

MÁRCIO NAKANISHI

**Polipose nasal: caracterização da infiltração dos
eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células
TGF-beta positivas em indivíduos com e sem asma**

Tese apresentada ao Departamento de
Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ossamu Butugan

**SÃO PAULO
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nakanishi, Márcio

Polipose nasal : caracterização da infiltração dos eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF-*beta* positivas em indivíduos com e sem asma /
Márcio Nakanishi. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Ossamu Butugan.

Descritores: 1.POLIPOS NASAIS/imunologia 2.INFLAMAÇÃO/ fisiopatologia
3.EOSINÓFILOS/imunologia 4.MASTÓCITOS/imunologia 5.FATOR DE
CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA/ imunologia
6.IMUNOHISTOQUÍMICA/métodos 7.ASMA/fisiopatologia

USP/FM/SBD-075/05

Dedico esta tese à Patrícia, minha querida e amada esposa, que sempre esteve ao meu lado dedicando amor, incentivo e compreensão.

A os meus pais Riyozo e Hemiko, pelo exemplo de amor, sabedoria e dedicação.

À querida e amada avó Sumino (*in memoriam*) minha eterna gratidão por todos os ensinamentos, orientação e proteção.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aroldo Miniti, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP pelas valiosas contribuições à especialidade.

Ao Prof. Dr. Ossamu Butugan, nosso orientador, grande exemplo de professor e otorrinolaringologista, que de forma incansável, está sempre presente para ensinar e orientar.

Ao Prof. Dr. Richard Louis Voegels, grande entusiasta da Rinologia, que além de professor, sempre se mostrou um amigo, apoiando, confiando e incentivando.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, pelo exemplo com que coordena e orienta a pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Domingos H. Tsuji, que sempre se mostrou disponível, e que me apoiou, orientou, incentivou e mostrou os caminhos a serem seguidos.

Ao Prof. Dr. Domingos H. Tsuji, Prof. Dr. Luis Ubirajara Sennes, Prof. Dr. Richard Louis Voegels, Dr. Olavo Mion, e Dr. Rui Imamura, membros da banca examinadora no exame de qualificação, pelas observações e orientações sobre nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Moriyama, exemplo de liderança, pelo apoio, orientação e pela oportunidade de desenvolver o trabalho no laboratório de pesquisa, e mais importante, pelo privilégio de aprender na *Jikei University School of Medicine*.

Ao Prof. Dr. Shinichi Haruna e ao Prof. Dr. Nobuyoshi Otori, por orientar e ensinar tanto durante as cirurgias como nas reuniões no laboratório de pesquisa.

À Hiromi Katsuyama pelo auxílio na confecção das lâminas.

Ao Dr. Victor Nakajima, a quem devo gratidão e respeito, por ensinar e orientar não apenas os caminhos da Rinologia, como também pelo exemplo de trabalho e dedicação. Meu agradecimento especial pela apresentação e recomendação à *Jikei University School of Medicine*.

Ao Prof. Dr. Jair Cortez Montovani, pelo apoio, incentivo e ensinamento durante a formação na residência.

À Marileide, Luci, Márcia e Bárbara, pela solicitude e apoio na secretaria.

Ao amigo Renato Bartholomeu Sobrinho pelo apoio irrestrito durante todos os momentos e pela minuciosa revisão ortográfica da tese.

À Dra. Siomara Bampirra de Oliveira, pelo acolhimento, apoio, e revisão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mikiya Muramatsu, querido tio e padrinho, pelo exemplo de vida, de professor e de pesquisador.

Ao Prof Dr. Pedro Tauil e Dr. Shintaro Chiba, pela orientação na realização da análise estatística.

Aos colegas Elder Y. Goto, Fabrizio R. Romano, Maura C. das Neves, Francine G. Pádua, pelo incentivo e amizade.

Aos amigos João Aragão Ximenes Filho e Norimar Hernades Dias e respectivas esposas pelos anos de amizade e carinho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para elaboração desta tese.

Agradeço em especial:

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro durante a elaboração desse trabalho.

À JICA – *Japan International Cooperation Agency*, pelo apoio financeiro durante o período de estadia no Japão.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Normas da revista	
Artigo	
Lista de abreviaturas e siglas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1 Polipose nasal e asma	06
2.2 Polipose nasal e intolerância ao ácido acetil salicílico	09
2.3 Histopatologia	11
2.3.1 Eosinófilos	11
2.3.2 Mastócitos.....	13
2.3.3 Miofibroblastos e TGF- β	16
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
3.1 Casuística	20
3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão	21
3.1.2 Grupo controle.....	21
3.2 Métodos	20
3.2.1 Diagnóstico de asma	22
3.2.2 Coleta do pólipo.....	23
3.2.3 Coleta de mucosa etmoidal do grupo controle.....	24
3.2.4 Método imunoistoquímico.....	26
3.2.4.1 Preparo para a coloração.....	27
3.2.4.2 Método de coloração imunoenzimática	28
3.2.4.3 Montagem das lâminas	30
3.2.5 Análise dos resultados.....	30
3.2.6 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Idade e sexo.....	35
4.2 Asma e intolerância ao ácido acetil salicílico	38
4.3 Imunoistoquímica	39
5 DISCUSSÃO.....	46
5.1 Idade	47
5.2 Sexo	50
5.3 Intolerância ao ácido acetil salicílico	51
5.4 Imunoistoquímica	52
5.4.1 Eosinófilos	54
5.4.2 Mastócitos.....	57
5.4.3 Miofibroblastos e células TGF- β positivas	60
5.4.4 Correlação da contagem celular com a presença de asma.....	62
5.5 Considerações finais.....	65

6	CONCLUSÕES.....	66
7	ANEXOS.....	68
8	REFERÊNCIAS.....	75

Guidelines for Authors
AMERICAN JOURNAL OF RHINOLOGY

95 PITMAN STREET
PROVIDENCE, RI 02906
(401)331-2510
FAX (401)331-5138

Coeditors-in-Chief

David W. Kennedy, M.D.
(Otorhinolaryngology)
Department of Otorhinolaryngology,
Head and Neck Surgery
University of Pennsylvania Medical Center
5 Silverstein, 3400 Spruce Street
Philadelphia, PA 19104

Philip Fireman, M.D.
(Allergy/Immunology)
Department of Pediatrics
Children's Hospital of Pittsburgh
One Children's Place
3705 Fifth Avenue at DeSoto
Pittsburgh, PA 15213

Authors: Title page, Subtitle (if any),
First name, middle initial, last name of each author (with highest academic degrees),
Name of Departments and Institutions to which work should be attributed;
Disclaimers (if any); and Acknowledgment of Financial Support.

Manuscript: Submit original copy and two duplicates along with a diskette containing the manuscript.
Please label the diskette with the software version that was used to create it.
Typed, double spaced (including references, legends, footnotes), unspecified length
Originals only of all tables, figures, and illustrations. Glossy photos, slides, electronic/digital figures and original pen and ink drawings are acceptable. Copies are not acceptable.
Include date of presentation at scientific meeting
Author's telephone number, FAX number, and e-mail address
References in the text should be superscript numbers in order of appearance
References with more than three authors should be presented as the first three authors followed by et al

Abstract: Beginning in 2002, the American Journal of Rhinology will require structured abstracts. The information in each abstract should be divided into Background, Methods, Results, and Conclusions. Please do not exceed 150 words.

Copyright: ALL MANUSCRIPTS MUST BE ACCOMPANIED BY THE FOLLOWING WRITTEN STATEMENT, SIGNED BY EACH AUTHOR: "*The undersigned author(s) transfer all copyright ownership including electronic of the manuscript (title of article) to OceanSide Publications, Inc in the event the work is published. The undersigned warrant(s) that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, and has not been previously published. I sign for and accept responsibility for releasing this material on behalf of any and all coauthors.*"
Items are accepted for publication on the understanding that they are contributed solely to *American Journal of Rhinology* and have not been or will not be published elsewhere in any format except in abstract form. Authors may use the following link to download the Copyright Release form: [AJR Publishing Forms](#)

Conflict of Interest: The American Journal of Rhinology requires all authors to acknowledge, on the title page of their manuscript, all funding sources that supported their work as well as all institutional or corporate affiliations of the authors. Authors are also required to disclose to the Editor, in a covering letter at the time of submission of their manuscript, any commercial associations that might pose a conflict of interest. These include consultant arrangements, stock or other equity ownership, patent licensing arrangements, or payments for conducting or publicizing the study. The disclosure will be held in strict confidence during the review process and will not influence any editorial decisions. However, if the paper is accepted for publication, the Editor will determine how any conflict of interest should be disclosed. Authors may use the following link to download the Conflict of Interest form to be signed by all authors: [AJR Publishing Forms](#)

References: About 10-20 per article; please follow format, e.g.:

1. Meltzer EO. Intranasal anticholinergic therapy of rhinorrhea. *J Allergy Clin Immunol* 90:1055-1064, 1992.
2. Benson S, Olnes S, Phil A, et al. On the mechanism of protein synthesis inhibition by abrin and ricin. *Eur J Biochem* 59:573-588, 1975.
3. Swift DL, and Proctor DF. Access of air to the respiratory tract. In *Respiratory Defense Mechanisms*. Brain JD, Proctor DF, and Reid LM (Eds). New York: Marcel Dekker, 21-40, 1977.

Nasal polyposis: characterization of eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells in individuals with and without asthma

Authors: Marcio Nakanishi, M.D.,* Shinichi Haruna, M.D.**, Nobuyoshi Otori, M.D.,*** Osamu Butugan, M.D.,**** and Hiroshi Moriyama, M.D.*****

* E.N.T. Department, University of Sao Paulo Hospital, Sao Paulo, Brazil. Fellow in the Department of Otolaryngology, The Jikei University School of Medicine.

** Assistant Professor of Otolaryngology, Department of Otolaryngology, The Jikei University School of Medicine.

*** Senior Staff Member, Department of Otolaryngology, The Jikei University School of Medicine.

**** Associate Professor of Otolaryngology, E.N.T. Department, University of Sao Paulo Hospital, Sao Paulo, Brazil.

***** Professor of Otolaryngology, Chairman of the Department of Otolaryngology, The Jikei University School of Medicine.

From the Department of Otolaryngology, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

Address correspondence to Marcio Nakanishi, SHIS QI 17 conjunto 01 casa 05, cep 71645-010, Brasilia-DF, Brazil. Phone number: 55 61 4356446, fax: 55 61 3646004.

E-mail: marcionakanishi@unb.br

Abstract

Introduction: Nasal polyposis is a chronic inflammatory disease of the nasal mucosa or paranasal sinuses characterized by the formation of benign polyps. The pathogenesis is not known, although nasal polyps are associated with several systemic diseases, with asthma being the most frequent. The aim of the present study was to identify, quantify, compare and correlate eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells in nasal polyps of patients with and without asthma. **Material and Methods:** Seventy-eight subjects with nasal polyps undergoing endoscopic sinus surgery were selected. Control specimens were obtained from eight subjects with a normal sinus mucosa. One group consisted of polyps from 56 patients with asthma and the other of polyps from 22 patients without asthma. Immunohistochemistry was performed using monoclonal antibodies against eosinophil cationic protein to stain eosinophils, against tryptase to stain mast cells, against alpha-smooth muscle actin to stain myofibroblasts, and against TGF- β to stain TGF- β -positive cells. **Results:** The number of eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells was significantly higher in the asthma group than in the non-asthma group, whereas no significant difference in the number of mast cells was observed between the two groups. The number of eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells was significantly higher in nasal polyps than in the control group. Myofibroblasts showed a significant correlation with eosinophils, mast cells, TGF- β -positive cells, and asthma. **Conclusion:** Eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells were identified in all nasal polyps, although the number of eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells was higher in the asthma group. The number of mast cells was similar regardless of the presence or absence of asthma. Myofibroblasts were a common denominator in the correlation between eosinophils, mast cells, TGF- β -positive cells, and asthma.

Key Words: Nasal polyps, eosinophils, mast cells, TGF- β , immunohistochemistry, asthma.

INTRODUCTION

Nasal polyposis (NP) is a multifactorial chronic inflammatory disease of the nasal mucosa and paranasal sinuses, characterized by the formation of benign polyps that almost always originate from the region of the middle meatus and can extend throughout the nasal cavity. The physiopathogenesis of NP is still not defined and its main symptoms include nasal obstruction, hyposmia and headache¹. The estimated prevalence of NP in the general population ranges from 1 to 4%, although an increased prevalence has been observed in certain groups such as asthmatic patients and patients with salicylate intolerance, cystic fibrosis and ciliary dyskinesia².

Among all systemic diseases associated with NP asthma is the most common. The prevalence of NP in asthmatic patients ranges from 6.7 to 13%, whereas the prevalence of asthma in individuals with NP ranges from 18 to 45%. According to the meta-analysis of Larsen³, 29.9% of patients with NP have asthma.

As for NP, the pathogenesis of asthma is still unknown. However, both diseases commonly show an increase in chemical mediators and inflammatory cells such as eosinophils and mast cells, a fact characterizing chronic inflammation¹. Another cell type found in the pulmonary tissue of asthmatic patients and also in NP are myofibroblasts⁴, which are differentiated fibroblasts characterized by a high expression of α -smooth muscle actin. Myofibroblasts are related to the process of airway remodeling and are responsible for the production and exaggerated deposition of collagen and extracellular matrix in the lamina propria, a finding suggesting their involvement in the growth of nasal polyps. Several studies have shown that transforming growth factor beta (TGF- β) plays an important role in the stimulation and differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, in addition to inducing the synthesis of type I collagen by these cells⁵⁻⁷. Although Wang et al.⁵ suggested that the accumulation of myofibroblasts might be involved in the formation of nasal polyps, no specific studies regarding the behavior and distribution of these cells in asthmatic patients with NP are available.

Since the presence of asthma in NP is associated with a higher recurrence of polyps^{8,9}, the possibility has been raised about the presence of a quantitative difference in the inflammatory cell infiltrate between polyps of patients with and

without asthma. Therefore, the objectives of the present study were 1) to identify eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells in nasal polyps by immunohistochemistry, 2) to quantify these positive cells in patients with and without asthma, and 3) to compare and correlate eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells in patients with and without asthma.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

Seventy-eight patients with NP submitted to endoscopic sinus surgery at the Jikei University School of Medicine Hospital, Tokyo, Japan, were prospectively studied between June 1999 and December 2001. Fifty-five (70.5%) patients were males and 23 (29.5%) were females, with a mean age of 48 ± 12.2 years.

The diagnosis of NP was based on a clinical history of nasal obstruction accompanied by anterior rhinorrhea and/or retronasal discharge and partial or complete loss of the sense of smell, as well as on otorhinolaryngologic examination of the nasal cavity (anterior rhinoscopy and examination with a rigid endoscope of 4 mm and 0 degree) showing bilateral polyps of a pale, slightly pink or grayish aspect originating from the region of the middle meatus. All patients were submitted to computed tomography of the paranasal sinuses which confirmed the bilaterality of the disease.

Only patients with a diagnosis of bilateral nasal polyps associated or not with asthma who underwent surgical treatment were included in the study. Excluded were patients with unilateral polyps, antrochoanal, sphenchoanal and ethmoidchoanal polyps, and polyps associated with cystic fibrosis, ciliary dyskinesia and tumors such as inverted papilloma or carcinomas.

The control group consisted of eight patients with pituitary adenoma who were submitted to surgical treatment through the transethmoidal-sphenoidal route. None of the patients had nasosinusal complaints. Examination of the nasal fossa with a rigid endoscope was normal. Computed tomography of the paranasal sinuses showed no signs of opacification or thickening of the nasosinusal mucosa. This group included six females and two males with a mean age of 39.3 years.

The study was approved by the Ethics Committee of the hospital of The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan, and by the Ethics Committee for the Analysis of Research Projects (CAPPesq) of the Clinical Board of the University Hospital, School of Medicine, University of São Paulo (protocol No. 794/03).

Diagnosis of asthma

All patients were submitted to medical-clinical evaluation for the definition of the presence or absence of asthma according to the criteria of the Japanese Society of Allergology (1 – clinical history: recurring dyspnea attacks, chest constriction, wheezing, nocturnal wakening, coughing, and a present history of dyspnea and/or wheezing upon physical examination; 2 – pulmonary function test: spirometry showing an FEV₁ <80% reversible by at least 12% after salbutamol or a positive methacholine test using a provocation dose of 1200 µg or less). In the group of asthmatic patients, 15 subjects with a clinical history of acetylsalicylic acid (ASA) intolerance (bronchospasm crises or dyspnea after ingestion of ASA) were identified.

The 78 patients were divided into two groups according to the presence or absence of asthma. The asthmatic group consisted of 56 patients and the non-asthmatic group of 22 patients.

All patients were treated with diverse medications such as antibiotics, antihistamines and corticosteroids which were withdrawn at least 4 weeks before surgery. In 20 of the 56 patients with asthma, the pneumologist prescribed systemic or inhaled corticosteroids one day before surgery.

Collection of nasal polyps

Fragments of the nasal polyps measuring approximately 1 to 2 cm in diameter were collected from the region of the middle meatus at the beginning of the surgical procedure, with 2 to 4 fragments being obtained for each patient. These fragments were immediately fixed in 10% neutral formalin in phosphate-buffered saline, pH 7.2, for 24 hours. The specimens were then cut into serial 3-µm thick sections, and 10 slides were prepared for each sample, 2 slides for each antibody (a total of 4 antibodies), one slide for the negative control reaction and one slide for hematoxylin-eosin staining.

Collection of ethmoidal mucosa from the control group

Ethmoidal mucosa was obtained from control patients during transethmoidal-sphenoidal surgery for access to the pituitary. Mucosal fragments measuring approximately 0.5 cm in diameter were collected from the region of the middle meatus at the beginning of the surgical procedure using a Grünwald cutting forceps. Two to four fragments of ethmoidal mucosa were obtained from each patient.

Immunohistochemistry

Antigens were determined in nasal polyps and ethmoidal mucosa using mouse monoclonal primary antibodies. The following specific primary antibodies were used: anti-EG2 (Kabi Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden), human mast cell anti-tryptase (Dako, clone AA1, Glostrup, Denmark), anti-SMA (Dako, clone 1A4), and anti-TGF- β (RD Systems, clone 1D11, Minneapolis, MN, USA). The antibodies were diluted 1:25 (anti-EG2), 1:50 (anti-tryptase and anti-SMA) and 1:10 (anti-TGF- β) in buffered 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2-7.6, containing 1% bovine serum albumin. Immunohistochemical staining was performed using the avidine-biotin enzymatic complex (Dako LSAB 2 kit, HRP, Carpinteria, CA, USA). For the negative control the primary antibody was omitted. The ethmoidal mucosa of the control group was used as control for staining of nasal polyps.

Data analysis

Positive cells (eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β cells) were detected by a red staining resulting from the reaction of the streptavidin-biotin-peroxidase complex with 3-amino-9-ethylcarbazole. All cells labeled with the anti-EG2, anti-tryptase and anti-TGF- β antibodies were considered to be positive. In the case of the anti-SMA antibody, only labeled cells observed in the connective tissue of polyps and ethmoidal mucosa were considered to be positive, i.e., myofibroblasts, whereas red cells grouped around blood vessels and glands were defined as negative (Fig. 1).

Immunohistochemically labeled cells were counted by an examiner who was unaware of the patient's diagnosis. Two slides were stained for each antibody. Cells

were counted under a 10 x 10 mm eyepiece grid of a Nikon Microphot-FXA light microscope (Tokyo, Japan) at 200x magnification, which corresponded to one field (Fig. 2). Ten fields per slide were analyzed, which were oriented along the basement membrane of the epithelium. The fields were chosen randomly, with a minimum area of 1 mm² being required for analysis. The number of positive cells was counted in each field with a manual cell counter and the results are expressed as the mean number of positive cells per field.

The results were compared and correlated according to age, gender, presence or absence of asthma, and intolerance to ASA.

Statistical analysis

Parametric and nonparametric tests were used for statistical analysis according to the nature and distribution of the data. A p value <0.05 was considered to be significant. The data were analyzed statistically using the SPSS 11.0 for Windows program (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Age and gender

The age of the patients ranged from 14 to 80 years, with a mean \pm standard deviation of 48 ± 12.2 years. Regarding gender, considering all cases studied, there was a prevalence of NP among males, but with no significant difference between asthmatic and non-asthmatic patients. Separate analysis of the groups showed a male/female ratio of 1.9 in the asthmatic group and of 4.5 in the non-asthmatic group. The distribution of age and gender in the asthmatic and non-asthmatic groups is shown in Table I.

Comparison of the male/female ratio showed a lower proportion in the group with intolerance to ASA and a higher proportion in the non-asthmatic group (Table II).

Immunohistochemistry

The numbers of positive cells (eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β cells) detected by immunohistochemistry are shown in Table III and Fig. 3. The mean number of eosinophils (Fig. 4), myofibroblasts and TGF- β -positive cells was higher in the asthmatic group than in non-asthmatic patients, whereas no significant difference in the mean number of mast cells (Fig. 5) was observed between the two groups. A significant difference was observed for all groups compared to the control group.

The number of mast cells, eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells in the asthmatic group and the group with intolerance to ASA is shown in Table IV.

Analysis of the correlation between the number of mast cells, eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells and the presence or absence of asthma by Spearman's correlation test is shown in Table V. The highest correlation was observed between eosinophils and TGF- β -positive cells.

DISCUSSION

The clinical-epidemiologic association between NP and asthma and the histologic, cellular and molecular similarities between the two diseases suggest the involvement of a common inflammatory process, which might be maintained and amplified by interrelated mechanisms.

Age and gender

The age of the patients ranged from 14 to 80 years, with a mean (\pm standard deviation) of 48 ± 12.2 years. Similar results have been reported by Rugina et al.¹⁰ for 224 patients with NP whose age ranged from 14 to 73 years (mean of 46 years).

Fifty-five (70.5%) of the 78 patients studied were males, in agreement with the literature which reports a predominance of males^{3,10,11}.

In the meta-analysis of Larsen³, the male/female proportion was also higher in groups with a lower prevalence of asthma. The prevalence of asthma was about 21% in male patients with NP, in contrast to a prevalence of 37% in female patients, i.e., the prevalence of asthma was almost two-fold higher in female patients with NP. According to the author, women with NP show a higher tendency to develop asthma than men.

Intolerance to acetylsalicylic acid

Individuals with ASA intolerance and NP show similar characteristics, i.e., both present serum eosinophilia, the frequency of both conditions increases with age, neither condition is measurable by IgE, and both are related to non-allergic asthma².

In the present series, 19.2% (15/78) of the patients with NP manifested ASA intolerance. This findings agrees with literature data showing a percentage of individuals with NP and ASA intolerance ranging from 3 to 35%^{3,9,10}.

Despite the lack of statistical significance, a lower male/female proportion was observed for individuals with NP and ASA intolerance when compared to the asthma and non-asthma groups (Table III and Fig. 3). A similar finding has been reported by Larsen³ who observed a higher predominance of females and more severe NP among patients with ASA intolerance.

Immunohistochemistry

The inflammatory process present in the nasosinusal mucosa is believed to be the central factor in the physiopathogenesis of NP. The inflammatory cellular infiltrate observed in nasal polyps is closely similar to that found in the lower airway mucosa of asthmatic patients, a fact suggesting the involvement of similar physiopathogenic mechanisms in asthma and NP^{11,12}.

In addition to the similar cellular infiltrate, epidemiologic studies have shown a strong association between NP and asthma, and the observation of increased severity and recurrence during the postoperative period in patients with NP and asthma^{10,11,13-15} suggests that the inflammatory cell infiltrate in NP is more intense when the disease is associated with asthma.

Eosinophils

In the present study, immunohistochemical analysis showed no qualitative difference in eosinophils between asthmatic and non-asthmatic patients, with eosinophils being detected in all nasal polyps studied. The same result was also reported by Larsen and Tos¹⁰ who detected eosinophils in practically all nasal polyps. However, quantitatively, the number of eosinophils in nasal polyps was higher in individuals with asthma than in those without asthma. Based on the body of evidence

suggesting a similar physiopathogenesis for NP and asthma¹⁵⁻¹⁸, the presence of asthma results in a larger number of eosinophils in nasal polyps.

No significant difference in the number of eosinophils was observed between asthmatic patients tolerant or not to ASA (Table IV). This finding agrees with Park et al.¹⁷ who demonstrated abundant eosinophils in nasal polyps of patients with ASA intolerance, but the difference was not significant when compared to a control group.

Ponikau et al.¹⁸ showed that the histopathologic characteristics of asthma such as an eosinophilic infiltrate and airway remodeling are also present in chronic rhinosinusitis and NP. These findings suggest the coexistence of both diseases with involvement of the same pathologic process.

Comparison of the present results with histologic studies analyzing asthmatic pulmonary tissue shows that the characteristic findings of asthma are qualitatively similar in the mild, moderate and severe forms.¹⁹ Regarding the quantification of eosinophils, evidence indicates that the number of eosinophils in pulmonary tissue and bronchial secretion is higher in the more severe forms^{20,24}.

The fact that the association of asthma with NP results in a more severe form of the latter and that more severe forms are related to a larger number of eosinophils explains the present observation of a larger number of eosinophils in nasal polyps associated with asthma than in those not associated with asthma.

Mast cells

No significant difference in the number of mast cells in nasal polyps was observed between asthmatic and non-asthmatic patients, with a mean number of cells per field of 13.33 ± 5.70 and 12.37 ± 4.77 , respectively. Similarly, Park et al.¹⁷ did not find a significant difference in the number of mast cells between nasal polyps from individuals with ASA intolerance, allergic and non-allergic subjects, and suggested that mast cells might be responsible for the inflammatory response of nasal polyps, irrespective of the association with ASA intolerance.

Discordant data regarding the number of mast cells in nasal polyps of asthmatic and non-asthmatic individuals have been reported in the literature. In the present study, tryptase-positive mast cells were detected in the lamina propria of all polyps, with a

larger number of mast cells being observed in nasal polyps from asthmatic and non-asthmatic patients compared to the control group. Similar findings have been reported by Rhuno et al.²¹, i.e., the number of mast cells is higher in nasal polyps than in the normal nasal mucosa irrespective of the presence or absence of asthma.

Controversies also exist regarding pulmonary tissue, but most literature data show a larger number of mast cells in pulmonary tissue of asthmatic patients compared to non-asthmatic subjects. Due to their similar histopathologic characteristics, it would be expected that nasal polyps of asthmatic individuals would show a larger number of mast cells than those of non-asthmatic subjects.

Brightling et al.²² demonstrated that the localization of mast cells around the bronchial smooth musculature is associated with the airway obstruction observed in asthma. The study calls attention to the importance of the localization of mast cells close to the smooth musculature in the physiopathogenesis of asthma. Similarly, Kawabori et al.²³ and Finotto et al.²⁴ emphasized the importance of the localization of mast cells in nasal polyp tissue and suggested the existence of functional heterogeneity according to localization. On the basis of these studies, mast cells from patients with NP and asthma may show increased cellular activity and distinct microlocalizations compared to mast cells isolated from nasal polyp tissue not associated with asthma. This hypothesis might explain the similar number of mast cells observed in the two groups studied and the greater severity and increased recurrence rate observed for asthma-associated NP, i.e., although quantitatively similar, the activity and localization of mast cells may differ, a fact causing distinct clinical manifestations.

Myofibroblasts and TGF- β -positive cells

Both myofibroblasts and TGF- β -positive cells were found to be increased in the nasal polyps of patients with asthma compared to non-asthmatic individuals and controls.

Wang et al.⁴ showed that myofibroblasts were increased in nasal polyps and were rare in the normal nasal mucosa. The present study also demonstrated an increased number of myofibroblasts in nasal polyps compared to normal mucosa.

We did not find any specific studies in the literature regarding the quantification of myofibroblasts in asthma-associated NP. However, the fact that NP shares histologic, cellular and molecular characteristics with asthma permits us to

assume that studies analyzing myofibroblasts in the pulmonary tissue of asthmatic patients may contribute to the comparison and analysis of the present results.

Several studies analyzing the pulmonary tissue of asthmatic patients have described an increase in the number of myofibroblasts and their intimate relationship with the presence of TGF- β . Gizycki et al.²⁵ observed a significantly increased number of myofibroblasts in the bronchial mucosa of asthmatic patients compared to non-asthmatic subjects. Vignola et al.⁶ demonstrated the synthesis of TGF- β by eosinophils and myofibroblasts present in the bronchial mucosa of asthmatic patients. Hashimoto et al.²⁶ observed that TGF- β 1 is able to induce the phenotypic modulation of fibroblasts into myofibroblasts, and Morishima et al.²⁷ demonstrated that TGF- β induces the formation of myofibroblasts which in turn synthesize collagen.

The association between NP and asthma was characterized by an increase in the number of myofibroblasts and TGF- β -positive cells when compared to NP not associated with asthma. Comparison of this result with the fact that myofibroblasts are responsible for the production of collagen, extracellular matrix and airway remodeling in asthma suggests that the larger number of myofibroblasts in nasal polyps of asthmatic patients is involved in the formation, severity and higher recurrence rate of NP.

Correlation between cell number and presence of asthma

Correlation of mast cells, eosinophils, myofibroblasts, TGF- β - positive cells and the presence of asthma (Table V) showed that myofibroblasts were the only variable correlated with all other variables (Spearman rank correlation).

The correlation between myofibroblasts and the presence of asthma, eosinophils and TGF- β - positive cells was expected because of the similar pathogenesis of NP and asthma and because of the larger number of all of these cells in the asthmatic group. This correlation suggests that the presence of asthma is related to an increase in eosinophils, one of the main sources of TGF- β which stimulates the phenotypic transformation of fibroblasts into myofibroblasts, thus increasing the number of the latter in nasal polyps.

On the other hand, mast cells were the only variable that showed no correlation with the presence of asthma, eosinophils or TGF- β -positive cells. An interesting finding was the correlation between mast cells and myofibroblasts,

indicating a possible interaction between these two cell types. This may provide the starting point for future studies based on the interactions between mast cells and asthmatic airway smooth muscle cells.

Asthma and eosinophilic bronchitis are characterized by a similar inflammatory infiltrate. Although eosinophilic inflammation is the main characteristic of asthma, the presence of eosinophils does not seem to be related to airway dysfunction. As demonstrated by Gibson et al.²⁸ and Brightling et al.²⁹, patients with eosinophilic bronchitis present no airway obstruction and show the same degree of airway eosinophilia as patients with asthma. According to Brightling et al.²⁹, the only immunopathologic difference between asthma and eosinophilic bronchitis is the presence of mast cells permeating the smooth musculature of the bronchial mucosa of asthmatic patients, whereas no mast cells are found close to the smooth musculature in patients with eosinophilic bronchitis or normal controls.

This finding provides new insights into the role of mast cells in asthma, suggesting that airway dysfunction in asthma results from “smooth muscle myositis” caused by mast cells. Thus, one may speculate that the interaction between mast cells and smooth muscle cells is a key element in the pathogenesis of asthma²⁹. Comparison of these data with the present results suggests that the correlation between mast cells and myofibroblasts observed for NP reflects cell interactions that involve mechanisms similar to those underlying the “smooth muscle myositis” observed in the pulmonary tissue of asthmatic patients. By analogy to mast cells in asthma in which their microlocalization around bronchial smooth muscle cells plays a key role in the respiratory pathophysiology that provokes bronchoconstriction²⁹, in NP mast cells located deep in the stroma^{23,24} induce eosinophilic inflammation either directly through the release of various inflammatory mediators^{1,30}, or indirectly through the activation of structural cells (fibroblasts and myofibroblasts), and thus contribute to the formation and progression of nasal polyps. In other words, according to their microlocalization, mast cells provoke the following main reaction: in the asthmatic lung mast cells predominate in the bronchial smooth musculature and their activation and degranulation are related to bronchoconstriction, whereas in NP mast cells predominate in the deep portion of the mucosa (a site with fibroblasts and myofibroblasts) and their activation is related to edema formation and the development of polyps.

Final considerations

Analysis of the results showed that eosinophilic inflammation was a common denominator in NP and asthma. However, although eosinophils were detected in all polyps, not all patients with NP had asthma.

The association with asthma was responsible for the larger number of eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells in nasal polyps compared to nasal polyps not associated with asthma. However, regarding the number of mast cells the association between NP and asthma represented no differentiation factor.

The presence of asthma was correlated with eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells, but not with the number of mast cells. A correlation between mast cells and myofibroblasts was observed irrespective of the presence of asthma.

Myofibroblasts were the common denominator in the correlation between eosinophils, mast cells, TGF- β -positive cells and the presence of asthma. This fact suggests that myofibroblasts, which act as structural and inflammatory cells, play an important role in the physiopathogenesis and cellular interaction of the inflammatory infiltrate found in NP.

CONCLUSIONS

The number of eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells was increased in nasal polyps from asthmatic patients compared to those of non-asthmatic subjects, whereas the number of mast cells was similar in all nasal polyps irrespective of the presence or absence of asthma.

Eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells were correlated with the presence of asthma. No correlation was observed between mast cells and the presence of asthma, eosinophils or TGF- β -positive cells.

Myofibroblasts were a common denominator in the correlation between eosinophils, mast cells, TGF- β -positive cells and the presence of asthma.

REFERENCES

1. Pawankar R. Nasal polyposis: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2003;3:1-6.
2. Settipane GA, Lund VJ, Berstein JM, Tos M. Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment. 1st ed. Rhode Island: Oceanside Publications, 1997.
3. Larsen K. The clinical relationship of nasal polyps to asthma. *Allergy Asthma Proc*. 1996;17: 243-249.
4. Wang QP, Escudier E, Roudot-Thoraval F, Samad IAAS, Peyegre R, Coste A. Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor β is involved in the pathogenesis of nasal polyps. *Laryngoscope*. 1997; 107:926-931.
5. Ohno I, Lea RG, Flanders KC, Clark DA, Banwatt D, Dolovich J. Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor b1 gene. *J Clin Invest*. 1992; 89:1662-1668.
6. Vignola AM, Chanez P, Chiappara GI. Transforming growth factor β . Expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:591-599.
7. Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF- β 1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res*. 2003;282(2):90-100.
8. Braun JJ, Haas F, Conraux C. Polyposis of the nasal sinuses. Epidemiology and clinical aspects of 350 cases. Treatment and follow-up over 5 years on 93 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*. 1992;109:189-199.
9. Wynn R, Har-El G. Recurrence rates after endoscopic sinus surgery for massive sinus polyposis. *Laryngoscope*. 2004, 114:811-813.
10. Voegels RL, Santoro P, Butugan O, et al. Nasal polyposis and allergy: Is there a correlation? *Am J Rhinol* 15:9-14, 2001.
11. Lamblin C, Gosset P, Salez F, Vandezande LM, Perez T, Darras J, et al. Eosinophilic airway inflammation in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104: 85-92.

12. Gaga M, Lambrou P, Papageorgiou N, Koulouris NG, Kosmas E, Fragakis S. Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:663-669.
13. Kennedy DW. Prognostic factors, outcomes and staging in ethmoid sinus surgery. *Laryngoscope*. 1992;102 (57):1-18.
14. Larsen K, Tos, M. A long-term follow-up study of nasal polyp patients after simple polypectomies. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997;254:85-88.
15. Jordana M, Dolovich J. Eosinophils in nasal polyps. In: Settipane GA, Lund VJ, Bernstein JM, Tos M, eds. *Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment*. Jordana M, Dolovich J. Eosinophils in nasal polyps. In: Settipane GA, Lund VJ, Bernstein JM, Tos M, eds. *Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment*. Providence, Rhode Island: Oceanside publication, 1997; 49-56.
16. Ten Brinke A, Grootendorst DC, Schmidt JT, De Bruine FT, Van Buchem MA, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Chronic sinusitis in severe asthma is related to sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(4):621-626.
17. Park H, Nahm D, Park K. Immunohistochemical characterization of cellular infiltrate in nasal polyp from aspirin-sensitive asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998;81:219-224.
18. Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Gaffey TA, Tarara JE, Kita H. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: is the histopathology similar to asthma? *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:877-882.
19. Boushey HA, Corry DB, Fahy JV. *Asthma*. In: Murray JF, Nadel JA, Mason RJ, Boushey HA. *Textbook of respiratory medicine*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000; 1255-1270.
20. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990;323(15):1033-1039.

21. Rhuno J, Howie K, Anderson B, Vanzielegem M, Hitch D, Laap P, Denburg J, Dolovich J. The increased number of epithelial mast cells in nasal polyps and adjacent turbinates is not allergy-dependent. *Allergy*. 1990;45:370-374.
22. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002; 346:1699-1705.
23. Kawabori S, Denburg JA, Schwartz LB, Irani AA, Wong D, Jordana G, Evans S, Dolovich J. Histochemical and immunohistochemical characteristics of mast cells in nasal polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6:37-43.
24. Finotto S, Dolovich J, Denburg JA, Jordana M, Marshall JS. Functional heterogeneity of mast cells isolated from different microenvironments within nasal polyp tissue. *Clin Exp Immunol*. 1994;95(2):343-350.
25. Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV. Myofibroblast Involvement in the Allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16:664-673.
26. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T. transforming growth factor induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblasts through a cJun-NH-terminal Kinase-Dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:152-157
27. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelia shedding. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 24:1-11.
28. Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale EH, Hargreave FE. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet*. 1989;1:1346-1348.
29. Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:550-556.
30. Di Lorenzo G, Drago A, Pellitteri ME, Candore G, Colombo A, Gervasi F, Pacor ML, D'Ambrosio FP, Caruso C. Measurement of inflammatory mediators of mast cells and eosinophils in native nasal lavage fluid in nasal polyposis. *Int Arch of Allergy & Immunol*. 2001;125(Suppl2):164-175.

TABLE I
Distribution of Age and Gender in Asthmatic and Non-Asthmatic Patients

	Asthmatics (n = 56)	Non-asthmatics (n = 22)
Age (years)*	46.7 ± 11.1	51.2 ± 14.5
Gender [#]		
Male	37 (66.1%)	18 (81.8%)
Female	19 (33.9%)	4 (18.2%)

Age is reported as mean and standard deviation.

*Student t-test: There was no significant difference ($p > 0.05$) between the asthmatic and non-asthmatic groups.

[#]Chi-square test: There was no significant difference ($p > 0.05$) between the asthmatic and non-asthmatic groups.

TABLE II
Distribution of Gender and the Male/Female Ratio in Patients with ASA
Intolerance, Asthmatic and Non-Asthmatic Patients

	ASA intolerance	Asthmatics	Non-asthmatics
Male	9	28	18
Female	6	13	4
Male/female ratio	1.5	2.1	4.5

Chi-square test: There was no significant difference ($p > 0.05$) between groups.

TABLE III
Distribution of the Number of Mast Cells, Eosinophils, Myofibroblasts and TGF- β -Positive Cells in the Asthmatic, Non-Asthmatic and Control Groups

	Asthmatics (<i>n</i> = 56)	Non-asthmatics (<i>n</i> = 22)	Control (<i>n</i> = 8)
Mast cells	13,33 \pm 5.7	12.37 \pm 4.7	5.82 * \pm 1.9
Eosinophils	55.27* \pm 34.7	21.70* \pm 27.9	1.46 * \pm 3.0
Myofibroblasts	24.74* \pm 13.7	13.11* \pm 7.8	4.07* \pm 1.5
TGF- β -positive cells	37.83* \pm 29.5	13.60* \pm 10.3	2.13* \pm 1.8

Data are reported as mean \pm standard deviation.

*Statistically significant ($p < 0.05$, ANOVA).

TABLE IV

Distribution of the Number of Mast Cells, Eosinophils, Myofibroblasts and TGF- β -Positive Cells in Asthmatic Patients with and without ASA Intolerance

	Without ASA intolerance (<i>n</i> = 41)	With ASA intolerance (<i>n</i> = 15)
Mast cells	14.8* \pm 5.7	9.1* \pm 2.5
Eosinophils	51.7 \pm 32.1	61.2 \pm 42.8
Myofibroblasts	28.3* \pm 11.4	15.5* \pm 15.3
TGF- β -positive cells	38.7 \pm 32.6	35.4 \pm 19.2

Data are reported as mean \pm standard deviation.

*Statistically significant ($p < 0.05$, Mann-Whitney test).

TABLE V
Spearman Correlation between Mast Cells, Eosinophils, Myofibroblasts, TGF- β -Positive Cells and the Presence or Absence of Asthma

	Mast cells	Eosinophils	Myofibroblasts	TGF- β -positive cells	Presence of asthma
Mast cells	$r = 1.0$				
Eosinophils	$r = -.039$ $p = 0.37$	$r = 1.0$			
Myofibroblasts	$r = 0.397 *$ $p < 0.001$	$r = 0.442 *$ $p < 0.001$	$r = 1.0$		
TGF- β -positive cells	$r = 0.078$ $p = 0.253$	$r = 0.656 *$ $p < 0.001$	$r = 0.507 *$ $p < 0.001$	$r = 1.0$	
Presence of asthma	$r = 0.063$ $p = 0.294$	$r = 0.535 *$ $p < 0.001$	$r = 0.417 *$ $p < 0.001$	$r = 0.504 *$ $p < 0.001$	$r = 1.0$

r = correlation coefficient.

*Statistically significant ($p < 0.05$, Spearman correlation).

Figure legends

Figure 1. Typical myofibroblast observed in the lamina propria of a nasal polyp (black arrow). Red cells grouped around blood vessels and glands were considered to be negative (white arrow) (light microscopy, magnification x400).

Figure 2. Immunohistochemical reaction showing cells positively stained for eosinophil cationic protein and the field used for eosinophil counting (light microscopy, magnification x200).

Figure 3. Distribution of the mean number of mast cells (A), eosinophils (B), myofibroblasts (C) and TGF- β -positive cells (D) in the asthmatic, non-asthmatic and control groups.

Mast cells/field

Figure 4. Distribution of eosinophils (eosinophil cationic protein) in the nasal polyps of patients with (A) and without asthma (B) (light microscopy, magnification x400).

Figure 5. Distribution of mast cells (tryptase) in the nasal polyps of patients with (A) and without asthma (B) (light microscopy, magnification x200).

Figure 1

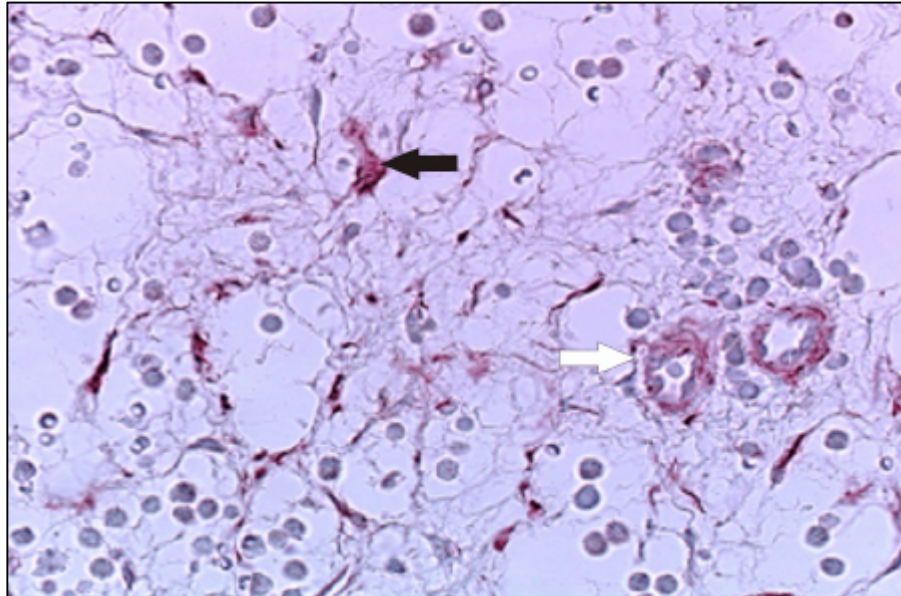


Figure 2

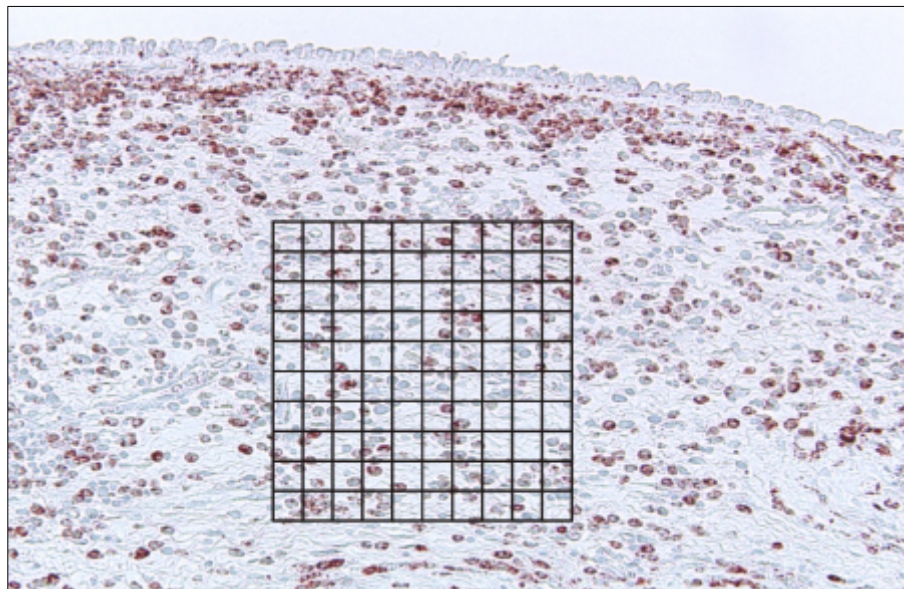


Figure 3

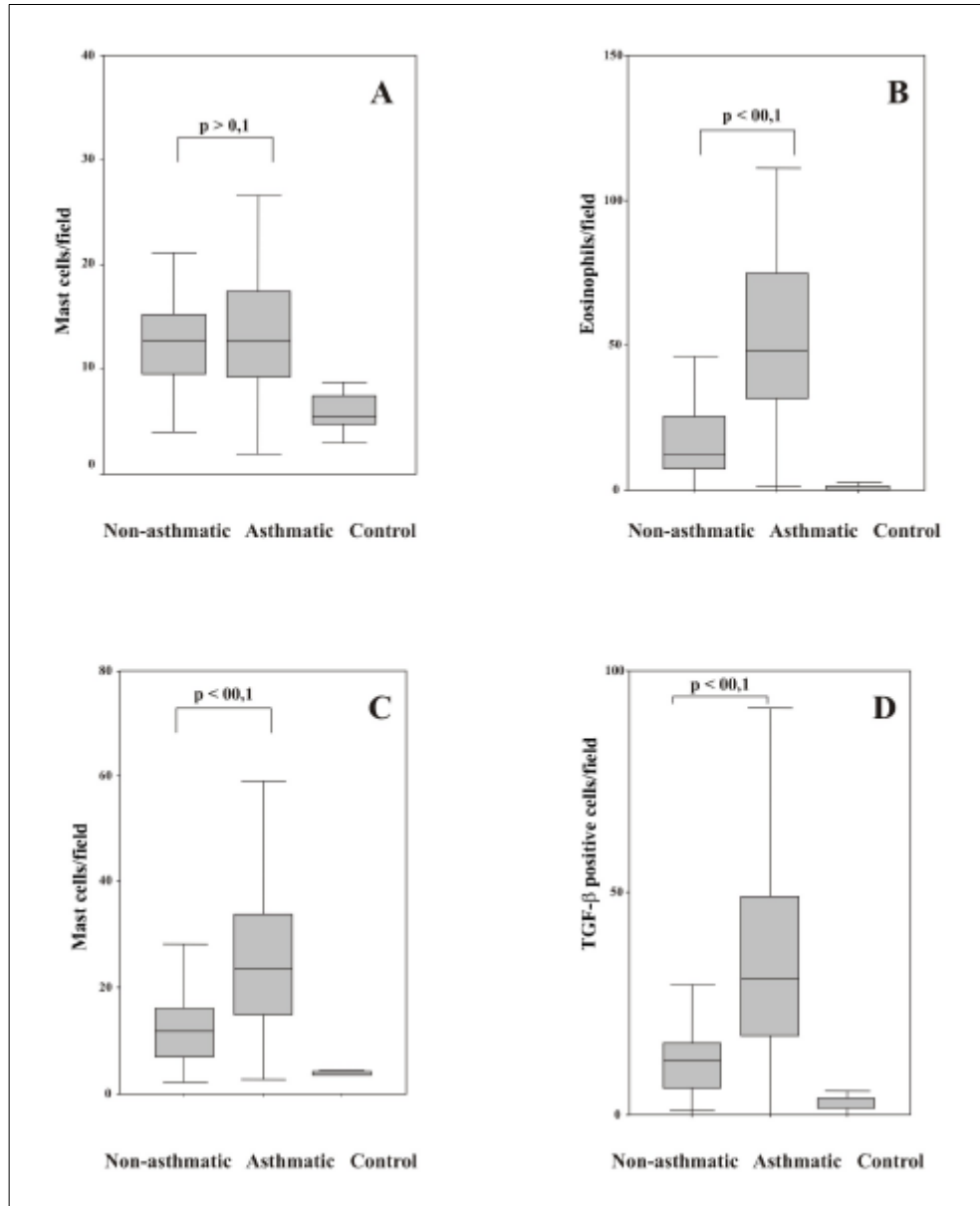


Figure 4

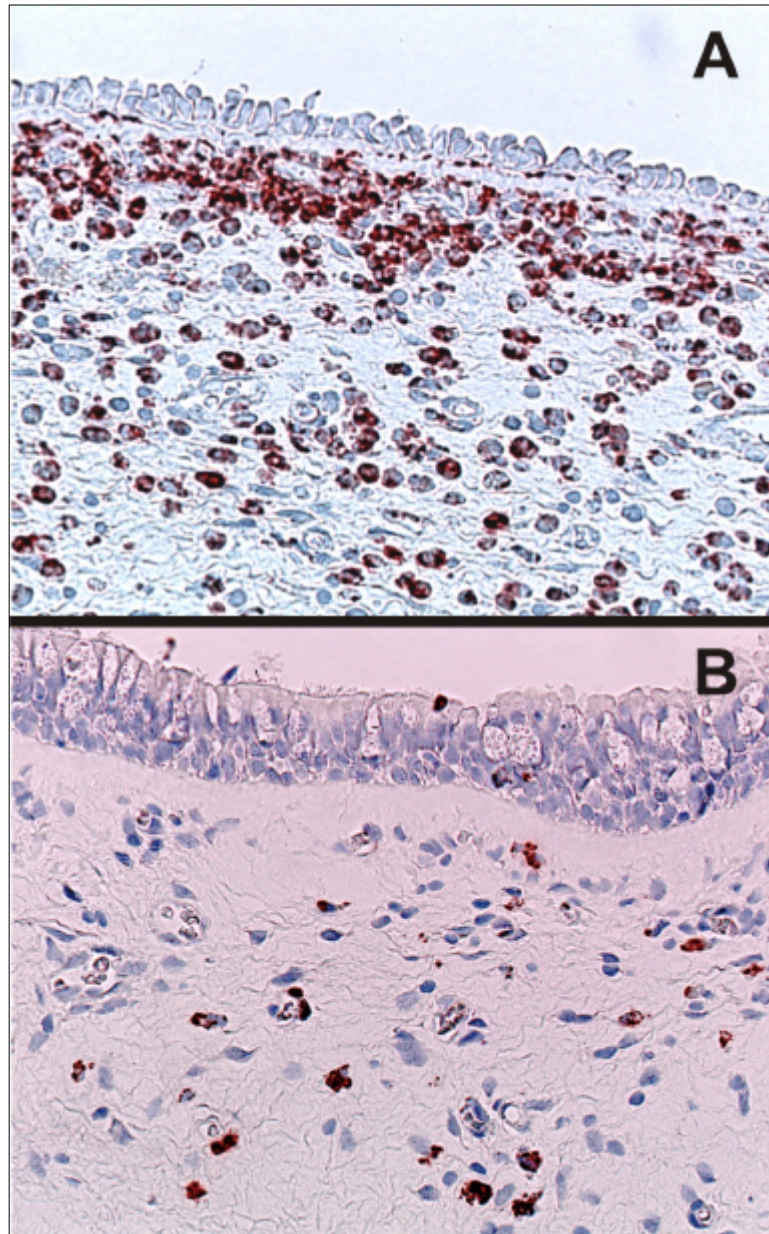
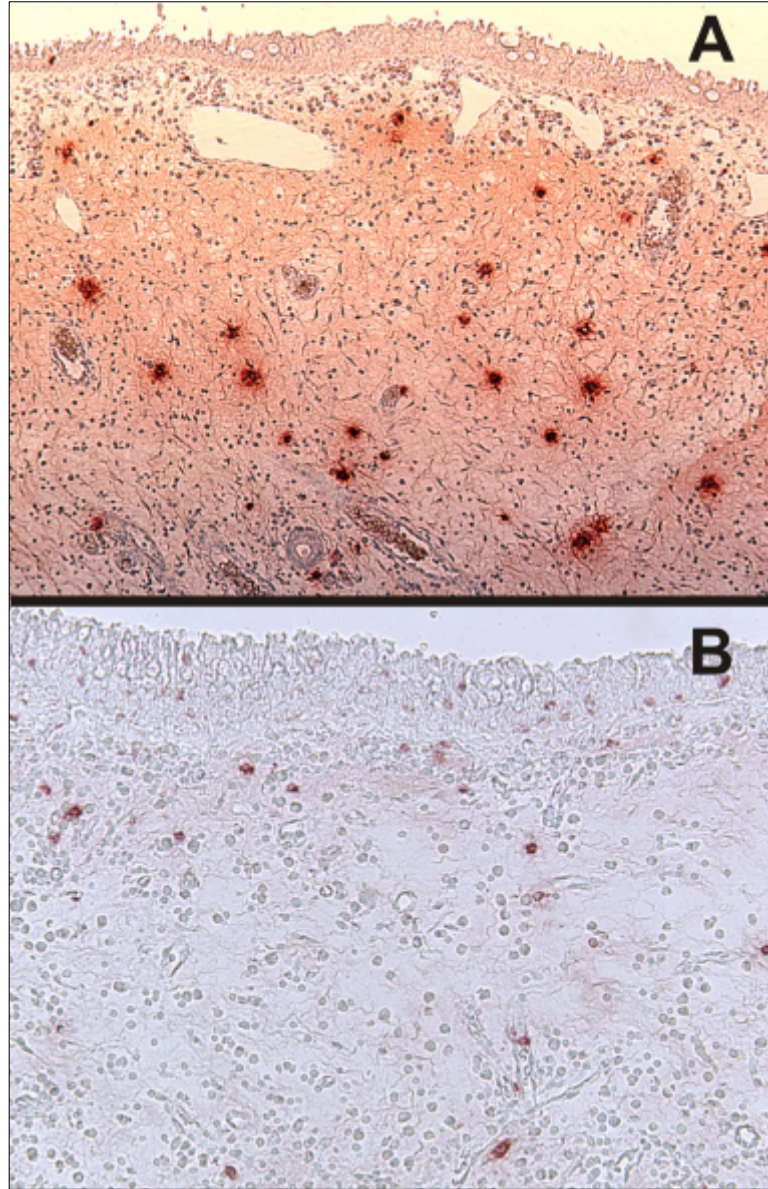


Figure 5



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
AA1	anticorpo monoclonal de rato anti-triptase humana
AAS	ácido acetil salicílico
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cm	centímetros
EG2	anticorpo monoclonal anti-proteína catiônica eosinofílica
FEV ₁	volume expiratório forçado no primeiro segundo
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
IgE	imunoglobulina E
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
M	molar
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
mm ³	milímetro cúbico
PBS	<i>phosphate buffered solution</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PN	polipose nasal
RANTES	<i>regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
TGF-β	fator de transformação de crescimento beta
TNF-α	<i>tumor necrosis factor alfa</i>
Tris-HCl	<i>aminomethane hydrochloride</i>

RESUMO

Nakanishi M. *Polipose nasal: caracterização da infiltração dos eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF-beta positivas em indivíduos com e sem asma* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 95p.

Introdução: A polipose nasal é uma doença inflamatória crônica da mucosa nasal e seios paranasais com formação de pólipos benignos. Apresenta fisiopatogenia ainda não definida e dentre todas as doenças sistêmicas relacionadas à polipose nasal, a asma é a associação mais comum. Os objetivos desse estudo foram identificar, quantificar e correlacionar os eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF-beta positivas nos pólipos nasais de pacientes com e sem asma. **Casuística e Métodos:** foram estudados prospectivamente 78 pacientes portadores de PN submetidos à cirurgia endoscópica nasossinusal, além de oito pacientes que constituíram o grupo controle. O grupo de asmáticos constituiu-se de 56 pacientes e o grupo de não asmáticos de 22 pacientes. Foi realizado a imunohistoquímica no pólipo nasal, utilizando anticorpos monoclonais contra proteína catiônica eosinofílica, para identificar eosinófilos, contra triptase para identificar mastócitos, contra actina alfa de músculo liso para identificar miofibroblastos e contra o fator de transformação de crescimento beta para identificação das células positivas para essa citocina. **Resultados:** Os eosinófilos, miofibroblastos e células TGF-beta positivas, apresentaram número significativamente maior no grupo dos asmáticos em comparação com os não-asmáticos, enquanto que o número de mastócitos não apresentou diferença estatística entre os grupos. Em relação ao grupo controle, houve diferença significativa em todos os grupos. O miofibroblasto foi a única variável que esteve correlacionada com todas as outras variáveis (eosinófilos, mastócitos, células TGF-beta positivas e presença de asma). **Conclusões:** Em todos os pólipos nasais identificou-se eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF-beta positivas, porém a quantidade de eosinófilos, miofibroblastos e células TGF-beta positivas esteve aumentada no pólipo nasal de indivíduos asmáticos em relação ao pólipo nasal de indivíduos não asmáticos. O número de mastócitos mostrou-se semelhante em todos os pólipos nasais, independente da presença ou não de asma. O miofibroblasto foi o denominador comum na correlação entre eosinófilos, mastócitos, células TGF-beta positivas e presença de asma.

Descritores: Pólipos nasais, Inflamação, eosinófilos, amastócitos, fator de crescimento transformador beta, imunohistoquímica, asma.

SUMMARY

Nakanishi M. *Nasal polyposis: characterization of eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF-beta positive cells in asthmatic and non-asthmatic patients*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005. 95p.

Introduction: Nasal polyposis is a chronic inflammatory disease of the nasal mucosa or paranasal sinuses characterized by the formation of benign polyps. The pathogenesis is not known, although nasal polyps are associated with several systemic diseases, with asthma being the most frequent. The aim of the present study was to identify, quantify, compare and correlate eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells in nasal polyps of patients with and without asthma. **Material and Methods:** Seventy-eight subjects with nasal polyps undergoing endoscopic sinus surgery were selected. Control specimens were obtained from eight subjects with a normal sinus mucosa. One group consisted of polyps from 56 patients with asthma and the other of polyps from 22 patients without asthma. Immunohistochemistry was performed using monoclonal antibodies against eosinophil cationic protein to stain eosinophils, against tryptase to stain mast cells, against alpha-smooth muscle actin to stain myofibroblasts, and against TGF- β to stain TGF- β -positive cells. **Results:** The number of eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells was significantly higher in the asthma group than in the non-asthma group, whereas no significant difference in the number of mast cells was observed between the two groups. The number of eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells was significantly higher in nasal polyps than in the control group. Myofibroblasts showed a significant correlation with eosinophils, mast cells, TGF- β -positive cells, and asthma. **Conclusion:** Eosinophils, mast cells, myofibroblasts and TGF- β -positive cells were identified in all nasal polyps, although the number of eosinophils, myofibroblasts and TGF- β -positive cells was higher in the asthma group. The number of mast cells was similar regardless of the presence or absence of asthma. Myofibroblasts were a common denominator in the correlation between eosinophils, mast cells, TGF- β -positive cells, and asthma.

Keywords: Nasal polyps, inflammation, eosinophils, mast cells, TGF- β , immunohistochemistry, asthma

1 INTRODUÇÃO

A polipose nasal (PN) é uma doença inflamatória crônica da mucosa nasal e dos seios paranasais, de causa multifatorial, com formação de pólipos benignos, que quase sempre se originam na região do meato médio, podendo se estender para toda a cavidade nasal. Apresenta fisiopatogenia ainda não definida e os sintomas principais são: obstrução nasal, hiposmia e cefaléia (Pawankar, 2003).

A prevalência estimada da polipose nasal na população geral varia de 1 a 4%, porém, em determinados grupos de pacientes como os asmáticos, pacientes com intolerância aos salicilatos, com fibrose cística e discinesia ciliar, observa-se aumento da sua prevalência (Settipane *et al.*, 1997).

Dentre todas as doenças sistêmicas relacionadas à polipose nasal, a asma é a associação mais comum. A prevalência da PN em asmáticos varia de 6,7 a 13% (Settipane, 1987; Settipane, 1996) enquanto a prevalência da asma em indivíduos com polipose nasal varia de 18 a 45% (Schenck, 1974; Rugina *et al.*, 2002). Segundo o estudo de meta-análise realizado por Larsen (1996), 29,9% dos pacientes com polipose nasal apresentaram asma.

Assim como na polipose nasal, a patogênese da asma ainda é desconhecida, no entanto, o que ambas as doenças apresentam em comum é o aumento de mediadores químicos e de células inflamatórias como

eosinófilos e mastócitos, o que caracteriza uma inflamação crônica (Pawankar, 2003).

Outra célula presente no tecido pulmonar de asmáticos e descrita também no pólipos nasal são os miofibroblastos (Wang *et al.*, 1997), que são fibroblastos diferenciados, caracterizados por alta expressão de atina e dos músculos lisos. Os miofibroblastos estão relacionados com o processo de remodelamento da via aérea e são um dos responsáveis pela produção e deposição exagerada de colágeno e matriz extracelular na lâmina própria, que sugere seu envolvimento no crescimento do pólipos nasal (Minshall *et al.*, 1997; Coste *et al.*, 1998). Muitos trabalhos (Ohno *et al.*, 1992; Vignola *et al.*, 1997; Hashimoto *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003) mostram que o fator β transformador de crescimento (TGF- β) desempenha um papel importante na estimulação e diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, além de induzir a síntese de colágeno tipo I por essas células.

Apesar de Wang *et al.* (1997) descrever que o acúmulo de miofibroblastos pode estar envolvido na formação do pólipos nasal, não há estudos específicos sobre o comportamento e distribuição dessas células em pacientes asmáticos com polipose nasal.

Visto que a presença da asma na polipose nasal determina maior recorrência dos pólipos (Braun *et al.*, 1992; Larsen e Tos, 1997, Wynn e Har-El, 2004), questiona-se sobre a possibilidade de existir diferença celular quantitativa no infiltrado de células inflamatórias entre pólipos de pacientes com e sem asma. Portanto, os objetivos desse estudo foram:

- identificar, por meio da imunohistoquímica, os eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF- β positivas nos pólipos nasais.
- quantificar essas células positivas nos pacientes com e sem asma.
- comparar e correlacionar eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF- β positivas nos pacientes com e sem asma.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polipose Nasal e Asma

Moloney (1977) em estudo retrospectivo de 445 pacientes com polipose nasal observa 95 (21%) com asma. A PN é duas vezes mais comum no sexo masculino, e no sexo feminino a prevalência de asma é o dobro da encontrada no sexo masculino.

Settipane e Chaffee (1977) estudam 6037 pacientes com asma e rinite alérgica e encontram 211 (4,2%) com pólipos nasais. Dos 211 pacientes 70% apresentam asma e 29,4%, rinite alérgica. No grupo dos asmáticos, 16% apresentam PN e no grupo com rinite alérgica 2,2% apresentam PN. A grande maioria dos pacientes com pólipos ocorre na faixa etária acima dos 40 anos, e na faixa etária abaixo dos 10 anos a ocorrência da PN é rara.

Maloney e Collins (1977) observam que indivíduos com PN apresentam chance de 25 a 30% de desenvolverem asma.

Estudos de Kaliner *et al.* (1973) mostram que pólipos nasais de indivíduos com rinite alérgica, quando estimulados com determinado antígeno, liberam histamina, leucotrienos, e fatores quimiotáticos de eosinófilos.

Downing (1982) e Miles-Lawrence (1982) demonstram que a hiperreatividade brônquica ao teste de provocação da metacolina nos indivíduos com PN é maior nos pacientes não-atópicos.

Slavin (1982) em estudo de 33 pacientes com doença sinusal e asma, encontra 30 (90%) com polipose nasal.

Braun *et al.* (1992) relatam o acompanhamento pós-operatório de 93 pacientes com PN por mais de cinco anos e observam que a intolerância ao ácido acetil salicílico determina pior prognóstico, com recidiva em aproximadamente 15% dos casos.

Larsen e Tos (1994) encontram em 180 pacientes com PN 38 (21%) com asma, sendo que 73% manifestaram o início da asma anteriormente ao surgimento do pólipso.

Larsen (1996), em estudo de meta-análise sobre asma e polipose nasal, observa nos pacientes asmáticos, uma incidência de 7 a 15% de polipose nasal, sendo a maior frequência no grupo etário acima dos 50 anos. Já nos pacientes com polipose nasal, a associação com a asma está presente em 29,9 a 70% dos casos. O sexo feminino com PN apresenta maior associação com a asma que o sexo masculino.

Settipane (1996) observa polipose nasal em 7% dos indivíduos asmáticos. A PN é estatisticamente mais comum na asma não-alérgica, quando comparada com a asma alérgica (13% e 5% respectivamente).

Larsen e Tos (1997) mostram em estudo de acompanhamento pós-operatório por um período de oito anos, que os pacientes com PN e asma (26%) apresentam um número maior de polipectomias (média de 2,4) quando comparado com os pacientes sem associação com a asma (média de 1,4). Os pacientes com PN e asma apresentam ainda sintomas mais severos. O maior número de polipectomias esteve presente no grupo com intolerância ao ácido acetil salicílico.

Hedman *et al.* (1999), na Finlândia, observam que a prevalência de asma na amostra de 4300 indivíduos é de 4,4%, enquanto que a prevalência da PN nessa mesma amostra é de 4,3%. Concluem que a presença de rinite alérgica, intolerância ao AAS e PN estão associados ao aumento do risco de desenvolver asma.

Grigoreas *et al.* (2002) investigam a prevalência da PN em pacientes com rinite crônica e asma. Em 3817 pacientes, 4,2% apresentam polipose nasal. No grupo específico de pacientes com asma não-alérgica, a prevalência da PN é de 13%.

Rugina *et al.* (2002) encontram em 224 pacientes com PN, 100 (45%) pacientes com asma. Os sintomas da asma ocorrem antes (43%), depois (21%) ou simultaneamente (30%) aos sintomas da PN. Apesar da PN ser mais prevalente no sexo masculino (63%), o sexo feminino apresenta sintomas mais severos e maior tendência de desenvolver asma.

Larsen e Tos (2002) estimam a incidência da PN, na população da Dinamarca, de 0,627 pacientes por 1000 habitantes/ano. A incidência, na faixa etária de 50 a 59 anos, atinge picos de 1,68 e 0,82 pacientes por 1000 habitantes/ano, no sexo masculino e feminino, respectivamente.

Johansson *et al.* (2003) encontram prevalência de 2,7% de polipose nasal sendo mais freqüente nos homens (2,2: 1) e na população acima de 60 anos e asmáticos.

2.2 Polipose Nasal e Intolerância ao Ácido Acetil Salicílico

Em 1922, Widal *et al.* descrevem o primeiro relato de associação da PN, asma e intolerância ao ácido acetil salicílico (AAS).

Samter e Beers (1967) estudam 1000 indivíduos com intolerância ao AAS e concluem que a associação da intolerância ao AAS, PN e asma constitui uma síndrome. Não há evidência de uma resposta alérgica, mas sim de uma doença inflamatória intrínseca ao trato respiratório.

Moloney (1977) examina 445 pacientes com PN e encontra 2% com asma e intolerância ao AAS, sendo que entre os asmáticos a intolerância ao AAS é de 10%.

Settipane *et al.* (1982) demonstram, através do teste de provocação, que 8% dos pacientes com PN desconhecem que são intolerantes ao AAS.

Jantti-Alanko *et al.* (1989) estudando a recorrência da PN após a polipectomia, observam que o risco de recorrência é maior no grupo com intolerância ao AAS. A asma está presente em 91% dos pacientes com intolerância ao AAS.

McFadden *et al.* (1990), em estudo retrospectivo de pacientes submetidos à sinusectomia devido à sinusite crônica, observam que a associação com a intolerância ao AAS determina rápida recorrência e progressão da PN.

Schaitkin *et al.* (1993) relatam os resultados da cirurgia endoscópica em 100 pacientes com história de doença naso-sinusal e observam que a presença de intolerância ao AAS está associada à falha do tratamento em aliviar os sintomas.

Larsen (1996) em estudo de meta-análise sobre asma e PN observa que 36 a 96% dos pacientes intolerantes ao AAS apresentam PN. Entre os pacientes com PN, 12,8% apresentam intolerância ao AAS. O resultado do tratamento mostra-se ruim nos indivíduos asmáticos e é ainda pior nos intolerantes ao AAS.

Jankowski *et al.* (1997) observam, na maioria dos pacientes com intolerância ao AAS, um crescimento difuso do pólipó nasal com necessidade de um procedimento cirúrgico mais radical.

Szczeklik *et al.* (2000) descrevem a história natural e as características clínicas de 500 pacientes com intolerância ao AAS, que ocorrem na seguinte seqüência: rinite persistente por volta dos 30 anos de idade, asma, intolerância ao AAS e, por fim polipose nasal.

Segundo Hosemann (2000), pacientes com PN, intolerância ao AAS e asma, representam cerca de 7% dos pacientes com sinusite crônica. Mais de 80% desses pacientes apresentam estágios avançados de polipose nasal.

Johansson *et al.* (2003) avaliando a amostra da população sueca de 1387 indivíduos, não encontram correlação dos sintomas subjetivos de intolerância ao AAS com a PN.

2.3 Histopatologia

2.3.1 Eosinófilos

Baugarten *et al.* (1980) descrevem eosinófilos e plasmócitos em todos os pólipos estudados em sua amostra de 15 pacientes e sugerem que a relação eosinófilo/plasmócito abaixo de cinco está relacionada com possível etiologia alérgica.

Kakoi e Hiraide (1987) classificam histologicamente os pólipos nasais em três tipos: 1) edematoso 2) glandular e 3) fibroso. Neste estudo, observam infiltração predominante de eosinófilos em 73% dos casos.

Krajina e Zirdum (1987) estudam 28 casos de pólipos nasais recorrentes e 48 casos de pólipos nasais não recorrentes e encontram infiltração eosinofílica de 74% e 44% respectivamente.

Harlin *et al.* (1988) relatam que a eosinofilia da mucosa nasal de pacientes com sinusite crônica está relacionada com a asma.

Jankowski *et al.* (1989), utilizando imunoistoquímica, observam número de eosinófilos dez vezes maior no pólipo nasal quando comparado com a mucosa normal. O número de mastócitos e plasmócitos não apresenta diferença entre os grupos.

Baroody *et al.* (1995) observam que a eosinofilia é uma característica histológica encontrada na sinusite crônica em crianças, especialmente naquelas com asma.

Hellquist, em 1996, classifica histologicamente o pólipo nasal em quatro tipos: 1) eosinofílico ou edematoso, 2) fibroinflamatório 3) hiperplasia de glândulas seromucinosas e 4) estroma atípico. O tipo eosinofílico ou

edematoso é encontrado em 86% dos 107 casos estudados e apresenta como característica principal a numerosa infiltração de eosinófilos no estroma.

Larsen e Tos (1997) analisam a histologia do pólipó nasal de 199 pacientes submetidos à polipectomia e observam eosinofilia em 97% dos casos.

Utilizando imunistoquímica, Park *et al.* (1998) encontram número aumentado de eosinófilos no pólipó nasal de indivíduos com asma e intolerância à aspirina, contudo, não observam diferença estatística quando comparado com o pólipó de indivíduos não asmáticos.

Lamblin *et al.* (1999) demonstram que pacientes com polipose nasal e hiperreatividade brônquica apresentam eosinofilia na mucosa brônquica semelhante à observada em pacientes com asma, enquanto que pacientes com polipose nasal sem hiperreatividade brônquica não apresentam eosinofilia na via aérea inferior.

Gaga *et al.* (2000) relatam na mucosa nasal de indivíduos asmáticos, maior número de eosinófilos quando comparado com a mucosa nasal de indivíduos sadios.

Ponikau *et al.* (2003) demonstram que achados histopatológicos da asma, como infiltrado eosinofílico e remodelamento, também estão presentes na rinosinusite crônica. Esses achados sugerem a coexistência de ambas as doenças com envolvimento do mesmo processo patológico.

2.3.2 Mastócitos

Takasaka *et al.* (1986), utilizando microscopia eletrônica e imunoistoquímica no pólipó nasal, encontram migração e aderência dos neutrófilos na lâmina basal e degranulação acelerada dos mastócitos. A degranulação dos mastócitos é mais acentuada no pólipó associado à intolerância ao AAS quando comparado com a sinusite crônica e rinite alérgica. O estudo sugere que a degranulação dos mastócitos desempenha um importante papel na formação do pólipó nasal, e provavelmente ela não seja dependente apenas do mecanismo mediado pela IgE.

Sasaki (1986) observa que a degranulação dos mastócitos no pólipó nasal ocorre de forma mais acentuada nas porções profundas do estroma. O pedículo do pólipó nasal apresenta maior quantidade de mastócitos e maior número de células degranuladas que a região do corpo e ápice do pólipó, sugerindo o envolvimento de um mecanismo diferente da IgE na degranulação dos mastócitos.

Drake-Lee *et al.*, (1988) constatou que os mastócitos são incomuns no epitélio nasal normal, mas estão presentes na submucosa do pólipó nasal.

Yamashita *et al.* (1989) encontram número abundante de eosinófilos e mastócitos degranulados no pólipó nasal de pacientes com intolerância ao AAS. Os pólipós nasais desses pacientes apresentam níveis aumentados de leucotrienos (LTC4 e LTD4) e níveis diminuídos de prostaglandinas.

Bellioni *et al.* (1989) encontram vários mastócitos no tecido conectivo e área perivascular do pólipó nasal. Os mastócitos apresentam receptores

para a IL-2 e estão freqüentemente localizados próximos aos linfócitos T, sugerindo que a degranulação dos mastócitos seja desencadeada por citocinas das células T.

Jankowski *et al.* (1989), utilizando imunoistoquímica, não observou diferença quantitativa de mastócitos no pólipó nasal e mucosa nasal de indivíduos sadios.

Rhuno *et al.* (1990) relatam que o número de mastócitos no epitélio do pólipó nasal e mucosa adjacente apresenta aumento em comparação com o epitélio nasal de indivíduos sadios.

Sun (1991) encontra número maior de mastócitos na base do pólipó nasal com graus variados de degranulação. Esse estudo sugere que a degranulação dos mastócitos na PN está relacionada com uma via diferente do clássico mecanismo mediado pela IgE.

Kawabori *et al.* (1992) observa que a maioria dos mastócitos, cora positivamente para a triptase e quimase. A porcentagem de mastócitos circundados por triptase pericelular, sugerindo ativação e degranulação, é estatisticamente maior no estroma do que no epitélio. Esses achados demonstram diferença no estado de ativação dos mastócitos do estroma e epitélio. Provavelmente, micro-ambientes distintos são responsáveis por influenciar os mastócitos nesses locais.

Otsuka *et al.* (1993) estudam a distribuição dos mastócitos no pólipó nasal e observaram na superfície epitelial e nos ductos dos pólipos uma média de 20.000 mastócitos por mm^3 . A contagem dos mastócitos na região subepitelial foi menor que 3.200 por mm^3 .

Ruger *et al.* (1994) demonstram que mastócitos na região perivascular secretam colágeno tipo VIII, podendo contribuir para angiogênese, remodelamento tecidual e fibrose.

Finotto *et al.* (1994) observam que os mastócitos localizados no estroma do pólipó nasal apresentam maior quantidade de triptase quando comparado com os mastócitos da camada epitelial. Os mastócitos do estroma liberam maior quantidade de histamina após estimulação com da IgE. Esses dados sugerem heterogeneidade funcional e diferença de mediadores nas subpopulações de mastócitos.

Pawliczak *et al.* (1997) estudam a distribuição de eosinófilos e mastócitos no pólipó nasal de indivíduos atópicos e não atópicos. Observam que os eosinófilos são as células predominantes, independente da presença de atopia. Os mastócitos e eosinófilos apresentam-se mais abundantes na camada superficial do que na camada profunda do estroma da mucosa. A distribuição dos mastócitos nos atópicos mostra-se com maior número na camada superficial quando comparado com os não-atópicos.

Park *et al.* (1998) não encontram diferença estatística no número de mastócitos no pólipó de pacientes com intolerância a salicilatos, de alérgicos e de não alérgicos.

Lee *et al.* (2003) observam que o TGF- β 1, além de induzir deposição de matriz extracelular, contribui para a migração de eosinófilos e mastócitos no pólipó nasal.

Pawankar (2003) observa aumento dos níveis de triptase, um marcador de mastócitos, em indivíduos com polipose nasal recorrente.

2.3.3 Miofibroblastos e TGF- β

Busuttil *et al.* (1976), em estudo da histologia do pólipó nasal, observam que existem fibroblastos edematosos com abundantes interdigitações citoplasmáticas e síntese aumentada de colágeno, sugerindo o envolvimento dessas células na patogênese da PN.

Batsakis (1986) observa que a atipia celular em células do estroma do pólipó nasal é uma resposta peculiar dos fibroblastos com produção aumentada de fluidos intracelulares.

Nakayama *et al.* (1995) investigam com imunoistoquímica, 29 casos de PN com células atípicas no estroma, e observam a presença de actina e vimentina. Baseado nos achados da microscopia óptica e imunoistoquímica, os autores concluem que as células atípicas representam miofibroblastos e não uma proliferação neoplásica.

Maune *et al.* (1996) observam que os fibroblastos nasais são possivelmente a fonte de RANTES (*Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted*), encontrada na mucosa ou secreção nasal de pacientes que sofrem de doenças em que a infiltração eosinofílica é a característica principal.

Wang *et al.* (1997) descrevem acúmulo de miofibroblastos e fator de transformação de crescimento β (TGF- β) no pólipó nasal, e sugerem que essas células podem estar envolvidas na sua patogênese através da liberação de matriz extracelular.

Gizycki *et al.* (1997) encontram número estatisticamente aumentado de miofibroblastos na mucosa brônquica de indivíduos asmáticos quando comparado com indivíduos não asmáticos.

Vignola *et al.* (1997), utilizando a combinação da hibridização *in situ* com a imunistoquímica, observam que o TGF- β , que é um fator fibrogênico envolvido no remodelamento da asma, é sintetizado pelos eosinófilos e miofibroblastos presentes na mucosa brônquica dos indivíduos asmáticos.

Rudack *et al.* (1999) estudam os efeitos das citocinas derivadas dos eosinófilos e fatores derivados dos fibroblastos nos eosinófilos sanguíneos isolados de pacientes com PN e observam que o GM-CSF, encontrado em altas concentrações nos fibroblastos, é provavelmente um dos responsáveis por prolongar a sobrevivência dos eosinófilos.

Lechapt-Zalcman e Escudier (2000) descrevem que a matriz metaloproteinase e seus inibidores teciduais, principais enzimas proteolíticas envolvidas no *turnover* da matriz extracelular, são produzidos pelos fibroblastos, células endoteliais e epiteliais.

Saji *et al.* (2000) demonstram que os fibroblastos nasais, sob estímulo do TNF- α e IL-1, são capazes de recrutar eosinófilos para o pólipó nasal.

Chang *et al.* (2001) investigam a relação da inflamação com o crescimento do pólipó nasal e observam que os índices da α -actina do músculo liso e o TGF- β 1 foram significativamente maiores no pólipó nasal quando comparado com a mucosa normal. Os autores concluem que o TGF- β 1 produzido por células inflamatórias pode influenciar o desenvolvimento dos miofibroblastos, que por sua vez, produzirá matriz extracelular e crescimento dos pólipos.

Hashimoto *et al.* (2001) demonstram que o TGF- β 1 é capaz de induzir a modulação fenotípica de fibroblastos para miofibroblastos.

Morishima *et al.* (2001) observam que a lesão epitelial da via aérea estimula a liberação de TGF- β causando síntese de colágeno através da indução de miofibroblastos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Comissão de ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital da *Jikei University School of Medicine*, Tóquio, Japão e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa nº 794/03.

3.1 Casuística

No período de junho de 1999 a dezembro de 2001 foram estudados prospectivamente 78 pacientes portadores de PN submetidos à cirurgia endoscópica nasossinusal no hospital da *Jikei University School of Medicine*, Tóquio, Japão.

No grupo, 55 pacientes (70,5%) eram do sexo masculino e 23 (29,5%) do sexo feminino. A idade média foi de 48 anos \pm 12,2 anos.

O diagnóstico da polipose nasal baseou-se na história clínica de obstrução nasal com rinorréia anterior e/ou secreção retro nasal, perda parcial ou completa do olfato acompanhada do exame otorrinolaringológico da cavidade nasal (rinoscopia anterior e exame com endoscópio rígido de

4,0mm e 0 grau), mostrando pólipos bilaterais de aspecto pálido, levemente rosados ou acinzentados, oriundos da região do meato médio. Em todos os pacientes foi realizada tomografia computadorizada dos seios paranasais em que foi comprovada a bilateralidade da doença.

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão: foram incluídos apenas os pacientes que apresentavam diagnóstico de polipose nasal bilateral, com ou sem associação com asma, submetidos a tratamento cirúrgico.

Critérios de exclusão: foram excluídos os pacientes portadores de pólipos unilaterais, pólipos antrocoanais, esfenocoanais e etmoidocoanais, os pólipos relacionados com a fibrose cística, discinesia ciliar e com tumores como o papiloma invertido e carcinomas.

3.1.2 Grupo controle

O grupo controle foi constituído por oito pacientes, com adenoma de hipófise, submetidos a tratamento cirúrgico por acesso transetmoidoesfenoidal. Nenhum dos pacientes apresentava queixas nasossinusais.

O exame da fossa nasal, com endoscópio rígido, mostrava aspecto normal. O exame tomográfico dos seios paranasais encontrava-se sem sinais de velamento ou espessamento mucoso nasossinusal. Neste grupo, seis indivíduos eram do sexo feminino e dois do sexo masculino. A idade média do grupo foi de 39,3 anos.

3.2 Métodos

3.2.1 Diagnóstico de asma

Todos os pacientes receberam a avaliação da clínica médica, que definiu a presença ou ausência de asma segundo os critérios da Sociedade Japonesa de Alergologia [a) História clínica: ataques recorrentes de dispnéia, aperto no tórax, sibilos, despertares noturnos, tosse, história atual de dispnéia e/ou sibilos ao exame físico. b) Prova de função pulmonar: espirometria mostrando $FEV_1 < 80\%$ com reversibilidade de pelo menos 12% após salbutamol ou teste positivo à metacolina com dose de provocação de 1200 μ g ou menos (Makino *et al.* 2000)]. No grupo de pacientes asmáticos foram identificados 15 pacientes com história clínica de intolerância ao ácido acetil salicílico (crises de broncoespasmo ou dispnéia após ingestão de ácido acetil salicílico).

Os 78 pacientes foram divididos em dois grupos segundo a presença ou ausência de asma. O grupo de asmáticos constituiu-se de 56 pacientes e o grupo de não asmáticos de 22 pacientes.

Todos os pacientes foram tratados com medicações diversas como antibióticos, anti-histamínicos e corticosteróides que foram suspensos por pelo menos quatro semanas antes da cirurgia. Em 20 de 56 pacientes com asma, o pneumologista prescreveu um dia antes da cirurgia corticosteróide sistêmico ou inalatório.

3.2.2 Coleta do pólipó nasal

Os pacientes foram submetidos à anestesia geral, e após os cuidados de assepsia e antissepsia com colocação de campos estéreis, sob visão endoscópica¹, foi realizado vasoconstricção da mucosa nasal com algodão embebido em adrenalina 1:2000 diluída em lidocaína a 4%, seguido da exérese cirúrgica do pólipó.

No início do procedimento cirúrgico, os fragmentos do pólipó foram obtidos da região do meato médio, seccionados em sua inserção, utilizando micro-tesoura endoscópica. Os fragmentos obtidos foram de aproximadamente 1 a 2 cm de diâmetro cada. Para cada paciente, foram obtidos 2 a 4 fragmentos de pólipó.

Esses fragmentos foram imediatamente submetidos ao processo de fixação em solução de formol a 10% neutro e tamponado em PBS (*Phosphate Buffered Solution*) pH 7.2, por um período de 24 horas. As amostras foram identificadas com o nome e registro do paciente e encaminhadas para o laboratório de pesquisa do departamento de Otorrinolaringologia da *Jikei University School of Medicine*.

Após o período de fixação em formol, realizou-se a desidratação em solução graduada de álcool, e em seguida as amostras foram incluídas em blocos de parafina (Anexo A).

Os blocos de parafina, contendo as amostras de pólipó nasal foram cortados em série de três micrômetros de espessura, utilizando um micrótomo².

¹ Endoscópio rígido Karl Storz, 4mm e 0 grau, fonte de luz de xenônio, monitor Sony e telecam da Storz

² Leica modelo RM2065

As amostras foram aderidas em lâminas de vidro banhadas com *poly-l-lisina*. Para cada bloco de parafina contendo o pólipó nasal foram preparadas 10 lâminas, sendo destinadas duas lâminas para cada anticorpo (total de 4 anticorpos), uma lâmina para a reação de controle negativo e uma lâmina para coloração de hematoxilina-eosina. Na reação de controle negativo foi omitido o anticorpo primário, e na coloração de hematoxilina-eosina, utilizou-se o método usual descrito no anexo B.

3.2.3 Coleta de mucosa etmoidal do grupo controle

A mucosa etmoidal do grupo controle foi obtida, durante o procedimento cirúrgico transetmoidoesfenoidal para acesso à hipófise.

Os pacientes foram submetidos à anestesia geral, e após os cuidados de assepsia e antissepsia com colocação de campos estéreis, sob visão endoscópica¹, foi realizado vasoconstricção da mucosa nasal com algodão embebido em adrenalina 1:2000 diluída em lidocaína a 4%.

No início do procedimento cirúrgico, os fragmentos de mucosa etmoidal foram obtidos da região do meato médio, utilizando pinça cortante tipo Grünwald. Os fragmentos obtidos foram de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro cada. Para cada paciente, foram obtidos dois a quatro fragmentos de mucosa etmoidal.

Esses fragmentos foram, imediatamente, submetidos ao processo de fixação em solução de formol a 10% neutro e tamponado em PBS (*Phosphate Buffered Solution*) pH 7.2, por um período de 24 horas. As amostras foram identificadas com o nome e registro do paciente e

encaminhadas para o laboratório de pesquisa do departamento de Otorrinolaringologia da *Jikei University School of Medicine*.

Após o período de fixação em formol, realizou-se a desidratação em solução graduada de álcool, e em seguida as amostras foram incluídas em blocos de parafina (Anexo A).

Os blocos de parafina, contendo as amostras de mucosa etmoidal foram cortadas em série de três micrômetros de espessura, utilizando um micrótomo³.

As amostras foram aderidas em lâminas de vidro banhadas com poly-l-lisina. Para cada bloco de parafina contendo a mucosa etmoidal foram preparadas 10 lâminas, sendo destinadas duas lâminas para cada anticorpo (total de 4 anticorpos), uma lâmina para a reação de controle negativo e uma lâmina para coloração de hematoxilina-eosina. Na reação de controle negativo foi omitido o anticorpo primário, e na coloração de hematoxilina-eosina utilizou-se o método usual descrito no anexo B.

³ Leica modelo RM2065

3.2.4 Método imunoistoquímico

Foram pesquisados antígenos nos pólipos nasais e na mucosa etmoidal com anticorpo primário monoclonal de camundongo para identificação dos seguintes tipos celulares: eosinófilos – anticorpo contra a proteína catiônica eosinofílica (EG2) (Tai *et al.* 1984a, 1984b); mastócitos – anticorpo contra triptase dos mastócitos humanos (Djukanovic *et al.* 1990, Walls *et al.* 1990a, 1990b e 1991); miofibroblastos – anticorpo contra actina a do músculo liso (SMA) (Skalli *et al.* 1986); e células contendo TGF- β – anticorpo contra células TGF- β positivas (Barral-Netto *et al.* 1992).

A coloração de imunoistoquímica foi realizada com o método do complexo enzimático avidina-biotina⁴, descrita por Hsu *et al.* (1981).

Os anticorpos primários específicos utilizados foram: anti-EG2 (Kabi *Pharmacia Diagnostics* AB, Uppsala, Suécia), anti-triptase humana de mastócitos⁵, anti-SMA⁶, e anti-TGF- β ⁷. Como controle negativo para o reagente, foi omitido o anticorpo primário. Como controle de coloração do pólipo nasal foi utilizado a mucosa etmoidal do grupo controle. Todas as reações imunoistoquímicas foram realizadas no laboratório de pesquisa do departamento de Otorrinolaringologia da *Jikei University School of Medicine*, Tóquio, Japão.

⁴ Dako LSAB 2 Kit, HRP. Carpinteria, CA 9013 EUA

⁵ Dako, clone AA1, Glostrup, Dinamarca

⁶ Dako, clone 1A4, Glostrup, Dinamarca

⁷ RD *Systems*, clone 1D11, Minneapolis, EUA

3.2.4.1 Preparo para a coloração

Realizou-se a deparafinização e rehidratação das amostras da seguinte maneira:

a) Colocada a lâmina em solução de xileno por cinco minutos. Repetido o processo em nova solução de xileno por cinco minutos.

b) Retirado o excesso de xileno e colocada a lâmina em etanol absoluto por três minutos. Repetido o processo em nova cuba contendo etanol absoluto, por três minutos.

c) Retirado o excesso de etanol e colocada a lâmina em etanol a 95% por três minutos. Repetido o processo em nova cuba contendo etanol a 95% por três minutos.

d) Retirado o excesso de etanol e colocada a lâmina em água destilada por 30 segundos.

Após o item d, realizada a digestão proteolítica por seis minutos a temperatura ambiente em solução contendo 0,025% de protease tipo XXIV (Sigma P-8038) e 0,025% CaCl_2 , em Tris-HCl tamponado, pH 7,2 – 7,6. A digestão proteolítica foi interrompida por lavagem em água destilada durante cinco minutos.

3.2.4.2 Método de coloração imunoenzimática

a) Peróxido de hidrogênio

Retirado o excesso de água da lâmina e secado cuidadosamente ao redor da amostra utilizando papel filtro. Aplicado peróxido de hidrogênio a 3% sobre a amostra e incubado por cinco minutos em câmara úmida a temperatura ambiente.

Enxaguado gentilmente com água destilada e colocada em solução Tris-HCl tamponada por dez minutos.

b) Anticorpo primário e reagente controle negativo.

Retirado o excesso de solução tamponada e secada a lâmina como anteriormente.

Aplicado o anticorpo primário cobrindo adequadamente toda a amostra e incubado por 10 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente, com exceção do anti-TGF- β , cujo tempo de incubação foi de 30 minutos. Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário.

Enxaguado gentilmente (duas lavagens sucessivas) com solução tris-HCl tamponada por dez minutos.

As diluições dos anticorpos primários utilizados foram: EG2⁸, diluição de 1:25; anti-triptase humana de mastócitos⁹, diluição de 1:50; anti-SMA¹⁰ diluição de 1:50; e anti-TGF- β ¹¹ diluição de 1:10. A solução para diluição utilizada foi Tris-HCl 0.05 M tamponado, pH 7.2 – 7.6, contendo 1% de albumina sérica bovina.

⁸ Kabi *Pharmacia Diagnostics* AB, Uppsala, Suécia

⁹ Dako, clone AA1, Glostrup, Dinamarca

¹⁰ Dako, clone 1A4, Glostrup, Dinamarca

¹¹ RD *Systems*, clone 1D11, Minneapolis, EUA

c) Anticorpo secundário

Retirado o excesso de solução tamponada e secada a lâmina como no item um.

Aplicadas sobre toda a amostra, gotas da solução contendo imunoglobulinas com biotina anti-coelho e anti-camundongo "*biotinylated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins phosphate buffered saline (PBS), containing carrier protein and 15mM sodium azide.*"¹² e incubado por 10 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente.

Enxaguada a lâmina conforme o item b.

d) Estreptavidina-peroxidase

Secada a lâmina conforme o item a.

Aplicadas sobre toda a amostra, gotas da solução contendo streptavidina conjugada com peroxidase em PBS contendo proteína carreadora e agentes antimicrobianos "*streptavidin conjugated to horseradish peroxidase in PBS, containing carrier protein and antimicrobial agents.*"¹¹. Incubado por 10 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente.

Enxaguada a lâmina conforme o item b.

e) Solução com substrato de cromogênio

Secada a lâmina conforme o item a.

Aplicadas sobre toda a amostra, gotas da solução a 3% de 3-amino-9-etilcarbazol em N, N-dimetilformamida (DMF), que foi preparada imediatamente antes do uso.

¹² Dako LSAB 2 Kit, HRP. Carpinteria, CA 9013 EUA

Incubado por 10 minutos em câmara úmida e em temperatura ambiente.

Enxaguado gentilmente com água destilada.

f)- Hematoxilina

Realizada a imersão das lâminas em solução de hematoxilina de Mayer por três minutos.

Enxaguada gentilmente com água destilada.

3.2.4.3 Montagem das lâminas

As amostras foram montadas e cobertas com lamínula em meio aquoso de glicergel¹³.

3.2.5 Análise dos resultados

As células positivas (eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF- β) foram detectadas pela coloração vermelha resultante da reação do complexo streptavidina-biotina-peroxidase com a solução de 3-amino-9-etilcarbazol. Todas as células marcadas pelo anti-EG2, anti-triptase e anti-TGF- β foram consideradas como positivas. No caso do anti-SMA, apenas as células positivas encontradas no tecido conectivo do pólipo e da mucosa etmoidal foram consideradas como positivas, isto é, miofibroblastos; as células vermelhas agrupadas ao redor dos vasos sanguíneos e glândulas não foram consideradas positivas (Figura 1).

¹³ Dako Glycergel mounting medium code No. C563

Durante a contagem das células coradas pela imunistoquímica, o examinador desconhecia o diagnóstico do paciente. Para cada anticorpo, foram coradas duas lâminas.

Foi utilizada na ocular do microscópio óptico¹⁴ uma lâmina graticulada de 10x10mm com aumento de 200 vezes, que correspondeu a um campo (Figura 2). Para cada lâmina foram analisados dez campos, que foram orientados aleatoriamente ao longo da membrana basal do epitélio. Os campos foram determinados de forma aleatória com área mínima requerida para análise de 1mm² (Braunstahl GJ, *et al.* 2000).

Em cada campo foi contado o número de células positivas, utilizando um contador de células manual. Os resultados foram expressos como média de células positivas por campo.

Os resultados foram comparados e correlacionados de acordo com a idade, sexo, presença ou ausência de asma, intolerância ao AAS.

¹⁴ Nikon *Microphot-FXA*, Tóquio, Japão

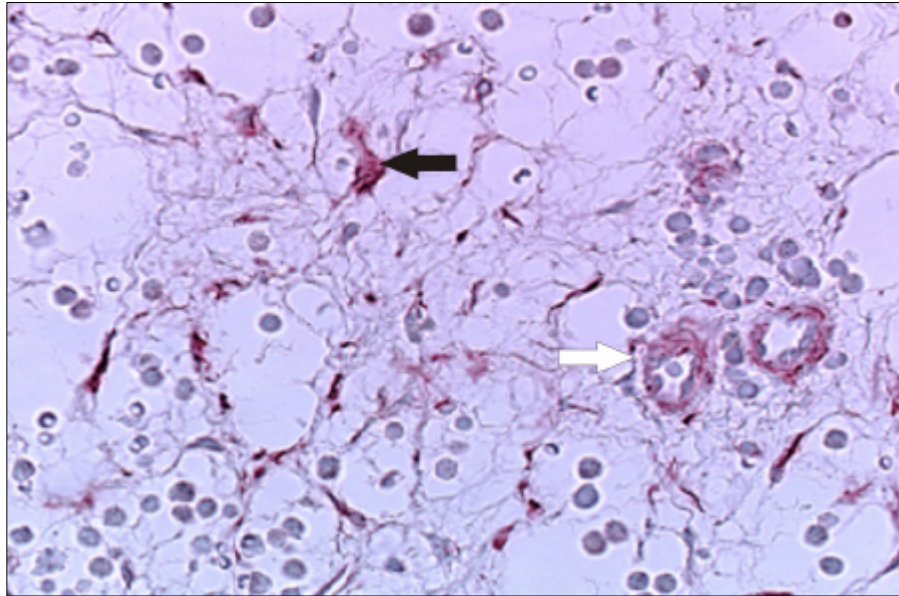


Figura 1 - Miofibroblasto típico observado na lâmina própria do pólipio nasal (seta preta). Células vermelhas agrupadas ao redor dos vasos sanguíneos e glândulas não foram consideradas positivas (seta branca) (microscopia óptica - x400)

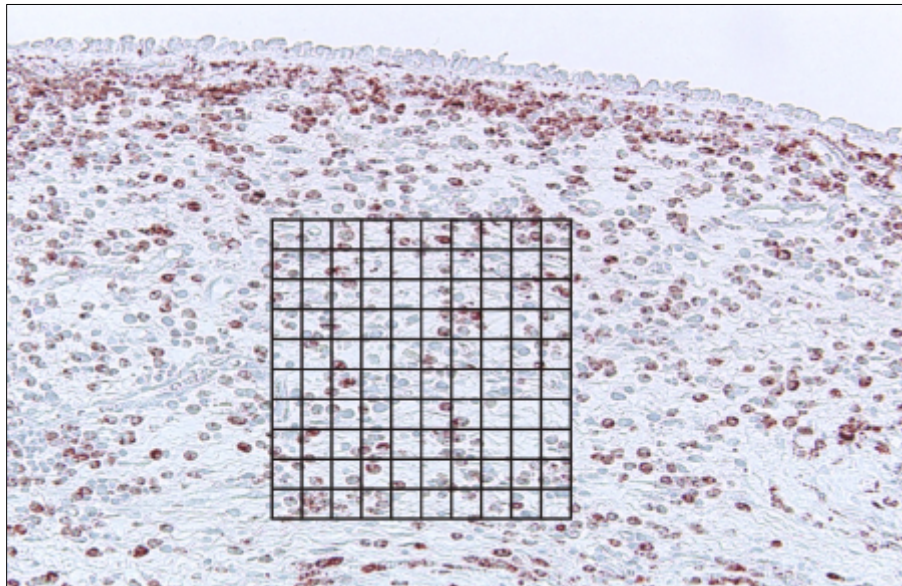


Figura 2 - Reação de imunohistoquímica demonstrando células coradas positivamente para proteína catiônica eosinofílica e o campo para contagem de eosinófilos (microscopia óptica - x200)

3.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando testes paramétricos e não paramétricos, de acordo com a natureza e distribuição dos dados (Byrne 1997, Doria 1999). Foram considerados significativos valores de p menores que 0,05. Foi utilizado o programa de estatística “SPSS 11.0 for Windows”¹⁵, executado em um computador¹⁶.

O teste t de *Student* foi utilizado para comparar a idade de grupos não emparelhados, com distribuição gaussiana.

O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar dados nominais, de grupos não emparelhados como o sexo, presença ou ausência de asma, intolerância ao AAS e proporções. O teste de Fischer foi utilizado para comparação de dados cujas amostras apresentaram valor esperado inferior a cinco.

A comparação das médias obtidas através do número de células positivas (eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e TGF- β positiva), foi realizada utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), para comparação entre o grupo asmático, não asmático e controle, visto que os dados são contínuos e apresentaram distribuição gaussiana.

Para o estudo da associação entre as variáveis contínuas (número de eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF- β positivas), de distribuição não gaussiana foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

¹⁵ SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA

¹⁶ Toshiba *Satellite* PS183-Z - Toshiba Corporation

4 RESULTADOS

4.1 Idade e Sexo

A faixa etária dos pacientes variou de 14 a 80 anos, com média de 48 anos e desvio padrão de $\pm 12,2$ anos. A distribuição da média, desvio padrão e amplitude da idade no grupo asmático e não-asmático podem ser observados na Tabela 1 e Gráfico 1.

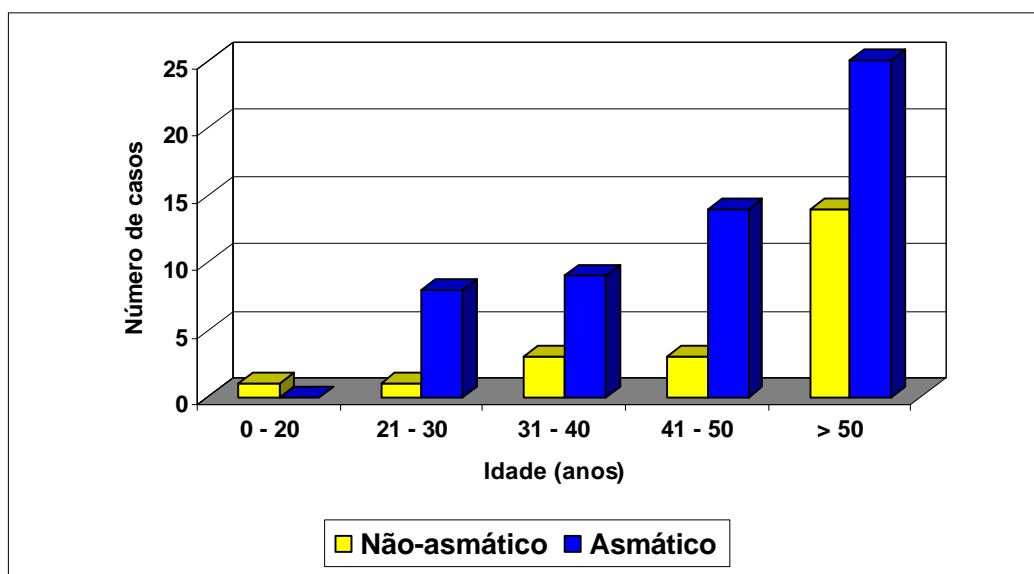
Tabela 1 - Distribuição da média e desvio padrão da idade nos grupos asmáticos e não-asmáticos

Grupos	Asmáticos (n=56)	Não-asmáticos (n=22)
Idade (anos)		
Média \pm dp	46,7 \pm 11,1	51,2 \pm 14,5

dp = desvio padrão

Teste t de Student: Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo asmático e não-asmático

Gráfico 1 - Distribuição do número de pacientes quanto à idade no grupo asmático e não asmático



Em relação ao sexo, considerando todos os casos estudados, houve prevalência de PN nos asmáticos e no sexo masculino. Analisando separadamente os grupos, a proporção masculino/feminino no grupo asmático foi de 1,9, enquanto que no grupo não-asmático, 4,5 (Tabela 2 e Gráfico 2). Os dados referentes à idade e sexo encontram-se no Anexo C.

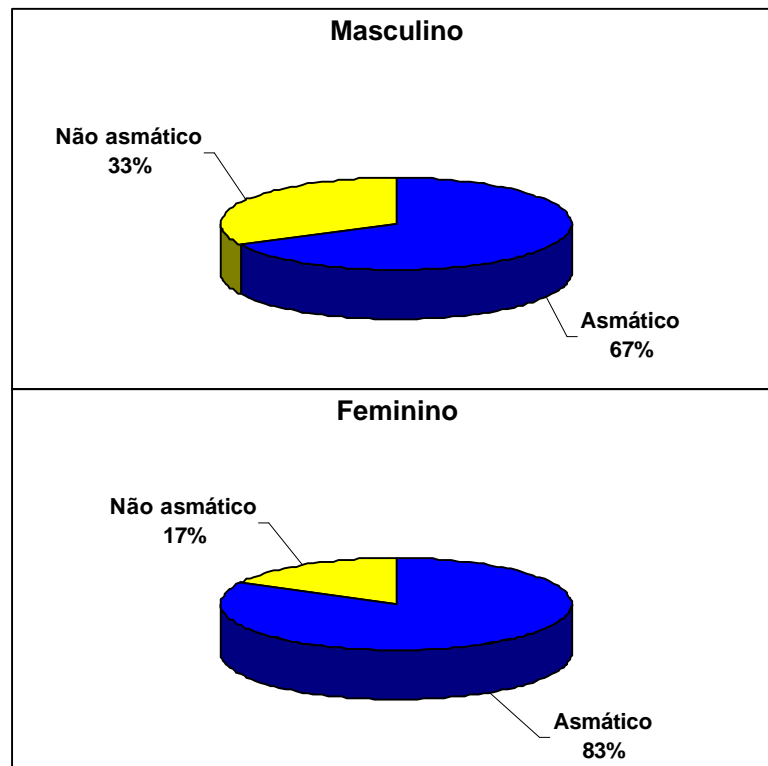
Tabela 2 - Distribuição do sexo dos pacientes com PN nos grupos asmáticos e não-asmáticos

	Asmáticos	Não-asmáticos
Masculino	37 (66, 1%)	18 (81, 8%)
Feminino	19 (33, 9%)	4 (18, 2%)
Total	56	22

Teste Qui-quadrado: Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos

A razão masculino/feminino no grupo de asmáticos foi de 1,9, enquanto que no grupo de não-asmáticos, a razão foi de 4,5.

Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes com PN em relação ao sexo e presença ou não de asma



A distribuição dos pacientes com polipose nasal em relação ao sexo e presença ou ausência de asma, mostra que a asma é prevalente em ambos os sexos. No entanto o sexo feminino, apesar de não apresentar diferença estatística ($p > 0,05$), existe maior porcentagem de asmáticos (83%) em relação ao sexo masculino (67%).

4.2 Asma e Intolerância ao Ácido Acetil Salicílico

Quando comparamos a proporção masculino/feminino por grupo, observamos que (Tabela 3 e Gráfico 3):

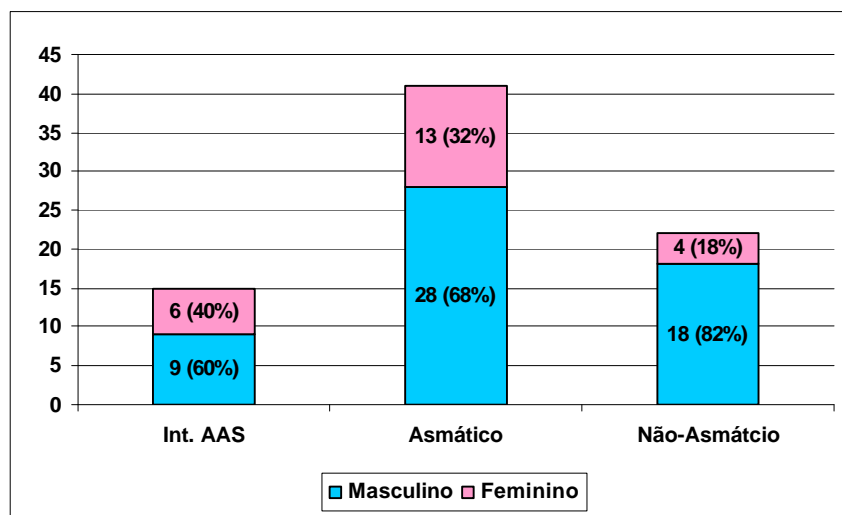
- No grupo com intolerância ao AAS houve a menor proporção.
- No grupo não-asmático, houve a maior proporção.

Tabela 3 - Distribuição do sexo e proporção masculino/feminino nos grupos com intolerância ao AAS, asmáticos e não asmáticos

Grupos	Intolerância ao AAS	Asmáticos	Não-asmáticos
Masculino	9	28	18
Feminino	6	13	4
Proporção Masculino/feminino	1,5	2,1	4,5

Teste Qui-quadrado: Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos

Gráfico 3 - Distribuição da prevalência de intolerância ao AAS e asma por sexo



4.3 Imunoistoquímica

Os resultados das contagens das células positivas (eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF- β) no exame imunoistoquímico estão na Tabela 4 e Gráfico 4. O número de eosinófilos (Figura 3), miofibroblastos e células TGF- β positivas, apresentaram média significativamente maior no grupo dos asmáticos em comparação com os não-asmáticos, enquanto que a média do número de mastócitos (Figura 4) não apresentou diferença estatística entre os grupos. Em relação ao grupo controle, houve diferença significativa em todos os grupos. Os dados referentes à imunoistoquímica encontram-se no anexo D.

Tabela 4 - Distribuição da média e desvio padrão dos mastócitos, eosinófilos, miofibroblastos e células coradas positivamente para TGF- β , nos grupos asmáticos e não-asmáticos e controle

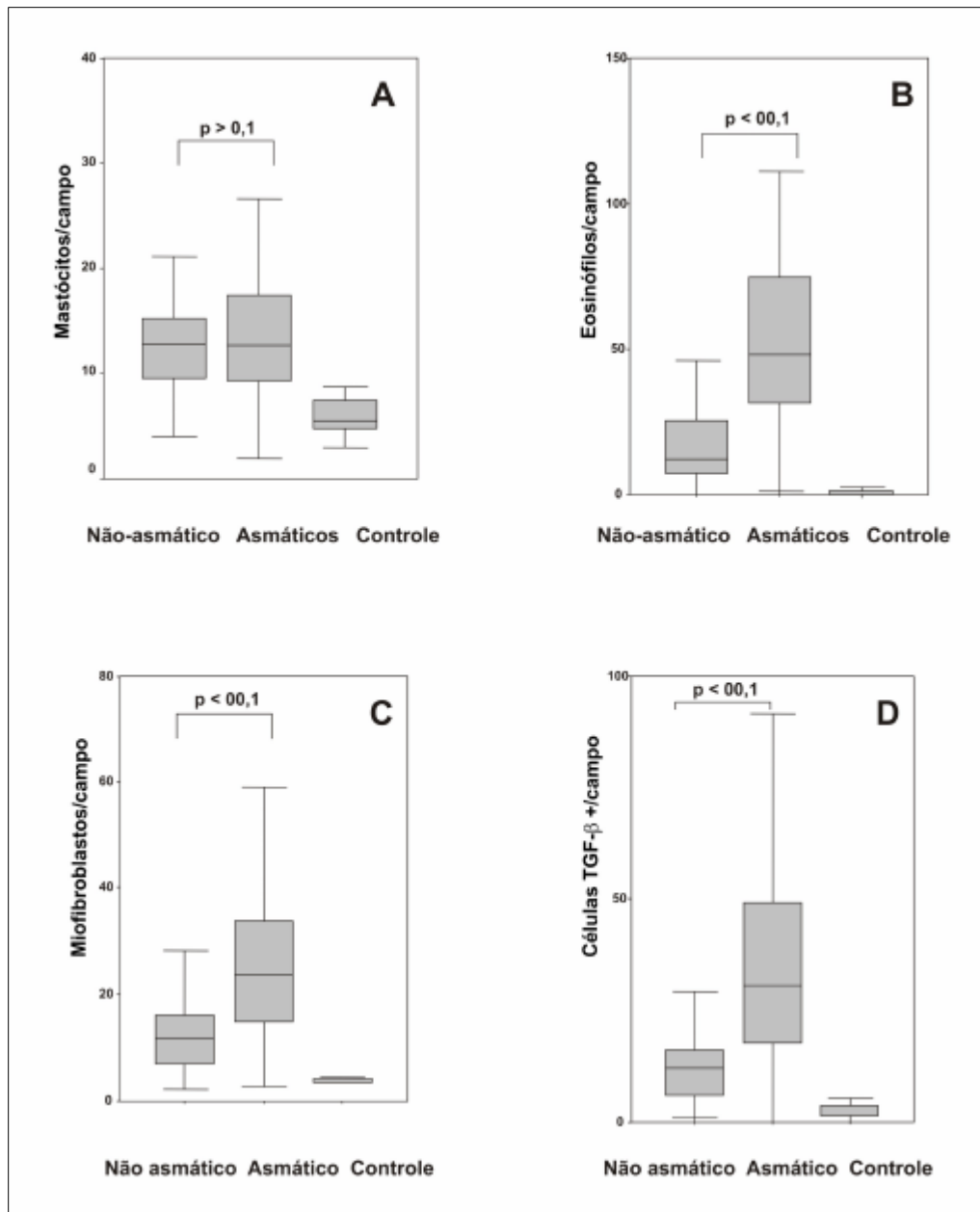
Grupos	Asmáticos n = 56	Não-asmáticos n = 22	Controle n = 8
Mastócitos	13,33 \pm 5,7	12,37 \pm 4,7	5,82 * \pm 1,9
Eosinófilos	55,27* \pm 34,7	21,70* \pm 27,9	1,46 * \pm 3,0
Miofibroblastos	24,74* \pm 13,7	13,11* \pm 7,8	4,07* \pm 1,5
Células TGF-β +	37,83* \pm 29,5	13,60* \pm 10,3	2,13* \pm 1,8

NOTA: \pm dp – desvio padrão

* estatisticamente significativa (p<0,05)

Teste estatístico utilizado: ANOVA

Gráfico 4 - Distribuição dos valores médios dos mastócitos (A), eosinófilos (B), miofibroblastos (C), e células TGF- β (D) positivas nos grupo asmáticos, não asmáticos e controle



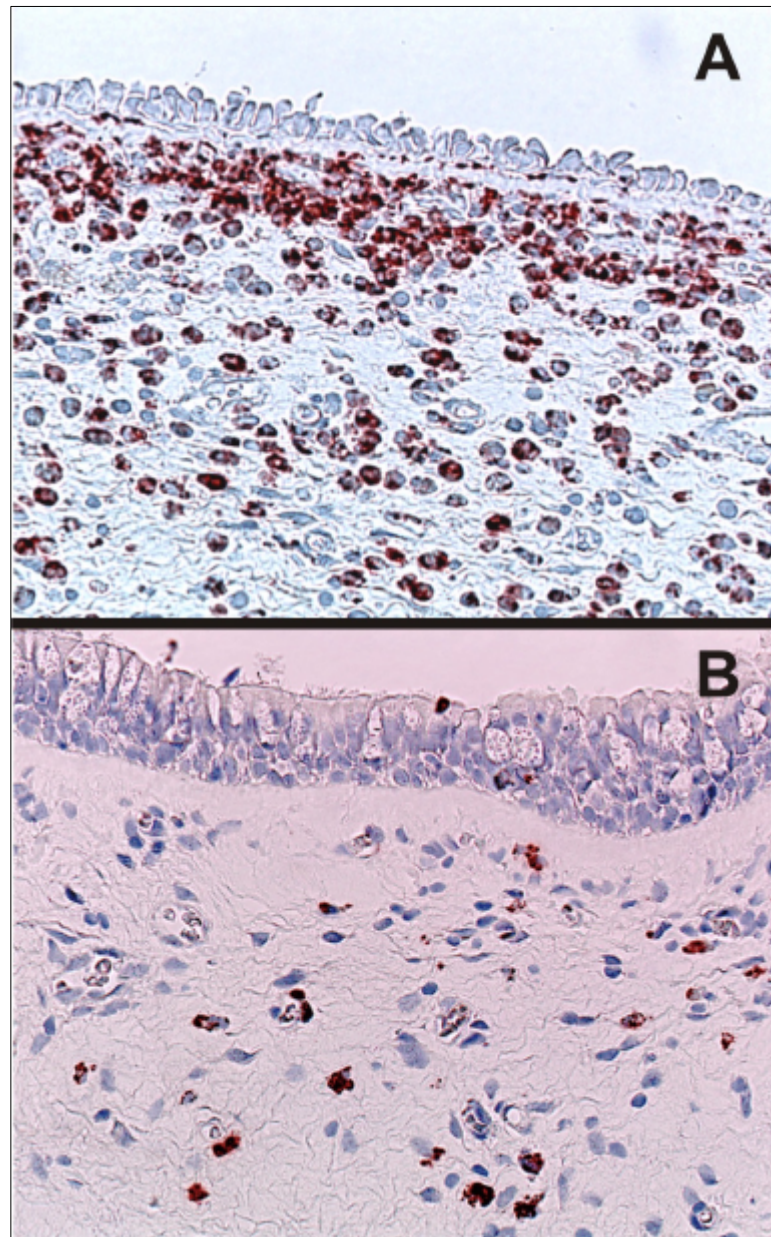


Figura 3 - Distribuição de eosinófilos (proteína catiônica eosinofílica) no pólipó nasal de indivíduos com asma (A) e sem asma (B). (microscopia óptica aumento x400)

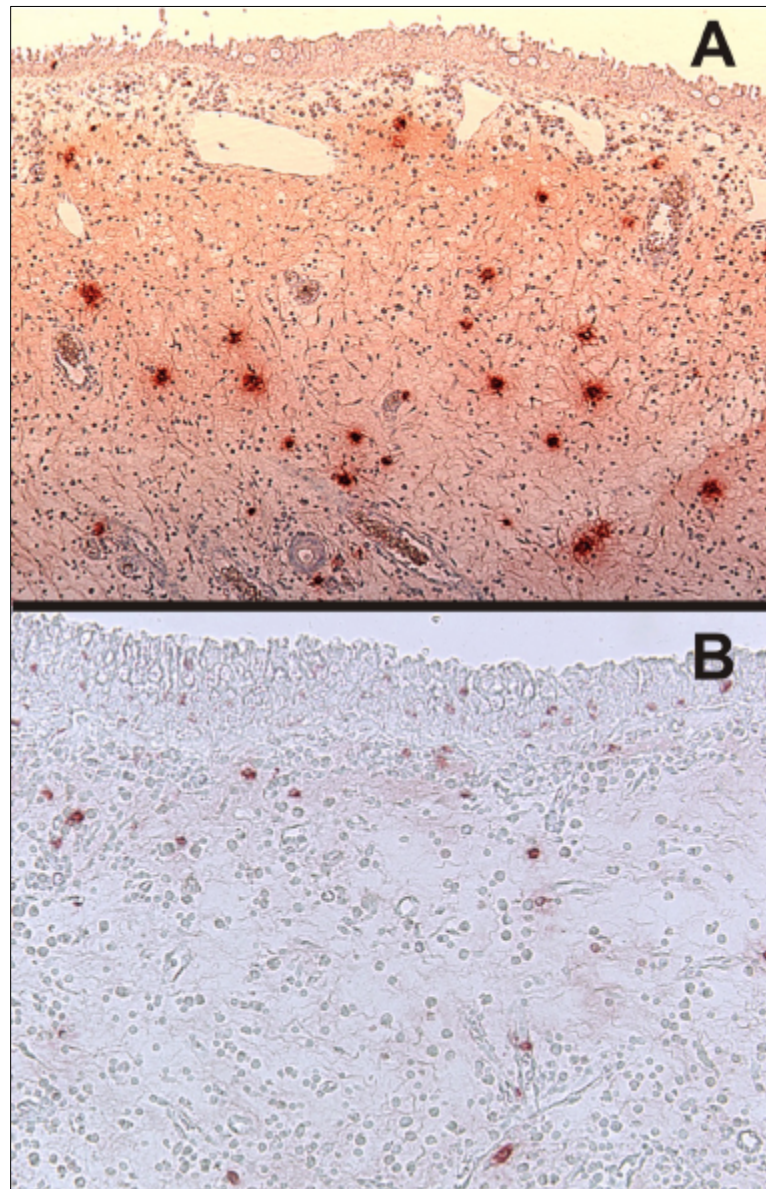


Figura 4 - Distribuição de mastócitos (anticorpo anti-triptase humana) no pólipó nasal de indivíduos com asma (A) e sem asma (B) (microscopia óptica aumento x200)

Os resultados da contagem de mastócitos, eosinófilos, miofibroblastos e células TGF- β positivas nos grupos asmático e com intolerância ao AAS estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição da média e desvio padrão dos mastócitos, eosinófilos, miofibroblastos e células TGF- β positivas, nos grupo asmático e com intolerância ao AAS

Asmático		
Grupos	Sem intolerância ao AAS (n=41)	Com Intolerância ao AAS (n=15)
Mastócitos	14,8* \pm 5,7	9,1* \pm 2,5
Eosinófilos	51,7 \pm 32,1	61,2 \pm 42,8
Miofibroblastos	28,3* \pm 11,4	15,5* \pm 15,3
Células TGF- β +	38,7 \pm 32,6	35,4 \pm 19,2

NOTA: dp – desvio padrão

* estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Teste estatístico utilizado: ANOVA

A análise do número de mastócitos, eosinófilos, miofibroblastos, células TGF- β positivas e presença ou ausência de asma, para o teste de correlação de Spearman estão na Tabela 6. Observa-se o valor de maior correlação entre eosinófilos e células TGF- β positivas. A Figura 5 mostra distribuição semelhante dos eosinófilos e células TGF- β positivas.

Tabela 6 - Correlação de Spearman para mastócitos, eosinófilos, miofibroblastos, células TGF- β positivas e presença ou ausência de asma

	Mastócitos	Eosinófilos	Miofibroblastos	Células TGF β +	Presença de asma
Mastócitos	$r = 1,0$				
Eosinófilos	$r = -,039$ $p = 0,37$	$r = 1,0$			
Miofibroblastos	$r = 0,397^*$ $p < 0,001$	$r = 0,442^*$ $p < 0,001$	$r = 1,0$		
Células TGF- β +	$r = 0,078$ $p = 0,253$	$r = 0,656^*$ $p < 0,001$	$r = 0,507^*$ $p < 0,001$	$r = 1,0$	
Presença de asma	$r = 0,063$ $p = 0,294$	$r = 0,535^*$ $p < 0,001$	$r = 0,417^*$ $p < 0,001$	$r = 0,504^*$ $p < 0,001$	$r = 1,0$

r = coeficiente de correlação

* estatisticamente significativo $p < 0,05$

Teste utilizado: correlação de Spearman

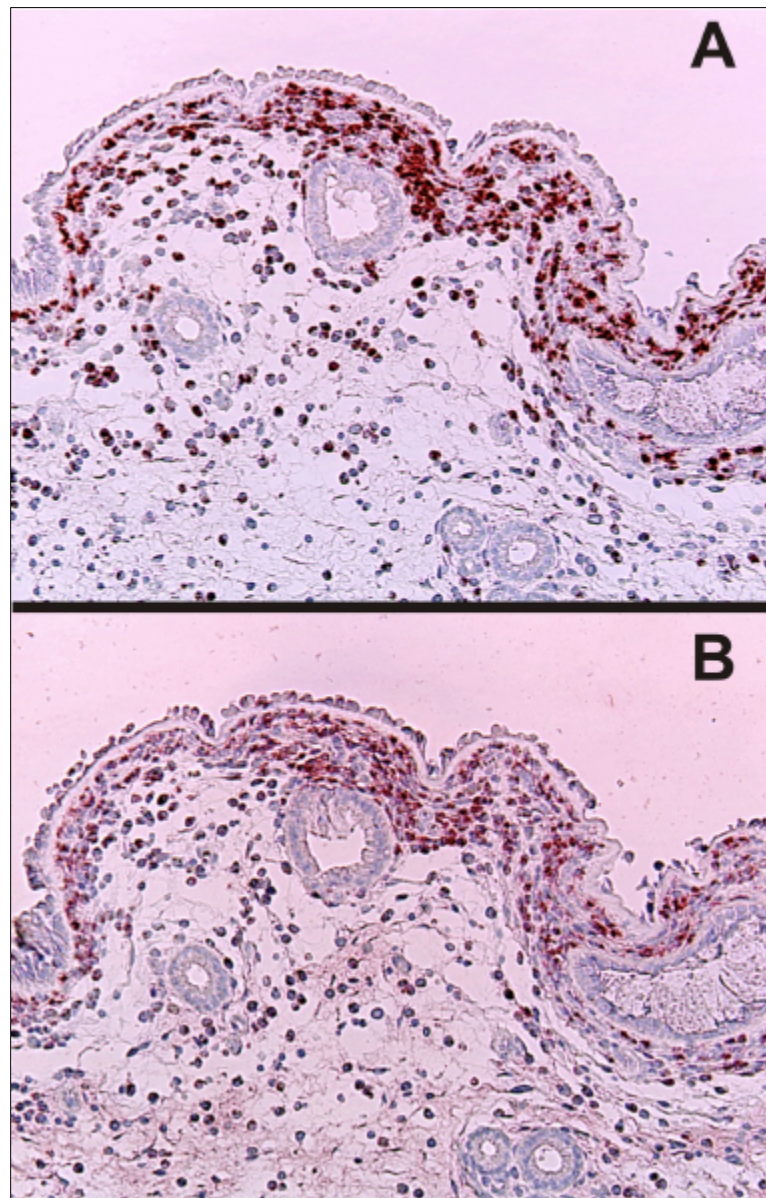


Figura 5 - Distribuição semelhante de eosinófilos (A) e células TGF- β positivas (B) no pólipó nasal. (microscopia óptica aumento x200)

5 DISCUSSÃO

A associação clínico-epidemiológica encontrada na PN com a asma e as semelhanças histológicas, celulares e moleculares descritas em ambas as doenças sugerem o envolvimento de um processo inflamatório comum, que pode ser mantido e amplificado por mecanismos inter-relacionados.

Discutiremos as correlações clínicas existentes entre a polipose nasal e asma, bem como as semelhanças e diferenças celulares observadas na imunohistoquímica.

5.1 Idade

A faixa etária dos pacientes variou de 14 a 80 anos, com média de 48 anos e desvio padrão de $\pm 12,2$ anos. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Rugina *et al.* (2002), em 224 pacientes com PN a idade variou de 14 a 73 anos com média de 46 anos.

No estudo de incidência realizado por Larsen e Tos (2002) na população da Dinamarca, observou-se que no grupo etário de 50 a 59 anos a incidência de PN (1,68/100.000 habitantes/ano) foi significativamente maior que na população geral (0,86/100.000 habitantes/ano). No presente

estudo, observa-se que a prevalência da PN foi mais alta na faixa etária acima dos 50 anos.

Comparando a idade dos pacientes com PN e asma e dos pacientes sem asma, não encontramos diferença significativa. Enquanto a idade média no grupo dos asmáticos foi de 46,7 anos, no grupo dos não-asmáticos foi de 51,2 anos.

Segundo a associação da PN com a asma, observamos tanto nos asmáticos como nos não-asmáticos predomínio da faixa etária acima dos 50 anos (Gráfico 1). Já no grupo abaixo de 20 anos encontramos apenas um caso de PN (grupo não-asmático), esse achado é concordante com os dados da literatura, de baixa prevalência de PN nas duas primeiras décadas de vida (Rugina *et al.* 2002, Johansson *et al.* 2003).

Estudos epidemiológicos sobre asma (Sunyer *et al.* 1997; Peat *et al.* 1994) mostram que a doença atinge todas as faixas etárias, e ao contrário da PN, a incidência e prevalência da doença é maior na infância do que na idade adulta.

O fato de a PN ser rara na infância (com exceção dos pacientes com fibrose cística) e da asma ser mais freqüente nesse grupo etário é um dado epidemiológico que a priori contradiz, pelo menos na infância, a associação da PN com a asma. Pois, se a asma é um fator de risco para PN haveria maior incidência e prevalência de PN na infância.

Uma possível explicação para esse fato está na existência de faixas etárias distintas, de acordo com o tipo de asma. Pois, a asma extrínseca ou alérgica, inicialmente descrita por Rackemann em 1947 *apud* Romanet-

Manent *et al.* (2002), refere-se ao quando clínico de asma desencadeada por inalação de alérgenos. Enquanto a asma intrínseca ou não-alérgica refere-se aos casos de pacientes asmáticos com teste cutâneo negativo para alérgenos inalantes.

Apesar de semelhanças imunológicas, epidemiologicamente a asma alérgica difere da asma não-alérgica. A prevalência da asma não-alérgica varia de 10 a 33% dos casos de asma, a idade de início dos sintomas é mais tardia, por volta dos 47 anos, apresenta predominância no sexo feminino e está associada à polipose nasal (Boushey *et al.*2000).

É interessante notar que a asma não-alérgica é o tipo observado com maior frequência na PN (Settipane *et al.*1997; Grigoreas *et al.* 2002). E nesse sentido, observamos que a idade dos indivíduos com asma não-alérgica encontrada na literatura é de 40 anos (Yasruel *et al.* 1997; Gern; Busse 2000; Romanet-Manent *et al.* 2002; Novak; Bieber 2003), sendo semelhante à idade encontrada na polipose nasal.

Portanto, considerando o tipo de asma, podemos dizer que a PN está relacionada principalmente com a asma não-alérgica quando comparada com a asma alérgica. (Settipane *et al.* 1997). No presente estudo, não foi identificado se a asma dos pacientes era do tipo alérgica ou não alérgica, mas pela faixa etária, sugere-se que haja predominância de pacientes com asma não alérgica.

No estudo de Romanet-Manent *et al.* (2002) a primeira crise de asma ocorreu, por volta dos 15 e 32 anos, na asma alérgica e não-alérgica, respectivamente. Cabe destacar que a prevalência da asma alérgica tem predomínio nas duas primeiras décadas de vida, enquanto que a asma não-

alérgica acomete a faixa etária entre 30 a 40 anos, isso pode nos levar a supor que os asmáticos estudados são na grande maioria do tipo não-alérgico. Isto é, a polipose nasal, raramente acomete indivíduos na faixa etária de 0 a 15 anos (período predominante da asma alérgica), pelo contrário o pico de incidência da polipose nasal ocorre na faixa etária acima dos 30 anos (período coincidente com a asma não-alérgica) (Settipane *et al.* 1997, Grigoreas *et al.* 2002).

Segundo Drake-Lee (1987) apud Kramer, Rasp (1999) raça e classe social parecem não influenciar na incidência da PN, permitindo assim a comparação entre os dados obtidos com os da literatura.

5.2 Sexo

Do total de 78 pacientes estudados, 55 (70,5%) foram do sexo masculino. Esse resultado está de acordo com aqueles encontrados na literatura, com predomínio do sexo masculino (Moloney 1977, Voegels 1998, 2001 e 2002, Larsen e Tos 2002, Rugina *et al.* 2002, Johansson 2003).

Analisando separadamente o grupo asmático e não-asmático, encontramos predomínio do sexo masculino em ambos os grupos (Tabela 2 e Gráfico 2). Porém, ao analisarmos a proporção masculino/feminino, observamos que no grupo asmático a proporção foi de 1,9 enquanto no grupo não-asmático de 4,5.

Na meta-análise realizada por Larsen (1996), a proporção masculino/feminino também é maior nos grupos com menor prevalência de asma. Nos pacientes do sexo masculino com PN a prevalência da asma

girou em torno de 21%, enquanto a prevalência no sexo feminino foi de 37%. Isto é, a prevalência da asma foi quase duas vezes maior em pacientes femininos com PN. Segundo o autor, o sexo feminino com PN apresenta maior tendência a desenvolver asma que o sexo masculino.

Rugina *et al.* (2002) encontraram predominância da PN no sexo masculino (62,9%). Entretanto, o sexo feminino esteve associado a maior prevalência de asma e maior gravidade da PN avaliada pela endoscopia nasal.

Esse fato também foi observado em nossa casuística, o que evidencia que a possibilidade de um paciente asmático desenvolver PN é maior no sexo feminino quando comparado com o sexo masculino.

5.3 Intolerância ao Ácido Acetil Salicílico

Indivíduos com intolerância ao AAS e com PN mostram características bastante semelhantes: ambos apresentam eosinofilia sérica, aumentam em frequência com a idade, não são mediadas pela IgE e estão relacionadas com a asma não-alérgica (Settipane *et al* 1997).

Jantti-Alanko *et al.* (1989) estudaram a recorrência da polipose nasal e observaram risco maior de recorrência nos pacientes com intolerância aos salicilatos e maior necessidade de utilização de corticosteróides tópicos quando comparado com pacientes sem intolerância. A asma e intolerância ao AAS estiveram presentes em 91% dos indivíduos com PN. Em nosso estudo, todos os pacientes com intolerância ao AAS apresentaram asma e PN, compondo a tríade completa descrita por Widal em 1922.

Em nossa casuística, 19,2% (15/78) dos pacientes com PN manifestaram intolerância ao AAS, este dado está de acordo com as porcentagens de indivíduos com PN e intolerância ao AAS descritas na literatura, que varia em torno de 3 a 35% (Delaney 1976, Drake-Lee *et al.* 1984, Braun *et al.* 1992, Schaitkin *et al.* 1993, Hoseman 2000, Becker 2001).

Apesar de não apresentar diferença estatística, encontramos a menor proporção masculino/feminino nos indivíduos com PN e intolerância ao AAS quando comparado com o grupo asmático e não-asmático (Tabela 3 e Gráfico 3). Esse dado é semelhante ao estudo de Larsen (1996) que observa entre os intolerantes ao AAS, maior predomínio no sexo feminino e maior gravidade da PN.

5.4 Imunoistoquímica

Acredita-se que o processo inflamatório na mucosa nasossinusal seja o fator central na fisiopatogenia da PN. O infiltrado celular inflamatório no pólipó nasal é constituído principalmente por eosinófilos, mastócitos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos. (Pawankar 2003, Hamilos 1996, Fokkens *et al.* 1990, Kawabori *et al.* 1992). Esse tipo de infiltrado celular é muito semelhante ao encontrados na mucosa de vias aéreas inferiores de asmáticos, o que sugere o envolvimento de mecanismos fisiopatogênicos semelhantes na asma e na PN (Djukanovic *et al.* 1990, Lamblin *et al.* 1999, Gaga *et al.* 2000).

Além da semelhança do infiltrado celular, estudos epidemiológicos mostram forte associação da PN com a asma, e a observação de que

pacientes com PN e asma apresentam maior gravidade e recorrência no pós-operatório (English *et al.* 1987, Kennedy 1992, Schaiktin *et al.* 1993, Larsen e Tos 1997, Wynn e Har-El 2004) sugere que o infiltrado de células inflamatórias na PN seja mais intenso quando existe a associação com a asma.

A imunistoquímica utiliza anticorpos monoclonais que reagem com o antígeno a ser estudado e permite a identificação específica do agente ou das células pertinentes. A vantagem desse método é que permite identificar de forma precisa e específica a célula a ser estudada e o local onde se encontra. Porém, em virtude da ausência de uniformidade e da grande variação da densidade tecidual do pólipó nasal, uma dificuldade encontrada nesse método é de quantificar os resultados. Para minimizar essa ausência de uniformidade, utilizamos a média de dez campos microscópicos, distribuídos aleatoriamente ao longo da lâmina própria do pólipó nasal.

A imunistoquímica é um método de fácil utilização que apresenta como vantagem a identificação precisa do antígeno, através da utilização de anticorpos monoclonais. Seu uso permitiu identificar com precisão eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF- β positiva. O TGF- β é uma citocina, cuja quantificação pode ser realizada pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA), que mede a concentração da citocina no tecido ou nas secreções. Porém como também é possível identificar as células que contém o TGF- β no tecido (Barral-Netto *et al.* 1992; Vignola *et al.* 1997; Wang *et al.* 1997; Morishima *et al.* 2001) utilizando a imunistoquímica, optamos por utilizar tal método para uniformizar a metodologia para todos os antígenos utilizados.

Como alguns autores (Fokkens *et al.* 1990, Hamilos *et al.* 1999; Braunstahl *et al.* 2000, Bhattacharyya *et al.* 2001), optamos por quantificar as células positivas por campo, tomando como referência a membrana basal do epitélio e pelo menos 1 mm de profundidade na lâmina própria.

5.4.1 Eosinófilos

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea, abundantes nos infiltrados inflamatórios das reações de fase tardia e contribuem em vários processos patológicos nas doenças alérgicas. Os eosinófilos estão normalmente presentes nos tecidos periféricos, em especial nos revestimentos mucosos, nos tratos respiratórios, gastrointestinal e gênito-urinário (Abbas *et al.* 2003). Possuem no seu interior hidrolases e proteínas eosinófilos-específica, como a proteína catiônica eosinofílica e proteína básica principal. Utilizamos a imunoistoquímica para identificação dos eosinófilos no pólipó nasal e como anticorpo monoclonal optamos pelo anti-EG2, marcador específico da proteína catiônica eosinofílica, presente no eosinófilo (Tai *et al.* 1984a, 1984b).

O número de eosinófilos no pólipó nasal de indivíduos asmáticos foi estatisticamente maior quando comparado com o pólipó nasal de não asmáticos. Esse resultado é concordante com a maioria dos estudos que mostram correlação da eosinofilia no pólipó e mucosa nasal com a presença de asma (Harlin *et al.* 1988, Baroody *et al.* 1995; Krajina e Zirdum 1987, Ponikau *et al.* 2003). O único estudo que mostrou discordância foi o de Park *et al.* (1998) que utilizando imunoistoquímica, encontraram número

aumentado de eosinófilos no pólipó nasal de indivíduos com asma e intolerância à aspirina, porém, não houve diferença estatística quando comparado com o pólipó de indivíduos não asmáticos.

Ao analisarmos o grupo de asmáticos com tolerância e intolerantes ao AAS, não observamos diferença estatística entre os grupos (tabela 5). Esse resultado é concordante com os estudos de Park *et al.* (1998), que demonstraram abundantes eosinófilos no pólipó nasal de pacientes com intolerância ao AAS, porém sem diferença estatística de seu número em relação ao grupo controle. Seria esperado que o número de eosinófilos nos asmáticos fosse maior no grupo com intolerância ao AAS, visto que a intolerância ao AAS representa um estado mais “avançado”.

Lamblin *et al.* (1999) observaram que os pacientes com PN apresentando hiperreatividade brônquica apresentaram eosinofilia pulmonar semelhante à observada em pacientes com asma. Gaga *et al.* (2000) relataram que a mucosa nasal de indivíduos asmáticos apresentou número maior de eosinófilos quando comparado com a mucosa nasal de indivíduos saudáveis.

Ponikau *et al.* (2003) demonstraram características histopatológicas da asma como o infiltrado eosinofílico e remodelamento também estão presentes na rinosinusite crônica e polipose nasal. Esses achados sugerem a coexistência de ambas as doenças, com envolvimento do mesmo processo patológico.

No estudo imunoistoquímico de nossa casuística, não houve diferença qualitativa dos eosinófilos entre asmáticos e não-asmáticos, visto que

observamos a presença de eosinófilos em todos os pólipos nasais estudados. Esse resultado também foi relatado por Larsen e Tos (1997), que observou a presença de eosinófilos em praticamente todos os pólipos nasais. Porém, quantitativamente, de acordo com a presença ou não de asma, o número de eosinófilos no pólipo nasal, foi maior nos indivíduos com asma quando comparado com a PN sem asma. Pelas diversas evidências que sugerem fisiopatogenia semelhante (Harlin *et al.* 1988, Newman *et al.* 1994, Jordana e Dolovich 1997, Bachert *et al.* 1997, Mygind *et al.* 2000, ten Brinke *et al.* 2002), a presença da asma na PN determinou maior quantidade de eosinófilos no pólipo nasal.

A comparação dos resultados do presente trabalho, com os estudos histológicos do tecido pulmonar asmático da literatura, mostra que os achados característicos da asma são qualitativamente similares nos quadros leve, moderado e severo. (Jeffery *et al.* 1989, Wardlaw *et al.* 1988, Kay 1996, Boushey *et al.* 2000). Em relação à quantificação dos eosinófilos, existem evidências que o número de eosinófilos no tecido pulmonar e na secreção brônquica é maior nos quadros mais severos (Bousquet *et al.* 1990, Djukanovic *et al.* 1990).

Considerando que a associação da asma com a PN torna a última mais severa, e baseada no fato de que quadros mais severos estão relacionados com maior número de eosinófilos, o resultado do presente estudo confirma essa hipótese, demonstrando maior quantidade de eosinófilos no pólipo nasal associado à asma quando comparado com o PN sem essa associação.

5.4.2 Mastócitos

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea, possuem no seu interior grânulos contendo histamina, heparina, sulfato de condroitina e proteases como a triptase e quimase. São ativados pela ligação cruzada entre duas moléculas de IgE, ligadas a receptores na superfície de mastócitos por alérgenos específicos. Sua ativação resulta na liberação do conteúdo pré-formado dos grânulos. Porém, mecanismos não mediados pela IgE podem também ativar os mastócitos, causando sua degranulação (Abbas *et al.* 2003).

A triptase é exclusiva dos mastócitos e por esse motivo que utilizamos o anticorpo monoclonal AA1 que marca a triptase presente nos mastócitos (Djukanovic *et al.* 1990, Walls *et al.* 1990a, 1990b e 1991).

No presente estudo, a quantidade de mastócitos encontrada no pólipó nasal de indivíduos asmáticos e não asmáticos não apresentou diferença estatística.

Nos indivíduos asmáticos encontramos em média $13,33 \pm 5,70$ células por campo e nos não-asmáticos $12,37 \pm 4,77$ células por campo. No grupo controle o número de mastócitos foi de $5,82 \pm 1,9$ células por campo.

Os resultados de nossa casuística são semelhantes aos descritos por Park *et al.* (1998). Os autores não encontraram diferença estatística no número de mastócitos do pólipó nasal de indivíduos com intolerância ao AAS, polipo nasal associado à alergia e polipo nasal sem associação com alergia. Nesse estudo, os autores sugerem que os mastócitos podem ser responsáveis pela resposta inflamatória na PN, independentemente de sua associação com a intolerância ao AAS.

Na literatura encontramos dados discordantes quanto ao número de mastócitos no pólipó nasal de indivíduos asmáticos e não asmáticos, a maioria dos dados mostra maior número de mastócitos quando existe associação com a asma (Rhuno *et al.* 1990; Jankowski *et al.* 1989; Yamashita *et al.* 1989; Park *et al.* 1998; Loesel 2001; Nasser *et al.* 1996; Kowalski *et al.* 2002).

Em nosso estudo, todos os pólipos apresentaram mastócitos triptase positivos na lamina própria. Em relação ao grupo controle, tanto o pólipó nasal de indivíduos asmáticos como o pólipó nasal de não-asmáticos mostraram maior número de mastócitos. Esse é um dado semelhante ao encontrado por Rhuno *et al.* (1990), isto é, no pólipó nasal, independentemente da presença ou não de asma, o número de mastócitos é maior que na mucosa nasal normal.

No tecido pulmonar, também existem controvérsias, porém a maioria dos dados da literatura mostra número maior de mastócitos no tecido pulmonar de asmáticos em relação aos indivíduos não asmáticos (Wasserman 1994; Santos 2001). Por compartilharem características histológicas semelhantes, seria esperado que o pólipó nasal de indivíduos asmáticos apresentasse maior quantidade de mastócitos que o pólipó nasal de não asmáticos.

Brightling *et al.* (2002) demonstraram que a localização dos mastócitos ao redor da musculatura lisa brônquica está associada à obstrução da via aérea encontrada na asma. Esse estudo chama a atenção para a importância da localização do mastócito próximo à musculatura lisa

para a manifestação da asma. De forma semelhante, os estudos de Sasaki (1986) e Sun (1991), chamam a atenção para a localização dos mastócitos, e demonstraram que no pedículo do pólipó nasal, existe maior número de mastócitos, como também, maior número de células degranuladas em relação ao ápice e corpo.

Kawabori *et al.* (1992) demonstraram que o estado de ativação/degranulação dos mastócitos no estroma é estatisticamente maior que no epitélio. Sugerem que micro ambientes distintos são responsáveis por afetar os mastócitos nesses locais. No pólipó nasal, a micro localização do mastócito ao redor de seu pedículo está relacionada com maior acúmulo celular e número de células degranuladas.

Finotto *et al.* (1994) também sugerem que exista heterogeneidade funcional e diferença de mediadores nas subpopulações de mastócitos, ao observarem que os mastócitos localizados no estroma do pólipó nasal apresentaram maior quantidade de triptase quando comparado com os mastócitos da camada epitelial.

Com base nesses estudos, os mastócitos dos pacientes com PN e asma, podem apresentar atividade celular aumentada e micro localizações distintas dos mastócitos de um pólipó nasal sem associação com a asma. Essa hipótese poderia ser uma das razões para explicar o número semelhante de mastócitos nos dois grupos estudados e a maior gravidade e recorrência da PN associada à asma. Ou seja, apesar de quantitativamente semelhantes, a atividade e localização dos mastócitos podem ser distintas, causando manifestações clínicas distintas.

Pela dificuldade de delimitar as diversas regiões do pólipó (pedículo, corpo, ou ápice) não foi possível estudar a distribuição do mastócito na presente casuística. A metodologia utilizada permitiu obter apenas a quantidade de células positivas por campo e não a sua localização e estado de atividade celular.

5.4.3 Miofibroblastos e células TGF- β positivas

Os miofibroblastos são fibroblastos ativados que possuem no seu interior fibras de musculatura lisa compostas de actina α . São derivados dos fibroblastos que são ativados pelo TGF- β , citocina de composição protéica de 25 – kD de peso molecular (Barnard *et al.* 1990) células, entre elas eosinófilos, linfócitos, macrófagos, células epiteliais e fibroblastos (Elovic *et al.* 1994; Ohno *et al.* 1992). Utilizamos anticorpo monoclonal anti-SMA que marca especificamente células que contêm a musculatura lisa actina α e permite identificar os miofibroblastos (Skalli *et al.* 1986). E o anticorpo monoclonal anti-TGF β que identifica as células que contêm o TGF- β . (Barral-Netto *et al.* 1992; Vignola *et al.* 1997).

Tanto os miofibroblastos como as células TGF- β positivas estiveram aumentadas no pólipó nasal de indivíduos asmáticos quando comparados com os não asmáticos e controles. O número de miofibroblastos observados no pólipó nasal do grupo de asmáticos com intolerância ao AAS foi menor que grupo de asmáticos tolerantes ao AAS (Tabela 5).

Os miofibroblastos descritos por Wang *et al.* (1997) estiveram aumentados no pólipó nasal e raramente encontrados na mucosa nasal. O

presente estudo também mostrou número aumentado de miofibroblastos no pólipio nasal quando comparado com a mucosa normal. Ao quantificamos os miofibroblastos no pólipio nasal segundo a associação com a asma, observamos que o número de miofibroblastos no grupo de asmáticos foi estatisticamente maior quando comparado com o grupo não-asmático.

Não encontramos na literatura estudos específicos a respeito da quantificação dos miofibroblastos na PN associada com a asma. Porém, o fato da PN compartilhar características histológicas, celulares e moleculares com a asma, permite supor que estudos sobre miofibroblastos no tecido pulmonar de asmáticos, possam contribuir na comparação e análise dos resultados observados em nossa casuística.

Vários estudos no tecido pulmonar de asmáticos descrevem o aumento de miofibroblastos e sua íntima relação com a presença do TGF- β . Gizycki *et al.* (1997) encontraram número estatisticamente aumentado de miofibroblastos na mucosa brônquica de indivíduos asmáticos quando comparado com indivíduos não asmáticos. Vignola *et al.* (1997), observaram que o TGF- β , é sintetizado pelos eosinófilos e miofibroblastos presentes na mucosa brônquica dos indivíduos asmáticos. Hashimoto *et al.* (2001) observaram que o TGF- β 1 é capaz de induzir a modulação fenotípica de fibroblastos para miofibroblastos. Morishima *et al.* (2001) demonstraram que o TGF- β induz a formação de miofibroblastos que por sua vez irão sintetizar colágeno.

A associação da PN com a asma demonstrou um aumento de miofibroblastos e células TGF- β positiva quando comparada com a PN sem associação com a asma. A comparação desse resultado, com o fato dos

miofibroblastos serem responsáveis pela produção de colágeno, matriz extracelular e remodelamento na asma, sugere que o maior número de miofibroblastos no pólipos nasal de asmáticos, possa estar envolvido na sua formação, gravidade e maior número de recorrência.

5.4.4 Correlação da contagem células com a presença de asma

A correlação de Spearman descreve a associação de duas variáveis não-paramétricas, não faz julgamento se uma é causa ou consequência da outra. É utilizada para estudar quão consistentemente duas variáveis mudam em conjunto (Doria Filho, 1999)

Ao correlacionarmos mastócitos, eosinófilos, miofibroblastos, células TGF- β positiva e presença de asma (Tabela 6), observamos que o miofibroblasto foi a única variável que esteve correlacionada com todas as outras variáveis.

A correlação do miofibroblasto com a presença de asma, com o eosinófilo e células TGF- β positivas já era esperada pelo aumento de todas essas células no grupo de pacientes asmáticos, e por compartilharem fisiopatogenia semelhantes. A observação dessa correlação sugere que a presença da asma está relacionada com um aumento de eosinófilos, que é uma das principais fontes de TGF- β , que ao estimular a transformação fenotípica de fibroblastos para miofibroblastos, aumenta essas células no pólipos nasal.

Porém, o mastócito foi a única variável que não mostrou correlação com a presença de asma, eosinófilos e células TGF- β positivas. O fato

interessante foi a correlação do mastócito com o miofibroblasto. Esse dado chama a atenção para a existência de uma possível interação entre mastócitos e miofibroblastos.

Aqui encontramos um gancho para futuras pesquisas baseados nas interações descritas entre mastócitos e células da musculatura na via aérea de asmáticos (Page *et al.* 2001).

A asma e a bronquite eosinofílica apresentam infiltrado inflamatório semelhante. Apesar da inflamação eosinofílica ser a característica principal da asma, a presença dos eosinófilos parece não estar relacionada com a disfunção da via aérea. Pois como demonstrado por Gibson *et al.* (1989) e Brightling *et al.* (1999, 2000) pacientes com bronquite eosinofílica, não apresentam obstrução da via aérea e possuem o mesmo grau de eosinofilia de vias aéreas que os pacientes asmáticos. A partir dessa observação Brightling *et al.* (2002) demonstraram que a única diferença imunopatológica encontrada na asma e na bronquite eosinofílica, foi a presença de mastócitos permeando a musculatura lisa da mucosa brônquica de asmáticos, enquanto que, nos pacientes com bronquite eosinofílica e controle normais, não foram encontrados mastócitos próximo à musculatura lisa.

Esse achado levanta a hipótese que a disfunção da via aérea na asma seja decorrente de uma “miosite da musculatura lisa” causada por mastócitos. Com isso, os autores especulam que a interação entre mastócitos e células da musculatura lisa seja um elemento chave na fisiopatogenia da asma (Brightling *et al.* 2003).

Ao compararmos esses dados com os resultados do presente estudo, podemos supor que a correlação entre mastócitos e miofibroblastos encontrada na PN, seja reflexo da interação celular envolvendo mecanismos semelhantes ao da “miosite da musculatura lisa”, observada no tecido pulmonar de asmáticos.

Fazendo uma analogia dos mastócitos na asma, em que sua micro localização ao redor das células da musculatura lisa dos brônquios desempenha um fator chave na fisiopatologia respiratória provocando broncoconstrição (Brightling *et al.* 2003). Na PN os mastócitos pela micro localização na profundidade do estroma (Pawliczak *et al.* 1997, Finotto *et al.* 1994, Kawabori *et al.* 1992, Drake-Lee e Price 1997, Sasaki 1986) vão de forma direta, induzir a inflamação eosinofílica através da liberação de vários mediadores inflamatórios (Pawankar 2003, Di Lorenzo *et al.* 2001), ou indiretamente, através da ativação de células estruturais (fibroblastos e miofibroblastos) contribuindo para a formação e progressão dos pólipos nasais.

Ou seja, supomos que de acordo com sua micro localização o mastócito irá provocar uma reação principal:

- No pulmão asmático há predomínio de mastócitos na musculatura lisa brônquica, sua ativação e degranulação estão relacionadas com a broncoconstrição.

- No pólipos nasal há predomínio de mastócitos na porção profunda da mucosa (local com fibroblastos e miofibroblastos), sua ativação está relacionada com a formação de edema e desenvolvimento do pólipo.

5.5 Considerações Finais

A análise dos resultados mostrou que inflamação eosinofílica foi o denominador comum entre a PN e asma. Porém, apesar dos eosinófilos estarem presentes em todos os pólipos, nem todos os pacientes com PN apresentaram asma.

A associação com a asma foi responsável pelo maior número de eosinófilos, miofibroblastos e células TGF- β positiva no pólipo nasal, quando comparado com o pólipo nasal sem associação com a asma. Porém, em relação ao número de mastócitos, a associação da PN com a asma não representou um fator de diferença.

A presença de asma mostrou correlação com eosinófilos, miofibroblastos e células TGF- β positivas; e não mostrou correlação com o número de mastócitos. Independentemente da presença de asma, houve correlação entre mastócitos e miofibroblastos.

O miofibroblasto foi o denominador comum na correlação com eosinófilos, mastócitos, células TGF- β positiva e presença de asma. Esse fato sugere que o miofibroblasto, agindo como célula estrutural e inflamatória, tenha um papel importante na fisiopatogenia e na interação celular do infiltrado inflamatório encontrado na polipose nasal.

6 CONCLUSÕES

a) Em todos os pólipos nasais identificou-se eosinófilos, mastócitos, miofibroblastos e células TGF- β positivas independentemente da presença ou não de asma.

b) A quantidade de eosinófilos, miofibroblastos e células TGF- β positivas esteve aumentada no pólipo nasal de indivíduos asmáticos em relação ao pólipo nasal de indivíduos não asmáticos.

c) O número de mastócitos mostrou-se semelhante em todos os pólipos nasais, independente da presença ou não de asma.

d) Os eosinófilos, miofibroblastos, e células TGF- β positivas correlacionaram-se com a presença de asma.

e) Os mastócitos não estiveram correlacionados com a presença de asma, eosinófilos e células TGF- β positivas.

f) O miofibroblasto foi o denominador comum na correlação entre eosinófilos, mastócitos, células TGF- β positivas e presença de asma.

7 ANEXOS

Anexo A - Desidratação e inclusão em blocos de parafina

As peças foram lavadas em água corrente por 15 minutos, seguido de desidratação em quatro cubas contendo álcool absoluto, durante uma hora cada uma. Em seguida o material foi mergulhado em xilol por duas vezes, com duração de duas horas cada. Realizado a diafanização com mergulho da amostra em parafina por uma hora. Em parafina nova e limpa, realizou-se a inclusão da peça em blocos.

Anexo B - Coloração com hematoxilina e eosina para histologia

A coloração com hematoxilina e eosina ocorreu da seguinte maneira:

- hematoxilina férrica de Harris – dois minutos;
- lavagem com água destilada – cinco minutos;
- eosina – cinco minutos;
- lavagem com água destilada – cinco minutos;
- montagem com lamínula em meio a base de xileno.

Anexo C - Idade, sexo, presença ou ausência de asma

Número do prontuário	Int AAS = 1 Asma = 2 Não asma = 3	Masculino=1 Feminino=2	Idade (anos)
117-4466-9	1	2	30
118-0626	1	1	29
119-2257-5	1	2	49
118-8442-8	1	2	35
119-2423-3	1	1	47
116-6461-4	1	1	46
120-5136-5	1	2	56
120-7161-7	1	2	49
123-0387-9	1	2	58
125-1863-8	1	1	54
126-1614-1	1	1	39
128-7449-3	1	1	55
114-1379-4	2	2	54
114-3724-3	2	1	40
42-8484-4	2	2	52
112-1886-A	2	1	50
115-1915-0	2	2	31
115-4265-	2	1	64
117-1771	2	1	54
117-6935-1	2	1	55
102-9123-7	2	1	44
119-6504-1	2	1	46
119-8386-8	2	1	48
120-6451-3	2	2	37
112-2418-5	2	1	28
65-2918-6	2	2	54
120-8657-6	2	1	50
121-0075-7	2	1	25
121-2077-4	2	2	57
122-0280-0	2	1	42
122-4456	2	1	61
118-6838-4	2	1	47
124-1337-2	2	1	65
116-5570-4	2	2	48
124-6210-1	2	2	51
124-3373-A	2	2	32
124-8785-A	2	1	56
125-1859-A	2	2	58
125-4156-7	2	1	57
79-3022-4	2	1	52

Continua

Conclusão

Número do prontuário	Int AAS = 1 Asma = 2 Não asma = 3	Masculino=1 Feminino=2	Idade (anos)
125-7827-4	2	2	55
111-6227-9	2	1	30
126-5698-4	2	1	45
103-5319-4	2	1	24
127-5811-6	2	2	36
054-4728	2	1	62
127-7449-9	2	2	53
127-9974-2	2	1	40
129-4510-2	1	1	46
129-9436-7	2	1	60
128-1988-3	3	2	14
129-9887-7	3	1	54
10-1221-5	3	1	42
75-7309-A	2	1	51
117-0381-4	3	2	55
126-6037-A	3	1	56
126-9423-1	3	1	38
127-3014-9	3	1	54
127-3385-7	3	1	61
127-8323-4	2	1	28
128-1987-5	3	2	45
128-6464-1	3	1	60
129-1763-A	3	1	49
128-3170-0	3	1	62
129-8068-8	3	1	80
75-1788-2	3	1	65
129-7578	3	2	36
125-3313-0	3	1	60
125-7076-1	3	1	34
121-3350-7	2	1	27
91-6832-A	3	1	57
126-1426-2	2	1	39
125-5745-5	3	1	59
94-3399-6	3	1	63
125-8911-A	3	1	29
126-4822-1	3	1	54
105-7437-9	1	1	58
118-0224-3	1	1	58
117-4466-9	1	2	30
118-0626	1	1	29
119-2257-5	1	2	49
118-8442-8	1	2	35
119-2423-3	1	1	47
116-6461-4	1	1	46
120-5136-5	1	2	56

Anexo D - Média do número de mastócitos, eosinófilos, miofibroblastos e células TGF- β positivas

Número do prontuário	Mastócitos	Eosinófilos	Miofibroblastos	TGF-β positivas
117-4466-9	7,9	33,1	5,9	12,7
118-0626	6,9	36,5	13,5	30,4
119-2257-5	9,5	33,2	9	41,6
118-8442-8	11	44,9	2,7	53,7
119-2423-3	7,2	31,9	7,7	27,6
116-6461-4	5,3	23,3	4,1	15,2
120-5136-5	8,7	22,4	3,4	19,3
120-7161-7	9	89,6	4,1	9,3
123-0387-9	12,8	59	2,7	14,3
125-1863-8	11,1	107,9	7	55,8
126-1614-1	7,7	48,3	20,4	37,9
128-7449-3	6,8	84,4	24,9	65,9
114-1379-4	1,8	25,6	14,4	10,9
114-3724-3	2,3	33	16	16,3
42-8484-4	13,6	28,2	16,6	19,1
112-1886-A	7,7	28,6	7,1	19,8
115-1915-0	12,9	35,6	13,5	2,4
115-4265-	14,7	79,6	22,6	22
117-1771	19,9	59	18,7	33,2
117-6935-1	19,3	36,4	28,6	22
102-9123-7	10,9	50,2	20,9	25,3
119-6504-1	17,6	73,8	34,6	91,5
119-8386-8	18,2	19,2	14,8	12,8
120-6451-3	17,5	15,2	22	47,1
112-2418-5	17,5	67	19,7	27,2
65-2918-6	5,7	56,5	27,1	36,9
120-8657-6	19	42,5	23,2	19,2
121-0075-7	12,7	46,2	25,2	17
121-2077-4	12,1	66,3	17	35,9
122-0280-0	30,7	22,4	19,4	25,7
122-4456	26	102,6	42,9	74,8
118-6838-4	11,6	53,3	59,2	58,3
124-1337-2	10,8	48,2	21,5	15,6
116-5570-4	26,6	48,7	30,5	44,9
124-6210-1	12	96,4	41,4	51,2
124-3373-A	18,5	2,3	33,9	0
124-8785-A	16,3	25,7	25,3	24,8
125-1859-A	16,9	89,5	31,7	40,9
125-4156-7	13	69,7	50,4	37,4
79-3022-4	19,1	45,1	26,3	18,4
125-7827-4	16,3	50,1	32,3	66,6

Continua

Conclusão

Número do prontuário	Mastócitos	Eosinófilos	Miofibroblastos	TGF-β positivas
111-6227-9	10,1	153,8	47,4	156
126-5698-4	12,5	0,9	37,7	114
103-5319-4	11,9	43,2	20,4	37,3
127-5811-6	8,4	76,1	28,8	117,7
054-4728	17,4	31,6	33,5	44,8
127-7449-9	18,5	107,3	36,6	56
127-9974-2	18,8	111,4	46,6	45,8
129-4510-2	6,8	82,6	38,6	30,8
129-9436-7	17,6	47	37,9	14,8
128-1988-3	21,1	4,9	32,1	7,7
129-9887-7	16,2	45,9	22,2	15
10-1221-5	12,7	25,1	11,6	13
75-7309-A	10,4	46,2	23,5	35,8
117-0381-4	10,8	16,3	16,2	11,9
126-6037-A	12,7	29,9	12	29,2
126-9423-1	9,5	51,8	2,1	43,6
127-3014-9	21,1	23,9	14,8	24,6
127-3385-7	13,8	9,4	14	12,2
127-8323-4	15,8	8,5	19,2	15,2
128-1987-5	12,9	0	10	11
128-6464-1	13,2	6,1	7,6	5,2
129-1763-A	17,1	22,1	7	13,7
128-3170-0	6,3	13,9	4,7	15,8
129-8068-8	4,3	9,8	4,6	3,5
75-1788-2	6,9	7,6	9,5	9,8
129-7578	4	11,3	5,2	6,7
125-3313-0	15,3	5,2	5,2	4,6
125-7076-1	10,3	3,6	13,6	1
121-3350-7	12,1	62,6	33,4	30,1
91-6832-A	6,7	132	23,4	13
126-1426-2	15,3	16,4	28,4	3
125-5745-5	13,3	8	17,4	12,2
94-3399-6	14,2	12	15,5	25
125-8911-A	17,1	12,3	28,2	4,5
126-4822-1	12,7	26,5	11,5	16,9
105-7437-9	13,7	83,85	43,9	58
118-0224-3	12,2	170,2	44,7	58,1

8 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 4a ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

Bachert C, Hormann K, Mosges R, Rasp G, Riechelmann H, Muller R, Luckhaupt H, Stuch BA, Rudack C. An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis. *Allergy*. 2003;58: 176-191.

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor β . *Biochim Biophys Acta*. 1990;1032:79-87.

Baroody FM, Hughes AC, McDowell P, Hruban R, Zinreich SJ, Naclerio RM. Eosinophilia in chronic childhood sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;121: 1396-1402.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*. 1992;257(5069):545-8.

Batsakis JG. Stromal cell atypia in sinonasal polyposis. *Ann Otol, Rhinol & Laryngol*. 1986;95:321-2.

Baugarten C, Kunkel G, Rudoph R, Staud D, Sperner I, Gelderblom H. Histopathological examinations of nasal polyps of different etiology. *Arch Otorhinolaryngol.* 1980, 226:187-197.

Becker HMG. Estudo clínico-imunológico e pesquisa de eosinofilia conjuntival em pacientes portadores de polipose nasossinusal eosinofílica associada a intolerância aspirínica e a rinite eosinofílica não alérgica. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Bellioni P, Ruscito P, Bevilacqua P, Maurizi M, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A. Recent advances concerning etiopathogenesis of nasal polyposis. [abstract] *Acta Otorhinolaryngologica Italica.* 1989;9(Suppl1):3-13.

Bhattacharyya N, Vyas DK, Fechner FP, Gliklich RE, Metson R. Tissue eosinophilia in chronic sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:1102-1105.

Boushey HA, Corry DB, Fahy JV. *Asthma.* In: Murray JF, Nadel JA, Mason RJ, Boushey HA. *Textbook of respiratory medicine.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 1255- 1270.

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323(Suppl15):1033-9.

Braun JJ, Haas F, Conraux C. Polyposis of the nasal sinuses. Epidemiology and clinical aspects of 350 cases. Treatment and follow-up over 5 years on 93 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1992;109:189-199.

Braunstaal GJ, Kleinjan A, Overbeek SE, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:2051-2057.

Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:550-556.

Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med.* 2002; 346:1699-1705.

Brightling CE, Ward R, Goh KL, Wardlaw AJ, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:406-10.

Brightling CE, Ward R, Woltmann G, et al. Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:878-82

Busuttill A, More IA, McSeveney D. Ultrastructure of the stroma of nasal polyps: cilia in stromal fibroblasts. *Arch of Otolaryngol.* 1976;102(Suppl10):589-95.

Byrne DW. Publishing your medical research paper. 1st ed. Baltimore: Lippincott Williams Wilkins, 1997.

Chang CH, Chai CY, Ho KY. Expression of transforming growth factor- β 1 and alpha-smooth muscle actin of myofibroblast in the pathogenesis of nasal polyps. *J Med Sci*. 2001;17: 133-138.

Coste A, Lefaucheur JP, Wang QP. Expression of the transforming growth factor β isoforms in inflammatory cells of nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 124:1361-1366.

Delaney JC. Aspirin idiosyncrasy in patients admitted for nasal polypectomy. *Clin Otolaryngol*. 1976;1(Suppl1):27-30.

Di Lorenzo G, Drago A, Pellitteri ME, Candore G, Colombo A, Gervasi F, Pacor ML, D'Ambrosio FP, Caruso C. Measurement of inflammatory mediators of mast cells and eosinophils in native nasal lavage fluid in nasal polyposis. *Int Arch of Allergy & Immunol*. 2001;125(Suppl2):164-75.

Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(Suppl4):863-71.

Doria FU. Introdução à bioestatística: para simples mortais. 1ª ed. São Paulo: Negócio Editora, 1999.

Downing E. Bronchial reactivity in patients with nasal polyps before and after polypectomy. *J Allerg Clin Immunol.* 1982; 69:102-10.

Drake-Lee A. Price J. Mast cell ultrastructure in the inferior turbinate and stroma of nasal polyps. *Journal of Laryngology & Otology.* 1997; 111(4):340-5

Drake-Lee AB, Chevreton E, Lowe D. The effects of different fixations on the distribution and numbers of mast cells in patients with nasal polyps. *J Laryngol Otol.* 1988, 102:1099-101.

Drake-Lee AB. Lowe D. Swanston A. Grace A. Clinical profile and recurrence of nasal polyps. *J Laryngol Otol.* 1984;98(8):783-93.

Elovic A, Wong DTW, Weller PF, Matossian K, Galli SJ. Expression of transforming growth factor- β and mRNA and product by eosinophils in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 93:864-869.

English GM, Spector S, Farr R, Carr R. Histopathology and immunofluorescent immunoglobulins in asthmatics with aspirin idiosyncrasy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 113:377-79.

Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF- β 1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res*. 2003;282(2):90-100.

Finotto S, Dolovich J, Denburg JA, Jordana M, Marshall JS. Functional heterogeneity of mast cells isolated from different microenvironments within nasal polyp tissue. *Clin Exp Immunol*. 1994;95(Suppl2):343-50.

Fokkens WJ, Holm AF, Rijntjes E, Mulder PG, Vroom TM. Characterization and quantification of cellular infiltrates in nasal mucosa of patients with grass pollen allergy, non-allergic patients with nasal polyps and controls. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1990;93(1):66-72.

Gaga M, Lambrou P, Papageorgiou N, Koulouris NG, Kosmas E, Fragakis S. Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:663-69.

Gern JE, Busse WW. The role of viral infections in the natural history of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:201-12.

Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale EH, Hargreave FE. Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet*. 1989;1:1346-8.

Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV. Myofibroblast Involvement in the Allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:664-73.

Grigoreas C, Vourdas D, Petalas K, Simeonidis G, Demeroutis I, Tsioulos T. Nasal polyps in patients with rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2002;23(Suppl3):169-74.

Hamilos DL, Nasal Polyps as immunoreactive tissue. *Allergy Asthma Proc.* 1996; 17:293-296.

Hamilos DL, Thawley SE, Kramper MA, Kamil A, Hamid Q. Effect of intranasal fluticasone on cellular infiltration, endothelial adhesion molecule expression, and proinflammatory cytokine mRNA in nasal polyp disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:79-87.

Harlin SI, Ansel DG, Lane SR, Myers J, Kehpard GM, Gleich GJ. A clinical and pathologic study of chronic sinusitis: the role of the eosinophil. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;81:867-75.

Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T. transforming growth factor induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblasts through a cJun-NH-terminal Kinase-Dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:152-157

Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance and chronic obstructive pulmonary disease in a population based study. *Int J Epidemiol.* 1999;28:717-22.

Hellquist HB. Histopathology. *Allergy and Asthma Proc.* 1996; 17:237-242.

Hosemann W. Surgical treatment of nasal polyposis in patients with nasal polyposis with aspirin intolerance. *Thorax.* 2000;55(Suppl2): 87-90.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled anti-body (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29:577-81.

Jankowski R, Bene MC, Moneret-Vautrin AD, Haas F, Faure G, Simon C, Wayoff M. Immunohistological characteristics of nasal polyps. A comparison with healthy mucosa and chronic sinusitis. *Rhinol.* 1989;8:51-8.

Jankowski R, Pigret D, Decroocq F. Comparison of functional results after ethmoidectomy and nasalization for diffuse and severe nasal polyposis. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1997;117:601-8.

Jantti-Alanko S, Holopainen E, Malberg H. Recurrence of nasal polyps after surgical treatment. *Rhinol.* 1989;8:59-64.

Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Disease*. 1989;140(Suppl6):1745-53.

Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melen I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skovde population-based study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112(Suppl7):625-9.

Jordana M, Dolovich J. Eosinophils in nasal polyps. In: Settupane GA, Lund VJ, Bernstein JM, Tos M, eds. *Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment*. Jordana M, Dolovich J. Eosinophils in nasal polyps. In: Settupane GA, Lund VJ, Bernstein JM, Tos M, eds. *Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment*. Providence, Rhode Island: Oceanside publication; 1997. p 49-56.

Kakoi H, Hiraide F. A histological study of formation and growth of nasal polyps. *Acta Otolaryngol (Stock)*. 1987;103:137-144.

Kaliner M, Wasserman SI, Austen KF. Immunologic release of chemical mediators from human nasal polyps. *New Eng J Med*. 1973;289:277.

Kawabori S, Denburg JA, Schwartz LB, Irani AA, Wong D, Jordana G, Evans S, Dolovich J. Histochemical and immunohistochemical characteristics of mast cells in nasal polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6:37-43.

Kay AB. Pathology of mild, severe, and fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(Suppl2):66-9.

Kennedy DW. Prognostic factors, outcomes and staging in ethmoid sinus surgery. *Laryngoscope.* 1992;102(12 Pt 2 Suppl 57):1-18.

Kowalski ML Grzegorzczak J Pawliczak R Kornatowski T Wagrowska-Danilewicz M Danilewicz M. Decreased apoptosis and distinct profile of infiltrating cells in the nasal polyps of patients with aspirin hypersensitivity. *Allergy.* 2002;57:493-500.

Kradina Z, Zirdum A. Histochemical analysis of nasal polyps. *Acta Otolaryngol (Stockl).* 1987; 103:435-40.

Kramer MF, Rasp G. Nasal polyposis: eosinophils and interleukin-5. *Allergy.* 1999; 54(7):669-80.

Lamblin C, Gosset P, Salez F, Vandezande LM, Perez T, Darras J, et al. Eosinophilic airway inflammation in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104: 85-92.

Larsen K, Tos M. The estimated incidence of symptomatic nasal polyps. *Acta Otolaryngol.* 2002;122:179-82.

Larsen K, Tos, M. A long-term follow-up study of nasal polyp patients after simple polypectomies. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254:85-8.

Larsen K, Tos, M. Clinical course of patients with primary nasal polyps. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1994;114:556-9.

Larsen K. The clinical relationship of nasal polyps to asthma. *Allergy Asthma Proc.* 1996;17: 243-249.

Lechapt-Zalcman E, Escudier E. Implication of extracellular matrix metalloproteinases in the course of chronic inflammatory airway diseases. *Morphologie.* 2000;84(265):45-9.

Lee YM, Kim SS, Kim HA, Suh YJ, Lee SK, Nahm DH, Park HS. Eosinophil inflammation of nasal polyp tissue: relationships with matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor- β 1. *J Korean Med Science.* 2003;18:97-102.

Loesel LS. Immunopathologic study of chronic sinusitis: a proposal for atopic and non-atopic IgE-activated mast cell allergic inflammation. *Ann of Otol, Rhinol Laryngol.* 2001;110(Suppl5):447-52.

Makino S, Miyamoto T, Nakajima S, Kabe J, Baba M, Mikawa H, Furusho M, Fukuda K, Nakagawa T, Naitou H. Survey of recognition and utilization of guidelines for the diagnosis and management of bronchial asthma in Japan. *Allergy*. 2000;55:135-40.

Maloney J, Collins J. Nasal polyps and bronchial asthma. [abstract] *Br J Dis Chest*. 1977;41: 1-6.

Maune S, Berner I, Sticherling M, Kulke R, Bartels J, Schroder JM. Fibroblasts but not epithelial cells obtained from human nasal mucosa produce the chemokine RANTES. *Rhinology*.. 1996;34(Suppl4):210-4.

McFadden E, Kany R, Fink J, Toohill R. Surgery for sinusitis and aspirin triad. *Laryngoscope*. 1990;100:1043-46.

Miles-Lawrence R. Methacoline sensitivity in nasal polyposis and the effects of polypectomy. *J Allergy Clin Immunol*. 1982;69:102-9.

Minshall EM, Leung DY, Martin RJ. Eosinophil associated TGF β 1 mRNA expression and airway fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 17:326-333.

Moloney JR. Nasal polyps, nasal polypectomy, asthma, and aspirin sensitivity: their association in 445 cases of nasal polyps. *J Laryngol Otol*. 1977;91(Suppl10):837-46.

Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelia shedding. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 24:1-11.

Mygind N, Dahl R, Bachert C. Nasal polyposis, eosinophil dominated inflammation, and allergy. *Thorax.* 2000;55(Suppl2):79-83.

Nakayama M, Wenig BM, Heffner DK. Atypical stromal cells in inflammatory nasal polyps: immunohistochemical and ultrastructural analysis in defining histogenesis. *Laryngoscope.* 1995;105(Suppl2):127-34.

Nasser SMS, Pfister R, Christie PE, Sousa AR, Barker J, Schmitz-Schumann M, Lee TH. Inflammatory cell populations in bronchial biopsies from aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153:90-6.

Newman LJ, Platts-Mills TA, Phillips CD, Hazen KC, Gross CW. Chronic sinusitis. Relationship of computed tomographic findings to allergy, asthma, and eosinophilia *JAMA.* 1994; 271(5):363-7.

Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:252-62.

Ohno I, Lea RG, Flanders KC, Clark DA, Banwatt D, Dolovich J. Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor b1 gene. *J Clin Invest.* 1992; 89:1662-8.

Otsuka H, Ohkubo K, Seki H, Ohnishi M, Fujikura T. Mast cell quantitation in nasal polyps, sinus mucosa and nasal turbinate mucosa. *J Laryngol Otol.* 1993;107(Suppl5):418-22.

Page S, Ammit AJ, Black JL, Armour CL. Human mast cell and airway smooth muscle interactions: implications for asthma. *Am J Physiol.* 2001;281:1313-23.

Park H, Nahm D, Park K. Immunohistochemical characterization of cellular infiltrate in nasal polyp from aspirin-sensitive asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998;81:225-230.

Pawankar R. Nasal polyposis: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003;3:1-6.

Pawliczak R, Kowalski ML, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M, Lewandowski A. Distribution of mast cells and eosinophils in nasal polyps from atopic and nonatopic subjects: a morphometric study. *Am J Rhinol.* 1997;11(Suppl4):257-62.

Peat JK, Gray EJ, Mellis CM, Leeder SR, Woolcock AJ. Differences in airway responsiveness between children and adults living in the same environment: an epidemiological study in two regions of New South Wales. *Eur Respir J.* 1994;7:1805-13.

Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Gaffey TA, Tarara JE, Kita H. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: is the histopathology similar to asthma? *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:877-82.

Rhuno J, Howie K, Anderson B, Vanzielegem M, Hitch D, Laap P, Denburg J, Dolovich J. The increased number of epithelial mast cells in nasal polyps and adjacent turbinates is not allergy-dependent. *Allergy.* 1990;45:370-374.

Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D and the EGEA Cooperative Group. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy.* 2002; 57:607-13.

Rudack C, Hauser U, Stoll W. Effect of cytokines and fibroblasts on eosinophilic granulocyte survival in polyposis nasi. [abstract] *Laryngo- Rhinology.* 1999;78(Suppl7):378-81.

Ruger B, Dunbar PR, Hasan Q, Sawada H, Kittelberger R, Greenhill N, Neale TJ. Human mast cells produce type VIII collagen in vivo. *Inter J Exp Pathol.* 1994;75(Suppl6):397-404.

Rugina M, Serrano E, Klossek JM, Crampette L, Stoll D, Bebear JP, Perrahia M, Rouvier P, Peynegre R. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. *Rhinology.* 2002;40:75-79.

Saji F, Nonaka M, Pawankar R. Expression of RANTES by IL-1 β and TNF- α stimulated nasal polyp fibroblasts. *Auris, Nasus, Larynx*. 2000;27(Suppl3):247-52.

Samter M, Beers RF. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy*. 1967;40(Suppl5):281-93.

Santos MA. Asma fatal: caracterização do infiltrado inflamatório em vias aéreas superiores e inferiores [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.

Sasaki Y. Distribution of the degranulated and non-degranulated mast cells in nasal polyp. *Acta Oto-Laryngologica*. 1986;430:34-8.

Schaitkin B, May M, Shapiro A, Fucci M, Mester SJ. Endoscopic sinus surgery: 4-year follow-up on the first 100 patients *Laryngoscope*. 1993;103:1117-20.

Schenck NL. Nasal polypectomy in the aspirin-sensitive asthmatic. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1974;78(Suppl3):109-19.

Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc*. 1996;17(Suppl5):231-6.

Settipane GA, Chafee FH, Klein DE. A critical evaluation of aspirin challenge in patients with nasal polyps. *J Allerg Clin Immunol*. 1982;69:148-52.

Settipane GA, Chafee FH. Nasal polyps in asthma and rhinitis: a review of 6037 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1977;59: 17-21.

Settipane GA, Lund VJ, Berstein JM, Tos M. Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment. 1st ed. Rhode Island: Oceanside publications, 1997.

Settipane GA. Nasal polyps: Epidemiology, pathology immunology and treatment. *Am J Rhinol.* 1987;1:119-26.

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1986;103:2787-96.

Slavin RG. Relationship of nasal disease and sinusitis to bronchial asthma. *Ann Allergy.* 1982;49:76-80.

Sun S. Ultrastructure of mast cells in nasal polyps. [abstract] *Chin J Otorhinolaryngol.* 1991;26:360-1.

Sunyer J, Anto JM, Kogevinas M, Barcelo MA, Soriano JB, Tobia A, Muniozguren N, Marineez-Mortalla J, Payo F, Maldonado JA. Risk factor for asthma in young adults. *Eur Respir J.* 1997; 10:2490-94.

Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. On behalf of the AIANE investigators: natural history of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J.* 2000;16:432-6.

Tai PC, Holt ME, Denny P, Gibbs AR, Williams BD, Spry CJ. Deposition of eosinophil cationic protein in granulomas in allergic granulomatosis and vasculitis: the Churg-Strauss syndrome. *Br Med J Clin Research*. 1984a;289(6442):400-2.

Tai PC, Spry CJ, Peterson C, Venge P, Olsson I. Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature*. 1984b;309(5964):182-4.

Takasaka T, Kaku Y, Hozawa K. Mast cell degranulation in nasal polyps. *Acta Oto-Laryngologica Suppl*. 1986;430:39-48.

ten Brinke A, Grootendorst DC, Schmidt JT, De Bruine FT, van Buchem MA, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Chronic sinusitis in severe asthma is related to sputum eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(4):621-6.

Vignola AM, Chanez P, Chiappara GI. Transforming growth factor β expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:591-9.

Voegels RL. Polipose nasal. Estudo da correlação entre as interleucinas 1,3,4 e 5 e a molécula de adesão VCAM-1 com a presença de alergia [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.

Voegels RL, Santoro P, Butugan O, et al. Nasal polyposis and allergy: Is there a correlation? *Am J Rhinol* 15:9-14, 2001.

Voegels RL. Polipose nasal: estudo das interleucinas 1 β , 3, 4, 5 no pré e pós operatório [tese de Livre Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.

Walls AF, Bennett AR, Godfrey RC, Holgate ST, Church MK. Mast cell tryptase and histamine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Clin Sci*. 1991;81(Suppl2):183-8.

Walls AF, Bennett AR, McBride HM, Glennie MJ, Holgate ST, Church MK. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for human mast cell tryptase. *Clin Exp Allergy*. 1990a;20(Suppl5):581-9.

Walls AF, Jones DB, Williams JH, Church MK, Holgate ST. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol*. 1990b;162(Suppl2):119-26.

Wang QP, Escudier E, Roudot-Thoraval F, Samad IAAS, Peyegre R, Coste A. Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor- β is involved in the pathogenesis of nasal polyps. *Laryngoscope*. 1997; 107:926-931.

Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(Suppl1):62-9.

Wasserman, SI. Mast Cells and airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150:39-41.

Widal MF, Abrami P, Lermoyez J. Anaphylaxie et idiosyndraise. *Press Med*. 1922;30:189.

Wynn R, Har-El G. Recurrence rates after endoscopic sinus surgery for massive sinus polyposis. *Laryngoscope*. 2004, 114:811-813.

Yamashita T, Tsuji H, Maeda N, Tomoda K, Kumazawa T. Etiology of nasal polyps associated with aspirin-sensitive asthma. *Rhinology*. 1989;8:15-24.

Yasruel Z, Humbert M, Kotsimbos TC, Ploysongsang Y, Minshall E, Durham SR.. Membrane-bound and soluble alpha IL-5 receptor mRNA in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;55:1413-8.

* De acordo com:
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.
Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of journals Indexed in Index Medicus*.