

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PERFIL REDOX DA CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DE POLIPOSE NASAL

Dissertação de Mestrado

Diego Antonio Mena Canata

Porto Alegre, Abril 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PERFIL REDOX DA CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DE POLIPOSE NASAL

Diego Antonio Mena Canata

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estresse Oxidativo, do Departamento de Biofísica da UFRGS com parceria do Hospital Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre e apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Porto Alegre, Abril 2016.

A minha amada esposa Fernanda, cujo amor, compreensão, carinho, amizade e cumplicidade possibilitaram a realização do meu trabalho.

A minha família, Carlos María, Antonia Isabel, Carlos Enrique, Adriana Paola, Guillermo Raúl e sobrinhos, que apoiaram minhas decisões e esforço desde longe.

Ever Tried. Ever Failed. No Matter.
Try Again. Fail Again. Fail Better.

(Samuel Beckett).

INDICE

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Polipose Nasal	10
1.2 Correlações com Doenças Sistêmicas	12
1.2.1 Polipose Nasal e Asma	12
1.2.2 Polipose nasal, asma e intolerância ao ácido acetilsalicílico	12
1.2.3 Polipose nasal e fibrose cística	13
1.2.4 Polipose nasal e rinosinusite fúngica	13
1.2.5 Polipose nasal e quadros sindrômicos	14
1.3 Tratamentos da Polipose Nasal	15
1.3.1 Farmacológico. Corticosteroides Tópicos e Sistêmicos	15
1.3.2 Tratamento Cirúrgico	16
1.4 Estresse Oxidativo	17
1.5 Estresse oxidativo e polipose nasal	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. MATERIAS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. RESULTADO SUPLEMENTAR	43
5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR	44
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
7. PERSPECTIVAS	49
8. REFERENCIAS	50
9. ANEXO	59
10. CURRICULUM VITAE	69

AGRADECIMENTOS

Dra. Mara da Silveira Benfato, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, dedicação e incentivo durante os dois anos da sua orientação fundamental para o desenvolvimento deste mestrado.

Dra. Fernanda Staniscuaski e Dr. Jose Artur Bogo Chies pelo acompanhamento contínuo do trabalho e o interesse mostrado nele.

Dr. Guilherme Franche, cirurgião da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brasil e sua equipe os doutores Lissandra Biolo, Egidio Portela, Fernando Machado, Marina Zottis, Izabela Rodrigues, Stéfanie Müller, Renata LossDrummond, Samantha Castro, Rafaela Reginatto e Taiãna Crestani Mistura pela colaboração e motivação as quais me levarão a concluir este importante trabalho.

Aos colegas do Laboratório Estresse Oxidativo (LEO) Àrtur, Fernanda, Vanessa, Jordana, Tiago, Nanda, Cristina, Thais, Jacson e Priscila pelo apoio constante, pelos ensinamentos diários, pelas risadas e brincadeiras na hora do café.

OBRIGADO...

RESUMO

Título: Perfil Redox Da Classificação Clínica De Polipose Nasal

Introdução: A polipose nasal (PN) é considerada uma condição inflamatória crônica da mucosa da cavidade nasal e seios paranasais de etiologia não muito clara. Há poucos dados sobre alterações epiteliais em PN e sua relação com a ação dos radicais livres. Muitas doenças estão ligadas a danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNSS) e ocorrem de um desequilíbrio entre eles e antioxidantes, o que for maior atividade de espécies reativas, o que chamamos de estresse oxidativo. **Objetivo:** O objetivo principal deste estudo é avaliar o estresse oxidativo em pólipos removidos cirurgicamente em 3 grupos de pacientes com polipose nasal (com PN unicamente, PN associado à asma e PN associado à asma e intolerância ao ácido acetilsalicílico) a fim de elucidar possíveis diferenças no perfil redox nestes grupos. **Material e Métodos:** Cinquenta e nove pacientes com diagnóstico de polipose nasal foram divididos em três grupos clínicos: um grupo controle PN unicamente, um grupo asma (PN associado à asma) e um grupo Widal (PN associado à asma e intolerância ao ácido acetilsalicílico). **Medição e Resultados Principais:** Neste trabalho defesas enzimáticas (superóxido dismutase, consumo de peróxido de hidrogênio, glutaciona peroxidase e glutaciona S-transferase) e defesas não enzimáticas (glutaciona total, nitritos e nitratos, vitamina C e E) foram analisados. Também foi realizada a medição de danos em lipídios (malondialdeído) e proteínas (carbonila). No grupo asma, o consumo de peróxido de hidrogênio, atividade da glutaciona peroxidase, níveis de malondialdeído e vitamina E foram significativamente menores do que no grupo de controle. No grupo Widal foram encontrados níveis significativamente maiores de glutaciona e nitritos e nitratos em relação ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação ao nível de carbonila e glutaciona, tamanho dos pólipos, atividades da superóxido dismutase e S-transferase. **Conclusões:** A classificação redox dos grupos de PN foi parcialmente alcançada. Os pólipos do grupo asma possuem alterações nas defesas enzimáticas relacionadas com o peróxido de hidrogênio e a peroxidação lipídica, enquanto pólipos do grupo Widal apresentaram alterações nos níveis de óxido nítrico e glutaciona.

Palavras chaves: pólipos nasais, Tríade de Widal, estresse oxidativo, otorrinolaringologia, glutaciona peroxidase e glutaciona S-transferase.

ABSTRACT

Title: Profile Redox of the Clinical Classification of Nasal Polyps

Introduction: Nasal polyposis (NP) is considered a chronic inflammatory condition of the mucosa of the nasal cavity and paranasal sinuses of etiology is not very clear. There are few data on epithelial changes in nasal polyposis and its relation to the action of free radicals. Many diseases are linked to damage caused by reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNSs) and occur from an imbalance between them and antioxidants, whichever is greater activity of reactive species, what we call oxidative stress. **Objective:** The primary objective of this study is to evaluate oxidative stress in polyps surgically removed in 3 groups of patients with nasal polyposis, in order to elucidate possible differences in redox profile in these groups. **Methods:** Fifty nine patients diagnosed with nasal polyposis were divided into three groups: a control group, an asthma group (NP with asthma) and a Widal group (NP with asthma and aspirin intolerance) in which patients had an association of NP, asthma and aspirin intolerance. **Measurement and main results:** In this work enzymatic defenses (superoxide dismutase, hydrogen peroxide consumption, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase) and non-enzymatic defenses (total glutathione, measurement of nitrites and nitrates, vitamin C and E) were analyzed. Also the measurement of damage in lipids (malondialdehyde) and proteins (carbonyl) was conducted. In the asthma group, hydrogen peroxide consumption, glutathione peroxidase activity, malondialdehyde, and vitamin E levels were significantly lower than in the control group. The Widal group showed significant higher glutathione levels, nitrite and nitrate levels than found in the control group. No differences were found among the groups regarding carbonyl level, polyp size, superoxide dismutase, and glutathione S-transferase activities. **Conclusions:** The redox classification of the groups of NP was partly achieved. Polyps of patients with asthma have changes in enzymatic defense pathways related to hydrogen peroxide and lipid peroxidation while polyps of patients with Widal triad present changes in nitric oxide and glutathione.

Keywords: nasal polyps, Widal triad, oxidative stress, otorhinolaryngology, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS: ácido acetilsalicílico;

AERD: doença respiratória exacerbada pela aspirina; “aspirin exacerbated respiratory disease”;

CAT: catalase;

CFTR: fibrose cística regulador da condutância transmembrana; “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”;

CL: quimioluminescência, “chemiluminescence”;

DDT: diclorodifeniltricloroetano;

DNA: deoxyribonucleic acid: “ácido desoxirribonucleico”;

ER: espécies reativas;

EROs: espécies reativas de oxigênio;

ERNs: espécies reativas de nitrogênio;

FC: fibrose cística;

GPx: glutathione peroxidase;

GR: glutathione reductase;

GSH: glutathione reduzida;

GSSG: glutathione oxidada;

GST: glutathione S-transferase;

HIF: fator induzido por hipóxia;

HPLC: cromatografia líquida de alta performance, “high performance liquid chromatography”;

MDA: malondialdeído;

NO: óxido nítrico;

NOSs: sintases de óxido nítrico; “nitric oxide synthases”

ORL: otorrinolaringologista;

PN: polipose nasal;

Prx: peroxirredoxina;

RC: rinossinusite crônica;

RFA: rinossinusite fúngica alérgica;

SOD: superóxido dismutase;

tGSH: glutationa total;

1. INTRODUÇÃO

1.1 Polipose Nasal

A polipose nasal (PN) é um processo inflamatório crônico da mucosa nasal que acomete em torno de 0,5% a 4% da população geral (Valera *et al.*, 2008). Apesar de a PN ter sido descrita desde a época do antigo Egito, há mais de 5000 anos, sua patogenia ainda permanece desconhecida. Mas acredita-se que a PN seja o resultado final de um processo inflamatório crônico com etiologia multifatorial, portanto, é possível que não seja uma doença, mas a manifestação nasal de doenças distintas (Voegels, 2001). Devido a isto a PN pode ser definida como uma doença crônica da mucosa nasal e seios paranasais com formação de pólipos benignos, múltiplos, bilaterais, que se originam como protuberâncias pedunculadas, edematosas, presas a uma base na concha média, bolha etmoidal ou óstio dos seios maxilares ou etmoidais (Fig. 1) (Voegels, 2001).

Os pólipos são geralmente moles, brilhantes, com coloração levemente acinzentada ou rosada, com superfície lisa, indolor a palpação e de aspecto translúcido, sendo recoberto pelo epitélio nasal e preenchido por estroma. O epitélio é uma barreira vulnerável e sofre influencia constante de fatores como correntes aéreas, poluentes, vírus, bactérias e outros fatores irritantes (Miyake & Voegels, 2002). O tamanho do pólipo é variável, podendo se expandir do meato médio para toda a cavidade nasal, nasofaringe, narinas e seios paranasais (Miyake & Voegels, 2002).

Existem poucos estudos epidemiológicos sobre a PN e seus resultados são de difícil comparação por utilizarem métodos diferentes de diagnóstico (Braun *et al.*, 1992; Larsen, 1996). Geralmente a prevalência da PN varia de 0,2% a 4,3% da população geral (Settipane, 1996; Myngind *et al.*, 2000).

Em estudo realizado por Larsen e Tos, observou-se uma incidência para a população da Dinamarca de 0,86 e 0,39 caso de polipose por 1000 habitantes/ano, para o sexo masculino e feminino, respectivamente. A incidência aumentou com a idade, atingindo picos de 1,68 e 0,82 casos de polipose por 1000

habitantes/ano nos sexos masculino e feminino, respectivamente no grupo etário de 50 a 59 anos (Larsen & Tos, 2002).

A PN acomete principalmente em adultos, atingindo todas as raças e classes sociais. As crianças raramente apresentam PN, mas quando presentes, deve-se suspeitar da associação com a fibrose cística (Delaney, 1976).

Observa-se uma predominância no sexo masculino (Larsen & Tos, 1991) e a população feminina geralmente é acometida pelos sintomas mais severos quando ela esta associada à rinosinusite crônica (RC) (Rigina et al., 2002; Stevens et al., 2015).

A PN pode estar associada a diversas condições reconhecidas, como asma alérgica e não alérgica, fibrose cística (FC), rinosinusite fúngica, intolerância ao ácido acetilsalicílico (AAS) e a quadros sindrômicos que podem ser síndrome de Churg-Strauss, síndrome de Kartagener e síndrome de Young (Voegels, 2001).

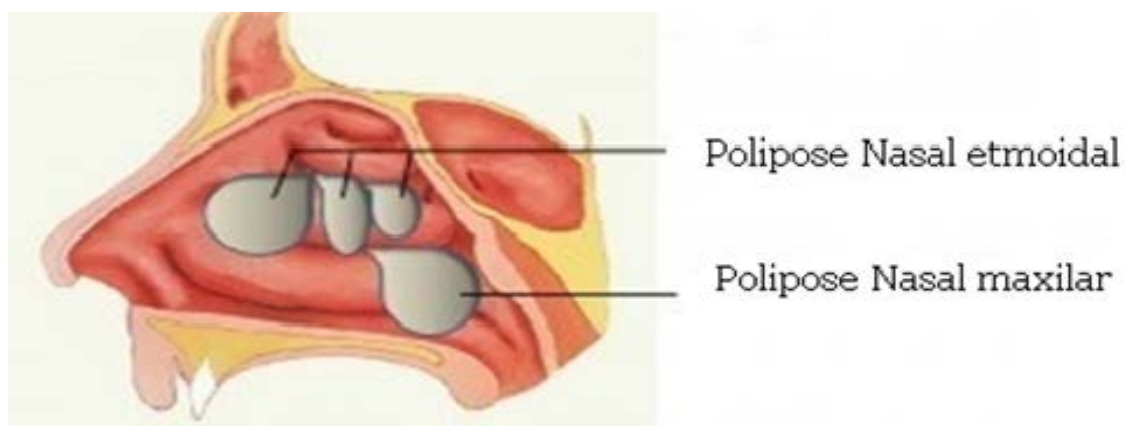


Figura 1: Vista lateral da cavidade nasal com pólipos nasais.

Fonte: Tratado de Otorrinolaringologia (SBORL), 1ªedição, vol. III

1.2 Correlações com Doenças Sistêmicas

1.2.1 Polipose Nasal e Asma

A prevalência da PN em asmáticos varia de 6,7% a 13% (Settipane, 1996; Stierna, 1996) enquanto a prevalência da asma em indivíduos com PN varia de 5% a 20%. (Tab. 1). (Rigina *et al.*, 2002; Schenck, 1974).

Na maioria dos casos, a asma (geralmente a não alérgica) costuma preceder a PN, no entanto, os pacientes com polipose incipiente sem asma podem desenvolver a doença, visto que pacientes com pólipos em estágios mais avançados apresentam duas vezes mais asma quanto comparados com pacientes com PN em estágios iniciais (Rigina *et al.*, 2002). A asma não alérgica costuma aparecer após 30 anos e a polipose por volta dos 40. Muitas vezes o quadro é grave e o paciente torna-se cortiço dependente (Miyake & Voegels, 2002).

1.2.2 Polipose nasal, asma e intolerância ao ácido acetilsalicílico

A associação da asma, PN e intolerância ao ácido acetilsalicílico (AAS) foi inicialmente descrita por Widal *et al.* em 1922, sendo conhecida como “tríade de Fernand Widal” (Widal *et al.*, 1922).

Em 1960 um imunologista americano, Max Samter fez uma revisão da associação e propôs à possível patogênese e é por isso que a tríade pode levar seu nome “síndrome de Samter” (Samter, 1968).

La condição de “tríade de Widal ou síndrome de Samter” agora é conhecida pelos otorrinolaringologistas como doença respiratória exacerbada pela aspirina AERD (Aspirin Exacerbated Respiratory Disease) (Tawakir & Anshul, 2011).

A incidência de intolerância ao AAS em indivíduos portadores de PN varia de 5% a 36 % (Tab. 1) (Jantti-Alanko *et al.*, 1989). O início dos sintomas da intolerância ao AAS ocorre entre a terceira e quarta década de vida (Samter & Beers, 1967; Schiavino *et al.*, 2000) com predominância do sexo feminino (Braun

et al., 1992; Szczeplik & Niankowska, 2000). Outras drogas, como tartrazina, aminopirina, anti-inflamatórios não esteroides podem apresentar reação cruzada nos indivíduos com intolerância ao AAS (Schiavino *et al.*, 2000). Quando a PN está associada à asma, à intolerância aos salicilatos ou a alimentos que contem derivados de salicilatos, ocorre um agravamento da história natural da polipose (Rigina *et al.*, 2002).

1.2.3 Polipose nasal e fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença genética, autossômica recessiva, em que se observa uma mutação no gene localizado na porção q31 do cromossomo 7, responsável por codificar a proteína reguladora da condutância iônica transmembrana, CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). A anormalidade dessa proteína leva a um bloqueio da secreção ativa do íon cloro e conseqüentemente acúmulo intracelular. Com isso as secreções tornam-se extremadamente espessas, favorecendo a estase e o crescimento bacteriano, cujos agentes etiológicos mais frequentes são a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* (Neely *et al.*, 1972).

A associação de PN com a FC encontra-se bem documentada. Hadfield *et al.* estudaram 221 pacientes com FC e encontraram PN em 37% (Tab. 1). Outros estudos relatam uma prevalência que varia de 10% a 32% (Hadfield *et al.*, 2000; Cepero *et al.*, 1987).

1.2.4 Polipose nasal e rinossinusite fúngica

A PN associada ao *Aspergillus* foi inicialmente descrita por Safirstein em 1976 (Safirstein, 1976). Novos relatos descrevendo outros fungos além do *Aspergillus* reconheceram o termo rinossinusite fúngica alérgica (RFA) como uma entidade clínica frequentemente associada à PN (Manning & Holman, 1998).

Os critérios dos diagnósticos e os protocolos de tratamento ainda são motivos de muitas divergências. A rinossinusite fúngica alérgica é uma doença sinusal benigna não invasiva, possivelmente decorrente de uma

hipersensibilidade a antígenos fúngicos e sua incidência depende dos pacientes imunodeprimidos que podem ser facilmente infectados por vírus, bactérias ou fungos (Tab. 1) (De Shazo & Swain, 1995).

Tabela 1: Frequência de associação das doenças sistêmicas com PN em um estudo em São Paulo, Brasil.

Polipose e associação	Incidência
Intolerância a aspirina	5 - 36%
Asma intrínseca	6 - 13%
Asma extrínseca	5%
Fibrose cística	37%
Sinusite crônica	5%
Rinossinusite alérgica	1 - 5%
Outras: Sinusite fúngica alérgica, síndromes de Young, Churg-Strauss, Kartagener	66-100%

Fonte: Tratado de Otorrinolaringologia (SBORL), 1ª edição, vol. III.

1.2.5 Polipose nasal e quadros sindrômicos

A síndrome de Churg-Strauss é um tipo de vasculite alérgica bastante rara, de difícil diagnóstico, muito associada à PN. O quadro inicial inclui asma e rinite alérgica, e pode evoluir com manifestações cardíacas, renais e pulmonares. A polipose incide em até 100% destes pacientes e está acompanhada de formação de muitas crostas, que mostram à histologia granulomas necrotizantes e muitos

eosinófilos. Na literatura, foram descritos pouco mais de 200 casos, incluindo pacientes com PN recidivante e asma que foram controlados depois de feito o diagnóstico e tratamento para a vasculite. Relata-se que este quadro possa ocorrer, ainda que raramente, como reação adversa ao uso de anti leucotrienos, novos medicamentos para controle da asma. São usados corticosteroides sistêmicos e, por vezes, citotóxicos no tratamento da Síndrome de Churg-Strauss (De Shazo & Swain, 1995).

Na síndrome de Kartagener, uma doença genética rara, caracterizada por uma discinesia ciliar primária acompanhada de bronquiectasias, sinusite crônica e *situs inversus* completo. Esta última característica, o *situs inversus*, demonstra como a disfunção ciliar pode afetar o desenvolvimento embriológico. No embrião normal, o movimento dos monocílios no nó primitivo é tido como responsável por determinar a simetria anatômica normal (*situs solitus*). Portanto, a ausência de motilidade ciliar normal resulta em distribuição e orientação errada dos órgãos do corpo humano. A alteração da motilidade ciliar ocorre em todo o organismo e leva a infecções pulmonares de repetição e infertilidade masculina. Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* são frequentes nestes pacientes, assim como na FC. O achado de pólipos nasais é muito frequente e deve alertar para o diagnóstico diferencial em relação à fibrose cística (Miyake & Voegels, 2002).

A síndrome de Young é uma discinesia ciliar primária caracterizada por doenças respiratórias recorrentes, polipose nasossinusal e azoospermia. Sinusite crônica importante pode se associar a bronquectasia. Estes pacientes apresentam estrutura dos cílios conservada. A espermatogênese é normal, mas há obstrução congênita do epidídimo (SBORL, 2003).

Apesar de pouco descrita no Brasil esta doença é menos rara que a Fibrose Cística ou Kartagener, e estima-se que seja responsável por 7% dos casos de infertilidade masculina (SBORL, 2003).

A incidência da PN varia de acordo com aos quadros sindrômicos associados (Tab. 1) (Miyake & Voegels, 2002).

1.3 Tratamentos da PN

Os principais objetivos do tratamento da PN devem ser: 1) eliminar os sintomas devidos aos pólipos e a rinosinusite, 2) restabelecer a respiração nasal e olfação e 3) prevenir a recorrência dos pólipos. Na maioria dos pacientes, o tratamento é clínico-cirúrgico (Voegels, 2001).

1.3.1 Tratamento farmacológico. Corticosteroides tópicos e sistêmicos

Os corticoides tópicos e sistêmicos até o momento são a forma mais eficaz a reposita inflamatória na PN. Seu mecanismo de ação ocorre através da ligação ao receptor de glicocorticoides no citoplasma da célula alvo e, como efeito, reduz a produção de citocinas, número de células inflamatórias, induz a apoptose nos eosinófilos, e reduz o extravasamento microvascular (Lildholdt *et al.*, 1997; Mygind & Lildholdt, 1997; Saunders *et al.*, 1999).

Os corticoides tópicos na PN reduzem, de forma eficaz, os sintomas de obstrução nasal, secreção e espirros. O uso de corticoide intranasal pode reduzir o tamanho, ou até mesmo fazer desaparecer a PN. Os corticoides sistêmicos são eficazes na diminuição do tamanho dos pólipos e atuam melhor sobre o olfato quando comparados aos corticoides tópicos. Essa eficácia dos corticoides sistêmicos é conhecida como polipectomia medicamentosa (Karlsson & Runderantz, 1982; Virolainen & Puhakka, 1980).

1.3.2 Tratamento Cirúrgico

O maior objetivo da cirurgia é restaurar as propriedades fisiológicas do nariz, retirando os pólipos e restabelecendo a drenagem dos seios paranasais. Técnicas cirúrgicas por via intranasal têm a vantagem da visualização direta, e o cirurgião pode ser mais seletivo e preciso (Miyake & Voegels, 2002).

O tratamento complementar da polipose é sempre necessário, já que o tratamento cirúrgico não consegue tratar o componente inflamatório da mucosa.

Os cuidados pós-operatórios meticulosos são insistentemente recomendados como essenciais aos bons resultados descritos, e incluem acompanhamento clínico com corticosteroides tópicos para prevenir recorrências e tratar o processo inflamatório (Miyake & Voegels, 2002).

1.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo, em sistemas biológicos, é caracterizado pelo desequilíbrio entre as espécies reativas (ER) de oxigênio (EROs) e ER de nitrogênio (ERNs) e seus respectivos agentes antioxidantes. O termo ERO inclui não somente radicais de oxigênio, como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (OH^{\bullet}), radical peroxil (RO_2^{\bullet}), radical alcóxil (RO^{\bullet}), sendo o OH^{\bullet} o mais reativo em sistemas biológicos, devido a sua facilidade em ligar-se a metais, outros radicais ou qualquer molécula biológica, mas também abrange derivados de oxigênio molecular (O_2) que podem atuar como oxidantes ou redutores (H_2O_2 peróxido de hidrogênio, HOCl ácido hipocloroso e O_3 ozônio) (Halliwell & Gutteridge, 2015).

EROs podem ser produzidas durante a redução de O_2 à água (H_2O) na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, possibilitando a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa. Este processo metabólico utilizado por organismos aeróbicos é essencial para manutenção da vida, porém podem formar EROs. No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo $O_2^{\bullet-}$. A partir deste, uma série de reações ocorrem, gerando outros radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Radicais livres podem ser definidos como espécies moleculares que contenham um ou mais elétrons desemparelhados (Sagit *et al.*, 2011). Os radicais livres são neutralizados *in vivo* por mecanismos de defesa antioxidantes do organismo. Uma vez que o equilíbrio entre a produção de radicais livres e atividade de defesa antioxidante é interrompido, o estresse oxidativo pode ocorrer, o que pode resultar em lesão ou morte celular, danos nos tecidos e, finalmente, doenças crônicas (Sagit *et al.*, 2011). Inúmeros estudos têm demonstrado que EROs participam da patofisiológica de várias doenças como

Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus, esclerose múltipla, cirrose hepática, e alguns tipos de câncer (Halliwell & Gutteridge, 2015).

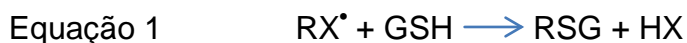
O aumento das espécies reativas ou a redução das defesas antioxidantes está envolvido no processo de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e ácidos nucleicos (Suzuki *et al.*, 2006). Mas é importante lembrar que as espécies reativas são produtos normais do metabolismo oxidativo e importantes para a manutenção da vida (Halliwell & Gutteridge, 2015). É necessário um equilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes e, por isso, os organismos desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos de defesas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 2015).

As células são protegidas em virtude de um sistema antioxidante intrincado, que consiste em sistemas enzimáticos e não enzimáticos, os últimos podendo ser de origem endógenas ou exógenas, para manter o estado redox homeostático das células (Kabuto *et al.*, 2003). Em paralelo, os organismos desenvolveram sistemas de regeneração de macromoléculas danificadas, especialmente o ácido desoxirribonucleico (DNA), a fim de corrigir possíveis falhas ou sobrecargas nos mecanismos de defesas (Thomas *et al.*, 1998; Halliwell & Gutteridge, 2015).

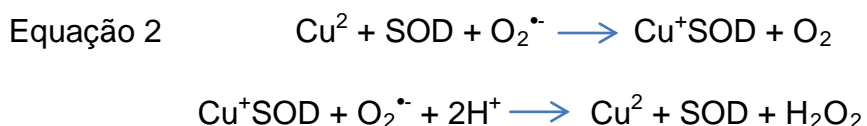
Entre as defesas antioxidantes enzimáticas encontra-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), peroxirredoxina (Prx) (Veerappan *et al.*, 2004). Já os antioxidantes não enzimáticos incluem carotenoides, flavonoides, tocoferóis, ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, alguns hormônios como progesterona e estradiol, glutathione (GSH), entre outros (Halliwell & Gutteridge, 2015). O ácido úrico, a GSH (Viña *et al.*, 2005), a progesterona e o estradiol (Moorthy *et al.*, 2005; Viña *et al.*, 2005) são importantes exemplos de antioxidantes não enzimáticos endógenos.

A GSH é um tripeptídeo endógeno, além de ser substrato da GPx, também é o principal composto não enzimático antioxidante intracelular, estando presente em concentrações semelhantes a da glicose em hepatócitos (Viña *et al.*, 1978). A

GSH é um sequestrador de radicais livres em condições fisiológicas ou sob a ação de xenobióticos, além de participar na regeneração dos antioxidantes ácido ascórbico e tocoferol, sua ação como antioxidante não enzimático está mais diretamente vinculada a sua ação sobre o H_2O_2 e peróxidos orgânicos (Monostori *et al.*, 2009). A GSH forma adutos com diferentes xenobióticos (clorofórmio, nitratos orgânicos, bromo benzeno, aflatoxinas, dicloro difenil tricloroetano (DDT), naftaleno e paracetamol), reação esta pode ocorrer espontaneamente ou catalisada pela família de enzimas GST (Eq. 1) (Halliwell & Gutteridge, 2015).



A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e H_2O (Eq. 2). Os mamíferos possuem três tipos de SOD, duas delas possuem cobre (Cu) no seu sítio ativo e uma possui manganês (Mn). Aquelas que possuem Cu no seu sítio ativo encontram-se uma intra e outra extracelular, enquanto a SOD com Mn localiza-se na mitocôndria (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).



A CAT, juntamente com as Prx, possui a propriedade de reduzir o H_2O_2 a H_2O (Eq. 3). A CAT localiza-se nos peroxisomos enquanto que as Prx localizam-se em diversos compartimentos celulares e são constituídas por uma família de seis diferentes isoformas (Prx1 a Prx6). As Prx convertem ainda peróxidos orgânicos em álcool, e peroxinitritos ($ONOO^-$) em nitritos (NO_2^-) (Shuvaeva *et al.*, 2009).

Nos mamíferos as Prx distribuem-se em diferentes compartimentos celulares. A Prx3 e Prx5 são direcionadas para a matriz mitocondrial, onde realizam a detoxificação do H₂O₂ produzido por esta organela. Pela abundância com que é encontrada, Prx3 é responsável por cerca de 90% da detoxificação do H₂O₂ na matriz mitocondrial (Cox *et al.*, 2010).

Os eritrócitos possuem as Prx1, Prx2 e Prx6 em seu interior, a Prx2 é a mais abundante (sendo a terceira proteína mais abundante no interior do eritrócito) e atua na detoxificação de baixos níveis de H₂O₂. Duas possíveis importantes fontes de H₂O₂ na circulação são: H₂O₂ gerado na detoxificação do O₂^{•-} pela SOD, assim como o H₂O₂ gerado da auto-oxidação da hemoglobina (Low *et al.*, 2008).



A GPx possui um átomo de selênio (Se) em seu sítio ativo e atua na degradação de peróxido no organismo (Eq. 4) (Singh *et al.*, 2010).



A GPx degrada peróxidos oxidando duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG), esta glutathiona oxidada pode ser reduzida novamente pela enzima glutathiona redutase (Eq. 5) (Halliwell & Gutteridge, 2015)

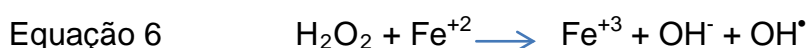


Existem quatro formas de GPx. A GPx1 é uma enzima citosólica, GPx2 é encontrada no trato gastrointestinal, conhecida como GI-GPx, GPx3 é originada no rim e encontra-se no plasma dos mamíferos e também em diversos fluidos corporais, sendo a única que possui a propriedade de utilizar a tioredoxina como

substrato, além de glutathione, e a GPx4 que reduz não somente peróxidos orgânicos e H₂O₂ mas também hidroperóxidos de colesterol e ácidos graxos (Halliwell & Gutteridge, 2015).

A GST é uma superfamília de três enzimas que se distribuem no citoplasma e nas mitocôndrias. As enzimas GST possuem a capacidade de catalisar a conjugação da forma reduzida da glutathione em substratos de xenobióticos para a detoxificação (Halliwell & Gutteridge, 2015). A GST pode constituir até 10% da proteína citoplasmática em alguns órgãos de mamíferos (Boyer, 1989).

A vitamina C (ácido ascórbico) tem importante papel como antioxidante. É um potente agente redutor e participa como cofator de vários processos de oxirredução. Atua como sequestrador de EROs e ERNs, entre eles o O₂^{•-} e o HO[•]. Além disso, participa juntamente com o tocoferol na inibição da peroxidação lipídica (Kojo, 2004). Ela também desempenha um papel de coenzima em processos de oxidação, tais como hidroxilases e dioxigenases (Davies *et al.*, 1991). A vitamina C ainda está envolvida no metabolismo de neurotransmissores, lipídeos e colágeno (Kojo, 2004). O ácido ascórbico participa, juntamente com o ferro (Fe) II na degradação do fator de transcrição induzível de hipóxia (HIF) em situações de normóxia intracelular (Mandl *et al.*, 2009). Cabe lembrar que o ácido ascórbico pode participar como agente redutor na redução do Fe III a Fe II, resultante da reação de Fenton (Eq. 6), em que o H₂O₂ reage com um metal de transição Fe II ou Cu⁺ formando dois hidróxidos, sendo um deles um radical hidroxila e outro apenas um íon (Kojo, 2004).



Os tocoferóis (vitamina E) e tocotrienóis estão embebidos nas membranas celulares e lipoproteínas, e são os principais inibidores da peroxidação lipídica uma vez que eles reagem com os radicais lipoperoxil (LO_2^\bullet) (Halliwell & Gutteridge, 2015).

1.5 Estresse oxidativo e polipose nasal

Os radicais livres desempenham papéis importantes no desenvolvimento da artrite, aterosclerose, catarata, asma e PN. Há publicações que identificam os danos oxidativos na presença de PN. Trabalhos têm demonstrado um papel para o estresse oxidativo no desenvolvimento de PN (Veyseller *et al.*, 2010). A etiologia da PN ainda é desconhecida, mas vários fatores, incluindo a formação de radicais livres, podem desempenhar um papel na formação da doença, mas o mais importante é a inflamação (Sagit *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos tem investigado os mecanismos inflamatórios da PN. No entanto, trabalhos recentes têm avaliado o papel dos radicais livres de oxigênio em pacientes com PN (Sagit *et al.*, 2011). Cheng e colaboradores coletaram 20 biopsias de pacientes não alérgicos com PN e foram determinados níveis de radicais livres em tecidos dos pólipos e tecidos sanguíneos, por método de quimioluminescência sensível obtendo como conclusão que o estresse oxidativo apresenta um papel importante na fisiopatologia da PN e existe uma relação casual entre o estresse oxidativo e células inflamatórias, especialmente eosinófilos e que os níveis de radicais livres estão associados com a gravidade da PN (Cheng *et al.*, 2006).

Bugdayci e Kaymakci examinaram o papel fisiopatológico do óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA), que é um produto final da peroxidação lipídica, em tecido de pacientes com PN. Os resultados dos níveis de nitritos e nitratos (medida indireta dos níveis de óxido nítrico), medidos pela reação de Griess, foram mais elevados em pacientes com PN que em tecidos normais. O mesmo resultado foi encontrado para o MDA (Bugdayci & Kaymakci, 2008).

Um estudo similar demonstrou que o estresse oxidativo e antioxidantes de tecidos dos pólipos e tecidos sanguíneos em pacientes com PN foram significativamente diferentes quando comparado com o grupo controle. Os níveis de antioxidantes nos tecidos sanguíneos e nos tecidos dos pólipos se mostraram diminuídos. O estudo também demonstrou que há fortes indícios relacionando o estresse oxidativo na patogênese da PN, os radicais livres podem ocasionar dano ou morte celular e danos nos tecidos subsequentes. Além disso, o estudo indicou que a ruptura do revestimento epitelial, provocada pelos radicais livres, pode ser essencial para a iniciação do pólipo, e os antioxidantes podem ter um papel preventivo em danos nos tecidos na PN (Dagli *et al.*, 2004).

Um grande número de estudos demonstrou que a PN tem algumas anormalidades histológicas como dano epitelial, edema e infiltração de células inflamatórias. As células inflamatórias produzem radicais livres durante a fagocitose, sendo assim esta a principal fonte de EROs (Özcan *et al.*, 2010).

Ainda não está claro como é a formação da PN e a literatura não estabelece uma comparação detalhada com as diferentes associações entre PN e o estresse oxidativo.

Com isso exposto o presente estudo pretende relacionar medidas de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e estresse oxidativo em PN e PN com duas associações (PN com asma e PN com asma e intolerância ao AAS) com vista ao melhor prognóstico da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação do estresse oxidativo em pólipos retirados cirurgicamente de 3 grupos de pacientes com polipose nasal (somente polipose; polipose associada à asma; polipose associada à asma e a intolerância ao ácido acetilsalicílico), a fim de elucidar possíveis diferenças no perfil redox nestes grupos

2.2 Objetivos Específicos

- I. Analisar os parâmetros de dano oxidativo através das análises bioquímicas de peroxidação lipídica e grupos carbonilas em proteínas.
- II. Quantificar as atividades de antioxidantes enzimáticos através das análises bioquímicas de superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), consumo de H_2O_2 e glutatona S-transferase (GST).
- III. Verificar os níveis de antioxidantes não enzimáticos, glutatona total, vitamina E e C.
- IV. Medir os níveis de óxido nítrico, através de uma medida indireta (nitrito e nitrato)
- V. Associar os dados de estresse oxidativo ao tipo de polipose nasal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.

Artigo será submetido a The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

Title: Redox profile of the clinical classification of nasal polyps.

Running title: Evaluation of oxidative stress in tissues of nasal polyposis and nasal polyposis with association.

Authors:

Mena Canata DA^{1,2}, Schüller Krumberg A^{1,2}, Engers Krüger V^{1,2}, Franche da Silva GL³, Salomon Boeira T^{1,2} and Benfato Silveira M^{1,2#}

Affiliation:

¹Biophysics Department , Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

²Graduate Program in Celular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³Santa Casa de Misericórdia Hospital; Porto Alegre, Brazil.

#Corresponding author: Dr. Mara Silveira Benfato, Biophysics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43422, Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970. Tel: (55-51) 33087603. Fax: (55-51) 33087003. E-mail: mara.benfato@ufrgs.br.

Classification: Pathophysiology; 13.4 Oxidants/Antioxidants.

¹ This work was sponsored by the Coordination for Improvement of Higher Level Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES), Brazil.

Author's contributions:

Diego Antonio Mena Canata: manuscript preparation, redox assays, collection of samples from patients and analyze and generate of results.

Ártur Krumberg Schüller: redox assays, manuscript preparation.

Vanessa Krüger Engers: redox assays.

Guilherme Luis Franche da Silva: collection of samples from patients and data, co- orientation.

Tiago Boeira Salomon: redox assays, manuscript preparation.

Mara Silveira Benfato: manuscript preparation, supervision.

Impact on research: This work suggests that the redox profile in patients with nasal polyps and nasal polyposis associated stress biomarkers such as malondialdehyde, carbonyl group and nitric oxide can have biochemical differences in the clinical profile.

Abstract

Introduction: Nasal polyposis (NP) is considered a chronic inflammatory disease of the mucosa of the nasal cavity and paranasal sinuses. Its etiology is not clear yet and there is little data on epithelial changes in nasal polyposis and its relationship with damage due to free radicals.

Objective: Evaluation of oxidative stress in nasal polyps surgically removed from the three groups of patients with nasal polyps (only polyposis, polyposis associated with asthmas and polyposis associated with asthma and aspirin intolerance) in order to elucidate differences in redox potential profile in these groups.

Methods: 59 patients diagnosed with nasal polyposis were divided into three groups: a control group, an asthma group (NP with asthma) and a Widal group (NP with asthma and aspirin intolerance) in which patients had an association of NP, asthma and aspirin intolerance.

Measurement and main results: In this work in the asthma group, H_2O_2 consumption, MDA, and vitamin E were significantly lower than the control group and enzymatic defense activity of glutathione peroxidase was lower in the asthma group (50.8 ± 7.67) compared with the control group (153 ± 37.11) and. In the Widal group the levels of total glutathione and NO_2 & NO_3 was higher (0.12 ± 0.01) and (33.34 ± 10.48) compared with the control group (0.06 ± 0.01) and (15.95 ± 1.38) respectively.

Conclusions: In the asthma group have changes in enzymatic defense pathways related to H_2O_2 and MDA. In the Widal group present changes in NO and (tGSH).The oxidative profiles found, could point to oxidative stress as a participant in both the inflammation process as well as the subsequent formation of the NP.

Number of words: 270.

Keywords: Redox profile, nasal polyps, Widal triad, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, oxidative stress.

Introduction

Nasal polyposis (NP) is considered a chronic inflammation, which can develop a benign tumor disease called nasal polyp in the nasal and paranasal sinus cavities. It is frequently encountered in otolaryngology clinics (1) with an incidence of 0.5% to 4% in the general population, the NP may be associated with different diseases such as asthma, cystic fibrosis, chronic sinusitis and also with aspirin intolerance. The NP association with asthma ranges from 5% to 20%, in the general population and NP associate with asthma and aspirin intolerance, called triad Widal, ranges from 5% to 36% in the general population. The etiology of NP has remained unclear so far (2).

The most important mechanism in the formation of the NP is inflammation (1). Most reported studies have investigated the inflammatory mechanisms of NP(3, 4, 5). However, recent studies have assessed the role of free radicals in patients with NP (6, 7).

Reactive species (RS) include ions oxygen, nitrogen, free radicals and peroxides, both organic and inorganic, and are generated by the normal metabolism of the cell (8, 9). In several cell and tissues, RS are involved in energy production, immune cell responses, cell growth regulation, intercellular signaling, cell differentiation, among other very important functions. Nevertheless, their excess has detrimental effects such as lipid peroxidation, protein oxidation, and inactivation by damaging enzyme active site, carbohydrate oxidation and oxidative damage to nucleic acids (10). When in excess, RS neutralized in vivo, by antioxidant defense mechanisms of the body, might interfere in the redox balance of the cell, thereby producing the so called oxidative stress, which may result in cell injury with chronic disease and, finally, cell death (11, 12) and the interaction of RS with macromolecules can be damaging, however, as stated before, it can also be beneficial (10).

Even this is the first study to try to make a difference and an evaluation in the redox profile in NP surgically removed from the three groups of patients with NP (only NP, NP associated with asthmas and NP associated with asthma and aspirin intolerance) in order to elucidate differences in redox potential profile in these three clinical groups.

This is the first study to use only NP as a control group to compare the measurements of enzymatic antioxidants and non-enzymatic, damage to proteins

and lipids and levels of nitric oxide (NO), by measuring nitrite and nitrate (NO₂ & NO₃).

1. Materials and Methods

a. Samples

The project was approved by the Ethics Committee of the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia Hospital (ISCM), nº 622164, in Porto Alegre, Brazil. The project was approved by institutional ethics committee and the patients signed a Term of Consentment after detailed information was provided. Before undergoing surgery to reduce the size of polyps, all patients used 20 mg prednisolone, associated with 500 mg azithromycin, on a daily basis, for 7 days. They also underwent nasal endoscopy and paranasal sinus tomography.

Were excluded from this study patients with systemic diseases (mellitus diabetes, arthritis), cataract, brain-vascular, Behçet's disease and neurodegenerative diseases (Parkinson e Alzheimer), pregnant women, patients under 18 and those who refused to join the study.

Fifty-nine patients diagnosed with NP, in Santa Casa de Misericórdia Hospital, were included in the study and divided into three clinical groups, classification which was made based on clinical features of otorhinolaryngology patients. In the control group (n=30), patients with NP and without association with other diseases were analyzed. In the asthma group (n=19), the analysis focused on patients with NP associated with asthma, and, finally, in the Widal group (n=10), patients with NP associated with asthma and aspirin intolerance.

NP was removed by endoscopic surgery by a specialist doctor, and part of it was sent to the laboratory of oxidative stress at UFRGS, in dry ice, after being frozen at -80 °C, for further processing and the other part was sent to the pathology, histology and imaging laboratory of Santa Casa de Misericórdia. At UFRGS, the NP was manually macerated and the samples were mixed in 5 mL of 30 mmol/L of phosphate buffer containing 120 mmol/L KCl, 100 µmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 7.4. After that, NP samples were sonicated three times for 10 s each, and centrifuged for 10 min at 1,700 x g. The supernatant of each tube was transferred to a second tube and centrifuged again for 10 min at 1,700 x g. The supernatant from the second centrifugation was aliquoted and frozen at -80 °C for later analysis and assays.

b. Enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidant Enzymatic Antioxidants

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured using the RanSOD kit (Randox, UK), with absorbance measured at 505 nm. Enzyme activities were analyzed and expressed as U of SOD/mg of protein.

Enzymatic kinetics of glutathione peroxidase (GPx) was assessed by the Ransel Kit (Randox, UK), with absorbance measured at 340 nm. The activities were expressed as U of GPx/mg of protein.

The hydrogen peroxide consumption was evaluated by measuring absorbance at 240 nm (13). The activity was expressed as ($\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]/\text{min}$)/mg of protein.

The glutathione S-transferase (GST) antioxidant assay measures the formation of S- (2,4-dinitrophenyl)-glutathione by GST enzymatic activity through 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione (GSH) conjugation and it was measured via absorbance at 340 nm (14). The GST activities were expressed as U of GST/mg of protein.

c. Non-enzymatic Antioxidants

The levels of vitamin C were measured by HPLC, employing a reversed-phase column (SUPELCOSIL™ LC-18-DB HPLC column; 15 cm × 4.6 mm, 5 μm) and using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v); samples were injected in a volume of 25 μL. The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm. Under these conditions, the retention time of vitamin C was 3.0 min and its amount was expressed as μmol of vitamin C/mg of protein (15).

The amount of vitamin E was measured by HPLC, using a 15 cm x 4.6 mm column (Nucleosil 120 C-18) with continuous flow of 2 mL per minute 96.5:3.5 (v/v) methanol: water. Detection was carried out by fluorescence (295 nm excitation and 350 nm emission). The retention time of vitamin E was 5 min. The amount of vitamin E was expressed as nmol of vitamin E/mg protein calculated from an alpha-tocopherol standard (16).

The assay to measure total GSH (tGSH) was performed by measuring the formation of p-nitrophenol from 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid, DNTB) in the

presence of the enzyme glutathione reductase (GR), which with adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH), reduces GSSG to 2GSH. Color development was read at 412 nm and the level was expressed as μmol of glutathione/mg of protein (14).

d. Oxidative damage

As an index of protein damage, carbonyl levels were measured using absorbance at 370 nm (17). The carbonyl content was calculated using a millimolar extinction coefficient of hydrazone as ($21,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl/mg of protein.

Malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation, was measured by HPLC, employing a reversed-phase column (SUPELCOSIL™ LC-18-DB HPLC column; 15 cm × 4.6 mm, 5 μm) and using a mobile phase flow rate of 1 mL/min in 30 mmol/L monobasic potassium phosphate (pH 3.6) and methanol (9:1, v/v); samples were injected in a volume of 25 μL . The absorbance of the column effluent was monitored at 254 nm. Under these conditions, the retention time of MDA was 5.6 min. MDA was expressed as nmol of MDA/mg of protein (15).

Indirect nitric oxide (nitrite and nitrate, NO_2 & NO_3) was measured via a spectrophotometric method, using the Griess solution, which absorbs at 543 nm to determine total nitrate and nitrite levels (18). The NO_2 and NO_3 level was standardized by sodium nitrite and expressed as nmol of NO_2 /mg of protein.

e. Data normalization

All results were normalized in relation to protein concentration determined by Bradford method using BSA (bovine serum albumin) as a standard (19). All assays in this study were independently performed three times.

f. Statistical analysis

Variables with normal distribution are presented as mean \pm SE, means being compared by one way ANOVA *post hoc* Dunnett test. Variables with non-normal distribution are presented as median (25% - 75%), which are compared using the Kruskal Wallis test. All analyses were performed at a 0.05 level of significance. A software package was used for all calculations (SPSS version 18.00, SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical analysis was accomplished with the support of the

Statistical Nucleus of the Federal University of Rio Grande do Sul (NAE-UFRGS).

We performed transformations of mean for GPx and NO₂ & NO₃. For GPx, the mean was raised to 0.2, and for NO₂ & NO₃, the square root of the mean was carried out to transform these means parametric data.

2. Results

Sample collection started on May 2014 and was completed on July 2015. The patients of the control group were 46,7 years old in average, being 67% male; in the asthma group, patients were 50,05 years-old in average, being 63% male and, in the Widal group, they were 42,5 years old in average, being 40% male.

a. Table 1: Anthropometric and laboratory data

Anthropometric and laboratory data of patients is shown in Table 1. The level of triglycerides was significantly lower in the asthma group (121.6 ± 4.36) in relation to the control group (149.1 ± 3.92) in relation to reference values (triglycerides > 150 mg/dL). The levels of eosinophils were higher in the asthma group (529.24 ± 27.93) and in the Widal group (539.38 ± 40.72) compared with the control group (337.48 ± 25.13) in relation to the reference values (eosinophils 50 to 500/ μ l). This study found no difference men, women and age in relation to the incidence of NP and their associations.

b. Table 2: Polyps size, enzymatic and non-enzymatic evaluations, carbonyl groups and nitrite and nitrate

Polyps size, evaluations of enzymatic and non-enzymatic (GST, SOD, GPx and GSH), damage in proteins (carbonyl groups) and NO₂ & NO₃ are presented in Table 2. The level of GSH was higher in the Widal group (0.12 ± 0.01) compared with the control group (0.06 ± 0.01). Enzymatic activity of GPx was lower in the asthma group (50.8 ± 7.67) compared with the control group (153 ± 37.11). Data for NO₂ & NO₃ was higher in the Widal group (33.34 ± 10.48) compared to the control group (15.95 ± 1.38).

In the asthma group, H₂O₂ consumption, MDA, and vitamin E were significantly lower than in the control group. Data shows no difference between the Widal group and the control group (Figure 1. A-C) and levels of vitamin C were

undetectable in all groups, even with careful processing of samples and using a very sensitive tool such as the HPLC.

An attempt was also made using a different classification according to the size of the polyp. According to Rouvier's classification, polyps can have the following sizes: mild small polyp size (stage 1), medium moderate polyp size (stage 2) and obstructive or large polyp size (stage 3). Through this classification no significant differences were found in the redox profile of the three groups (data no show).

3. Discussion

This work was done based on the analysis three groups of polyps: a control group, polyposis without any association with other diseases, an asthma group, polyposis associated with asthma, and a Widal group - polyposis associated with asthma and aspirin intolerance. The objective was to find differences in the redox profile of these clinical groups of NP, based on antioxidant defenses and oxidative damage to have a clearer picture of the NP and their associations with oxidative stress.

Physiologically, RS are kept in balance with the antioxidant defense system in the body, condition called redox homeostasis. The RS are normally controlled by the antioxidant defense mechanisms, including enzymatic antioxidant such as SOD, catalase, GPx and GST, and non enzymatic antioxidants such as GSH, α -tocopherol, retinol, and ascorbic acid. Oxidative stress ensues when there is oxidants/antioxidants imbalance due to an excess of RS production or depletion of antioxidants (20).

Asthmatic patients are exposed to oxidative stress due to the generation of reactive oxygen and nitrogen species as a consequence of chronic airway inflammation. High levels of hydrogen peroxide, NO and isoprostane in exhaled breath, and excessive oxidative protein products in lung epithelial lining fluid, peripheral blood, and urine provide abundant evidence for pathologic oxidizing (processes in asthma). The situation is further aggravated by the fact that these patients have diminished defenses antioxidants (21). It was shown by remarkable increase in MDA and protein carbonyls in plasma. These was accompanied by alterations in several endogenous enzymatic antioxidants in erythrocytes including decreased catalase, GPx and SOD activities, whereas total blood glutathione increased (22).

Regarding the increase in eosinophils, this work shows a more significant difference in the asthma and in the Widal group compared to the control group. The eosinophilia, which is caused by parasitic infections, allergy, collagen vascular disease, hypersensitivity conditions, or underlying hematologic or malignancies (23), is well described in the literature. Given the exclusion criteria for the study, which were patients with cancer, hematological diseases, vascular diseases, among others, we can assume that the increase in the number of eosinophils is due to the presence of asthma.

The high concentration of inflammatory cells found in NP potentially results in the overproduction of RS. Inflammatory cells such as eosinophils and macrophages were shown to produce elevated amounts of RS (24, 25). Eosinophils are believed to be of great importance in inflammatory diseases, such as allergic asthma, atopic dermatitis, connective tissue diseases, among others (26). They are activated by various cytokines and inflammatory mediators, leading to the invasion of eosinophils at the site of inflammation and tissue damage by releasing toxic granule proteins and reactive species (27, 28).

Many theories have been proposed to explain the etiology of NP. These theories include adenoma and fibroma theories, glandular hyperplasia theory, gland new formation theory, glandular cyst theory, ion transport theory, and many others (29, 30). Studies which investigate the role of RS and antioxidants in NP have found strong evidence for the involvement of OS in the pathogenesis of this condition (31).

Nitric oxide (NO) can react with superoxide forming peroxynitrite, thereby preventing superoxide radicals from reacting with other radicals or attacking cellular components. In the lower respiratory tract, NO are low, normally less than 20 p.p.b (32). Raised levels indicate inflammation, which can have many causes, including allergy and infection (33). In the upper respiratory tract, the situation is more complex as constitutive nitric oxide production in high bactericidal levels (20 to 25 p.p.m.) occurs in paranasal sinuses (34). In the nasal epithelium the inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) is present and with a high activity, especially in patients with Widal syndrome (36). The increase in NO₂ & NO₃ in the Widal group can be due to high concentrations of inflammatory cells in the nasal mucosa, NP and aspirin sensitivity. It is possible that this increase has induced the synthesis of glutathione. Moellering et al (35) and Li et al (36) showed that, in endothelial cell, nitric oxide increases intracellular GSH concentration by induction

of γ -glutamylcysteine synthetase (GCS), the rate-limiting enzyme of glutathione synthesis, as well as cellular cystine uptake. In lung samples of patients with asthma increased levels of glutathione are typically observed, which appear to relate to the level of pulmonary inflammation and are therefore regarded as an adaptive response to the associated oxidative stress. Also in blood samples increased total GSH levels have been reported, representing the systemic inflammatory component of the disease (Reynaert, 2011). There are no data in the literature regarding the systemic oxidative profile in Widal patients. Noteworthy was observed the increase of GSH and NO in the nasal polyp extract of Widal group, but not the asthma group.

For levels of GPx and enzymes that detoxify the hydrogen peroxide (H_2O_2), like catalase and peroxiredoxins, which are the main enzymes that detoxify H_2O_2 , but not the only (13), in asthma group, Yalcin et al (37) showed that bronchial asthma can be found in two periods: stable and exacerbation. In the exacerbation period, in which there is transient increase in the severity of a symptom or a disease, there is a reduction in the levels of reduced glutathione, GPx, catalase and MDA, while there are high levels of eosinophils in both periods. However, it is not known in which period these patients were. Based on the findings of low levels of GPx, catalase and MDA, it is believed that the patients in the asthma group could be in the period of exacerbation and that corticosteroid medication only influenced the reduction in polyp size to optimize endoscopic surgery (38).

An important mechanism in the development of cell injury due to reactive species is lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids in cell membranes, leading to the formation of products such as MDA which is an end product of lipid peroxidation (39). Dogru et al. (6) reported that MDA levels were higher in NP tissue when compared to the nasal mucosa used as a control. Many studies use nasal mucosa as a control group (1, 6, 9, 10, 20, 40, 41). In this study, the objective was to compare the data of patients with polyposis 3 groups, and then decided to consider the group with polyposis not associated with other diseases such as control.

This work shows low levels of MDA and Vitamin E in the asthma group when compared with the control group. Therefore, it can be inferred that the lipid is protected from damage by vitamin E in that group, because tocopherols and tocotrienols inhibit lipid peroxidation, they scavenge lipid peroxy radicals (42). It is well known that Vitamin E is absorbed through the diet and can be mobilized for

different tissues according to the injury occurred (43, 44), then, it is possible that vitamin E could migrate to the polyp tissue and prevent further damage to the nasal mucosa (lipoperoxidation) and the low levels of vitamin C lead to low levels of vitamin E, in the asthma group. This happens because the ascorbate regenerates the α -tocopherol, donating hydrogen. As a result, the ascorbate becomes semidehydroascorbate (45). Therefore, without ascorbate does not occur regeneration of vitamin E. However, we cannot rule out the possibility that variations in the levels of vitamin E be due to the diet of patients. There are no studies that measure the levels of vitamin E and C in patients with asthma. But there are several clinical trials with administration of these vitamins in patients (46).

4. Conclusion

Polyps of patients with asthma have changes in enzymatic defense pathways related to hydrogen peroxide and lipid peroxidation and polyps of patients with Widal triad present changes in nitric oxide and glutathione. This happened because there are similarities and differences in the groups and, based on the results obtained, cannot elucidate one of the exact redox classification that identifies and/or clinical group differs from another.

The oxidative stress could point to as a participant in both the inflammation process as well as the subsequent formation of the polyp. However, others types of analysis and/or strategies are necessary to elucidate better redox classification. Here are some suggestions: increase the number of samples per group; homogenize the size of the groups and collect NP along with blood samples from the same patient to make a redox comparison between the two samples and among the three groups.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank Santa Casa de Misericordia Hospital for providing facilities for the samples collection, Dr. I. Vaz, for generously providing equipment, and Dr. C. Staats for reviewing the paper.

Table I: Anthropometric and laboratory data

Dependent Variable	Control Group			Asthma Group			Widal Group		
Age	46.66	±	2.72	50.05	±	2.93	42.5	±	3.91
Glucose (mg/dL)	95.81	±	1.62	92.65	±	1.81	92.25	±	2.64
Creatine (mg/dL)	0.88	±	0.03	0.96	±	0.04	0.87	±	0.06
Uric acid (mg/dL)	5.43	±	0.3	5.24	±	0.34	5.24	±	0.49
Cholesterol (mg/dL)	171.24	±	5	160.59	±	5.56	168.88	±	8.11
Triglycerides (mg/dL)	149.1	±	3.92	121.6	±	4.36*	141.38	±	6.36
HDL (mg/dL)	67.14	±	2.18	70	±	2.42	68.13	±	3.53
LDL (mg/dL)	93.89	±	3.92	89.06	±	4.36	86.25	±	6.35
Erythrocytes (mill/μL)	4.979	±	0.09	4.91	±	0.1	4.79	±	0.15
Hemoglobin (g/dL)	15.51	±	0.32	15.15	±	0.36	14.69	±	0.53
Leukocytes (/μL)	7970.19	±	393.73	7610	±	437.61	7807.5	±	637.91
Basophils (/μL)	70.76	±	5.73	51.71	±	6.4	60.13	±	9.3
Eosinophils (/μL)	337.48	±	25.13	529.24	±	27.93*	539.38	±	40.72*
Neutrophils (/μL)	4018.71	±	243.33	4003.47	±	270.45	4046.5	±	394.25
Lymphocytes (/μL)	2365.43	±	174.91	2613.03	±	194.41	2784.88	±	283.4
Platelets (/μL)	234810	±	13419.11	285706	±	14914.51	287125	±	21741.45

Data is given as mean ± SE unless otherwise noted.

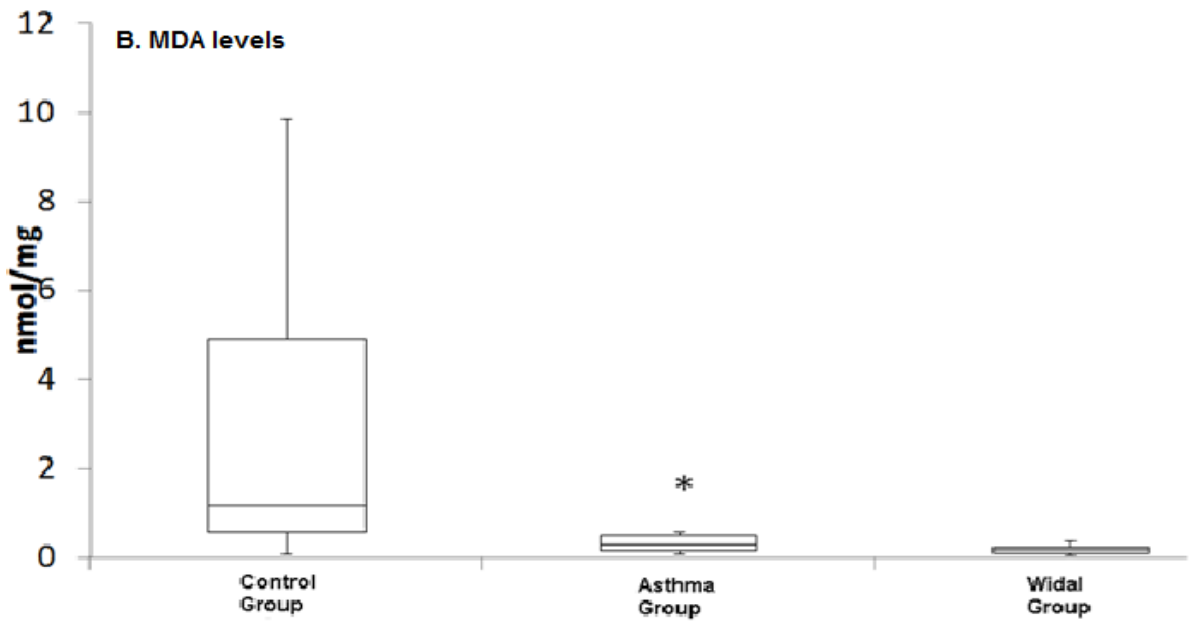
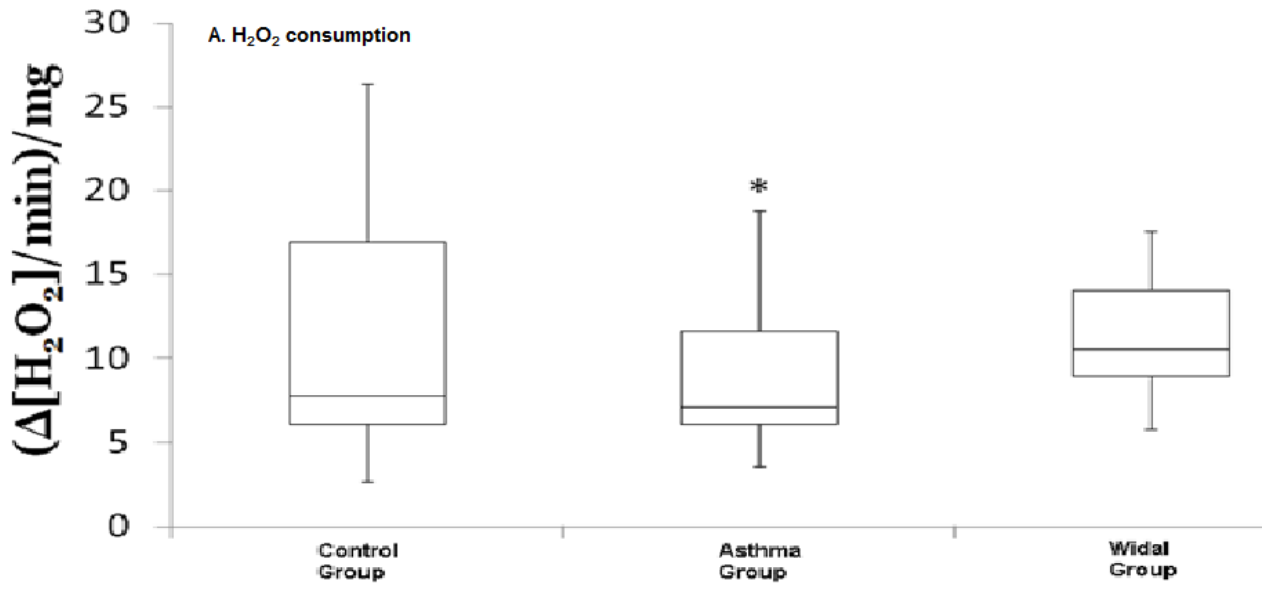
*p≤ 0.05 when compared with the control group.

Table II: Polyps size and nasal polyp tissue biomarkers

Dependent Variable	Control Group			Asthma Group			Widal Group		
Polyps size (g)	2.43	±	0.18	2.18	±	0.21	2.57	±	0.18
Carbonyl group (nmol/g)	0.07	±	0.02	0.07	±	0.02	0.08	±	0.01
GST (U/mg)	1.4	±	0.49	1.5	±	0.22	1.96	±	0.21
SOD (U/mg)	7.14	±	1.35	5.16	±	0.76	8.16	±	0.93
GSH (μmol/mg)	0.06	±	0.01	0.09	±	0.01	0.12	±	0.01*
GPx (U/g)	153	±	37.11	50.8	±	7.67*	132.98	±	8.02
NO ₂ & NO ₃ (nmol/mg)	15.95	±	1.38	19.73	±	3.41	33.34	±	10.48*

Data are given as mean ±SE unless otherwise noted.

*p≤ 0.05 when compared with the control group.



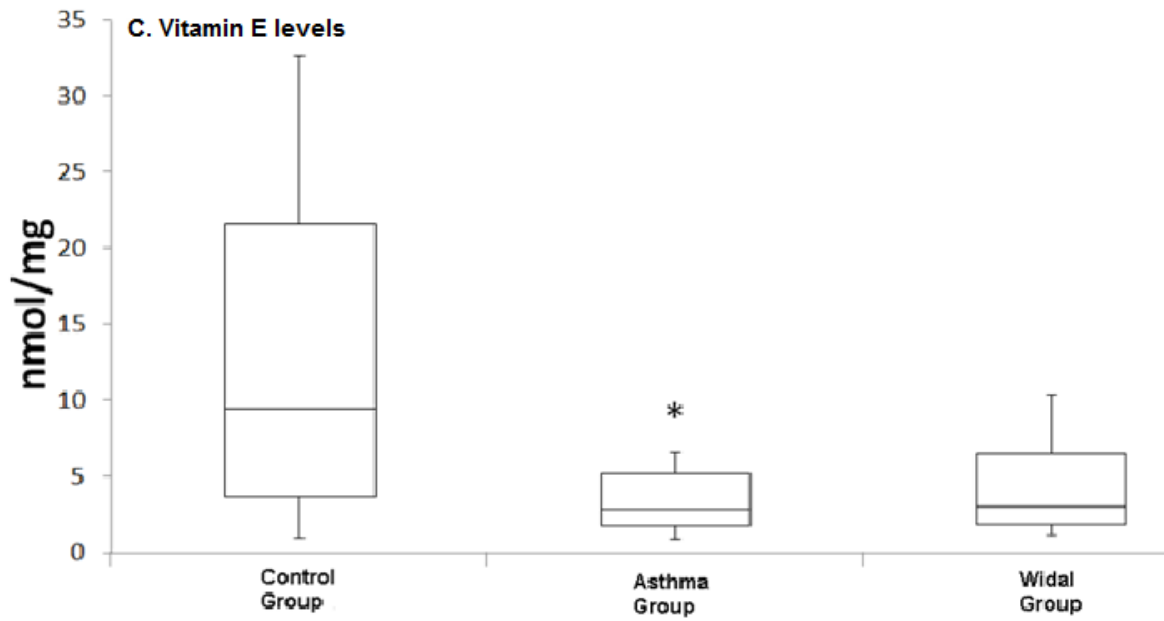


Figure 1 nasal polyp tissue biomarkers: A. H_2O_2 consumption; B. MDA levels and C. Vitamin E levels * $p \leq 0.05$ comparing with the control group.

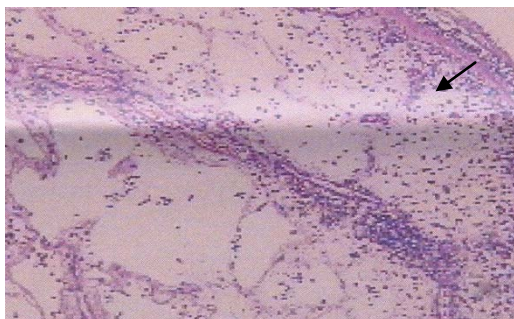
6. References

1. Dagli M, Eryilmaz A, Besler T, Akmansu H, Acar A, Korkmaz H. Role of free radicals and antioxidants in nasal polyps. *Laryngoscope* 2004; 114: 1200-1203.
2. SBORL. Tratado de Otorrinolaringología. 1ª ed; 2003. p. 88-99.
3. Ganju SA, Bhagra S, Kanga AK, Singh DV, Guleria RC. A case report of an uncommon phaeoid fungal infection in nasal polyposis and review of literature. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2013; 31: 196-198.
4. Bernstein JM, Gorfien J, Noble B. Role of allergy in nasal polyposis: A review. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1995; 113: 724-732.
5. Fairbanks DNF. Dental and allergic aspects of sinusitis and nasal polyposis - A Review. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1982; 90: 527-533.
6. Dogru H, Delibas N, Doner F, Tuz M, Uygur K. Free radical damage in nasal polyp tissue. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2001; 124: 570-572.
7. Sagit M, Erdamar H, Saka C, Yalcin S, Akin I. Effect of antioxidants on the clinical outcome of patients with nasal polyposis. *Journal of Laryngology and Otology* 2011; 125: 811-815.
8. Halliwell B. Oxidants and human disease, some new concepts. *Faseb Journal* 1987; 1: 358-364.
9. Karlidag T, Ilhan N, Kaygusuz I, Keles E, Yalcin S, Yildiz M. Roles of free radicals, nitric oxide, and scavenging enzymes in nasal polyp development. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology* 2005; 114: 122-126.
10. Ye Z-W, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2015; 1850: 1607-1621.
11. Doner F, Delibas N, Dogru H, Sari I, Yorgancigil B. Malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in experimental maxillary sinusitis. *Auris Nasus Larynx* 1999; 26: 287-291.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease, where are we now. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1992; 119: 598-620.
13. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol* 1984; 105: 121-126.
14. Taniguchi N, Gutteridge J. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford UK; 2000.
15. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *Lc Gc North America* 2004: 104-106.
16. Barbas C, Castro M, Bonet B, Viana M, Herrera E. Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1997; 778: 415-420.
17. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 464-478.
18. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Nitric Oxide, Pt a - Sources and Detection of No; No Synthase* 1996; 268: 237-246.
19. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
20. Cheng YK, Tsai MH, Lin CD, Hwang GY, Hang LW, Tseng GC, Shen PS, Chang WC. Oxidative stress in nonallergic nasal polyps associated with bronchial hyperresponsiveness. *Allergy* 2006; 61: 1290-1298.
21. Comhair SAA, Erzurum SC. Redox Control of Asthma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 2010; 12: 93-124.
22. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Annals of Thoracic Medicine* 2012; 7: 226-232.

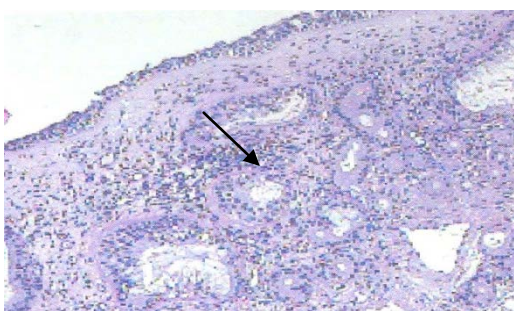
23. Zhou W-W, Guan Y-Y, Liu X-M. Paraneoplastic Eosinophilia in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Chinese Medical Journal* 2015; 128: 2271-2272.
24. Millar TM, Kanczler JM, Bodamyali T, Stevens C, Blake DR. Nitric oxide. Its generation, reactions and role in physiology. *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects* 2003; 344: 71-88.
25. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002; 110: 349-356.
26. Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Eosinophils: Biology and role in disease. *Advances in Immunology, Vol 60* 1995; 60: 151-266.
27. Rochester CL, Ackerman SJ, Zheng T, Elias JA. Eosinophil-fibroblast interactions - Granule major basic protein interacts with IL-1 and transforming growth factor-beta in the stimulation of lung fibroblast IL-6-type cytokine production. *Journal of Immunology* 1996; 156: 4449-4456.
28. Ying S, Tabordabarata L, Meng Q, Humbert M, Kay AB. The kinetics of allergen-induced transcription of messenger-RNA for monocyte chemoattractant protein-3 and rantes in the skin of human atopic subjects, relationship to eosinophil, T-cell and macrophage recruitment. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 181: 2153-2159.
29. M T, C M. Pathogenesis of nasal polyps. 1977. p. 87-97.
30. Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy and Asthma Proceedings* 1996; 17: 231-236.
31. Taysi S, Uslu C, Yilmaz A, Aktan B, Altas E. Lipid peroxidation and some antioxidant enzymes in nasal polyp tissue. *Cell Biochemistry and Function* 2006; 24: 461-465.
32. Borland C, Cox Y, Higenbottam T. Measurement of exhaled nitric oxide in man. *Thorax* 1993; 48: 1160-1162.
33. Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *European Respiratory Journal* 1995; 8: 295-297.
34. Lundberg JON, Farkasszallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggard A, Hokfelt T, Lundberg JM, Alving K. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nature Medicine* 1995; 1: 370-373.
35. Moellering D, McAndrew J, Patel RP, Cornwell T, Lincoln T, Cao X, Messina JL, Forman HJ, Jo HJ, Darley-Usmar VM. Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998; 358: 74-82.
36. Li HF, Marshall ZM, Whorton AR. Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1999; 276: C803-C811.
37. Yalcin AD, Gorczyński RM, Parlak GE, Kargi A, Bisgin A, Sahin E, Kose S, Gumuslu S. Total Antioxidant Capacity, Hydrogen Peroxide, Malondialdehyde and Total Nitric Oxide Concentrations in Patients with Severe Persistent Allergic Asthma: Its Relation To Omalizumab Treatment. *Clinical Laboratory* 2012; 58: 89-96.
38. Tuncer U, Soyly L, Aydogan B, Karakus F, Akcali C. The effectiveness of steroid treatment in nasal polyposis. *Auris Nasus Larynx* 2003; 30: 263-268.
39. Cekin E, Ipcioglu OM, Erkul BE, Kapucu B, Ozcan O, Cincik H, Gungor A. The Association of Oxidative Stress and Nasal Polyposis. *Journal of International Medical Research* 2009; 37: 325-330.
40. Okur E, Inanc F, Yildirim I, Kilinc M, Kilic MA. Malondialdehyde level and adenosine deaminase activity in nasal polyps. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2006; 134: 37-40.
41. Kamani T, Sama A. Management of nasal polyps in 'aspirin sensitive asthma' triad. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2011; 19: 6-10.

42. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. London; 2007.
43. Green PHR, Riley JW. Lipid absorption and intestinal lipoprotein formation. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 1981; 11: 84-90.
44. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Current Opinion in Lipidology* 2014; 25: 200-206.
45. Barreiros A, David JM, David JP. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova* 2006; 29: 113-123.
46. Han Y-Y, Forno E, Holguin F, Celedon JC. Diet and asthma: an update. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2015; 15: 369-374.

4. RESULTADO SUPLEMENTAR



I



II



III

Figura 2: Histologia do tecido de pólipos nasais. I- Grupo controle, II- Grupo asma e III- Grupo Vidal. As setas indicam a concentração dos eosinófilos em cada grupo. Coloração Hematoxilina-Eosina, 50X. Figuras representativas.

5. DISCUSSÃO SUPLEMENTAR

Para avaliar as implicações do estresse oxidativo (EO) na patogenia da PN foram analisados diversos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos assim como danos oxidativos em proteínas e lipídios e a quantidade de óxido nítrico em tecidos de pólipos retirados de pacientes com PN, a fim de elucidar as diferenças de perfil clínico da PN e suas associações.

Todas as medidas foram comparadas, analisadas e associadas aos diferentes tipos de PN com vista ao melhor diagnóstico e prognóstico da doença.

O trabalho foi feito com três tipos de PN. O grupo controle, PN sem associação a doença, grupo 2 ou grupo asma, PN associada à asma e grupo 3 ou grupo Widal, que é a associação de PN, asma e intolerância ao AAS. As maiorias dos trabalhos de PN utilizam mucosa nasal como grupo controle (Dagli *et al.*, 2004; Dogru *et al.*, 2001; Karlidag *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2015). Neste trabalho se usou PN como grupo controle uma vez que o objetivo era comparar os três tipos de PN.

É sabido que os pólipos são geralmente moles, brilhantes, com coloração levemente rosada ou acinzentada, com superfície lisa, indolor a palpação e de aspecto translúcido e que na maioria dos casos eles aparecem após de um processo inflamatório que ocorre na mucosa das cavidades nasais e paranasais, podendo ser únicos ou múltiplos e também unilaterais ou bilaterais e de tamanho variável (Miyake & Voegels, 2002).

Na literatura está bem descrito que o processo inflamatório acarreta mudanças na formação de células sanguíneas e a mobilização delas ao lugar da inflamação (Wardlaw *et al.*, 1995; Rochester *et al.*, 1996; Ying *et al.*, 1995). A eosinofilia pode ocorrer por um processo infeccioso por parasitas, alergia (como asma e intolerância ao AAS) e outras diferentes doenças (Zhou *et al.*, 2015). Neste sentido, se observa (Tab. 1 – do Artigo) uma diferença significativamente maior nos eosinófilos em dois grupos, asma e Widal, em relação ao grupo controle. Aumento dos eosinófilos pode ser observado ao comparar a histologia de cada um dos pólipos (Figura 2– Resultados Suplementar).

Sabe-se que os eosinófilos aumentados podem ocorrer por asma e alergia e que a alta concentração de células inflamatórias pode levar à sobre produção de ER. Células inflamatórias como eosinófilos e macrófagos podem produzir uma elevada quantidade de ER (Millar *et al.*, 2003; Bowler & Crapo, 2002).

ER incluem íons de oxigênio, nitrogênio, radicais livres e peróxidos, tanto inorgânicos como orgânicos e as ER são formadas pelo metabolismo normal da célula (Halliwell, 1987; Karlidag *et al.*, 2005). As ER estão envolvidas na produção de energia, crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular, sinalização, morte celular programada, envelhecimento, entre outras importantes funções celulares (Ye *et al.*, 2015). Fisiologicamente as ER são mantidas em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático no corpo, processo denominado balanço redox (Cheng *et al.*, 2006). As ER são normalmente controladas por enzimas antioxidantes com SOD, CAT, peroxirredoxinas, GPx, e GST e também por antioxidantes não enzimáticos com GSH, α -tocoferol, retinol, ácido ascórbico entre outros (Cheng *et al.*, 2006)

Várias teorias foram propostas para explicar a etiologia da PN, entre elas estão à teoria de adenomas e fibromas, teoria da hiperplasia glandular, teoria do transporte iônico e muitas outras (Settipane, 1996). Novos estudos estão investigando as ER na etiologia e formação da PN demonstrando fortes evidências de que o EO está implicado na patogênese desta condição (Taysi *et al.*, 2006).

ERNs são principalmente formadas pelo óxido nítrico (NO). No estado de repouso, o NO é considerado uma molécula de sinalização. As fontes de NO são três sintases de óxido nítrico (NOSs): a. NOS constitutiva, a qual é encontrada no epitélio respiratório, vasos sanguíneos e terminações nervosas; b. NOS induzível, encontra-se no epitélio respiratório e em macrófagos ativados (Kobzik *et al.*, 1993) e c. NOS neural, encontrada em plexo nervoso (Guembe & Villaro, 1999). No tecido muscular das vias respiratórias o NO pode agir como um bronco dilatador, mas no epitélio o NO funciona como regulador da resposta imune (Bowler & Crapo – 2002).

Neste trabalho, pacientes do grupo Widal demonstraram um aumento significativo nos níveis de NO₂ e NO₃ e de GSH em comparação a grupo controle (Tab. 2 – do Artigo), o aumento de NO₂ e NO₃ poderia ser pelo aumento de células inflamatórias, que estão concentrados nos tecidos dos pólipos da mucosa nasal e a intolerância ao AAS poderia ajudar com o aumento no número destas.

Parikh *et al.* demonstraram que a forma NOS induzível, está presente no epitélio nasal e há um aumento da sua atividade em NP, especialmente em pacientes sensíveis a aspirina, isso poderia explicar o aumento de NO₂ e NO₃ no grupo Widal (Parikh *et al.*, 1999). O tratamento farmacológico com esteroides tópicos ou sistêmicos leva ao aumento da concentração de NO em exalados em pacientes com asma (Kharitonov *et al.*, 1994). Tratamento com corticoides tópicos ou sistêmicos é de uso comum na PN para reduzir o tamanho deles (Lildholdt *et al.*, 1997; Karlsson & Runderantz, 1982), mas neste trabalho não foi feito um levantamento para descobrir se os pacientes cumpriram com a rotina de tomar os medicamentos corticoides por sete dias, e por isso não podemos afirmar que o aumento do NO seja pelo medicamento.

O aumento de NO observado no grupo Widal deste trabalho pode aumentar a indução da síntese de glutathiona total (tGSH), o que poderia explicar os resultados observados. Moellering *et al.* e Li *et al.* demonstraram que, em células endoteliais, o NO aumenta a concentração intracelular de GSH por indução da enzima γ -glutamil cisteína sintase (GCS), enzima que limita a síntese de glutathiona e também limita a taxa de captação da cistina (Moellering *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999). Esta relação entre o aumento de NO₂ e NO₃ e a sínteses de GSH poderia explicar o aumento de tGSH no grupo Widal,

Para os níveis baixos de GPx (Tabela 2 – do Artigo), consumo de H₂O₂ (Figura 1: A – do Artigo) e MDA (Figura 1: B – do Artigo) achados no grupo asma com relação ao grupo controle, poderíamos dizer, com base nos resultados obtidos, que os pacientes do grupo asma se encontram no período de exacerbação da doença. Yalcin *et al.* demonstraram que a asma bronquial pode ser encontrado em dois períodos: estável e exacerbação. No período de exacerbação há um aumento na gravidade de um sintoma ou de uma doença, há

uma redução nos níveis de glutathiona reduzida, GPx, catalase e MDA, enquanto que os níveis de eosinófilos continuam elevados em ambos os períodos (YALCIN *et al.* 2012). Esta relação entre a exacerbação e os baixos níveis de GPx, consumo de H₂O₂ e MDA e os altos níveis de eosinófilos obtidos no grupo asma, poderia explicar os resultados achados neste trabalho.

O MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em lipídios, ele é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poli-insaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoleico, araquidônico e docosaexaenoico (Kadiiska *et al.*, 2005). Dogru *et al.* relataram que os níveis de MDA foram maiores no tecido NP quando comparado com a mucosa nasal utilizada como um controle (Dogru *et al.*, 2001).

Este trabalho mostra baixos níveis de MDA e vitamina E (Figura 1: B e C – do Artigo) no grupo de asma quando comparado com o grupo controle. Portanto, pode-se inferir que os lipídios são protegidos de dano oxidativo por ação da vitamina E neste grupo. Os tocoferóis e tocotrienóis inibem a peroxidação lipídica ao eliminar os radicais peroxil lipídicos (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Sabe-se que a vitamina E pode ser mobilizada de um lugar para outro no organismo (Green & Riley, 1981; Hussain, 2014; Barreiros *et al.*, 2006) , e com base disso poderíamos supor que a vitamina E migrou para o tecido do pólipo para prevenir mais danos na mucosa nasal. O ascorbato regenera o α -tocoferol pela doação de um hidrogênio, como resultado disto o ascorbato torna-se semi dehidroascorbato (Barreiros *et al.*, 2006). Os baixos níveis da vitamina C poderiam levar a um baixo nível de vitamina E já que não haveria quantidade de ascorbato para poder regenerar o α -tocoferol. Como o estudo demonstrou que os níveis da vitamina C não foram detectados nos três grupos, mesmo com uma técnica sensível como HPLC, acredita-se que isso influenciaria nos níveis da vitamina E.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme a revisão da literatura realizada no presente trabalho sabe-se que a PN é uma doença com uma incidência alta. Tanto com tratamento farmacológico e cirúrgico existe uma alta porcentagem de recidiva nos pacientes com PN.

Não há um estudo que compare a PN, PN e associações e medidas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, danos em proteínas e lipídios e níveis de NO_2 e NO_3 . Neste trabalho foi avaliado o EO em três grupos de pólipos, analisando parâmetros de danos em proteínas (grupo carbonila) e danos em lipídeos (MDA) para fazer uma associação e diferença entre os grupos. Foram quantificadas as atividades dos antioxidantes enzimáticos SOD, GPx e GST, os resultados foram analisados e comparados entre os grupos.

As alterações nos perfis oxidativos encontradas, poderiam apontar ao EO como participante tanto do processo da inflamação assim como na subsequente formação do pólipo.

7. PERSPECTIVAS

Com a conclusão deste trabalho podemos pensar em novas estratégias para elucidar as implicações do EO, PN e PN e associações (asma e asma com intolerância ao AAS).

Estas novas estratégias podem ser:

- a. aumentar o tamanho das amostras,
- b. homogeneizar o número de paciente nos três grupos,
- c. fazer coleta tanto de tecido do pólipo e tecido sanguíneos para novos estudos (bioquímicos e genéticos)

8. REFERÊNCIAS

- Barreiros, A., David, J.M., David, J.P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova*; 29: 113-123. 2006.
- Boyer, T. D. The glutathione S-transferases. An update. *Hepatology*, 9 (3), 486–96. 1989.
- Braun, J., J., Haas, F. & Conraux, C. Polyposis of the nasal sinuses. Epidemiology and clinical aspect of 350 cases. Treatment and follow-up over 5 years on 93 cases. *109: 189-199*. 1992.
- Bowler, R.P., Crapo, J.D. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 110: 349-356. 2002.
- Bugdayci, G. & Kaymakci, M. Nitrite, nitrate and malondialdehyde levels in nasal polyp. *Cellular and molecular biology*. 1043-1045. 2008.
- Cepero, R., Smith, R., J., H., Catlin F., I., Bressler, K., L., Furuta, G., T. & Shandera, K., C. Cystic fibrosis – an otolaryngologic perspective. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 97: 356-360. 1987.
- Cheng, Y., K., Tsai, M., H., Lin, C., D., Hwang, G., Y., Hang, L., W., Tseng, G., C., Shen, P., S. & Chang, W., C. Oxidative stress in nonallergic nasal polyps associated with bronchial hyperresponsiveness. *Allergy*. 61: 1290-1298. 2006.
- Cox, A. G., Winterbourn, C. C. & Hampton, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defense and redox signaling. *Biochemical journal*, 425, 313-325. 2010.
- Dagli, M., Eryilmaz, A., Besler, T., Akmansu, H., Acar, A. & Korkmaz, H. Role of free radicals and antioxidants in nasal polyps. *Laryngoscope*. Vol. 114(7):1200-1203. 2004.
- Davies, M. B., Austin, J. & Partridge, D. A. Vitamin C. Its chemistry and biochemistry. Royal Society of chemistry, Cambridge. 1991.

De Shazo, R., D. & Swain, R., E. Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. *J Allergy Clin. Immunol.* 96: 24-35. 1995.

Dogru, H., Delibas, N., Doner, F., Tuz, M., Uygur, K. Free radical damage in nasal polyp tissue. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*; 124: 570-572. 2001.

Doner, F., Delibas, N., Dogru, H., Sari, I., Yorgancigil, B. Malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in experimental maxillary sinusitis. *Auris Nasus Larynx*; 26: 287-291. 1999.

F. C. P. Valera, R. Queiroz, C. Scrideli, L.G. Tone, W. T. Anselmo-Lima. Expression of transcription factors NF- κ B and AP-1 in nasal polyposis. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 579-585. 2008.

Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. Superoxide dismutase. Role in redox signaling, vascular function and Diseases. *Antioxidants & Redox signaling*, 15(6), 1583-1603. 2011.

Green, P.H.R., Riley, J.W. Lipid absorption and intestinal lipoprotein formation. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*; 11: 84-90. 1981.

Guembe, L., Villaro, A.C. Histochemical demonstration of neuronal nitric oxide synthase during development of mouse respiratory tract. *Am J. Respir Cell Mol Biol.*;20:342–351. 1999.

Hadfield, P., J., Rowe Jones, J., M. & Mackay, I., S. The prevalence of nasal polyps in adults with cystic fibrosis. *Clin Otol.* 25: 19-22. 2000.

Halliwell, B. Oxidants and human disease, some new concepts. *Faseb Journal*; 1: 358-364. 1987.

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C, Cross, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease, where are we now. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*; 119: 598-620. 1992.

Halliwell, B. & Gutteridge; J.M.C. free Radicals in Biology and Medicine, 5th ed, New York, oxford university press. 2015.

Hussain, M.M. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Current Opinion in Lipidology*; 25: 200-206. 2014.

Jankowski R., Bouchoua F., Coffinet L., Vignaud J.M. Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps. *Rhinology*; 40: 173-178. 2002

Jantti-Alanko, S., Holopainen, E. & Malmberg, H. Recurrence of nasal polyps after surgical treatment. *Rhinology*. 8: 59-64. 1989.

Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., & Shishibori, T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental Research* 93, 31–35. 2003.

Kadiiska, M. B. et al. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the non steroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl₄ poisoning. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 38, n. 6, p. 711-718, 15. 2005.

Karlidag T, Ilhan N, Kaygusuz I, Keles E, Yalcin S, Yildiz M. Roles of free radicals, nitric oxide, and scavenging enzymes in nasal polyp development. *Annals of Otolaryngology Rhinology and Laryngology*; 114: 122-126. 2005.

Karlsson, G., Runderantz, H. A randomized trial of intranasal beclomethasone dipropionate after polypectomy. *Rhinol.* 20:144-8. 1982.

Kharitonov, S. A., Yates, D., Robbins, R.A., Logansinclair, R., Shinebourne, E. A., Barnes, P. J. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*; 343: 133-135. 1994.

Kobzik, L., Bredt, D.S., Lowenstein, C.J., Drazen, J., Gaston, B., Sugarbake, D., Stamler, J.S. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Bio*; 9:371–377. 1993.

Kojo, S. Vitamin C. Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 11(8), 1041-1064; 2004.

Larsen, K. The clinical relationship of nasal polyps to asthma. *Allergy and asthma proc.* 17: 243-249. 1996.

Larsen, K. & Tos, M. The estimated incidence of symptomatic nasal polyps. *Actaotolaryngol.* 122: 179-182. 2002.

Larsen, P., L. & Tos, M. Site of origin of nasal polyps. Endoscopic nasal and paranasal sinus surgery as a screening method for nasal polyps in autopsy material. *Am J Rhinol.* 10: 211-216. 1996.

Larsen, P., L. & Tos, M. Origin of nasal polyps. *Laryngoscope.* 101: 305-312. 1991.

Li, H.F., Marshall, Z.M., Whorton, A.R. Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*; 276: C803-C811. 1999.

Lildholdt, T., Runderantz, H., Bende, M., Larsen, K. Glucocorticoid treatment for nasal polyps. The use of topical budesonide, intramuscular betamethasone, and surgical treatment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 123:595-600. 1997.

Low, F. M., Hampton, M. B. & Winterbourn, C. C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1621-1629. 2008.

Mandl, J., Szarka, A. & Banhegyi, G. Vitamin C. Update on physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology*, 157(7), 1097-1110. 2009.

Manning, S., C. & Holman, M. Further evidence for allergic pathophysiology in allergic fungal sinusitis. *Laryngoscope.* 108: 1485-1496. 1998.

Millar, T.M., Kanczler, J.M., Bodamyali, T., Stevens, C., Blake, D.R. Nitric oxide. Its generation, reactions and role in physiology. *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects*; 344: 71-88. 2003.

Miyake M., A., M. & Voegels R., L. Polipose nasossinusal. *Tratado de otorrinolaringologia.* São Paulo. Roca. 2002.

Moellering, D., McAndrew, J., Patel, R.P., Cornwell, T., Lincoln, T., Cao, X., Messina, J.L., Forman, H.J., Jo, H.J., Darley-Usmar, V.M. Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 358: 74-82. 1998.

Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E. & Turi, S. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *Journal of Chromatography B-Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 877: 3331-3346. 2009.

Moorthy, K., Sharma, D., Basir, S. F. & Baquer, N. Z. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferase in naturally menopausal rats. *Experimental gerontology*, 40: 295-305. 2005.

Mygind, N., Lildholdt, T. Medical management. In: Settipane, G., Lund, V. J., Bernstein, J. M., Tos, M. (eds.) *Nasal polyps: epidemiology, pathogenesis and treatment*. Providence, RI: Ocean Side Publications: 147-55p. 1997.

Myngind, N., Dahl, R., & Bachert, C. Nasal polyposis, eosinophil inflammation and allergy. *Thorax*. 55: S79-S83. 2000.

Neely, J., G., Harrison, G., M., Jenger, J., F., Greenberg, S., D. & Presberg, H. The otolaryngologic aspects of cystic fibrosis. *Trans amacad Ophthalmolotolaryngol*. 76: 313-324. 1972.

Özcan, C., Tamer, L., Aras, Ates, N. & Görür, K. The glutathione-S-transferase gene polymorphisms (Gstt1, Gstm1 and Gstp1) in patients with non-allergic nasal polyposis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*. 267:227-232. 2010.

Parikh, A., Mitchell, J.A., Scadding, G.K. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity in aspirin-sensitive nasal polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 103: S249-S249. 1999

Rigina, M., Serrano, E., Klossek, J., M., C. Rampette, L., Stoll, D., Bebear, J., P., Perrahia, M., Rouvier, P. & Peynegre, R. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France. The ORLI group experience. *Rhinology*. 40: 75-79. 2002.

Rochester CL, Ackerman SJ, Zheng T, Elias JA. Eosinophil-fibroblast interactions - Granule major basic protein interacts with IL-1 and transforming growth factor-beta in the stimulation of lung fibroblast IL-6-type cytokine production. *Journal of Immunology*; 156: 4449-4456. 1996.

Safirstein, B., H. Allergic Broncho pulmonary aspergillosis with obstruction of the upper respiratory tract. *Chest*. 70: 788-790. 1976.

Sagit, M., Erdamar, H., Saka, C., Yalcin, S. & Akin I., Effect of antioxidants on the clinical outcome of patients with nasal polyposis. *The journal of Laryngology & Otology*. 125, 811-815. 2011.

Samter, M. & Beers, R., F. Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis. *Ann Intern Med*. 68:975-983. 1968.

Samter, M. & Beers, R., F. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy*. 40(5): 281-293. 1967.

Saunders, M. W., Wheatley, A. H., George, S. J., Lai, T., Birchall, M. A. Do corticosteroids induces apoptosis in nasal polyps inflammatory cells? In vivo and in vitro studies. *Laryngoscope*. 109(5): 785 -790. 1999.

Schenck, N., L. Nasal polypectomy in the aspirin-sensitive asthmatic. *Trans amacadophtalmol-otolaringol*. 78: 108-119. 1974.

Settipane, G., A. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy and asthma proc*. 17: 231-236. 1996.

Shuvaeva, T. M., Novoselov, V. I., Fesenko, E. E., & Lipkin, V. M. Peroxiredoxins, a new Family of antioxidant proteins. *Russian Journal of Bioorganic chemistry*, 35(5), 523-537. 2009.

Singh, B. C., Bag, P. P., Kumakura, F., Iwaoka, M. & Priyadarsini, K. I. Role of substrate reactivity in the glutathione peroxidase (GPx) activity of selenocystine. *Bulletin of the chemical society of Japan*, 83(6), 703-708. 2010.

Stierna, P., L. Nasal polyps. Relationship to infection and inflammation. *Allergy asthma proc.* 17(5): 251-257. 1996.

Suzuki, Y. J., Jain, V., Park, A. M. & Day, R. M. Oxidative stress and antioxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radicals biology and medicine*, 40: 1683-1692. 2006.

Szceklik, A. & Niankowska, E. Clinical features and diagnosis of induced asthma. *Thorax*. 55: S42-S44. 2000.

Tawakir Kamani & Anshul Sama. Management of nasal polyps in aspirin sensitive asthma triad. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 19:6-10. 2011.

Taysi S, Uslu C, Yilmaz A, Aktan B, Altas E. Lipid peroxidation and some antioxidant enzymes in nasal polyp tissue. *Cell Biochemistry and Function*; 24: 461-465. 2006.

Thomas, S., Lowe, J. E., Knowles, R. G., Green, I. C., & Green, M. H. L. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutation research*, 402: 77-84. 1998.

Tratado de Otorrinolaringologia (SBORL). 1º edição, volume 3, São Paulo, Editora Roca; pp88-99. 2003.

Tuncer, U., Soyulu, L., Aydogan, B., Karakus, F., Akcali, C. The effectiveness of steroid treatment in nasal polyposis. *Auris Nasus Larynx*; 30: 263-268. 2003.

Veerappan, R. M., Senthil, S., Rao, M. R., Ravikumar, R., & Pugalendi, K. V. Redox status and lipid peroxidation in alcoholic hypertensive patients and alcoholic hypertensive patients with diabetes. *ClinicaChimica Acta*, 340, 207. 212. 2004.

Viña, J., Borrás, C., Gambini, J., Sastre, J. & Pallardo, F. V. Why females live longer than males? Importance of the up regulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *Febs letters*, 579: 2541-2545. 2005.

Viña, J., Hems, R. & Krebs, H., A. Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *Biochemical journal*, 170: 627-630. 1978.

Virolainen, E., Puhakka, H. The effect of intranasal beclomethasone dipropionate on the recurrence of nasal polyps after ethmoidectomy. *Rhinol.* 18:9-18. 1980.

Voegels R., L. Nasal polyposis and allergy. Is there a correlation? *American Journal of Rhinology*, 15(1), 9-14. 2001.

Veyseller, B., Aksoy, F., Ertaş, B., Keskin, M., Özturan, O., Yildirim, Y., S., Bayraktar, G., I. & Öztürk. A new oxidative stress marker in patients with nasal polyposis: advanced oxidation protein products (AOPP). *B-ent.* Vol. 6, 105-109. 2010.

Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Eosinophils: Biology and role in disease. *Advances in Immunology*, Vol. 60; 60: 151-266. 1995.

Whitney W. Stevens, Anju T. Peters, Lydia Suh, James E. Norton, Robert C. Kern, David B. Conley, Rakesh K. Chandra, Bruce K. Tan, Leslie C. Grammer III, Kathleen E. Harris, Roderick G. Carter, Atsushi Kato, Margrit Urbanek, Robert P. Schleimer & Kathryn E. Hulse. A retrospective, cross-sectional study reveals that women with CRSwNP have more severe disease than men, *Immunity, Inflammation and Disease*; 3(1): 14-22. 2015

Widal, M., F., Abrami, P. & Lermoyez, J. Anaphylaxie etidiosyndraise. *Press Med.* 30:189. 1922.

Yalcin, A.D., Gorczynski, R.M., Parlak, G.E., Kargi, A., Bisgin, A., Sahin, E., Kose S., Gumuslu, S. Total Antioxidant Capacity, Hydrogen Peroxide, Malondialdehyde and Total Nitric Oxide Concentrations in Patients with Severe Persistent Allergic Asthma: It is Relation To Omalizumab Treatment. *Clinical Laboratory*; 58: 89-96. 2012.

Ye, Z.W., Zhang J., Townsend D.M., Tew, K.D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochemical et Biophysical Act-General Subjects*; 1850: 1607-1621. 2015.

Ying S, Tabordabarata L, Meng Q, Humbert M, Kay AB. The kinetics of allergen-induced transcription of messenger-RNA for monocyte chemo tactic protein-3 and rantes in the skin of human atopic subjects, relationship to eosinophil, T-cell and macrophage recruitment. *Journal of Experimental Medicine*; 181: 2153-2159. 1995.

Zhou, W.W., Guan, Y.Y., Liu, X.M. Paraneoplastic Eosinophilia in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Chinese Medical Journal*; 128: 2271-2272. 2015.

9. ANEXOS

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA.

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de Estresse Oxidativo em Pacientes com Polipose Nasal

Pesquisador: MARA DA SILVEIRA BENFATO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25856014.0.0000.5335

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 622.164

Data da Relatoria: 07/04/2014

Apresentação do Projeto:

Estudo do tipo intervenção/experimental, a ser realizado em 100 pacientes que possuem Pólipo nasal e necessitam realizar a retirada dos mesmos a qual será realizada na Irm. Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Após este procedimento este Pólipo será analisado para verificar se há correlação entre o estresse oxidativo e a formação de pólipos nasais.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme já referido em parecer anteriormente emitido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme já referido em parecer anteriormente emitido

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme já referido em parecer anteriormente emitido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme já referido em parecer anteriormente emitido.

Recomendações:

Não aplicável.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram adequados:

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

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 622.164

1. "O TCLE está sem espaço para escrever o nome do paciente, a assinatura e a data, assim como o do pesquisador": inserido em 04/04/2014, um novo modelo de TCLE onde constam os dados acima solicitados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

PORTO ALEGRE, 23 de Abril de 2014

Assinador por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

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

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: ESTUDO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM POLIPOSE NASAL,

Porto Alegre ____/____/____.

O tema escolhido se justifica pela importância de relacionar medidas de estresse oxidativo a diferentes tipos de polipose nasal a fim de contribuir para o melhor esclarecimento destas diferentes patologias, tendo em vista, o melhor diagnóstico e prognóstico da doença, sendo necessários maiores estudos.

O trabalho está sendo realizado sob a supervisão e orientação do professor Dr. Guilherme Franche, Otorrinolaringologista do Hospital Santa Casa de Misericórdia e Dra. Mara da Silveira Benfato da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Sendo assim, você está sendo convidado a participar da pesquisa acadêmica com o nome: **“ESTUDO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM POLIPOSE NASAL”**, o qual tem como objetivo principal Avaliar o estresse oxidativo em pólipos nasais extraídos de pacientes com polipose nasossinusal e asma, pacientes com polipose nasossinusal, asma e intolerância a ácido acetilsalicílico (Síndrome de Widal) e pacientes com polipose nasossinusal.

O material biológico a ser utilizado na pesquisa serão pólipos nasais, obtidos cirurgicamente pelo especialista em ORL Dr. Guilherme Franche. Este é o procedimento padrão realizado para a retirada completa do pólio nasal.

Procedimento do Estudo: Após a coleta, uma parte do pólio será levada ao laboratório de Patologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia e a outra parte será conservada em nitrogênio líquido e encaminhada para o Laboratório de Estresse Oxidativo no Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), para análises bioquímicas.

Este estudo pretende comparar os parâmetros de estresse oxidativo associados aos pólipos nasais.

INFORMAÇÃO: A polipose nasal é uma doença inflamatória que se dá na maior parte dos casos na mucosa dos seios paranasais, podendo levar a formação de tumores benignos, pela cicatrização e a formação de crostas. Os mecanismos de formação de pólipos nasais ainda não são bem compreendidos, mas sabe-se que isto está relacionado com mudanças nas defesas das células.

Riscos: Em relação ao projeto não há riscos para os pacientes uma vez que serão utilizados os pólipos nasais que são extraídos e enviados para a biópsia no laboratório de Patologia do hospital Santa Casa de Misericórdia. A coleta das amostras será feita através da cirurgia do pólipo por um especialista em ORL, Dr. Guilherme Franche com riscos inerentes a mesma.

Benefícios: Os benefícios incluem o melhor conhecimento sobre a associação da polipose nasal e, melhorando o tratamento de pessoas afetadas por esta doença.

Custo: A participação no estudo não gera custo ao paciente ou familiar.

Os dados de identificação serão confidenciais e os nomes reservados.

Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pelo (a) pesquisador (a) principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96).

EU _____ recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar voluntariamente do estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;
- De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim;

· Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa;

· Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com o Dr. Guilherme Franche ORL da Santa Casa da Misericórdia, pelo telefone (51)8181 8493, email: g.franche@hotmail.com ou com a Dra. Mara da Silveira Benfato, telefone (51)3308 7603, email: mara.benfato@ufrgs.br e Dr. Claudio Telöken, 3214 8571, Coordenador do Comitê de ética em Pesquisas da Santa Casa da Misericórdia de Porto Alegre.

· Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com o pesquisador.

	Nome	Assinatura	Carimbo
Pesquisadores	Dra. Mara da Silveira Benfato		
	Dr. Guilherme Franche		
	Diego Mena Canata		
Paciente			
Representante do paciente			

Anexo 3: Termo de Compromisso par utilização de Dados e Prontuários.

TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS E PRONTUÁRIOS

“Estudo de Estresse Oxidativo em Pacientes com Polipose Nasal”

Os autores do projeto de pesquisa comprometem-se a manter o sigilo dos dados coletados em prontuários e banco de dados referentes à pacientes atendidos no (a) **Hospital Santas Casa de Misericórdia**. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes. Irão cumprir todos os termos das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 466/12do Conselho Nacional de Saúde).

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Pesquisadores Envolvidos	
Nome Completo	Assinatura
Doutor Guilherme Luís da Silva Franche	
Doutora Mara da Silveira Benfato	
Licenciado Diego Antonio Mena Canata	

Anexo 4: Declaração de uso e publicação de dados.

DECLARAÇÃO DE USO E PUBLICAÇÃO DE DADOS

Protocolo: “**Estudo de Estresse Oxidativo em Pacientes com Polipose Nasal**”

Pesquisador Responsável:

Conforme estipulado na Resolução 466/12CNS/MS, venho por meio desta, declarar que estou comprometido em publicar a pesquisa clínica supracitada assegurando que os resultados serão reportados de maneira ética, responsável e coerente, sejam eles favoráveis ou não.

Porto Alegre, ____ de _____ de ____.

Pesquisadores Envolvidos	
Nome Completo	Assinatura
Doutor Guilherme Luís da Silva Franche	
Doutora Mara da Silveira Benfato	
Licenciado Diego Antonio Mena Canata	

Anexo 5: Declaração de uso de dados e Materiais.

DECLARAÇÃO DE USO DE DADOS E MATERIAIS

Protocolo: “**Estudo de Estresse Oxidativos em Pacientes com Polipose Nasal**”

Pesquisador Responsável:

Declaramos que os dados obtidos e os materiais biológicos coletados no estudo serão utilizados exclusivamente para as finalidades descritas no protocolo e no termo de consentimento livre e esclarecido. Não haverá teste além daqueles descritos no protocolo e não há previsão de armazenamento das amostras biológicas para testes futuro, sendo as mesmas apropriadamente destruídas após o uso.

Porto Alegre, ____ de _____ de ____.

Pesquisadores Envolvidos	
Nome Completo	Assinatura
Doutor Guilherme Luís da Silva Franche	
Doutora Mara da Silveira Benfato	
Licenciado Diego Antonio Mena Canata	

Anexo 6: Declaração de Riscos e Benefícios.

DECLARAÇÃO DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Protocolo: “**Estudo de Estresse Oxidativo em Pacientes com Polipose Nasal**”

Pesquisador Responsável:

Declaramos que serão instituídos os cuidados necessários para minimizar todos os riscos relativos à violação ou quebra do sigilo dos dados envolvendo a pesquisa clínica com seres humanos conforme previsto na Resolução 466/2012 CNS/MS, gerando para seus participantes o mínimo de riscos possíveis, tudo no sentido de que o risco se justifique pelo benefício esperado com o desenvolvimento da pesquisa.

Na pesquisa experimental o benefício será maior ou no mínimo igual às alternativas já estabelecidas para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento existentes.

Porto Alegre, ____ de _____ de ____.

Pesquisadores Envolvidos	
Nome Completo	Assinatura
Doutor Guilherme Luís da Silva Franche	
Doutora Mara da Silveira Benfato	
Licenciado Diego Antonio Mena Canata	

Anexo 7: Declaração de Confidencialidade do Sujeito no Estudo.

DECLARAÇÃO DE CONFIDENCIALIDADE DO SUJEITO NO ESTUDO

Protocolo: “**Estudo de Estresse Oxidativo em pacientes com Polipose Nasal**”

Pesquisador Responsável:

Asseguramos que os sujeitos de pesquisa incluídos no protocolo “**Estudo de Estresse Oxidativo em pacientes com Polipose Nasal**” terão a sua confidencialidade resguardada pela equipe envolvida na condução do projeto de pesquisa e que em nenhum momento a identidade será revelada, conforme disposto na Resolução 466/2012 seus complementares, e demais normas legislativas vigentes.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Pesquisadores Envolvidos	
Nome Completo	Assinatura
Doutor Guilherme Luís da Silva Franche	
Doutora Mara da Silveira Benfato	
Licenciado Diego Antonio Mena Canata	

10. CURRICULUM VITAE



1. Dados Pessoais:

- **Nome:** Diego Antonio Mena Canata.
 - **Filiação:** Antonia Isabel Canata e Carlos Maria Mena.
 - **Naturalidade:** Assunção.
 - **Nacionalidade:** Paraguaia.
 - **Data de Nascimento:** 13, maio, 1980.
 - **RG:** V906741-O.
 - **CPF:** 869.572.280-53.
-

2. Endereço Residencial:

- **Medianeira , 297.**
 - **Santa Isabel – Viamão.**
 - **94480-600, RS – Brasil.**
 - **Telefone:** (+55) 51 3435 2503.
 - **Telefone Celular:** (+55) 51 8552 9457.
-

3. Endereço Profissional:

- **Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).**
 - **Laboratório de Estresse Oxidativo, Depto. de Biofísica.**
 - **Av. Bento Gonçalves, 9500.**
 - **Agronomia – Porto Alegre.**
 - **91501 – 970, RS – Brasil.**
 - **Telefone:** (+55) 51 3308 7372
-

4. Endereço Eletrônico:

- **E-mail para contato:** menacanatadiego@gmail.com
-

5. Formação Acadêmica/Titulação:

- **2014 – 2016: Mestrado em Biologia Celular e Molecular:** PPGBCM – UFRGS. Porto Alegre, RS – Brasil.
 - **Título:** Perfil redox da Classificação Clínica de Polipose Nasal.
 - **Orientação:** Mara da Silveira Benfato.
 - **2002 – 2007:** Graduação em Ciências Biológicas Universidade Nacional de Assunção (UNA) – Paraguai, **Bacharelado em Ciência Biológica.**
 - **2012: Bacharelado em Pedagogia da Educação.** Colégio El Sembrador.
-

6. Cursos Ministrados UNA:

a. Graduação em Biologia:

- **Imunologia Molecular:** monitor das aulas teóricas e práticas 2006.
 - **Anatomia comparada em vertebrados:** monitor das aulas práticas, 2005.
 - **Filogenética:** monitor das aulas teóricas e práticas, 2003-2004.
 - **Genética:** monitor das aulas teóricas e práticas, 2003-2004.
-

b. Outros:

- **Centro de Organización Multidisciplinaria de Apoyo a Profesores y Alumnos (OMAPA),** Capacitador do Projeto Agua Fonte de Vida, 2011.
 - **UFRGS;** Projeto de pesquisa Perfil Redox da Classificação Clínica de Polipose Nasal. Em parceria com o Otorrinolaringologista Dr. Guilherme Franche da Silva.
-

7. Participação em Cursos e Eventos:

- **Seminario Ministrado. Universidade Nacional de Assunção (UNA), Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN);** “Estrés Oxidativo y Defensas Antioxidantes. Conceptos Básicos”. Maio 2016.
 - **Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** Novembro 2015.
 - **Aperfeiçoamento Profissional e Científicas,** UFRGS Laboratório de Estresse Oxidativo. Outubro 2013.
 - **Curso de Extensão, Ferramenta Moleculares para Estudo de Proteínas,** PUCRS. Julho 2013.
 - **Curso de Extensão, Introdução a Biologia Forense,** PUCRS. Maio/Junho 2013.
 - **Curso de Extensão, Evaluación de Riesgos de Productos de Biotecnología Moderna en el Ámbito del Protocolo de Cartagena,** UNA. Janeiro/Fevereiro 2013.
 - **Curso de Extensão, Métodos Cromatográficos Modernos,** UNA. Janeiro 2013.
 - **Curso de Extensão, Técnicas Moleculares Aplicadas a Tuberculosis, Diagnóstico, Epidemiología Molecular y Detección de Resistencia a Drogas,** IICS. Outubro 2005.
 - **Curso de Extensão, Epidemiología Molecular y Biología Celular,** UNA. Outubro 2004.
-

8. Línguas:

- **Espanhol:** Nativo.
 - **Portuguesa:** Intermediário na Proficiência de Língua Portuguesa.
 - **Inglesa:** Médio.
-

9. Endereço Lattes:

- <http://lattes.cnpq.br/2169160081489265>