rhinosinusitis with polyps. *American journal of rhinology*. 2006;20(2):138-44.
- 68- Young Hoon Yoon¹, Jun Jin¹, Ki Ryun Kwon¹, Sung Ha Kim¹, Ki-Sang Rha^{1,2}, Yong Min Kim^{1,2}. The role of B cell Activating Factor (BAFF) expression on pathogenesis of nasal polyp in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Rhinology* 52: 390-396, 2014
- 69- Peters AT, Kato A, Zhang N, Conley DB, Suh L, Tancowny B, et al. Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010 Feb;125(2):397-403
- 70- Atsushi Kato. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergology International* 64 (2015) 121e130
- 71- Zhou B, Headley MB, Aye T, Tocker J, Comeau MR, Ziegler SF. Reversal of thymic stromal lymphopoietin-induced airway inflammation through inhibition of Th2 responses. *J Immunol* 2008;181:6557e62
- 72- Kim J, Myers AC, Chen L, Pardoll DM, Truong-Tran QA, Lane AP, et al. Constitutive and inducible expression of b7 family of ligands by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Sep;33(3):280-9.
- 73- Colantonio D, Brouillette L, Parikh A, Scadding GK. Paradoxical low nasal nitric oxide in nasal polyposis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2002 May;32(5):698-701
- 75- Ozgul Topal, M.D.,¹ Sevsen Kulaksizoglu, M.D.,² and Selim S. Erbek, M.D. Oxidative stress and nasal polyposis: Does it affect the severity of the disease? *American Journal of Rhinology & Allergy*. January–February 2014, Vol. 28, No. 1; e1-4
- 76- Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy*. 2011 May;66(5):579-87

- 77- Schleimer R, Kato A, Kern RC. "Eosinophils in CRS". Eosinophils in Health and Disease 2011
- 78 Cao PP, Li HB, Wang BF, Wang SB, You XJ, Cui YH, et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:478e84. 84e1e2. e imunopatol
- 79- Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, Van Steen K, Van Zele T, Acke F, et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:989
- 80- Iikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Okayama Y, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest* 2007;87
- 81- Patou J, Holtappels G, Affleck K, van Cauwenberge P, Bachert C. Syk-kinase inhibition prevents mast cell activation in nasal polyps. *Rhinology*. 2011 Mar;49(1):100-6
- 82- Kato A, Hulse KE, Tan BK, Schleimer RP. B-lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:933e57. quiz 58
- 83- Allakhverdi Z, Delespesse G. Hematopoietic progenitor cells are innate Th2 cytokine-producing cells. *Allergy*. 2012 Jan;67(1):4-9
- 84- Rehl RM, Balla AA, Cabay RJ, Hearp ML, Pytynia KB, Joe SA. Mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis. *American journal of rhinology*. 2007;21(6):651-7.
- 85- Berger G, Kattan A, Bernheim J, Ophir D. Polypoid mucosa with eosinophilia and glandular hyperplasia in chronic sinusitis: a histopathological and immunohistochemical study. *The Laryngoscope*. 2002 Apr;112(4):738-45
- 86- Van Bruaene N, Perez-Novo C, Van Crombruggen K, Deruyck N, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. Inflammation and remodelling patterns in early stage chronic rhinosinusitis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2011:1-887- 1009
- 87- Lee HS, Myers A, Kim J. Vascular endothelial growth factor drives autocrine epithelial cell proliferation and survival in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009 Dec 1;180(11):1056-67.
- 88- Martinez-Anton A, de Bolos C, Garrido M, Roca-Ferrer J, Barranco C, Alobid I, et al. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clinical & Experimental Allergy*. 2006;36:448-57.
- 89- Perez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, Van Cauwenberge P, Bachert C. Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005 Jun;115(6):1189-96

- 90- Pacova H, Astl J, and Martinek J. The pathogenesis of chronic inflammation and malignant transformation in the human upper airways: The role of beta-defensins, sNOS, cell proliferation and apoptosis. *Histol Histopathol* 24:815–820, 2009
- 91- Kupper DS, Valera FCP, Malinsky R, Milanezi CM, Silva JS, Tamashiro E and Anselmo-Lima WT. Expression of apoptosis mediators p53 and caspase 3, 7, and 9 in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *American Journal of Rhinology & Allergy*. May–June 2014, Vol. 28, No. 3
- 92- Garavello W, Vigano` P, Romagnolli M, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins and analysis of apoptosis in normal nasal mucosa and in nasal polyps. *Am J Rhinol* 19:549–553, 2005
- 93- Sipila J, Antila J, Suonpaa J. Pre- and postoperative evaluation of patients with nasal obstruction undergoing endoscopic sinus surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996;253:237–9
- 94- Hamilos, DL. Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and medical management. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:693-707
- 95- Khalid AN, Hunt J, Perloff JR, Kennedy DW. The role of bone in chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*. 2002 Nov;112(11):1951-7
- 96- Mfuna-Endam L, Zhang Y, Desrosiers MY. Genetics of rhinosinusitis. *Current allergy and asthma reports*. 2011 Jun;11(3):236-46.
- 97- Wang X, Moylan B, Leopold DA, Kim J, Rubenstein RC, Togias A, et al. Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to chronic rhinosinusitis in the general population. *JAMA*. 2000 Oct 11;284(14):1814-9
- 98- Damm M, Quante G, Jungehuelsing M, Stennert E. Impact of functional endoscopic sinus surgery on symptoms and quality of life in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2002;112(2):310-5
- 99- Lal D, Scianna JM, Stankiewicz JA, *Am J Rhinol Allergy*, 23 (2009) 396.
- 100- Adnane C., Adouly T, Zouak A, Mahtar M. Quality of life outcomes after functional endoscopic sinus surgery for nasal polyposis. *Am Jour Oto Head and Neck*; 36 (2015): 47-51
- 101- Radenne F, Lamblin C, Vandezande LM, Tillie-Leblond I, Darras J, Tonnel AB, et al. Quality of life in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(1):79-84

102- Rimmer J, Fokkens W, Chong LY, Hopkins C. DecSurgical versus medical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Cochrane, Dec 2014

103- Isam Alobid,; Pedro Benitez; Sara Cardel; Francisco de Borja Callejas, ;Eduardo Lehrer-Coriat,; Laura Pujols,; Cesar Picado; Joaquim Mullol. Oral Plus Nasal Corticosteroids Improve Smell, Nasal Congestion, and Inflammation in Sino-Nasal Polyposis. *Laryngoscope*, 124:50–56, 2014

104- Watanabe K, Kanaizumi E, Shirasaki H, Himi T. Effects of glucocorticoids on infiltrating cells and epithelial cells of nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;113:465-73

105- Bachert C, Watelet, JB, Gevaert P, Cauwenberge, PV. Pharmacological management of nasal polyposis. *Drugs* 2005;65(11):1537-52

106 - Sieskiewicz A, Olszewska E, Rogowski M, Grycz E. Preoperative corticosteroid oral therapy and intraoperative bleeding during functional endoscopic sinus surgery in patients with severe nasal polyposis: a preliminary investigation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115(7):490-4.

107- Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, *Am J Rhinol*, 22 (2008) 549.

108- Harvey RJ, Wallwork BD, Lund VJ. Antiinflammatory effects of macrolides: applications in chronic rhinosinusitis. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2009 Nov;29(4):689-703

109- Ragab SM, Lund VJ, Scadding G. Evaluation of the medical and surgical treatment of chronic rhinosinusitis: a prospective, randomised, controlled trial. *Laryngoscope* 2004;114:923-30

110- Payman Dabirmoghaddam, Jalal Mehdizadeh Seraj, Shahin Bastaninejad, Ali Meighani, and Zahra Mokhtari. The Efficacy of Clarithromycin in Patients with Severe Nasal Polyposis. *Acta Medica Iranica*, 2013; 51(6): 359-364.

111- Vaughan WC, Carvalho G. Use of nebulized antibiotics for acute infections in chronic sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;127:558-68

112- Elliott KA, Stringer SP. Evidence-based recommendations for antimicrobial nasalwashes in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2006;20:1-6

113- Whatley WS, Chandra RK, MacDonald CB. Systemic absorption of gentamicin nasal irrigations. *Am J Rhinol* 2006;20:251-4

- 114- Sacks PL, Harvey RJ, Rimmer J, Gallagher RM, Sacks R. Topical and systemic antifungal therapy for the symptomatic treatment of chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst Rev*; Aug 2011
- 115- Harvey R, Hannan SA, Badia L, Scadding G. Nasal saline irrigations for the symptoms of chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jul
- 116- Silvio Caldas Neto *et al.* Tratado Brasileiro de Otorrinolaringologia, Ed Roca, 2011, 2 ed. Volume III, capítulo 11 e Volume I, capítulo 33
- 117 - Lumry WR, Curd JG, Zeiger RS, Pleskow WW, Stevenson DD. Aspirin-sensitized rhinosinusitis: the clinical syndrome and effects of aspirin administration. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71:580-7
- 118- Els De Schryver, Lien Devuyst, Lara Derycke, Melissa Dullaers, Thibaut Van Zele, Claus Bachert, Philippe Gevaert. Local Immunoglobulin E in the Nasal Mucosa: Clinical Implications. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015 July;7(4):321-331.
- 119- Bassiouni A, Chen PG, Wormald PJ. Mucosal remodeling and reversibility in chronic rhinosinusitis. *Curr Op Allergy Clin Immunol*.2013; 13: 4-12.
- 120- C. Hopkins, J. Rimmer, V.J. Lund. Does time to endoscopic sinus surgery impact outcomes in Chronic Rhinosinusitis? Prospective findings from the National Comparative Audit of Surgery for Nasal Polyposis and Chronic Rhinosinusitis. *Rhinology* 53: 10-17, 2015
- 121- Georgy MS, and Peters AT. Chapter 7: Nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 33(suppl 1):S22–S23, 2012
- 122- Messerklinger W. *Endoscopy of the Nose*. Baltimore, MD: Urban & Schwarzenberg, 1978.
- 123- Stammberger H. Endoscopic endonasal surgery—concepts in treatment of recurring rhinosinusitis. Anatomic and pathophysiological considerations. *Otolaryngol Head Neck Surg* 94:143–156, 1986.
- 124- Sharma R, Lakhani R, Rimmer J, Hopkins C. Surgical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Nov
- 125- Norman GR, Sloan JA, Wyrwich KW. Interpretation of changes in health-related quality of life: the remarkable universality of half a standard deviation. *Med Care* 2003;41(5):582–92

126 - Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome Vijay R. Ramakrishnan, Leah J. Hauser, Leah M. Feazel, Diana Ir, BS^b, Charles E. Robertson, Daniel N. Frank. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Available online 26 March 2015

127- Silva J, Erdtmann B, Henriques PJA. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003

128- Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*. 2004; 347:15-24

129 - Bolognesi C, Lando C, Forni A, Landini E, Scarpato R, Migliore L, Bonassi S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing*. 1999; 28:393-7

130- M. S. Kumar, "Biomarkers of disease in medicine," *Current Trends in Science*, pp. 403–417, 2009

131- Znaor A, Fucic A, Strnad M, Barkovic D, Skara M, Hozo I. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes as a possible cancer risk biomarker: a cohort study of occupationally exposed workers in Croatia. *Croat Med J*. 2003; 44:441-6

132 - Gluck U, Gebbers JO. The comet assay of nasal epithelia: measurement of DNA damage for the assessment of genotoxic air pollution. *The Laryngoscope*. 2000; 110:123-5

133- Knasmueller S, Holland N, Wultsch G, Jandl B, Burgaz S, Misik M, Nersesyan A. Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies. *Mutagen*. 2011; 26:231-8

134- Olivia Torres-Bugarín, María Guadalupe Zavala-Cerna, Arnulfo Nava, Aurelio Flores-García, and María Luisa Ramos-Ibarra. Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. *Disease Markers* Volume 2014, Article ID 956835, 13 pages

135- Falck GC, Catalán J, Norppa H. Nature of anaphase laggers and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutagenesis* 2002;17:111–117.11

136- Majer BJ, Laky B, Knasmueller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research* 489 (2001) 147–172

- 137- Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M. Micronucleifrequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk:evidence from human studies. *Mutagenesis* 2011;26:93-100
- 138- Swapan Samanta, M.B.B.S.and Pranab Dey,. Micronucleus and Its Applications. *Diagn. Cytopathol.* 2012;40:84–90.
- 139 - Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay:Statistical and epidemiological issues. *Mut Res.* 2010; 705:11–9
- 140- Squier, C. A. and Kremer, M. J. (2001) Biology of oral mucosa and esophagus. *J. Natl Cancer Inst. Monogr.*, 29, 7–15
- 141- Bakou K, Stephanou G, Andrianopoulos C, Demopoulos NA.Spontaneous and spindle poison-induced micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes from two age groups of women. *Mutagenesis* 2002;17:233–239
- 142- Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, Bolognesi C, Knasmueller S, Kirsch-Volders M and Bonassi S. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis* vol. 26 no. 1 pp. 239–245, 2011
- 143- Wynder EL, Hoffmann D, Tobacco and tobacco smoke, *Semin Oncol.* 3 (1976) 5–15.
- 144- Evans HJ, Neary GJ, Williamson F, The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei, *Int. J. Rad. Biol.* 3 (1959) 216–229.
- 145- OECD, Genetic Toxicology, Micronucleus test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 1983
- 146- G.S. Rodrigues, T.H. Ma, D. Pimentel, L.H. Weinstein, Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review, *Critical Rev. Plant Sci.* 16 (1997) 325–359
- 147- Stich H.F.; Curtis, J.R.; Parida, B.B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int J Cancer*, v. 30, p. 553-559, 1982
- 148 - Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M., et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 2008;659:93–108.

- 149- Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S. Micronucleifrequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients:A meta-analysis. *Mutat Res* 2008;659:274–283
- 150- Desai SS, Ghaisas S.D., Jakhi S.D. Bhide SV, Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions, *Cancer Lett.* 109 (1996) 9–14
- 151- Mandard AM, Duigou F, Marnay J, Masson P, Qiu SL, Yi JS, Barrellier P, Lebigot G. Analysis of the results of the micronucleus test in patients presenting upper digestive tract cancers and in non-cancerous subjects, *Int. J. Cancer* 39 (1987) 442–444
- 152- Chakrabarti RN, Dutta K, Micronuclei test in routine smears from uterine cervix, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 9 (1988) 370–372.
- 153- Samanta S, Dey P, Nalini Gupta, Mauleeswaran, Nijhawan R. Micronucleus in Atypical squamous cell of undetermined significance. *Diagn Cytopathol.* Published Online: 4 May 2010
- 154- Ramirez MJ, Surralles J , Galofre P, Creus A, Marcos R, FISH analysis of 1cen-1q12 breakage, chromosome 1 numerical abnormalities and centromeric content of micronuclei in buccal cells from thyroid cancer and hyperthyroidism patients treated with radioactive iodine, *Mutagenesis* 14 (1999) 121–127.
- 155- Hofseth LJ, Dunn BP, Rosin MP, Micronucleus frequencies in urothelial cells of catheterized patients with chronic bladder inflammation, *Mutat. Res.* 352 (1996) 65–72.
- 156- H.F. Stich, M.P. Rosin, A.P. Hornby, B. Mathew, R. Sankaranarayanan, M.K. Nair, Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus Vitamin A, *Int. J. Cancer* 42 (1988) 195–19
- 157- Weitzman SA, Gordon LI, Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis, *Blood* 76 (1990) 655–663
- 158- Loomis DP, Shy CM, Allen JW, Saccomanno G. Micronuclei in epithelial cells from sputum of uranium workers, *Scand. J. Work Environ. Health* 16 (1990) 355–362
- 159- Pinto D, Ceballos JM, Garcia G, Guzman P. Increased cytogenetic damage in outdoor painters, *Mutat. Res.* 467 (2000) 105–111
- 160- Azqueta, A., Shaposhnikov, S. and Collins, A. R. (2009) DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat. Res.*, 674, 101–108

- 161 - Kang SH, Young Kwon JY, Lee JK, Seo YR. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. *J Cancer Prev* 2013;18:277-288
- 162- Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M. et al. (2009) State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMN(XL) project initiative. *Mutagenesis*, 24, 295–302
- 163- Tisch, M., Faulde, M. K. and Maier, H. (2005) Genotoxic effects of pentachlorophenol, lindane, transfluthrin, cyfluthrin, and natural pyrethrum on human mucosal cells of the inferior and middle nasal conchae. *Am. J. Rhinol.*, 19, 141–151
- 164- Fortoul, T. I., Valverde, M., Lopez Mdel, C. et al. (2003) Nasal cytology and genotoxic damage in nasal epithelium and leukocytes: asthmatics versus nonasthmatics. *Int. Arch Allergy Immunol*, 130, 232–235.
- 165- Carrard VC, Costa CH, Ferreira LA, Lauxen IS, Rados PV. Micronucleus Assay – A Biomarker Of Genotoxic Damage In Exfoliated Oral Mucosa Cells. *R. Fac. Odontol. Porto Alegre*. 2007; 48:77-81
- 166- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica texto e atlas*. 11 ed. Rio de Janeiro; Guanabara-koogan, 2008
- 167- Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Effect of Staining Procedures on the Results of Micronucleus Assays with Exfoliated Oral Mucosa Cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2006; 15:1835-40
- 168- Huvinen, M., Makitie, A., Jarventaus, H. et al. (2002) Nasal cell micronuclei, cytology and clinical symptoms in stainless steel production workers exposed to chromium. *Mutagenesis*, 17, 425–429
- 169- Frankfurt OS e Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamideinduced DNA denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49: 369–378
- 170- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Publishing Group*. 2009; 12:53-66

4. Argumentos

Atualmente, estima-se que 2% da população mundial seja portadora de rinossinusite crônica com polipose nasossinusal; a doença causa grande impacto no dia-a-dia do paciente, e sabe-se que o tratamento adequado, clínico e/ou cirúrgico, traz melhora importante na qualidade de vida. Diversas teorias tentam explicar a formação de pólipos nasais, entretanto, nenhuma conseguiu esclarecer a totalidade dos eventos envolvidos na fisiopatogenia da doença; pesquisas atuais demonstram que diferentes danos celulares podem ser encontrados em células nasais, desde rupturas físicas de membrana até danos moleculares e citogenético. Dessa forma, as pesquisas demonstram que o uso de biomarcadores para avaliação de danos celulares, já bem estabelecido em pesquisas de avaliação de poluição ambiental, é útil para investigar genotoxicidade localmente induzida.

Não há na literatura estudos que avaliem a presença de MNs em pacientes com polipose, no entanto, diversos trabalhos vem demonstrando que pacientes portadores de PN podem ter alterações no DNA celular; assim, entendemos que a avaliação dos danos teciduais pode ser utilizada na melhora do entendimento da patogênese da polipose e, conseqüentemente, do manejo terapêutico da mesma, visando melhora da qualidade de vida do paciente portador da doença.

5. Objetivos

5.1 . Objetivo Geral:

Avaliar a presença de danos ao DNA de células do epitélio nasal em pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal

5.2. Objetivo Secundário:

Avaliar se há diferença entre os danos de DNA em pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal e em pacientes sem rinossinusite crônica

6. Materiais e Métodos

6.1. Participantes:

Após a aprovação pelo Comitê de Ética (CEP / ISCMPA), amostras de swab nasal foram coletadas de 40 indivíduos não-tabagistas (21 com polipose e 19 sem polipose nasossinusal) no período entre julho e agosto de 2015 no Hospital Santa Clara do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil). Foram excluídos os pacientes tabagistas; nenhum paciente se recusou de participar do estudo. Um questionário foi aplicado após a coleta da amostra, para avaliação da saúde do paciente.

6.2. Coleta das amostras:

A amostra foi coletada com um pequeno *cytobrush*, fabricada comercialmente para consultórios médicos; a coleta foi realizada pela pesquisadora nos 40 pacientes. As escovas foram inseridas nas narinas abertas pelo espéculo nasal, até a concha média, onde foram rodados na cavidade nasal, a fim de obter a maior quantidade possível de material. Em seguida, os *cytobrushes* foram armazenados em tubos Falcon, contendo 3 mL de solução fixadora de Carnoy (metanol a 3: 1 de ácido acético). Os materiais foram mantidos a fresco (4° C) durante um período máximo de 14 dias.

6.3 Processamento e análise das amostras:

No laboratório, os microtubos foram centrifugados durante 5 minutos, a 19°C, a 1000 rotações por minuto (RPM), seguido por 3 lavagens dos peletes, com re suspensão das amostras entre cada centrifugação com 1 mL de solução fixadora de Carnoy. Após a última centrifugação, foram dispostos 500uL das células por lâmina; assim, duas lâminas foram feitas para cada indivíduo, cada um com aproximadamente 0,5 mL de suspensão de células do material. A lâminas foram coradas pelo seguinte processo, sempre em temperatura ambiente: tratamento por 1 minuto com etanol 50%; após: tratamento por 1 minuto em etanol 20%; seguindo-se lavagem com água destilada por 2 minutos; após: foram as laminas foram imersas em solução de HCl 5M (40 ml de HCl e 60 mL de água destilada); seguindo-se lavagem com água destilada por 2 minutos e banho em solução de Schiff por 80 minutos, sob proteção da luz ambiente; após

lavagem com água corrente por 5 minutos, procedeu-se lavagem com água destilada por 1 minuto e banho na solução *Fast Green* a 0,2%; finalizando-se com lavagem em água destilada por 2 minutos.

Após a coloração, as análises foram realizadas de deslizamento com um microscópio óptico a 400X de ampliação com a adição de óleo mineral. Apenas células basais e diferenciadas foram consideradas na análise. Duas mil células de cada amostra foram analisados (mil por lâmina) e classificados de acordo com a frequência de micronúcleos. Os valores são apresentados por média \pm desvio padrão (DP).

6.4. Análise estatística:

A análise dos dados, mostrou, através do teste de Shapiro-Wilk que as variáveis distribuem-se dentro da normalidade; assim, aplicou-se o teste t para analisar a associação entre as duas variáveis. Consideramos possíveis vieses, que também foram analisados: a análise do sexo dos pacientes, da presença de asma e rinite alérgica foram realizadas pelo teste do qui-quadrado; a idade foi avaliada pelo teste t; e o uso de álcool pelo teste exato de Fisher. O nível de significância foi considerado com $p \leq 0.05$. As análises foram realizadas no programa Sigma.

7. Artigo científico

Evaluation of DNA damage in the nasal epithelial cells of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: cross sectional study

Abstract

Introduction: Chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (CRSwNP) is characterized by a symptomatic inflammation of the nasal mucosa. This is a widely prevalent disease, reaching up to 2% of the world population, considerably affecting the quality of life of the affected individuals. Currently, it is understood that different factors are involved in its etiology, including the characteristics of the host. Thus, inflammatory molecular models may assist in determining the physiopathology of the disease, and guide the appropriate therapy. The micronucleus technique (MNs) was used to indicate cellular and molecular events; this way, the analysis of DNA damage of epithelial cells can help better understand the etiology and pathogenesis of diseases, enabling the planning of strategies for prevention and treatment.

Objective: The objective of this study is to evaluate the presence of DNA damage of nasal epithelial cells in patients with rhinosinusitis (CRSwNP) and its association with prognostic factors.

Materials and Method: A cross sectional study, where samples collected from the nasal mucosa of 40 non-smoker patients (21 with polyposis and 19 without nasal polyposis) were analyzed.

Results: An average of 3.690 micronuclei per 1000 cells analyzed (± 2.165) in patients with CRSwNP, while patients in the control group showed an average of 1.237 (± 0.806); (t-test=4.653, $p < 0.001$). No difference was observed in the occurrence of AERD ($p = 0.310$) and presence of nasal surgery in the last five years ($p = 0.251$).

Conclusion: The presence of MNs seems to be influenced by the presence of CRSwNP, which makes it a new possibility to evaluate these patients.

Keywords: nasal polyposis, micronuclei, DNA damage

Chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (CRSwNP) is characterized by a persistent symptomatic inflammation of the nasal mucosa and paranasal sinuses with the formation of nasal polyps (1). It is estimated that 2 to 5 % of the world population carries the disease (2). Some patients present significant worsening in the quality of life and the CRSwNP can be compared to rheumatoid arthritis and diabetes mellitus (3). Currently, it is understood that the CRSwNP has multifactorial causes, with persistence of inflammation, by dysfunction of the host-environment relationship, associated with exogenous factors (4). It is known that the appropriate clinical and/or surgical treatment entails significant improvement in quality of life (5). However, some patients, for reasons as yet unknown, present frequent relapse and difficult handling. We still do not know any laboratory resource able to discriminate abnormalities or establish prognoses associated with the evolution of this disease.

In some diseases of the respiratory tract, such as in asthma and acute viral bronchiolitis (6), the survey of the micronuclei (MNs) has proven useful for the characterization of cellular damage. The MNs are biomarkers, which have the ability to demonstrate the occurrence of events associated with genotoxicity in a cellular and molecular level, and may help better understand the etiology and pathogenesis of diseases and, consequently, in obtaining prevention strategies. (7). Therefore, the determination of the occurrence of MNs in exfoliated cells of patients with nasal polyposis could become a feasible resource for investigation, in case it were capable of discriminating abnormalities, not evaluated until then (8).

The objective of our study is to determine the occurrence of MNs in exfoliated cells of the nasal cavity and its association with severity in a series of patients with nasal polyposis.

Materials and Method

A cross sectional study was outlined, controlled by a consecutive sampling technique in the Otorhinolaryngology clinic of Hospital Santa Clara, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brazil. Patients over 18 years old were selected, with clinical diagnosis of nasal polyposis accompanied in the Service they had consulted in the months of July and August 2015. Active smoker patients and patients with active infectious status were excluded from the sample.

The control group was obtained in a convenience sampling process, at the surgical ward of the institution. Thus, it was basically composed of hospital employees and people accompanying the patients that accepted to participate in the study. They should not present any

active disease in the upper respiratory tract, be over 18 years old and, like patients with nasal polyposis, should meet the same exclusion criteria established.

At a stage prior to material collection, a standardized questionnaire was applied for evaluating the health of the patient and of the control group.

The technique used for the characterization of cellular damage was the counting of micronuclei obtained directly from the nasal mucosa. The procedure for obtaining exfoliative cellular material was performed in a sitting position, by the same researcher, through the introduction of a cytobrush in the middle meatus region. The material collected was stored in a fixative Carnoy's solution (3 parts methanol, 1 part acetic acid), and kept at 4° C for a maximum period of 14 days. In the laboratory, the microtubes were centrifuged for five minutes at 19°C, in a frequency of 1000 revolutions per minute, followed by three washes, with resuspension of the samples between each centrifugation. After the last centrifugation, 500uL of cell solution were prepared per slide, obtaining two slides for each individual, each one with approximately 0.5 mL of cell suspension of the material. The slides were stained in a sequential fashion: 50% ethanol (treatment for one minute); ethanol 20% (treatment for one minute); followed by rinsing with distilled water for two minutes. Afterwards it was immersed in an HCl 5M solution (40 ml of HCl and 60 mL of distilled water); followed by rinsing with distilled water for two minutes and bath in a Schiff's solution for 80 minutes, under protection from ambient light. It was then washed with water for 5 minutes and with distilled water for 1 minute followed by bath in a Fast Green solution at 0.2%. The technique was finalized with washing in distilled water for two minutes. The analyses were performed with an optical microscope to 400x magnification. Only basal and differentiated cells were considered in the analysis; 1,000 cells were analyzed per slide, quantifying the frequency of micronuclei. The values are presented by mean \pm standard deviation (SD).

The normal distribution of the population sampled was confirmed by the Shapiro-Wilk test. Student's t-test was used for comparison of means and the association between the variables was determined by the Chi-square test. The adopted significance level was 95% ($p < 0.05$). The analyses were carried out in the SigmaPlot™ program (version 13, 2012).

All patients signed a written consent form to participate in the research and the study was approved by the Ethics Research Committee (CEP) of Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (No. 8064 / 2015).

Results:

The sample was constituted by 40 patients who were distributed in two groups based on the presence of polyposis: group I (21 patients with polyposis) and group II (19 controls without nasal polyposis). Both groups were homogeneous in demographics data, except for the age range (Table 1). All patients and their controls declared themselves as nonsmokers.

When we compared the count of MNs in the exfoliative material of all individuals studied, we observed a count approximately three times higher in patients with polyposis. Group I presented an average of 3.69 ± 2.165 MNs per 1,000 cells evaluated, whereas in group II the count was 1.237 ± 0.806 MNs per 1,000 cells. (Figure 1)

Several factors have been associated with a worse prognosis of nasal disease (1), among them we can mention the presence of Samter Triad (or Widal Syndrome, or AERD - aspirin-exacerbated respiratory disease, characterized by asthma, nasal polyposis and allergy to AAS). ($p=0.310$)

When we evaluated the influence of the history of previous nasal surgery in the last five years, compared to the MNs count, we observed no significant differences ($p=0.251$).

Discussion

The MNs count in nasal mucosa cells obtained by the exfoliative technique showed to be feasible, simple and safe in patients with CRSwNP. The technique enables the direct evaluation of the target-organ affected (9), which is why several studies are being developed for different diseases (10). For many years, MNs were used for biomonitoring of genotoxicity of carcinogenic agents; in the last decades it has been considered a biomarker of chromosomal damage, genomic instability and risk of cancer (11); more recently its use for evaluation of damage in the nasal mucosa was initiated by the research of tissular genotoxicity in environmental monitoring studies (12).

The difference found in the MN count between the two groups, approximately three times higher in patients with polyposis, point to a higher presence of cellular damage (genotoxicity) in patients with CRSwNP. Although there are no studies that have evaluated the technique in patients with polyposis, different authors have demonstrated alterations in the cellular DNA in the development of many diseases (13). Thus, the findings of our study are similar to literature data, which show a higher MNs count in the target cells of sick patients, when compared to their controls

(9). Mandard and collaborators (14) found two times the amount of MNs in the oral mucosa of patients with digestive tract carcinoma compared to their controls; Chakrabarti and Dutta (15) related the increase of MNs proportional to the degree of malignancy of the uterine cervix disease; Herrström *et al* observed increased MNs in blood samples of asthmatic young people (16). The use of the technique in recent studies shows that MNs can be used in the biomonitoring of several stages of diseases, among which we can mention screening of genotoxicity, detection of malignancies, paraneoplastic diseases, and radiotherapy side effects (9). However, the studies point to the need to find the normal value of MNs in different tissues (17), which would allow the adequacy and comparison of research data on a global scale.

We were not able to determine any correlation between the factors considered to be of worse prognosis, such as AERD and history of previous surgery in the last five years, with an increase in the MNs count in the exfoliative material. We believe that this fact is due to the small sample size, since several authors have proven the variation in the quantity of MNs in patients in different stages of evolution of diseases; like a decrease in the number of MNs in bladder cells after treatment for schistosomiasis (18), MNs decrease after the use of agents considered protective of DNA, such as beta-carotene and vitamin A (19).

Our study has some limitations. The first is the sample size of the constituent groups. The inability to determine the differences between the groups, mainly in the prognostic factors, can derive from a low sample power, leading us to a type II error. Another issue to be discussed is the age difference found between the polyposis group and its controls. We cannot determine the action of this effect; however, the two groups were comprised of patients situated within the same biological status and, in their majority, by adults of mature or average age, between 30 and 60 years old, according to the geriatric classification by the WHO. Recent studies (20,21) suggest an increase in the occurrence of the event in older patients; however, Calderon-Garciduenas *et al* (22) have not observed differences in the presence of MNs related to age of patients. Thus, we understand that larger studies can help understand the importance of age in the formation of the MNs.

Therefore, we consider that the use of the MNs technique in the exfoliative cells of the nasal mucosa in patients with CRSwNP is feasible, safe, simple and does not demand large laboratory resources, and can easily be performed both in experimental and in clinic scales. We believe that the differences found in the MN count in patients with nasal polyposis appear as a new perspective for the evaluation of these patients, who do not have a full understanding about the development and evolution of the disease.

Conflicts of Interest

None declared.

Bibliography

- 1- Fokkens WJ et al. (2012) European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyposis (EPPOS). *Rhinology* (5); Supl 23.
- 2- Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Serrano E, Chanal I, et al.(2005) Prevalence of nasal polyposis in France: A crosssectional, case-control study. *Allergy*. 60(2):233-7.
- 3- Diretrizes Brasileiras de Rinossinusite. (2008) *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*.74
- 4- Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, et al. (2008) Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *American journal of rhinology*. 22(6):549-59.
- 5- AdnaneC., AdoulyT , Zouak A, Mahtar M. (2015) Quality of life outcomes after functional endoscopic sinus surgery for nasal polyposis. *American Journal Otolaryngology- Head and Neck*. 36: 47-51.
- 6- Mergener M, Amantea SL, Rhoden CR. (2014) Nuclear abnormalities in cell from nasal epithelium: a promising assay to evaluate DNA damage related to air pollution in infants. *Jornal de Pediatria*. 90:632-6.
- 7- Znaor A, Fucic A, Strnad M, Barkovic D, Skara M, Hozo I. (2003) Micronuclei in peripheral blood lymphocytes as a possible cancer risk biomarker: a cohort study of occupationally exposed workers in Croatia. *Croatia Medical Journal*. 44:441-6.
- 8- Bunnag C, Pacharee P, Vipulakom P, Ann Allergy, 50 (1983)126 Robinson S, Douglas R, Wormald PJ. The relationship between atopy and chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*. 20:625-8.
- 9- Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. (2001) Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*. 489:147–172.
- 10- Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. (2010) Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mut Res*. 705:11–9.
- 11- Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S. (2008) Micronucleifrequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mut Res*. 659:274–283.
- 12- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M., et al. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mut Res*. 659:93–108.

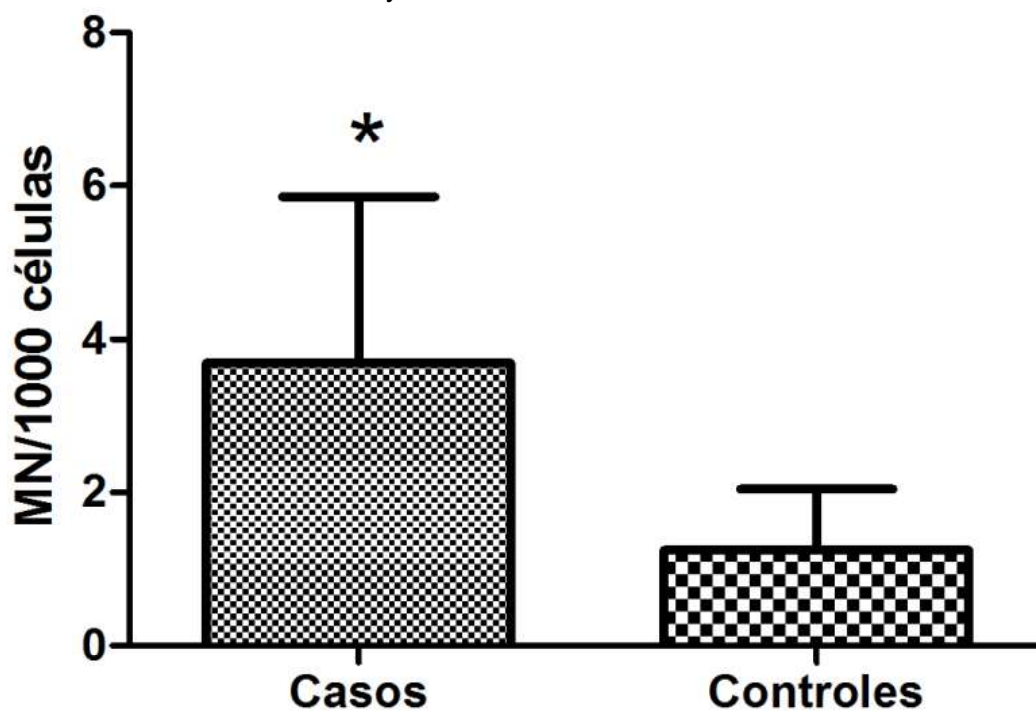
- 13- Kupper DS, Valera FCP, Malinsky R, Milanezi CM, Silva JS, Tamashiro E and Anselmo-Lima WT. (2014) Expression of apoptosis mediators p53 and caspase 3, 7, and 9 in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *American Journal of Rhinology & Allergy*. 28;3.
- 14- Mandard AM, Duigou F, Marnay J, Masson P, Qiu SL, Yi JS, Barrellier P, Lebigot G. (1987) Analysis of the results of the micronucleus test in patients presenting upper digestive tract cancers and in non-cancerous subjects, *Int. J. Cancer*. 39;442–444.
- 15- Chakrabarti RN, Dutta K. (1988) Micronuclei test in routine smears from uterine cervix. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 9;370–372.
- 16- Herrström P, Bratt I, Holmén A, et al. (1998) Micronuclei in lymphocyte subsets in relation to immune proteins and allergic disease. *Mutat Res*. 405:35-40.
- 17- Samanta S, Dey P, Nalini Gupta, Mauleeswaran, Nijhawan R. (2010) Micronucleus in Atypical squamous cell of undetermined significance. *Diagn Cytopathol*. Published Online: 4.
- 18- Weitzman SA, Gordon LI. (1996) Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis, *Blood*. 76; 655–663.
- 19- H.F. Stich, M.P. Rosin, A.P. Hornby, B. Mathew, R. Sankaranarayanan, M.K. Nair. (1988) Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus Vitamin A. *Int. J. Cancer*. 42;195–19.
- 20- Squier, C. A. and Kremer, M. J. (2001) Biology of oral mucosa and esophagus. *J. Natl Cancer Inst. Monogr*. 29; 7–15.
- 21- Bakou K, Stephanou G, Andrianopoulos C, Demopoulos NA. (2002) Spontaneous and spindle poison-induced micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes from two age groups of women. *Mutagenesis*.17;233–239.
- 22- Calderon-Garciduenas, L., Wen-Wang, L., Zhang, Y. J., Rodriguez-Alcaraz, A., Osnaya, N., Villarreal-Calderon, A. and Santella, R. M. (1999) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ. Health Perspect*. 107; 469–474.

Table 1- Population Characteristics

	Group I	Group II	p
Age (years \pm SD)	52.57 (\pm 9.79)	41.05 (\pm 11.93)	0.002 ^a
Gender			
Male	10	9	0.763 ^b
Female	11	10	
Rhinitis	14	13	0.826 ^b
Asthma	8	6	0.921 ^b
Alcohol Abuse	1	0	1.000 ^c
Number of MNs /1000 cells (average \pm SD)	3.690 (\pm 2.165)	1.237 (\pm 0.806)	< 0,001 ^a

^a t-test; ^b chi-square test; ^c Fisher's exact test

Figure 1: Number of MNs for every 1000 cells



MN/1000 cells – Cases – Controls

Anexos

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Avaliação do dano do DNA em células do epitélio nasal de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal”

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. Antes de decidir se quer ou não participar, é importante que entenda porque o estudo está sendo realizado e o que ele vai envolver. Sinta-se livre para perguntar sobre qualquer coisa se desejar mais informações.

QUAL O PROPÓSITO DESTA ESTUDO?

Esse estudo pretende avaliar alterações na mucosa nasal em pacientes com rinossinusite crônica e polipose nasal; visando, possivelmente, no futuro, em conjunto com outros estudos, otimizar o tratamento da polipose nasal.

POR QUE FUI ESCOLHIDO?

Você está sendo escolhido porque tem polipose nasal, e seu médico acredita que você possa participar do estudo.

O QUE ACONTECERÁ AO PARTICIPAR DO ESTUDO?

Se você aceitar participar do estudo, após a consulta normal serão realizados: questionário com perguntas relacionadas a sua saúde, exame endoscópico nasal e coleta de material nasal (colocação de pequena escova para coletar células da mucosa nasal). É importante lembrar que este procedimento é indolor.

QUAIS SÃO AS POSSÍVEIS DESVANTAGENS E OS RISCOS DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Não há nenhum trabalho na literatura atual que mostre as alterações na mucosa nasal causadas pela polipose nasal.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Um possível benefício deste estudo é, no futuro, a melhora do tratamento para polipose nasal. Este estudo poderá não trazer nenhuma ajuda direta para você, mas pode reunir informações valiosas que poderão ajudar outras pessoas no futuro.

QUEM PROCURAR EM CASO DE EMERGÊNCIA?

Se precisar de cuidados de emergência durante o estudo, por favor alerte o médico pesquisador que o está tratando neste estudo e informe a sua equipe imediatamente ligando para Dra. Renata Loss Drummond, telefone 9807.48.38. Se seus sintomas forem graves e o serviço de emergência não estiver disponível ou não puder ser alcançado, você deverá ir ao pronto-socorro mais próximo para ser tratado.

A PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO SERÁ MANTIDA CONFIDENCIAL?

Seu médico vai tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O prontuário vai permanecer confidencial. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no prontuário médico e uma será fornecida a você.

O QUE VAI ACONTECER COM OS RESULTADOS DO ESTUDO DA PESQUISA?

Os resultados poderão ser publicados, mas você não será identificado em nenhum relatório/publicação.

CUSTOS

Você não receberá dinheiro por sua participação no estudo, como também não terá gastos adicionais por participar do mesmo.

QUEM ESTÁ ORGANIZANDO A PESQUISA?

O estudo está sendo organizado por médicos otorrinolaringologistas do Hospital Santa Clara.

DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

O pesquisador e sua equipe farão todos os esforços no sentido de evitar que danos possam resultar deste estudo.

QUEM REVISOU O ESTUDO?

O estudo foi revisado por um comitê de ética para cumprir os padrões médicos e éticos e o valor científico. Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Porto Alegre: (51) 3214.8571

DECLARAÇÃO - Eu tive tempo para ler e pensar sobre a informação contida neste formulário antes de entrar para o estudo. O programa proposto foi explicado claramente. Eu concordei voluntariamente quanto a participação neste estudo.

Compreendo que a recusa em participar deste estudo não irá envolver qualquer perda de benefícios. Também compreendo que posso retirar meu consentimento e interromper o tratamento a qualquer momento sem penalidade e sem prejuízo para tratamento futuro ou alternativo neste hospital.

Declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento e se qualquer problema ou questão aparecer com relação aos meus direitos enquanto paciente de pesquisa clínica, ou com relação a lesão relacionada à pesquisa clínica, compreendo que devo entrar em contato com:

Médico: Renata Loss Drummond

Telefone: (51) 9807.48.38

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do médico: _____

Data: ___/___/___

Anexo B -Questionário

"Avaliação do dano do DNA em células do epitélio nasal de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal"

Nome: _____

Idade: _____

Profissão: _____

Diagnóstico RSC com polipose - ANO: _____

QUEIXAS: () OBSTR. NASAL () HIPO/ ANOSMIA () SECR. NASAL

() OUTRAS: _____

CIRURGIA: () SIM () NAO

SE SIM, QUANTAS / DATA: _____

Historia médica pregressa:

() ASMA () ALERGIA A AAS () HAS

() RINITE () DM () OUTRAS: _____

MEDICAMENTOS EM USO: _____

ALERGIAS: _____

CIRURGIAS: _____

TABAGISMO: () ATIVO () PASSIVO () NENHUM

SE TABAGISTA: _____ ANOS / _____ CIGARROS POR DIA

Álcool: () SIM () NAO

SE SIM, QUANTIDADE/SEMANA: _____

OBS: _____

Anexo C - Aprovação do CEP

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do dano do DNA em células do epitélio nasal de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal

Pesquisador: Renata Loss Drummond

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 41611615.2.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.192.661

Apresentação do Projeto:

Ítem já avallado e adequado em pareceres anteriores (987.783 e 1.108.617).

Objetivo da Pesquisa:

Ítem já avallado e adequado em parecer anterior (1.108.617).

Avalliação dos Riscos e Benefícios:

Ítem já avallado e adequado em parecer anterior (987.783).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ítem já avallado e adequado em parecer anterior (1.108.617).

Delineamento: descrito em carta ao CEP. Explicado ser um estudo com grupo controle.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ítem já avallado e adequado em parecer anterior (987.783).

Recomendações:

Este projeto foi novamente discutido em reunião com os relatores do CEP.

Descrito e explicado em carta ao CEP o delineamento do projeto.

Ainda permanecem algumas recomendações, que solicitamos serem corrigidas.

Como já estamos no mês de agosto, no cronograma consta coleta de dados no mês de julho. A coleta só pode ser iniciada após a aprovação do CEP. Solicitamos que seja corrigido.

Endereço: R. Profa Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.lche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.192.661

Lembrar que o grupo controle necessariamente deve ter TCLE assinado, assim como os casos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com Recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	orcamento.pdf	09/02/2015 11:53:38		Acelto
Outros	cronograma.pdf	09/02/2015 11:54:00		Acelto
Outros	inscricao.pdf	09/02/2015 11:55:24		Acelto
Outros	dados e prontuarios.pdf	09/02/2015 11:57:15		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE-POLIPOSE.docx	09/02/2015 11:57:43		Acelto
Outros	confidencialidade.pdf	09/02/2015 11:58:27		Acelto
Outros	autorizacao chefia .pdf	09/02/2015 11:59:03		Acelto

Endereço: R. Profª Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
 Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.192.681

Outros	uso e publicacoes.pdf	09/02/2015 12:00:18		Aceito
Outros	uso de dados e materiais.pdf	09/02/2015 12:00:57		Aceito
Outros	isencao onus.pdf	09/02/2015 12:01:16		Aceito
Outros	riscos e beneficios.pdf	09/02/2015 12:02:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	polipose-projeto 31.01.2015.doc	09/02/2015 12:04:28		Aceito
Folha de Rosto	folha rosto.pdf	09/02/2015 11:52:05		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_461518.pdf	09/02/2015 12:05:34		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - VERSÃO 1.1.docx	01/04/2015 11:56:28		Aceito
Outros	cronograma-versao1.1 (1).docx	01/04/2015 11:57:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	polipose-projeto versÃ£o 1.1.docx	01/04/2015 11:57:22		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_461518.pdf	01/04/2015 11:58:36		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_461518.pdf	30/06/2015 22:03:16		Aceito
Outros	carta ao cep 001.jpg	28/05/2015 07:11:03		Aceito
Outros	cronograma 2.1 001.jpg	28/05/2015 07:11:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	polipose-projeto versao2.1.docx	28/05/2015 07:11:55		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_461518.pdf	28/05/2015 07:12:47		Aceito
Outros	cronograma versao1.3 001.jpg	30/06/2015 22:01:45		Aceito
Outros	carta ao cep versao1.3 001.jpg	30/06/2015 22:02:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	polipose-projeto versao 1.3.docx	30/06/2015 22:02:42		Aceito

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
 Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.fche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.192.661

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Agosto de 2015

Assinado por:

Carlos Henrique Munhoz Olea
(Coordenador)

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.iche.br

Anexo D Norma para autores do *Clinical Otolaryngology*

Disponível em:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1749-4486/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1749-4486/homepage/ForAuthors.html)

Author Guidelines

Clinical Otolaryngology is intended to reflect all aspects of otorhinolaryngology and head and neck surgery, but in particular its clinical aspects. We welcome contributions under various headings, each of them having different requirements. Should a contribution be outside these guidelines, they will still be considered for publication, but the authors are advised to include a covering letter explaining why they find it difficult to comply with the guidelines. Overall, our aim is to publish original articles that add to what is already known about clinical aspects of otorhinolaryngology. Authors should attempt to demonstrate how their contribution does this. Animal and laboratory studies, as well as case reports, are advised to be submitted to alternative journals.

There is no charge for illustrations in colour.

Ethical policies of *Clinical Otolaryngology*

The ethical policies of *Clinical Otolaryngology* have been adapted (with permission) from the guidelines published by Blackwell Publishing Ltd¹ and the guidelines adopted by the British Medical Association.² In the opinion of the editors, these represent stringent and careful policies for a leading medical journal. Submitted work must comply with these policies, which are also based on the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their Code of Conduct.

AUTHORSHIP

All authors must fulfil the following three criteria:

- Have made a substantial contribution to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data;
- Have drafted the paper or revised it critically;
- Have approved the submitted and final versions. An author may list more than one contribution, and more than one author may have contributed to the same element of the work. E.g. 'A performed the research, A and C analysed the data and wrote the paper, E contributed the knockout mice for the study and G designed the research study and wrote the paper'.

ETHICS APPROVAL FOR PAPERS SUBMITTED TO *CLINICAL OTOLARYNGOLOGY*

The Editors aim to ensure that all articles published in *Clinical Otolaryngology* (hereinafter called 'the journal') meet internationally accepted ethical standards. To achieve this, we evaluate the ethical aspects of submitted work that involves human or animal subjects. We require that authors submitting a paper provide the date, approval number or code and or name of the approving committee on all work submitted to the journal.

There may be some exceptions (for example retrospective reviews of anonymised clinical records) in which case a letter from the relevant ethics committee (translated into English if necessary) stating that ethical permission was not required must be included.

If ethical concerns are raised, we will require full disclosure of ethical aspects of a study (such as

copies of the consent forms or animal care certification) and we may, at our discretion conduct a formal or informal ethical review of the study whether or not it meets acceptable standards for publication. Results of this review may be shared with the authors, and if concerns are identified they will be passed along to the authors' institution(s).

Editorial appraisal of ethical issues goes beyond simply deciding whether human subjects in a study gave fully informed consent, although this is one very important issue to consider. The Editors will judge whether the overall design and conduct of each piece of work is morally justifiable. If a study is deemed unethical, it will be rejected whether or not the findings were judged to be of importance.

Patient confidentiality and consent to publication

The journal requires that authors use the BMJ guidelines on patient consent to publication: <http://resources.bmj.com/bmj/about-bmj/advisory-panels/ethics-committee/>.

Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the Declaration of Helsinki, and that the procedures have been approved by a local ethics committee. Images of, or information about, identifiable individuals: it is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require authors must obtain explicit written consent from the individual and provide that to us.

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

Animal work

Manuscripts describing studies involving animals should comply with local/national guidelines governing the use of experimental animals and must contain a statement indicating that the procedures have been approved by the appropriate regulatory body.

Authors are expected to comply with the ARRIVE guidelines for reporting research (www.nc3rs.org.uk/ARRIVE) before submission of a manuscript. While the guidelines refer to animal experiments, most of the elements are common to all forms of research communication and adherence will strengthen the transparency and completeness of reporting.

Defining Ethnicity

Ethnicity and culture are socially determined variables of limited use in biological research, though they are useful in health services research. All the variables are confounded by socioeconomic status. Try to use accurate descriptions of race, ethnicity and culture rather than catch all terms in common use. In the Methods section of research papers, describe the logic behind any ethnic groupings used. It is best to present a range of information including the following:

- Genetic differences;
- Self assigned ethnicity, using nationally agreed guidelines;
- Observer assigned ethnicity;
- Country or area of birth (participant's own, or parents' or grandparents', if applicable);
- Years in country of residence;
- Religion.

Reporting Clinical Trials Conducted by Pharmaceutical Companies

Relying on published trials alone can provide a biased view of effectiveness and safety when assessing medical interventions. Therefore, all trials should be deposited in a Clinical Trials Registry such as:

- <http://www.anzctr.org.au>
- <http://www.clinicaltrials.gov>
- <http://isrctn.org>
- <http://www.trialregister.nl/trialreg/index.asp>
- <http://www.umin.ac.jp/ctr>

Publications must include the registration number and name of the trial register. Note that registration can be obtained retrospectively if necessary.

Please ensure that clinical trials sponsored by pharmaceutical companies follow the guidelines on good publication practice. These guidelines aim to ensure that such trials are published in a responsible and ethical manner. The guidelines cover companies' responsibility to endeavour to publish results of all studies, companies' relations with investigators, measures to prevent redundant or premature publication, methods to improve trial identification and the role of professional medical writers.

Role of professional medical writers in peer-reviewed publications

Please ensure that you follow the guidelines by the European Medical Writers Association on the role of medical writers.³ The guidelines emphasise the importance of respecting widely recognised authorship criteria, and in particular of ensuring that all people listed as named authors have full control of the content of papers. The role of professional medical writers must be transparent. Please name any professional medical writer among the list of contributors to any article for the journal (not only original research papers), and specify in the acknowledgments and statement of competing interests for the article who paid the writer. Writers and authors must have access to relevant data while writing papers. Medical writers have professional responsibilities to ensure that the papers they write are scientifically valid and are written in accordance with generally accepted ethical standards.³

DISCLOSURE AND COMPETING INTERESTS STATEMENTS

Authors are required to disclose financial interests in any company or institution that might benefit from their publication. A competing interest exists when a primary interest (such as patients' welfare or the validity of research) might be influenced by a secondary interest (such as financial gain or personal rivalry). It may arise for the authors of the journal article when they have a financial interest that may influence their interpretation of their results or those of others. Financial interests are the easiest to define and they have the greatest potential to influence the objectivity,

integrity or perceived value of a publication. They may include any or all, but are not limited to, the following:

- **Personal financial interests:** Stocks or shares in companies that may gain or lose financially through publication; consultant fees or fees from speakers bureaus other forms of remuneration from organisations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication;
- **Funding:** Research support from organisations that might gain or lose financially through publication of the paper;
- **Employment:** Recent, present or anticipated employment of you or a family member by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper. Any such competing interest that authors may have should be declared. The aim of the statement is not to eradicate competing interests, as they are almost inevitable. Papers will not be rejected because there is a competing interest, but a declaration on whether or not there are competing interests will be added to the paper;
- **Patent rights;**
- **Consultancy work.**

At the time of **submission**, all authors must complete the Conflict of Interest form available in the 'Instructions and Forms' section of the journal's [ScholarOne Manuscripts website](#) and ensure that it reaches the journal's [Editorial Office](#).

All sources of funding must be disclosed in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript. Attribution of these funding sources is preferred.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB);
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD);
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

For papers where there are no competing interests, all authors must include the statement 'Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.'

We will also ask reviewers to provide a statement of competing interests.

SERIOUS RESEARCH MISCONDUCT

Very rarely, the Editors may have cause to suspect serious research misconduct, based on comments received or his/her own review of a paper. In this case, the article in question will be held in abeyance until this matter is resolved. The Editors will contact authors and any appropriate third party to ascertain whether the grounds for investigation are justified. If serious research misconduct is discovered, the Editors will contact the authors' institutions after rejecting the paper. Despite vigorous peer-review, it is possible that a paper that is fraudulent in some manner may be published. If this is discovered, it will be retracted and appropriate steps will be taken to notify readers of the journal, and the authors' institution. Retractions will include the word 'Retraction' in the title, so that they are identified as such on indexing systems, for example, PubMed. In any case of serious research misconduct, all authors of such an article may be banned from

future publication in the journal.

Plagiarism and falsification

The journal carefully scrutinises all papers for evidence of plagiarism and falsified data using specialised software. Plagiarism can comprise the following:

- Multiple submission (i.e. to several journals at the same time);
- Redundant publication (i.e. when the same data are published repeatedly, especially when articles contain an unacceptable degree of overlap but some original data, or in the case of the first time data are published (followed by subsequent redundant publications));
- Self-plagiarism;
- Reviewer misconduct (e.g. a reviewer making use of material obtained during review);
- Changes to authorship after publication due to discovery of guest or ghost authors;
- Deliberate omission of funding or competing interest information.

Manipulation of images

The journal follows [the guidelines and procedures](#) established by the Council of Science Editors for digital imaging data. Please note the following in particular:

- No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced;
- Adjustments of brightness, contrast, or colour balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original;
- The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g., dividing lines) and in the text of the figure legend;
- Images will be examined for any indication of improper modifications. The final acceptance of all manuscripts is contingent on any concerns raised in our review of the figures being resolved.

Responding to institutions and research integrity bodies (eg the ORI)

Where the US Office of Research Integrity (ORI), and other research integrity bodies, request that the Journals publishes a correction or retraction resulting from scientific misconduct cases, the Editors will consider this request carefully. If the retraction is accepted by the Editor, the usual procedure for Retractions will be followed (see above).

Expressions of Concern

The journal publishes Expressions of Concern if the Editor has well-founded suspicions of misconduct, where they feel that it is sufficiently serious to warrant warning potential readers. The title of the Expression of Concern will include the words 'Expression of Concern'. Expressions of Concern are published on numbered pages (print and electronic) and are listed in the journal's table of contents. They will cite the original article and be linked to it, so that indexing and abstracting services are able to identify and link to both the Expression of Concern and the original paper. Reasons for the Expression of Concern are clearly stated.

HONEST ERRORS – PUBLICATION OF CORRECTIONS

The journal has a duty to publish corrections (Errata) when errors could affect the interpretation of data or information, whatever the cause of the error (i.e. arising from author or publisher errors). It is important to set the scientific record straight. The title of the Erratum will include the words 'Erratum'. Errata are published on a numbered page (print and electronic) and are listed in the journal's table of contents. They will cite the original article and be linked to it, so that indexing and abstracting services are able to identify and link to both the erratum and the original paper. Reasons for retraction are clearly stated.

APPEALS

Decisions on manuscripts or on ethical misconduct are regarded as final; however, we recognise the right of an individual to challenge our decisions and seek an appeal. For appeals on ethical issues or on manuscript decisions, contact the Editor-in-Chief, Professor Terry Jones, who will be given full access to the submitted materials and all correspondence, and will conduct an inquiry independent of the Editors and Editorial Board and render a final binding decision.

HANDLING EDITORS' CONFLICTS OF INTEREST AND PUBLICATIONS BY THE EDITORS OR EDITORIAL BOARD

Editors or Editorial Board members are never involved in editorial decisions about their own work. Journal editors, Editorial Board members and other editorial staff (including peer reviewers) withdraw from discussions about submissions where any circumstances might prevent him/her offering unbiased editorial decisions. When making editorial decisions about peer reviewed articles where an editor is an author or is acknowledged as a contributor, affected editors or staff members exclude themselves and are not involved in the publication decision. When editors are presented with papers where their own interests may impair their ability to make an unbiased editorial decision, he/she deputises decisions about the paper to a suitably qualified individual. Editors and members of the Editorial Board disclose their competing interests on an annual basis.

EDITORS' DUTY OF CONFIDENTIALITY TO AUTHORS

The Editors of the journal treat all submitted manuscripts as confidential documents, which means they will not divulge information about a manuscript to anyone without the authors' permission. During the process of manuscript review, the following people may also have access to manuscripts:

- Editors and editorial staff of the journal;
- External reviewers, including statisticians and experts in trial methods;
- Third parties (the only occasion when details about a manuscript might be passed to a third party without the authors' permission if there is reason to suggest serious research misconduct—see above);
- Third parties invited to write an Editorial Commentary on a paper.

REFERENCES

1. Graf C, Wagner E, Bowman A, Fiack S, Scott-Lichter D, Robinson A. Best Practice Guidelines

on Publication Ethics: a Publisher's Perspective. *Int J Clin Pract* 2007; 61(Suppl. 152): 1–26.

2. <http://resources.bmj.com/bmj/authors/editorial-policies>.

3. Jacobs A, Wager E. European Medical Writers Association (EMWA) guidelines on the role of medical writers in developing peer-reviewed publications. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 317–321.

Copyright Information

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign.

The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html>

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html> and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#>

Any authors wishing to send their paper for OnlineOpen will be required to submit a completed Copyright Transfer Agreement Form and complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen. All OnlineOpen articles go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Accepted Articles

This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online soon after acceptance, prior to copyediting or typesetting. *Clinical Otolaryngology* gives Accepted Articles status to Reviews, Original Articles and Our Experience correspondence. Accepted Articles appear in PDF-only format, without the accompanying full-text HTML. Each manuscript is assigned a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Manuscript Submission

Clinical Otolaryngology receives all manuscript submissions electronically. To submit a manuscript launch your web browser (Internet Explorer 5 or higher or Netscape 7 or higher) and go to the JOURNAL'S ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) homepage (<http://mc.manuscriptcentral.com/coa>).

A Conflict of Interest Form should be uploaded with your manuscript.

If you have any problems with your submission, please contact the editorial office.

Preparation of manuscripts

a. Titles should be brief and include the type of study. See CONSORT guidelines at <http://www.consort-statement.org> and STROBE guidelines at <http://www.strobe-statement.org>.

b. A short title should be provided.

c. The style of writing should conform to acceptable English usage and syntax. Spellings should be taken from the Concise Oxford Dictionary of Current English. Authors are advised to use the terminology recommended by the ISO–IEC, Nomina Anatomica as used in the latest edition of Gray's Anatomy and WHO list of approved names for drugs.

d. Illustrations. The artwork should be submitted in electronic form. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in encapsulated Postscript format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in tagged image file format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

No artwork should be incorporated into text files. Individual figure files should bear a reference number corresponding to a similar number in the text. References to figures should be by arabic numerals (e.g. Figure 3) and they should be numbered in order of appearance. The most suitable place for the figures to be inserted in the text should be indicated. A list of legends for the figures should be submitted on a separate page. In the full-text online version of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Tables should be typed on a separate page and should be given arabic numbers (e.g. Table 3). The approximate position in the text should be indicated. Units should appear in parentheses in the column headings and not in the body of the table. Words or numerals should be repeated on successive lines; 'ditto' or 'do' should not be used.

e. References in the text must be numbered with superscript in the order of appearance and should be listed on a separate sheet (doublespaced) at the end of the paper. In the bibliography references should be quoted as shown.

1. Wright A., Hawkins C.H., Änggård E.E. et al. (2009) A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin. Otolaryngol.* 34, 349–357.

2. National Institute for Clinical Excellence (2008). Surgical management of otitis media with effusion in children; available at: <http://guidance.nice.org.uk/CG60>

The responsibility of checking references rests with the author.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting.

f. The name, address, telephone and fax numbers and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be sent must be provided.

g. Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

h. Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication.

Proofs

Proofs will be sent via e-mail to the corresponding author as an Acrobat PDF* (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof.

Proof corrections should be returned to the Author Corrections Team (bpccorrections@sps.co.in) within 3 days of receipt.

EarlyView (Publication Prior to Print)

Clinical Otolaryngology is covered by Wiley's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Categories of contributions and their requirements

Original Articles

- Reports of randomised controlled trials should conform to the CONSORT guidelines for the international reporting of such trials. See <http://www.consort-statement.org>
- Epidemiology studies [case controlled, cohort, cross sectional] should conform to the STROBE guidelines. See <http://www.strobe-statement.org>
- Titles should include the study design (e.g. prospective case-controlled study)
- Structured abstract of no more than 250 words with the following headings: Objectives; Design; Setting; Participants; Main outcome measures; Results; Conclusions. Only abbreviations that are in the [list of acceptable abbreviations](#) are permitted in the Abstract.
- Text 2500 words maximum. In the text limit the number of abbreviations of medical/scientific terminology aiming for no more than 2 such abbreviations. Define the abbreviation (term in full followed by the abbreviation in parentheses) on the first mention in the text; thereafter, use the abbreviation only.
- Method section broken down under a series of subheadings covering the aspects detailed in the CONSORT and STROBE guidelines.
- Method section must include at the beginning an 'Ethical considerations' section detailing what ethical considerations were made or undergone prior to commencing the study.
- Results with missing data can be a considerable source of bias if it exceeds 20%. If this is the case then serious efforts have to be made to show that such bias is unlikely to exist.
- Results with audiometric outcome data must be reported using the American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology (AAOO) Committee on hearing and Equilibrium 'Guidelines for the evaluation of results of treatment of conductive hearing loss' (Otolaryngol. Head Neck Surg. 1995; 113, 186-187). This may be modified by the use of 4 kHz rather than 3 kHz. Data to include the reporting of air-bone gaps in 10 dB bins.
- Discussion section must be structured with subheadings such as: Synopsis of key/new findings; Strengths of the study; Comparisons with other studies; Clinical applicability of the study.
- Six tables/figures maximum.
- Appendices and additional figures or tables, that will not be in the print edition but will be in the online edition can be submitted. Such material must be submitted with the rest of the article and

identified with a prefix S, for example Table S1 or Figure S1

(see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>).

- 25 references maximum
- Conflicts of Interest section must declare conflicts of any of the authors or statement 'None declared'.

Reviews

- Appropriate where the intention is to update a topic where recent, quality evidence is available, or where scientific knowledge is rapidly advancing.
- Prior consultation with the editor of a proposed review is recommended via the [Editorial Office](#).
- It is essential for the review to have a clearly defined question.

- Structured abstract of no more than 400 words with the following headings: Background; Objective of review; Type of review; Search strategy; Evaluation method; Results; Conclusions.
- Up to five succinct key points in addition to the structured abstract.
- Abbreviations, other than those in our [list of acceptable abbreviations](#), are not permitted in the abstract or key points.
- In the text limit the number of abbreviations of medical/scientific terminology aiming for no more than 2 such abbreviations. Define the abbreviation (term in full followed by the abbreviation in parentheses) on the first mention in the text; thereafter, use the abbreviation only.
- Method section including reviewed source of literature. If electronic search (e.g. Medline) performed, word/s used and time period of search stated. Methods of review and outcomes of identified literature stated.
- Text for reviews should not normally exceed 2,500 words. Some flexibility on word count may be offered, but all reviews must adhere to the same structural requirements.
- Discussion section should be structured with subheadings such as: Summary of main results; Overall completeness and applicability of evidence; Quality of evidence; Potential biases in review; Comparison with other reviews; Implications for clinical practice; Implications for research.
- Six tables/figures maximum.
- Supplementary tables/figures can be submitted as detailed in the Original articles section above.
- Audiometric outcomes must be reported as detailed in the Original articles section above.
- 'Conflicts of Interest' section declaring conflicts of any of the authors or statement 'None declared'.

Correspondence

There are two types of correspondence:

Our Experience

For contributions reporting audit, uncontrolled case series, scientific methods, questionnaire studies, educational and management issues.

- Such contributions must materially add to rather than repeat the existing literature.
- Titles should include the number of participants (e.g. twenty-two children)
- No abbreviations apart from those on our [list of acceptable abbreviations](#).
- Five succinct key points (and no abstract).

- Text 1500 words maximum.
- Methods section should have a separate Ethical considerations section at the beginning.
- Discussion should be structured as detailed in the Original articles section above.
- Four figures/tables maximum.
- Audiometric data should be reported as detailed in the Original articles section above.
- Ten references maximum.
- ‘Conflicts of Interest’ section declaring conflicts of any of the authors or statement ‘None declared’.

Technical Notes

For contributions reporting technical descriptions which do not report on measures outcomes. Such contributions must materially add to rather than repeat the existing literature.

- Three succinct points (and no abstract).
- Should contain: Introduction, Technical Description, Discussion.
- Text 1000 words maximum.
- Two figures/tables maximum.
- Six references maximum.
- No abbreviations apart from those on our [list](#).

Letters to the Editor

Priority given to letters that discuss previous articles.

- Text 400 words maximum.
- One table/figure maximum.
- Five references maximum.
- No abbreviations apart from those on our [list](#).
- Ensure that your correspondence article includes the following information: title of correspondence article; list of author names; author affiliation details; and correspondence author details, in particular e-mail address.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.