

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

**DOCTORAT EN BIOMEDICINA I FARMÀCIA**



**IMPLICACIÓN DE LAS MUCINAS 1 Y 4 EN EL ASMA Y  
LA POLIPÓISIS NASAL RESISTENTES A  
CORTICOIDES**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**ANSELM MORELL GARCÍA**

**Dirigida por:**

**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO**

**DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ**

**VALÈNCIA, 2017**







VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO**  
Catedrático Numerario de Universidad  
Departamento de Farmacología  
Universidad de Valencia

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Don Anselm Morell García, con el título:

**“IMPLICACIÓN DE LAS MUCINAS 1 Y 4 EN EL ASMA Y LA POLIPÓISIS NASAL  
RESISTENTES A CORTICOIDES”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En València, júnio de 2017.

Dr. Julio Cortijo Gimeno





**DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ**

Farmacéutico Adjunto en el Hospital General Universitario de Valencia  
Profesor Asociado de la Universidad Jaume I (UJI)

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Don Anselm Morell García, con el título:

**“IMPLICACIÓN DE LAS MUCINAS 1 Y 4 EN EL ASMA Y LA POLIPÓISIS NASAL  
RESISTENTES A CORTICOIDES”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En València, júnio de 2017.

Dr. Javier Milara Payá



La presente Tesis Doctoral, realizada en la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- Ministerio Español de Economía y Competitividad: SAF2011-26443 y SAF2014-55322-P.  
([https://sede.micinn.gob.es/stfls/eSede/Ficheros/2015/Anexo\\_Preseleccionados PRP Proyectos Excelencia 2014.pdf](https://sede.micinn.gob.es/stfls/eSede/Ficheros/2015/Anexo_Preseleccionados_PR_Proyectos_Excelencia_2014.pdf)).
- Subvenciones de la acción estratégica en salud (modalidad proyectos de investigación en salud) del Instituto de Salud Carlos III, dentro del subprograma estatal de generación de conocimiento, en el marco del plan estatal de investigación científica y técnica: FIS PI11/02618 y FIS PI14/01733  
(<http://gesdoc.isciii.es/?action=download&id=08/10/2014-fe2a818ac5>).
- Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias: CIBERES apoyado por el Instituto Nacional de Salud Carlos III y los Ministerios españoles de Economía y Competitividad y Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.  
(CIBERES; CB06/06/0027; <http://www.ciberes.org/>)
- El proyecto “Modelo in vitro de resistencia a esteroides en cultivo de células humanas epiteliales de vías aéreas: estudio de nuevas dianas farmacológicas”, con número de expediente TRA2009-0311 ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, en el marco del VI Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011. Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental orientada a la transmisión de conocimiento a la empresa (TRACE).  
(<https://www.boe.es/boe/dias/2010/08/05/pdfs/BOE-A-201012605.pdf>)
- Fondos de la Generalitat Valenciana: Prometeo II/2013/014  
([http://www.cece.gva.es/poci/docs/2013/NUEVAS/RESOLUCIONES/PROMETEOII13\\_Resolucion\\_Concesion\\_c.pdf](http://www.cece.gva.es/poci/docs/2013/NUEVAS/RESOLUCIONES/PROMETEOII13_Resolucion_Concesion_c.pdf))



## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral es el resultado de 4 años de trabajo y vivencias compartidas con personas cuyo apoyo y cariño ha sido inconmensurable. De manera que quisiera intentar expresarles mi más sincero agradecimiento en la poca medida que me permiten estas palabras.

En primer lugar, agradecer a Julio Cortijo por darme la gran oportunidad de aprender y desarrollarme en su grupo de investigación. Su experiencia y confianza me han hecho crecer tanto a nivel personal como científico; siempre estaré agradecido por todas las oportunidades y muestras de apoyo que me ha dado. A Javier Milara, aquel profesor de máster divertido y bonachón que me hizo cambiar de planes. Su incansable pasión por la investigación y un conocimiento inabarcable son mis referentes para el futuro, sin olvidar una proximidad que me hizo sentir siempre feliz y realizado por el trabajo.

A mis más que compañeras del trabajo, amigas, por todas las horas de risas, agobios e ilusiones compartidas. Siempre me habéis apoyado pasase lo que pasase, os habéis preocupado por mí, me habéis ayudado desinteresadamente y me regalásteis a mis guapísimos gatos Taro y Yami. Nunca olvidaré esta etapa compartida con vosotras. Muchas gracias Pili, Adela, Patri, Javi, Sonia, Lucy, Gracia, Bea, Sonia C, Tere, Inés, Pilar, Alpascle, Martín y Pablo. Quisiera destacar el papel de Teresa Peiró, su paciencia y ánimo por enseñarme son la causa primera de este trabajo. Gracias también a los estudiantes en prácticas Pablete, Dani y Jose por las risas y sus ganas de aprender conmigo.

También agradecer el tiempo compartido y la ayuda del resto de miembros de la fundación de investigación del Hospital General Universitario de València. Muchas gracias a M<sup>a</sup> Dolores, Amparo, Eloisa, Sandra, Marta, Eva, Silvia, Alejandro, Franklin, Marais y Sisco; así como a los compañeros de administración y servicios: Román, Ángela y Carla.

Este trabajo tampoco sería posible sin la inmensa colaboración del doctor Miguel Armengot, jefe del servicio de Otorrinolaringología; y el doctor Alfredo de Diego, del servicio de Pneumología. Ambos del Hospital Universitario la Fe de València.

A mis amigos, que lo son todo para mí, mil gracias por estar ahí siempre para apoyarme y animarme a luchar por mis sueños. A mis amigos de l'Eliana, los de "toda la vida": Sara, Lola, Xabi, Carla, David, Alex, Marc y Mireya. Als meus estimadíssims amics de barna: Julia, Jorge, Rocío i Gina. A mis compañeros del PIE: Andrea, Dani T, Marta, Jose, Silvia, Borja, Carmen, Yerca y Ximo. A los de "la Fina": Sandra, Carmen, Rebeca, Joseán y Alejandro. A mis amigos del cedro: Julio, Marina, Javi, África, Edgar, Alejandra, Miguel, Clara y Bea. Sin olvidar a gente muy especial: Xesus, Martina, Lara, Patrícia, Laia, Laurabel y Lluís. Y por supuesto a Juanca, mi compañero en esta aventura, gracias por hacerlo tan fácil y genial cada día.

Por último, agradecer a mi familia todo lo que me han dado, ellos son mi referente para una vida de esfuerzo y humildad. A mis padres, mi hermano Alejandro, mi primo Miguel, mis tías Emilia y Elvira, y Hernán.



*A mis padres,*



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1 LA BARRERA EPITELIAL EN LA FUNCIÓN Y PATOLOGÍA RESPIRATORIA</b>	<b>19</b>
1.1 ANATOMÍA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO	21
1.2 EL EPITELIO RESPIRATORIO COMO BARRERA DEFENSIVA	24
1.2.1 Complejos de unión intercelular	25
1.2.2 Productos antimicrobianos	25
1.2.3 Aclaramiento mucociliar	26
1.2.4 El epitelio respiratorio modula la respuesta inmune	28
1.3 MUCINAS	29
1.3.1 Mucina 1 (MUC1)	31
1.3.2 Mucina 4 (MUC4)	33
1.4 ASMA	34
1.4.1 Definición	34
1.4.2 Fisiopatología	34
1.4.3 Epidemiología	37
1.4.4 Diagnóstico	37
1.4.5 Clasificación del asma del adulto	39
1.4.6 Tratamiento	40
1.4.7 Modelos animales en el estudio del asma	42
1.5 RINOSINUSITIS CRÓNICA ASOCIADA A PÓLIPOS NASALES	44
1.5.1 Definición	44
1.5.2 Clínica	44
1.5.3 Fisiopatología	46
1.5.4 Epidemiología	48
1.5.5 Factores asociados a la RSC-PN	48
1.5.6 Diagnóstico	49
1.5.7 Tratamiento	50
<b>CAPÍTULO 2 CORTICOIDES Y CORTICORRESISTENCIA</b>	<b>53</b>
2.1 QUÉ SON LOS CORTICOIDES	55
2.2 CÓMO ACTÚAN LOS CORTICOIDES	56
2.2.1 El receptor de glucocorticoides	56
2.2.1.1 Regulación génica del receptor de glucocorticoides	56
2.2.1.2 Variantes de splicing e isoformas de GR	57
2.2.1.3 Estructura del receptor de Glucocorticoides	58
2.2.2 Mecanismos anti-inflamatorios de los corticoides	58

2.2.3 Vías de administración y dosificación	61
2.2.4 Efectos secundarios de los corticoides	63
<b>2.3 LA CORTICORRESISTENCIA EN ENFERMEDADES RESPIRATORIAS</b>	<b>64</b>
2.3.1 Resistencia a corticoides en Asma	65
2.3.2 Resistencia a corticoides en Rinosinusitis crónica asociada a Pólipos Nasales	66
2.3.3 Mecanismos moleculares de corticorresistencia	66
2.3.3.1 Mecanismos de auto-regulación de los transcritos de GR	67
2.3.3.2 Mutaciones del receptor de Glucocorticoides	68
2.3.3.3 Expresión de diferentes isoformas del receptor de glucocorticoides	68
2.3.3.4 Actividad defectiva del GR $\alpha$	69
2.3.3.5 Estrés oxidativo y acetilación anormal de Histonas	69
2.4 Corticoides y mucinas	70
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
3.1 HIPÓTESIS	77
3.2 OBJETIVOS	78
<b>CAPÍTULO 4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>79</b>
4.1 MATERIALES	81
4.1.1 Reactivos utilizados	81
4.1.2 Pacientes	84
4.1.2.1 Asma	84
4.1.2.2 Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales	85
4.1.3 Animales de experimentación	86
4.2 MÉTODOS	88
4.2.1 Cultivos celulares	88
4.2.1.1 Aislamiento de neutrófilos humanos de sangre periférica.	88
4.2.1.2 Aislamiento y cultivo de células primarias epiteliales de Pólipos Nasales.	88
4.2.1.3 Cultivo de líneas celulares inmortalizadas.	89
4.2.1.4 Silenciamiento génico mediante ARN interferente	91
4.2.1.5 Transformación de células HEK293 para la expresión inducible de MUC4 (HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4)	92
4.2.1.6 Estimulación <i>in vitro</i>	97
4.2.1.7 Ensayo de migración quimiotáctica	99
4.2.1.8 Flow Chamber	100
4.2.1.9 Sistema reportero de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE)	103
4.2.2 Modelo de Asma agudo en ratón	105
4.2.2.1 Protocolo	105

4.2.2.2 Preparación y administración de sustancias, fármacos y radiofármacos	107
4.2.2.3 Imagen Molecular	109
4.2.2.4 Extracción de muestras	111
4.2.2.5 Recuento de células totales en el lavado broncoalveolar (BAL)	112
4.2.2.6 Aislamiento de neutrófilos de ratón.	112
4.2.3 Histología	113
4.2.3.1 Fijación y deshidratación de tejidos	113
4.2.3.2 Tinción Hematoxilina-Eosina de tejido pulmonar de ratón.	114
4.2.3.3 Inmunohistoquímica de tejido de Pólipo Nasal.	115
4.2.3.4 Co-Inmunofluorescencia	115
4.2.4 Estudio de la expresión génica	118
4.2.4.1 Extracción de ARN total y cuantificación	118
4.2.4.2 Transcripción reversa (RT)	119
4.2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	120
4.2.5 Estudio de la expresión proteica	124
4.2.5.1 Western Blot	124
4.2.5.2 Inmunoprecipitación	127
4.2.5.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	128
4.2.6 Análisis estadístico	129
<b>RESULTADOS</b>	<b>131</b>
<b>CAPÍTULO 5 ANÁLISIS DE MARCADORES DE CORTICORRESISTENCIA EN ASMA Y CORRELACIÓN CON MUC1</b>	<b>133</b>
5.1 Caracterización de los sujetos donantes de sangre periférica	135
5.2 Efectos de la fluticasona en neutrófilos de sangre periférica	136
5.3 La expresión de MUC1 en neutrófilos es menor en asmáticos corticorresistentes y correlaciona con la reversibilidad tras el tratamiento	137
5.4 El silenciamiento de MUC1 reduce el efecto anti-inflamatorio de la dexametasona sobre la adhesión y la migración de células inflamatorias.	138
<b>CAPÍTULO 6 MODELO MURINO MUC1-KO DE ASMA TRATADO CON DEXAMETASONA</b>	<b>143</b>
6.1 Cuantificación del efecto de la dexametasona sobre la inflamación pulmonar en ratones asmáticos con la técnica de imagen diagnóstica PET/CT.	145
6.2 Los marcadores inflamatorios en el lavado broncoalveolar de ratones asmáticos MUC1-KO no se reducen con el tratamiento con dexametasona	148
6.3 La inflamación del tejido pulmonar en ratones asmáticos MUC1-KO no se resuelve tras el tratamiento con dexametasona	151
6.4 La translocación nuclear del GR $\alpha$ inducida por dexametasona está	

inhibida en ratones MUC1-KO	157
6.5 Los neutrófilos de ratones MUC1-KO son insensibles al efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la migración quimiotáctica	160
<b>CAPÍTULO 7 ANÁLISIS DE MARCADORES DE CORTICORRESISTENCIA EN RSC-PN Y CORRELACIÓN CON MUC4</b>	<b>161</b>
7.1 Caracterización de los pacientes con RSC-PN	163
7.2 Expresión de marcadores de resistencia a corticoides	165
7.3 La expresión y distribución de MUC4 está alterada en pacientes con RSC-PN resistente a corticoides orales	166
7.4 Efectos de la Dexametasona en células epiteliales de NP	168
7.5 La interacción de MUC4 $\beta$ con el complejo de GR $\alpha$ difiere entre células epiteliales de pacientes RSC-PN respondedores y no respondedores	170
<b>CAPÍTULO 8 LA MODULACIÓN DE MUC4 ALTERA LA RESPUESTA A DEXAMETASONA <i>IN VITRO</i></b>	<b>173</b>
8.1 El silenciamiento de MUC4 aumenta los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona en las células epiteliales BEAS-2B	175
8.2 La sobre-expresión de MUC4 disminuye los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona en la línea celular HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4	178
8.3 La sobre-expresión de MUC4 impide la translocación nuclear del GR $\alpha$ inducida por dexametasona	180
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>183</b>
<b>CAPÍTULO 9 DISCUSIÓN</b>	<b>185</b>
9.1 Implicación de la mucina 1 en el Asma resistente a corticosteroides	187
9.2 Implicación de la mucina 4 en la Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales resistente a corticosteroides	194
9.3 Relación entre la mucina 1 y la mucina 4 en el contexto de la resistencia a corticoides	199
<b>CAPÍTULO 10 CONCLUSIONES</b>	<b>201</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>205</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>225</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>231</b>
ANEXO 1 Aprobación del comité ético y modelo de consentimiento informado de estudio con pacientes	233
ANEXO 2 Autorización para el procedimiento de experimentación animal	237

<b>ANEXO 3</b> Publicación científica “Mucin 1 downregulation associates with corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps”	241
<b>ANEXO 4</b> Publicación científica “MUC4 impairs the anti-inflammatory effects of corticosteroids in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps”	251
<b>ANEXO 5</b> Secuencia completa del plásmido CS-H2247-pTRE3G	275





# INTRODUCCIÓN



## **CAPÍTULO 1**

# **LA BARRERA EPITELIAL EN LA FUNCIÓN Y PATOLOGÍA RESPIRATORIA**



---

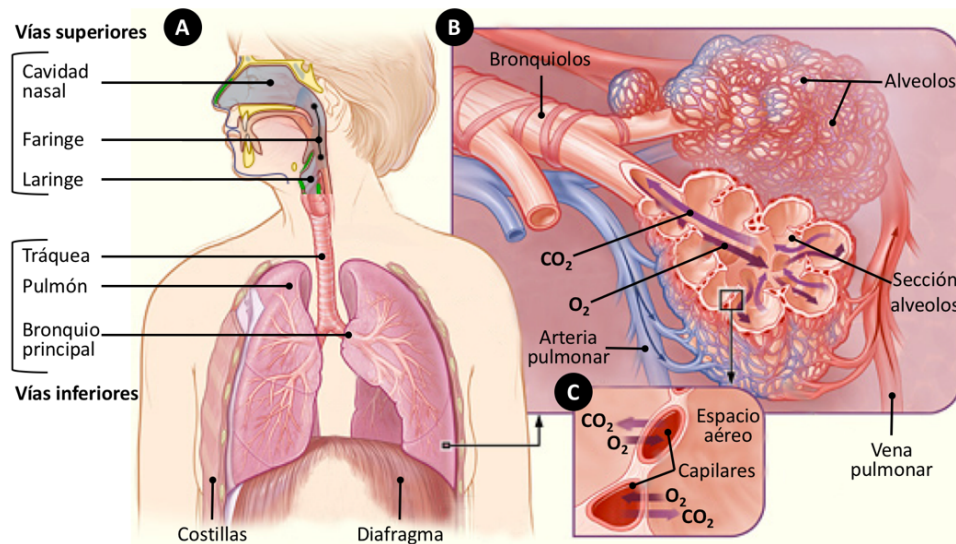
# LA BARRERA EPITELIAL EN LA FUNCIÓN Y PATOLOGÍA RESPIRATORIA

---

## 1.1 ANATOMÍA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO

La función principal del sistema respiratorio humano es el intercambio gaseoso entre la sangre y la atmósfera, aprovisionando de oxígeno ( $O_2$ ) las células y eliminando el dióxido de carbono ( $CO_2$ ) generado por el metabolismo<sup>1</sup>. Por ello disponemos de estructuras anatómicas llamadas vías aéreas, que transportan el aire desde el exterior del organismo hasta los pulmones. En su conjunto, las vías aéreas de un individuo adulto tienen una superficie aproximada de  $70\text{ m}^2$  que está virtualmente en contacto con el medio exterior<sup>2</sup>. Esto unido a que inspiramos de media entre 6 y 12 litros de aire por minuto<sup>3</sup> supone una exposición continuada a microbios, alérgenos y partículas; por esta razón el sistema respiratorio presenta la mayor tasa de infecciones en humanos<sup>4</sup>. Es por tanto necesaria una barrera eficaz que elimine estas amenazas sin provocar inflamación, manteniendo la homeostasis del tejido a fin de preservar el intercambio gaseoso, que es crítico para el organismo.

La porción conductora del sistema respiratorio es un conjunto de estructuras anatómicas que transportan el aire desde el exterior del organismo hasta la porción respiratoria dentro de los pulmones. La porción conductora se divide en vías aéreas superiores e inferiores y no sólo conduce el aire inspirado sino que también lo filtra, humedece y atempera; mientras que la porción respiratoria está formada por los bronquiolos y sus unidades funcionales llamadas alveolos, donde se produce el intercambio gaseoso con la sangre<sup>5</sup> (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1 Anatomía del sistema respiratorio.** *A*, La porción conductora se divide consecutivamente en vías aéreas superiores (cavidades nasales, faringe, laringe) y vías aéreas inferiores (tráquea, bronquios y bronquiolos). *B*, la porción respiratoria incluye los bronquiolos respiratorios, los ductos alveolares y los alveolos. *C*, la fina pared que separa la luz alveolar de los capilares sanguíneos adyacentes permite el intercambio gaseoso. Imagen modificada de referencia<sup>6</sup>.

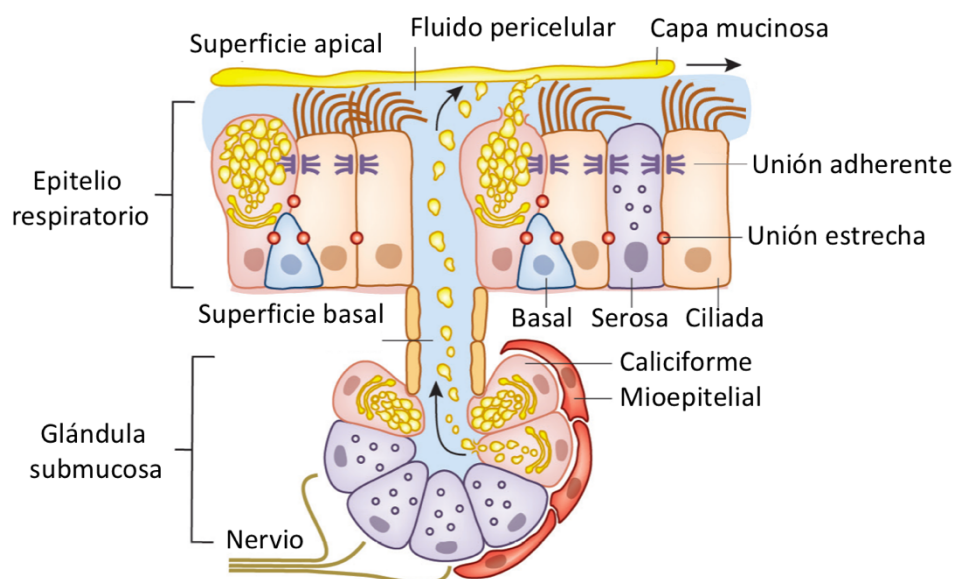
La superficie del sistema respiratorio está cubierta por una capa continua de células epiteliales que varían en su distribución, abundancia y tipo celular según la región. Las vías proximales hasta los bronquios están tapizadas con el denominado epitelio respiratorio, que es un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado compuesto principalmente por tres tipos celulares:

- **Células ciliadas:** suponen hasta un 50% de la población celular en las vías aéreas. Tienen forma columnar con el núcleo en la base y poseen de 200 a 300 cilios en su membrana celular apical; el movimiento coordinado de estos cilios se conoce como batida ciliar y es de gran relevancia, como veremos más adelante.
- **Células secretoras no ciliadas** (caliciformes y serosas). Presentan múltiples gránulos en la región apical que liberan su contenido al lumen respiratorio. Morfológicamente las células caliciformes y serosas son similares, pero se distinguen en el contenido de sus gránulos. En el primer caso se trata de

glicoproteínas de alto peso molecular llamadas mucinas, que atrapan partículas inhaladas. En el segundo caso contienen un fluido seroso electrodenso que contribuye al volumen de líquido que recubre el epitelio e hidrata las mucinas secretadas por las células caliciformes, constituyendo el moco.

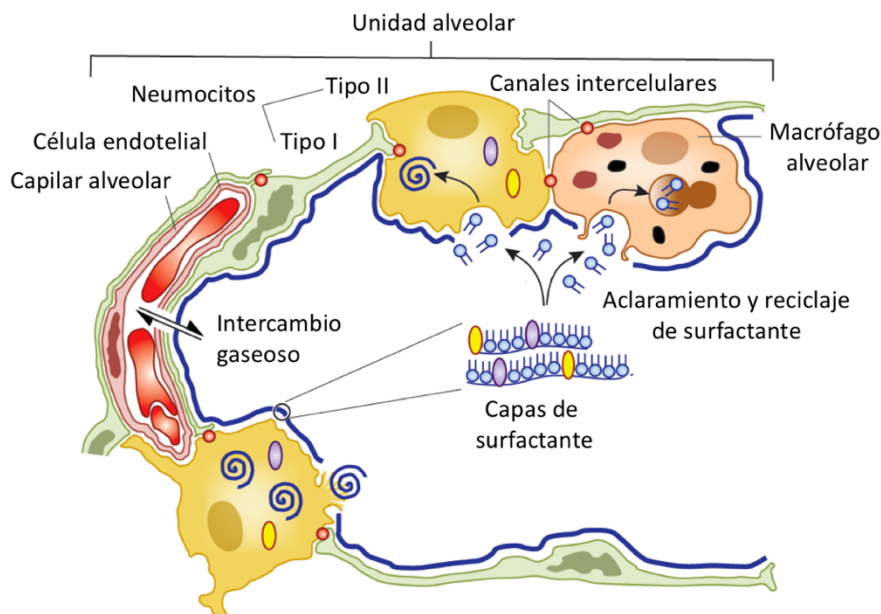
- **Células basales:** se sitúan sobre la lámina basal pero sus superficies apicales no alcanzan el lumen. Están relativamente indiferenciadas y se consideran células madre con capacidad de restaurar la mayoría de poblaciones celulares del epitelio respiratorio.

Además, en las vías más proximales la invaginación del epitelio forma glándulas submucosas con una proporción variable de células ciliadas y secretoras (**Figura 1.2**). A medida que se llega a los bronquiolos, el epitelio cambia gradualmente a cuboidal simple y predominan las también secretoras células de Clara, que liberan proteínas surfactantes y anti-proteinasa que protegen el epitelio bronquiolar<sup>3,7</sup>.



**Figura 1.2 Estructura y función defensiva del epitelio respiratorio.** Las vías respiratorias desde los bronquiolos terminales hasta la tráquea están recubiertas de un epitelio pseudoestratificado formado por células ciliadas y secretoras, que junto a las glándulas submucosas secretan mucinas y otras proteínas de defensa al fluido pericelular. Las propiedades de gel del moco, las uniones célula-célula y la comunicación entre células epiteliales respiratorias proporciona múltiples barreras contra la infección. Figura adaptada de referencia<sup>8</sup>.

Finalmente, en la porción respiratoria los bronquiolos y posteriormente los ductos alveolares presentan las pequeñas evaginaciones llamadas alveolos, cuyas paredes están formadas por un epitelio escamoso simple poblado por células epiteliales llamadas neumocitos tipo I y II. El intercambio gaseoso está mediado por el estrecho contacto entre las células endoteliales de los capilares pulmonares y los neumocitos tipo I, que forman y mantienen una extensa superficie gracias a las propiedades tensoactivas del surfactante pulmonar secretado por neumocitos tipo II (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3 Integración de la función del surfactante y la inmunidad innata en el alveolo.** El intercambio gaseoso está mediado por la proximidad de los neumocitos tipo I y II con las células endoteliales en los capilares pulmonares. Estos capilares forman una enorme superficie por la que la entrada de gases genera presiones sobre las paredes de los alveolos. El surfactante secretado por los neumocitos tipo II recubre estas paredes, reduciendo la tensión superficial de los alvéolos y evitando su colapso. El surfactante presenta además actividad antimicrobiana, atrapando microbios o partículas que son fagocitadas por macrófago alveolares para generar inmunidad, y por neumocitos tipo II para reciclar y aclarar el surfactante del espacio alveolar. Figura adaptada de referencia<sup>8</sup>.

## 1.2 EL EPITELIO RESPIRATORIO COMO BARRERA DEFENSIVA

En un principio se pensó que el epitelio respiratorio tenía únicamente una función de barrera física, impidiendo la entrada de patógenos de manera estática. No obstante, tras años de estudios se ha recogido una exhaustiva evidencia de que el



epitelio respiratorio presenta una compleja dinámica en la defensa del organismo. Los tres componentes esenciales que contribuyen a la función barrera del epitelio de las vías respiratorias son: las uniones intercelulares estrechas y adherentes, que regulan la permeabilidad intercelular epitelial<sup>9</sup>; la secreción de productos antimicrobianos que matan a los patógenos inhalados<sup>10</sup> y el aclaramiento mucociliar, que atrapa y elimina las partículas extrañas inhaladas de las vías respiratorias<sup>3,11</sup>.

### **1.2.1 Complejos de unión intercelular**

Las células de los epitelios, incluyendo el respiratorio, disponen de estructuras proteicas enclavadas en los bordes apicolaterales que proporcionan unión intercelular. Estas estructuras se denominan uniones estrechas y uniones adherentes, y su cooperación regula la permeabilidad del epitelio. Las uniones estrechas forman canales entre las células con un transporte regulado de solutos e iones, mientras que las uniones adherentes impiden el paso de los patógenos inhalados y partículas ambientales. Además, las proteínas que componen las uniones adherentes, como cadherinas o cateninas, participan en la señalización de procesos de expresión génica, proliferación y diferenciación celular. Así pues, la disociación o los daños sostenidos que afectan estos complejos de unión interrumpen no sólo la función de barrera, sino que también pueden interferir en la reparación y diferenciación de las células epiteliales. En este sentido, en los fumadores y en los pacientes con asma y EPOC se ha observado que el epitelio de las vías respiratorias se torna permeable, hiperproliferativo y anormalmente diferenciado<sup>12-15</sup>. La infección con virus o bacterias también puede causar alteración transitoria de las uniones estrechas o adherentes. Factores tales como los interferones y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  expresados en respuesta a la infección pueden prolongar la interrupción de las uniones estrechas mucho después de que la infección se haya resuelto, dando paso a alérgenos inhalados y contaminantes<sup>16</sup>.

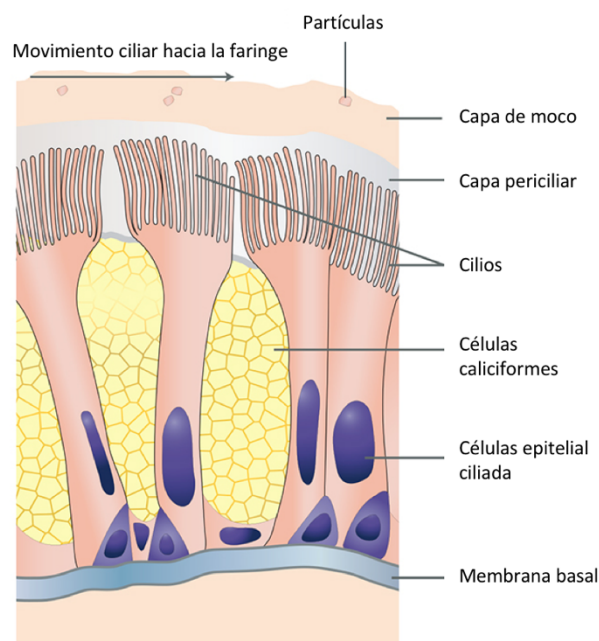
### **1.2.2 Productos antimicrobianos**

La defensa del epitelio no sólo es una cuestión física, sino que también existe una barrera bioquímica. Las células epiteliales expresan y liberan al lumen una gran variedad de componentes antimicrobianos que matan a los patógenos inhalados. Estas sustancias incluyen enzimas, inhibidores de proteasas, oxidantes y péptidos

antimicrobianos. Un ejemplo clave es la lisozima, que degrada la capa de peptidoglicano de las bacterias gram positivas<sup>17</sup>. Por otro lado, la lactoferrina permite también a la lisozima penetrar y degradar la capa de peptidoglicano de bacterias gram negativas<sup>18</sup>. La lactoferrina actúa como un quelante de hierro, que es esencial para la respiración bacteriana, de manera que ejerce un efecto bactericida<sup>19</sup>; además presenta actividad antiviral contra los virus de ARN y de ADN, ya sea inhibiendo la unión del virus a las células huésped o por el bloqueo directo del virus<sup>20</sup>. Por otro lado, los inhibidores de proteasas mitigan los efectos de las proteasas expresadas por patógenos y las células inmunes innatas reclutadas, como el inhibidor de la leucoproteasa secretada (SLPI), inhibidor de la elastasa,  $\alpha$ 1-antiproteasa y antiquimiotripsina. Finalmente, las células epiteliales también generan moléculas oxidantes tales como Óxido Nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )<sup>3</sup>.

### 1.2.3 Aclaramiento mucociliar

Los principales actores que contribuyen a la función mucociliar del epitelio de las vías respiratorias son el moco y los cilios. Mientras que el moco atrapa patógenos inhalados u otro material particulado, el batido coordinado de los cilios de las células epiteliales barre el material atrapado hacia la faringe, lejos de los pulmones<sup>21</sup>. Para ello el moco flota sobre una capa periciliar menos viscosa (**Figura 1.4**), compuesta por proteínas de membrana, que actúa como lubricante de la batida ciliar.

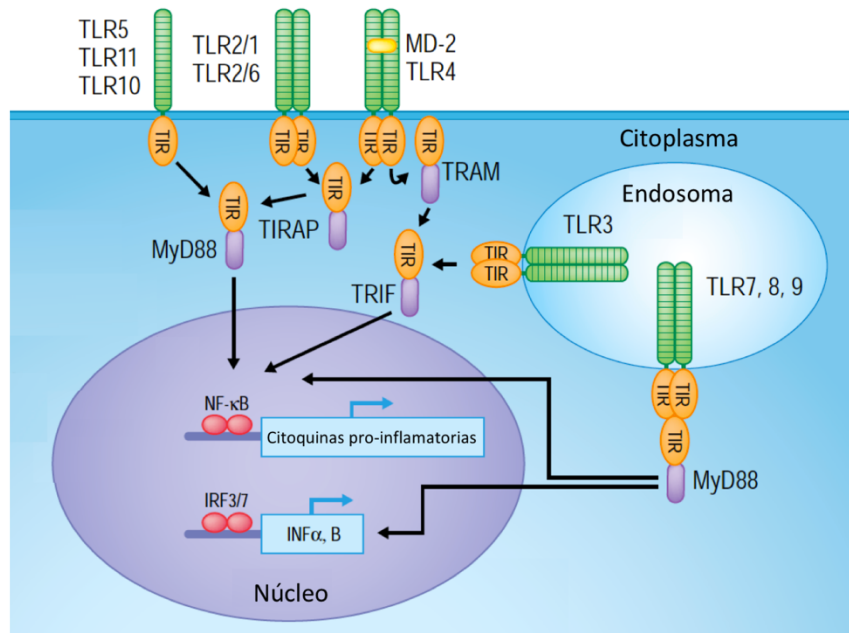


**Figura 1.4 Aclaramiento mucociliar**

El transporte eficiente del moco es dependiente de la velocidad del batido ciliar así como de la hidratación del moco, lo que contribuye a sus propiedades viscoelásticas<sup>22,23</sup>. En general, el moco más hidratado es eliminado más eficientemente de los pulmones. La mucosidad de las vías respiratorias contiene más de 200 proteínas, y es secretado tanto por las células caliciformes como por las glándulas submucosas. El componente principal del moco de las vías respiratorias son las mucinas, que son glicoproteínas de alto peso molecular que se compactan para formar el armazón estructural de la barrera del moco<sup>24,25</sup>. Se han detectado hasta 12 mucinas en los pulmones humanos. MUC5AC y MUC5B son las mucinas predominantes en las vías respiratorias normales<sup>26</sup>. El MUC5AC es producido principalmente por células caliciformes, mientras que MUC5B es producido predominantemente por las glándulas submucosas<sup>27,28</sup>. En individuos sanos, los ritmos circadianos regulan la secreción normal del moco, principalmente a través del nervio vago. Sin embargo, en pacientes con enfermedades inflamatorias respiratorias, la hipersecreción del moco a partir de células caliciformes hiperplásicas contribuye a la obstrucción de las vías aéreas<sup>29</sup>. Varios mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-13, IL-17, factores de crecimiento tales como EGF y TGF, y factores ambientales como el humo de tabaco, alérgenos y patógenos microbianos han demostrado estimular la hipersecreción de moco<sup>30-32</sup>. Terapias dirigidas a limitar la hipersecreción de moco como N-acetilcisteína y la carbocisteína, además de modular el aclaramiento mucociliar, pueden mejorar la obstrucción de las vías respiratorias. Por otro lado, el epitelio respiratorio alberga una flora bacteriana comensal cuyo mantenimiento está mediado por la barrera mucociliar y las respuestas inmunes innatas y adquiridas, que minimizan la inflamación y mantienen la homeostasis del tejido<sup>33</sup>. No obstante, los pulmones de los fumadores y los pacientes con fibrosis quística, EPOC y/o asma muestran alteración del aclaramiento mucociliar normal, lo que podría alterar la cantidad y diversidad de poblaciones bacterianas en el epitelio respiratorio. Este hecho subyace a las infecciones respiratorias recurrentes y persistentes que contribuyen a la morbilidad y mortalidad en estos trastornos<sup>15,34,35</sup>.

#### 1.2.4 El epitelio respiratorio modula la respuesta inmune

Además del sistema de defensa innata proporcionado por el aclaramiento mucociliar y el surfactante, las células epiteliales reconocen a los patógenos microbianos y sus productos, iniciando la señalización para reclutar e instruir a las células del sistema inmunitario. Las superficies de las células epiteliales proporcionan la interfaz inicial con el medio ambiente y están bien equipadas para responder a los patrones asociados a patógenos (PAMP) y los patrones moleculares asociados al peligro (DAMP). Receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluyendo receptores tipo *Toll* (TLR) y receptores tipo *Nod* (NLR), se expresan ampliamente en células epiteliales respiratorias<sup>10,36</sup>. Aunque la señalización por estos receptores en las células hematopoyéticas es un componente esencial de la inmunidad innata en los pulmones, la señalización de los TLR en las células estructurales, incluyendo las células epiteliales de las vías respiratorias, es fundamental para impulsar las respuestas inmunológicas mucosas<sup>37-40</sup>. Las células epiteliales ciliadas y las células alveolares de tipo II expresan múltiples TLR, incluyendo TLR2, TLR4 y TLR5<sup>36,41</sup>. Los PAMP y los DAMP son reconocidos por los TLR de manera específica: lipoproteínas (TLR1, -2 y -6), LPS (TLR4), flagelina (TLR5), ADN (TLR9) y ARN (TLR3, -7, y -8). Este reconocimiento inicia la transducción de señales a través del adaptador MyD88 y otros mecanismos independientes. MyD88 provoca la fosforilación de quinasas como p38, JNK o ERK1/2 que a su vez activan factores de transcripción como NF-κB y/o IRF3, induciendo la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF, IL-1b, IL-6 e IL-8 en las células epiteliales (**Figura 1.5**). Estas citoquinas y quimiocinas inducen el reclutamiento y activación de células profesionales del sistema inmunológico para modular las respuestas inflamatorias. De este modo, el resultado de la señalización vía PAMPs o DAMPs, influenciado por la naturaleza tanto del patógeno como del entorno inflamatorio en los pulmones, puede desencadenar tanto efectos protectores como patológicos sobre las funciones de barrera de las vías respiratorias<sup>10,37,42</sup>.



**Figura 1.5 Localización y señalización de los receptores tipo Toll (TLR).** Los TLR se localizan en la membrana celular y endosomal. La unión del correspondiente ligando a cada TLR activa una cascada de señalización a través de sus dominios Toll/IL-1R (TIR), que mediante las moléculas adaptadoras MyD88 y/o TRIF inducen la transcripción de genes pro-inflamatorios. Figura adaptada de referencia<sup>43</sup>.

### 1.3 MUCINAS

Las mucinas (MUC) son glicoproteínas de alto peso molecular cuya función básica consiste en dar protección y lubricar la superficie epitelial. Son el componente principal del moco, confiriéndole sus propiedades viscoelásticas<sup>22,26,44</sup>, y se ha propuesto también su participación en la renovación y diferenciación del epitelio<sup>45-49</sup>, así como en la modulación de la adhesión celular<sup>50</sup>. Desde el punto de vista molecular todas las mucinas presentan múltiples repeticiones de secuencias cortas de entre diez y ochenta aminoácidos, principalmente serinas o treoninas. Estas repeticiones son modificadas post-traduccionalmente mediante la adición de múltiples residuos oligosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos o N-glicosídicos en menor proporción<sup>26</sup>.

Según su localización las mucinas se pueden clasificar en dos familias:

- **Mucinas secretadas:** son proteínas altamente glicosiladas que carecen de un dominio de unión a la membrana citoplasmática y son secretadas al

espacio extracelular. Son el componente principal de las secreciones mucosas del epitelio, donde cumplen principalmente una función protectora mediante el proceso de aclaramiento mucociliar. Las mucinas secretadas que se conocen son MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8 y MUC19<sup>26,28,44</sup>.

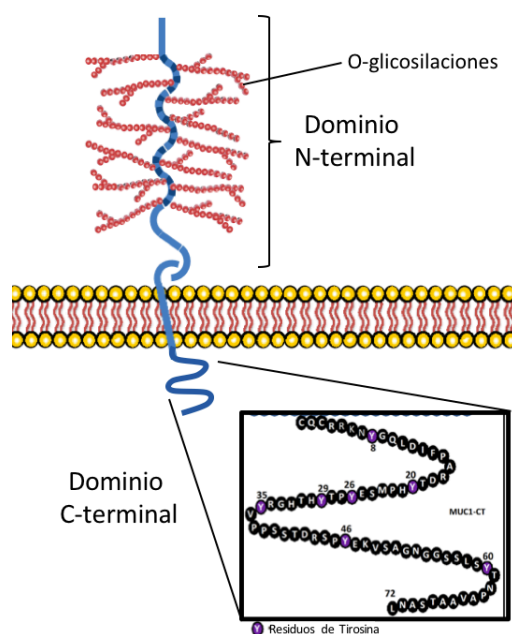
- **Mucinas de membrana:** son proteínas de anclaje a la membrana celular de tipo I, con un dominio transmembrana flanqueado por una región extracelular glicosilada NH<sub>2</sub>-terminal y una región COOH-terminal citoplasmática (CT). Estas mucinas modulan las interacciones extracelulares en celulares epiteliales y leucocitos, actuando como ligandos para proteínas de unión a carbohidratos como selectinas e integrinas<sup>50</sup>. Además, la región CT actúa como receptor y permite su participación en la señalización intracelular<sup>49,51</sup>. Las mucinas de membrana descritas hasta ahora son MUC1, MUC3, MUC4, MUC12-17 y MUC20<sup>26</sup>.

Se han distinguido al menos 22 genes humanos responsables de la codificación de mucinas. Estas proteínas, aunque comparten características similares en su estructura primaria, albergan múltiples dominios proteicos con funciones específicas, que condiciona que la expresión de las mucinas sea diferente en cada órgano, tejido y tipo celular.

Las principales mucinas expresadas en las vías aéreas son las mucinas de membrana MUC1, MUC4, y MUC16; y las mucinas secretadas formadoras de gel MUC2, MUC5AC y MUC5B<sup>52,53</sup>. Como ya hemos visto, el aclaramiento mucociliar es la primera barrera defensiva frente a patógenos transportados por el aire y frente a contaminantes. Sin embargo, enfermedades tales como el asma, bronquitis, EPOC o Rinosinusitis crónica asociada a pólipos nasales cursan con hiperplasia del epitelio y sobre-expresión de mucinas, con la consecuente hipersecreción de moco que contribuye a la progresión de la enfermedad<sup>54</sup>. Dado el carácter proliferativo de los epitelios respiratorios en estas enfermedades, las mucinas de membrana 1 y 4 están siendo estudiadas por su implicación en la diferenciación y migración de células epiteliales<sup>47,55,56</sup>.

### 1.3.1 Mucina 1 (MUC1)

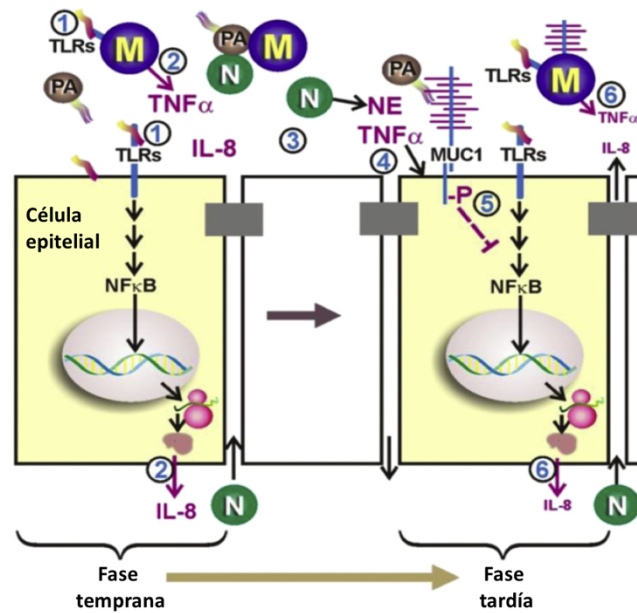
MUC1 se encuentra en la superficie apical de las células epiteliales y las células hematopoyéticas<sup>26,52,57</sup>, donde actúa como un sensor capaz de participar en la señalización celular debido a su estructura característica<sup>58</sup>. Como miembro de la familia de las mucinas de membrana, MUC1 está compuesta por tres subunidades distintas: un dominio extracelular muy glicosilado, una región transmembrana de una sola cadena y una cola citoplasmática intracelular (CT) que contiene varias tirosinas conservadas evolutivamente (**Figura 1.6**). La fosforilación de estos residuos de tirosina media la unión de diferentes quinasas y adaptadores de proteínas, modulando múltiples señales intracelulares<sup>49,58</sup>.



**Figura 1.6 Estructura de MUC1.** La mucina de membrana MUC1 se compone por tres subunidades distintas: un gran dominio extracelular fuertemente glicosilado, una región transmembrana y una cola citoplásmica intracelular (CT) que contiene varios residuos de tirosina conservadas evolutivamente.

Entre las diferentes mucinas de membrana, MUC1 destaca como una molécula antiinflamatoria con potenciales aplicaciones clínicas. MUC1 ha sido ampliamente vinculado con la transducción de señales intracelulares en las células cancerosas<sup>59</sup>, sin embargo, destaca su papel antiinflamatorio en las vías respiratorias. Se ha descrito que, durante las etapas tardías del proceso inflamatorio, la fosforilación de tirosinas del dominio citoplasmático (CT) de MUC1 conduce a la inhibición de la

señalización de los receptores tipo *Toll* (TLR) provocada por patógenos<sup>58-60-63</sup> (Figura 1.7). Esto es especialmente relevante en el estudio de enfermedades como el asma o la poliposis nasal, ya que la superficie de los bronquios o los pólipos nasales está colonizada por múltiples bacterias patógenas que, ya sea formando biofilms o a través de sus superantígenos, contribuyen al proceso inflamatorio y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad<sup>64-65</sup>.



**Figura 1.7** Papel anti-inflamatorio de MUC1 durante la infección de las vías aéreas. 1, durante los primeros estadios de la infección por *P. aeruginosa* (PA), los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como la Flagelina activan los TLRs y NF- $\kappa$ B en las células epiteliales y macrófagos (M). 2, la activación de NF- $\kappa$ B aumenta la expresión de Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-8, que son secretadas. 3, IL-8 recluta neutrófilos (N) en torno a la barrera epitelial que secretan Elastasas Neutrofílicas (NE) al lumen de las vías aéreas. 4, NE y TNF- $\alpha$  aumentan la expresión del gen MUC1, que supone más mucina MUC1 en la superficie apical de las células epiteliales. 5, durante el último estadio de la infección, la fosforilación de tirosinas en el dominio citoplasmático (CT) de MUC1 da lugar a la inhibición de la señalización de los TLRs y 6, el consecuente efecto anti-inflamatorio. Adaptado de la referencia<sup>58</sup>.

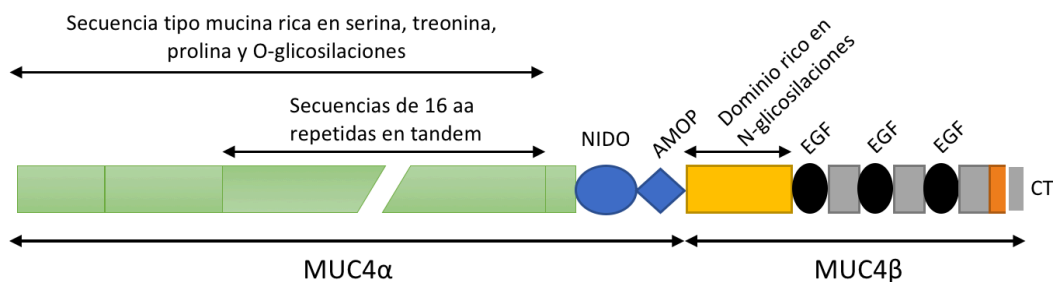
Además de la interacción de MUC1-CT con diferentes proteínas que actúan como transductores de señal, se ha descrito que MUC1-CT se transloca al núcleo de la célula donde media las diferentes respuestas biológicas. Por ejemplo, un estudio previo ha descrito la interacción entre MUC1-CT y el receptor de estrógenos (ER)  $\alpha$ ,



formando un complejo de transcripción MUC1-CT-ER  $\alpha$  que transloca al núcleo<sup>66</sup>. Además, otro complejo de transcripción que implica MUC1-CT,  $\beta$ -catenina-MUC1-CT, se ha descrito para modular morfogénesis<sup>67,68</sup>. En ambos casos, la formación de estos complejos de transcripción se ha asociado a un papel protector frente a la degradación por el proteasoma<sup>66,67</sup>.

### 1.3.2 Mucina 4 (MUC4)

MUC4 es una O-glicoproteína de membrana formada por una gran subunidad alfa extracelular (MUC4 $\alpha$ ) que está fuertemente glicosilada y una subunidad beta (MUC4 $\beta$ ) que está anclada en la membrana celular y se extiende dentro del citosol. MUC4 $\alpha$  posee tres dominios funcionales putativos: TR, *nidogen-like* (NIDO) y el dominio asociado a la adhesión en MUC4 y otras proteínas (AMOP); mientras que MUC4 $\beta$  tiene tres dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y una cola citoplasmática corta de 22 aminoácidos<sup>69</sup> (**Figura 1.8**).



**Figura 1.8 Estructura de MUC4.**

Al igual que MUC1, MUC4 también ha sido implicado en la regulación de la señalización del crecimiento celular, a través de su interacción con la familia de proteínas ErbB, constituida por cuatro receptores tirosin-quinasa, estructuralmente relacionadas con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La familia de ligandos del factor de crecimiento tipo EGF se unen al dominio extracelular de los receptores ErbB, dando lugar a la formación de homo y heterodímeros<sup>70</sup>. La formación de dímeros inducida por el ligando causa la fosforilación cruzada de residuos de tirosina específicos en la CT, que sirven como sitios de acoplamiento para la activación de diversas proteínas de señalización para controlar la proliferación, diferenciación, apoptosis y supervivencia de las células epiteliales

respiratorias<sup>71</sup>. Por otro lado, la subunidad alfa glicosilada probablemente confiere las propiedades anti-adhesivas a la célula, lo que permite el desprendimiento de los complejos célula-célula y célula-matriz en los epitelios sanos, así como cancerosos<sup>72-74</sup>. Todas estas propiedades correlacionan con el hecho de que la expresión de MUC4 esté incrementada en contextos de disrupción epitelial, como en las células epiteliales bronquiales de asmáticos severos<sup>75</sup> y en el epitelio de pólipos nasales<sup>76</sup>.

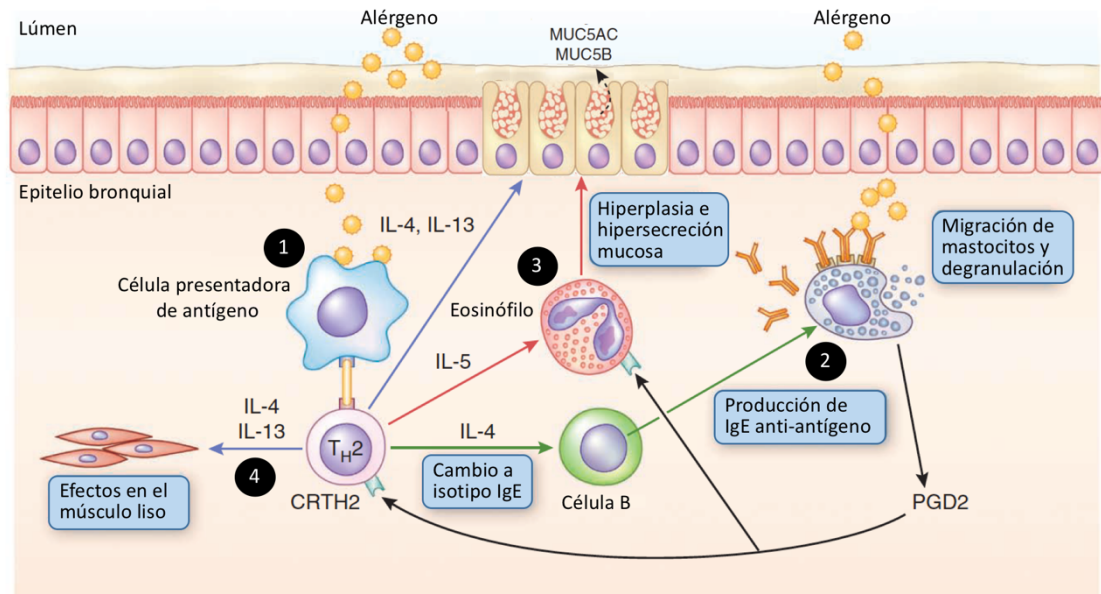
## 1.4 ASMA

### 1.4.1 Definición

El asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias. La inflamación crónica, coordinada por células de la inmunidad innata y adaptativa junto al epitelio respiratorio, se asocia con la hiperreactividad de las vías respiratorias (una respuesta exagerada a los desencadenantes, como los alérgenos y el ejercicio), que conduce a síntomas recurrentes como sibilancias, disnea, opresión torácica y tos. Los episodios sintomáticos generalmente se basan en una obstrucción generalizada del flujo de aire, pero variable, dentro de los pulmones, que suele ser reversible ya sea espontáneamente o con un tratamiento adecuado<sup>77</sup>.

### 1.4.2 Fisiopatología

El asma se caracteriza por un espectro clínico muy heterogéneo, cuyo factor común es la presencia de inflamación en las vías respiratorias, que puede afectar desde la mucosa nasal hasta los alveolos<sup>77,78</sup>. A nivel celular, la inhalación de alérgenos como ácaros o polen activa las células presentadoras de antígeno que dirigen la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia el fenotipo T auxiliar tipo 2 (Th2). Los linfocitos Th2 secretan citoquinas inflamatorias como IL-4, -5, -9, y -13, que orquestan la activación y reclutamiento de eosinófilos, así como la generación de IgE por linfocitos B. Entonces, la IgE es reconocida por los receptores FcεRI en los mastocitos, liberando mediadores inflamatorios como histamina, leucotrienos y prostaglandinas que conducen a los síntomas característicos del asma como hipersecreción mucosa y alteraciones del músculo liso bronquial<sup>79-81</sup> (**Figura 1.9**), que se detallan más adelante.



**Figura 1.9 Procesos inmunológicos Th2 en las vías respiratorias con asma.** 1, los alérgenos inhalados penetran el epitelio y son procesados por células presentadoras de antígeno. Estas células inducen la diferenciación de linfocitos T vírgenes al fenotipo Th2 y la producción de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citoquinas estimulan: 2, la generación de IgE por linfocitos B, que es reconocida por los mastocitos, liberando prostaglandinas (PGD2); 3, la inflamación alérgica y eosinofílica, así como la hiperplasia e hipersecreción mucosa en el epitelio; 4, y la alteración del músculo liso bronquial, que contribuyen a la patología del asma. Figura modificada de la referencia<sup>82</sup>.

La inflamación juega claramente un papel importante en la iniciación del asma y en las exacerbaciones de la afección, pero la consecuencia a largo plazo de estos procesos es un cambio permanente en la estructura y función de las vías respiratorias. En un sentido amplio, la vía aérea es "remodelada" para que se comporte de manera exagerada cuando el paciente está expuesto a agentes inocuos tales como aire frío, ejercicio o humo. El remodelado se explica con varias características histológicas y fisiológicas que se producen en grados variables en cada individuo con asma<sup>83,84</sup>. Histológicamente, la característica más obvia es el engrosamiento de la membrana basal debida a la deposición de colágeno. Esto es producido por miofibroblastos, que invaden el espacio subepitelial generando una fibrosis inducida y regulada por factores de crecimiento liberados por el epitelio. Además, varias citoquinas reguladoras producidas por células T y eosinófilos, como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-17, tienen efectos profibróticos<sup>85,86</sup>. Los factores de crecimiento y las quimiocinas

liberadas por el epitelio respiratorio también juegan un papel activo en la remodelación<sup>87</sup>. Quimiocinas como IL-8 están presentes en el epitelio, donde están unidas a la matriz extracelular. Cuando se produce inflamación, hay liberación de metaloproteasas de matriz que liberan y activan estas quimioquinas, que a su vez pueden atraer neutrófilos y otras células inflamatorias al área de lesión. También se liberan factores de crecimiento epidérmico que pueden inducir alteraciones estructurales en las vías respiratorias<sup>43:88</sup>.

Los mediadores inflamatorios, como histamina y leucotrienos, liberados en la degranulación de mastocitos aumenta la permeabilidad vascular, provocando edema y la infiltración de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo<sup>89:90</sup>. Mientras que la acción de la citoquina IL-13 genera la metaplasia e hiperplasia de células caliciformes<sup>91-93</sup>. Hiperplasia se refiere a un mayor número de células caliciformes en las vías respiratorias más grandes, mientras que la metaplasia se refiere a la aparición de estas células en las vías respiratorias más pequeñas, donde normalmente no se ven. Con el aumento de de células secretoras se produce una hipersecreción de moco, caracterizado por mayores concentraciones de mucinas, principalmente 5AC y 5B<sup>54</sup>, que lo hacen más viscoso y difícil de eliminar. De hecho, el análisis génico mediante PCR de biopsias bronquiales de sujetos asmáticos mostró un patrón alterado de mucinas respecto a sujetos sanos<sup>94</sup>. Estos fenómenos pueden conducir a la obstrucción de las vías aéreas, ocasionando disnea y sibilancias.

Por otro lado, las vías aéreas asmáticas se contraen (broncoespasmo) más vigorosamente que las vías respiratorias sanas, debido a que hay una mayor cantidad de músculo (hipertrofia), y su función está alterada. La musculatura lisa bronquial en asmáticos no sólo contrae con más fuerza, sino que una vez contraída es más difícil de relajar que el músculo liso de las vías respiratorias normales<sup>95</sup>.

El resultado neto es una obstrucción bronquial en ocasiones irreversible, por lo que los pacientes asmáticos presentan una limitación al flujo aéreo con una progresiva pérdida de la función pulmonar. No obstante, los síntomas derivados pueden resolverse de forma espontánea o en respuesta al tratamiento, e incluso estar ausentes durante algún tiempo.

---

Otro fenómeno característico del asma son las exacerbaciones asmáticas. Al tener las vías respiratorias irritables, fenómenos ambientales comunes como infecciones víricas de la vía respiratoria superior (rinovirus y virus respiratorio sincitial), la exposición a alérgenos o fenómenos inespecíficos como el frío o el ejercicio ocasionan una hiperrespuesta bronquial que conduce a un rápido estrechamiento de la vía respiratoria, cuya intensidad se relaciona con la inflamación subyacente. Así pues, la sensibilidad a fenómenos ambientales y el grado de inflamación hacen que los síntomas y la función pulmonar fluctúen en el tiempo<sup>77,96</sup>.

### 1.4.3 Epidemiología

El asma es un problema de salud de elevada prevalencia, con importantes implicaciones en la esperanza y calidad de vida de las personas que la padecen y que genera un importante consumo de recursos sanitarios y unas fuertes pérdidas sociales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el asma es la séptima enfermedad más prevalente del mundo, con cerca de 300 millones de afectados. La cifra de afectados en Europa es alrededor de 29 millones. Además, supone la 5ª causa de muerte en los países desarrollados<sup>97</sup>. En España la prevalencia en adultos es inferior respecto a países anglosajones y centroeuropeos. El Estudio Europeo de Salud Respiratoria en nuestro país<sup>98</sup> constató una mayor prevalencia en mujeres y tasas de incidencia muy variables entre regiones, siendo mayor en áreas mediterráneas (3,5% en Barcelona) que en la costa atlántica (1,7% en Oviedo). No obstante, durante el estudio se determinó que hasta un 52% de personas con asma no habían sido diagnosticadas y de estas, un 26% no seguía ningún tratamiento pese a padecer síntomas.

### 1.4.4 Diagnóstico

La presencia de asma se debe sospechar ante los siguiente síntomas y signos clínicos:

- Sibilancias
- Disnea
- Tos y opresión torácica

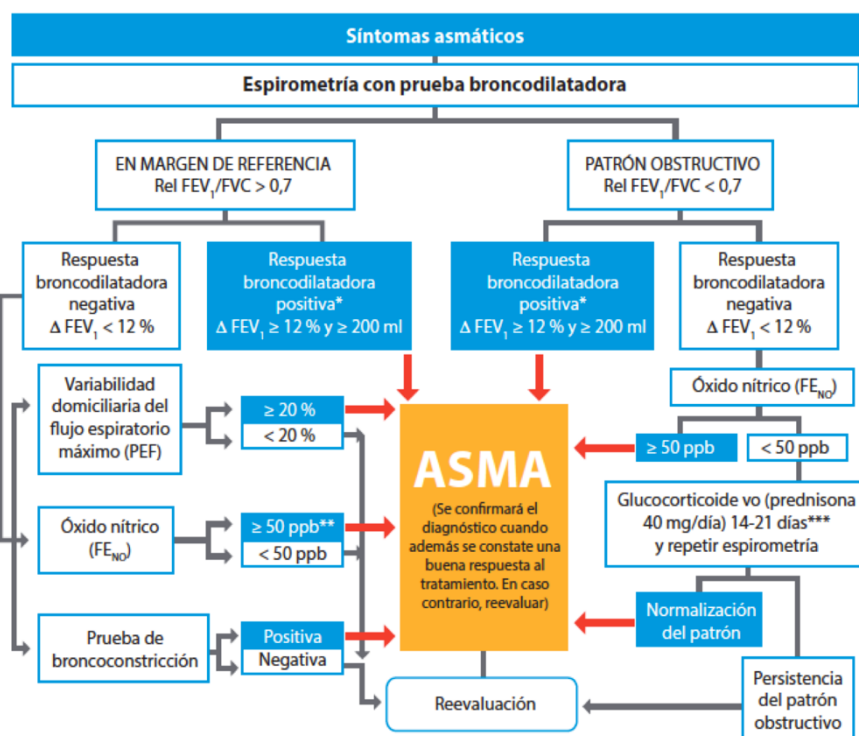
Éstos pueden variar de manera estacional o durante el día y suelen ir ligados a fenómenos desencadenantes como infecciones víricas, alérgenos, humo de tabaco, ejercicio, etc. Los antecedentes familiares y personales de atopia son aspectos importantes a considerar. Puesto que estos síntomas son comunes a otras patologías como la EPOC, es necesaria una prueba objetiva diagnóstica, normalmente pruebas funcionales respiratorias.

Las principales alteraciones funcionales del asma en adultos son la obstrucción del flujo aéreo, su reversibilidad, la variabilidad y la hiperrespuesta bronquial. La espirometría es la prueba diagnóstica de primera elección, tal como recoge el algoritmo del proceso diagnóstico propuesto en la Guía española para el manejo del asma<sup>77</sup> (**Figura 1.10**):

*“Los principales parámetros a determinar son la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1). Los valores de referencia deben adecuarse a la edad y etnia/raza de cada paciente. La obstrucción se define como un cociente FEV1/FVC por debajo del límite inferior de los valores de referencia, que arbitrariamente se sitúa en 0,773. No obstante, este criterio puede originar una sobreestimación de la obstrucción en personas de edad avanzada. Un FEV1 reducido confirma la obstrucción, ayuda a establecer su gravedad e indica un mayor riesgo de exacerbaciones.*

*Para la prueba de broncodilatación, se recomienda administrar 4 inhalaciones sucesivas de 100 µg de salbutamol, o su equivalente de terbutalina, mediante un inhalador presurizado con cámara espaciadora y repetir la espirometría a los 15 minutos.*

*Se considera respuesta positiva (o broncodilatación significativa) un aumento del FEV1  $\geq 12\%$  y  $\geq 200$  ml respecto al valor basal. Un criterio de broncodilatación alternativo es un aumento del flujo espiratorio máximo (PEF)  $> 60$  l/min o  $>20\%$ . La reversibilidad también puede ser identificada por una mejoría del FEV1 o del PEF tras 2 semanas de tratamiento con glucocorticoides sistémicos (40 mg/día de prednisona o equivalente) o 2-8 semanas de glucocorticoides inhalados (1.500- 2.000 mg/día de fluticasona o equivalente). Aunque característica del asma, la reversibilidad de la obstrucción bronquial no está presente en todos los pacientes.”*



\*En niños un incremento del 12 % es suficiente para considerarla positiva aunque éste sea < de 200 mL. \*\*En los casos en los que la prueba de broncoconstricción sea negativa debe considerarse el diagnóstico de bronquitis eosinofílica. \*\*\*Como alternativa pueden utilizarse glucocorticoides inhalados a dosis muy altas, 1.500 - 2.000 µg de fluticasona, en 3 o 4 tomas diarias, durante 2-8 semanas.

Figura 1.10 Algoritmo diagnóstico del asma propuesto en la Guía española para el manejo del asma. Figura modificada de la referencia<sup>77</sup>.

### 1.4.5 Clasificación del asma del adulto

Tras el diagnóstico inicial de la enfermedad, si el paciente no está recibiendo tratamiento, se debe clasificar en función de la gravedad, dividiéndose en cuatro categorías: intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave. En la **Figura 1.11** se indican los parámetros de cada categoría, siendo el más afectado el que determina la clasificación del paciente.

La gravedad de cada paciente puede variar a lo largo de su vida, de manera que conviene reevaluar al paciente periódicamente. Esto determinará las pautas de tratamiento farmacológico con el fin de mantener el control de los síntomas. Este control se define como “el grado en el que las manifestaciones del asma están ausentes o se ven reducidas al máximo”<sup>77</sup>, de manera que en pacientes tratados la gravedad se clasifica en función del escalón de tratamiento (**Figura 1.12**). Existen 6 escalones de

tratamiento en función de los requerimientos mínimos de medicación para mantener el control, como veremos en el siguiente apartado.

	Intermitente	Persistente leve	Persistente moderada	Persistente grave
Síntomas diurnos	No (2 veces o menos a la semana)	Más de 2 veces a la semana	Síntomas a diario	Síntomas continuos (varias veces al día)
Medicación de alivio (agonista $\beta_2$ -adrenérgico de acción corta)	No (2 veces o menos /semana)	Más de 2 veces a la semana pero no a diario	Todos los días	Varias veces al día
Síntomas nocturnos	No más de 2 veces al mes	Más de 2 veces al mes	Más de una vez a la semana	Frecuentes
Limitación de la actividad	Ninguna	Algo	Bastante	Mucha
Función pulmonar ( $FEV_1$ o PEF) % teórico	> 80 %	> 80 %	> 60 % - < 80 %	≤ 60 %
Exacerbaciones	Ninguna	Una o ninguna al año	Dos o más al año	Dos o más al año

**Figura 1.11 Clasificación de la gravedad del asma en adultos (antes de recibir tratamiento).** Figura modificada de la referencia<sup>77</sup>.

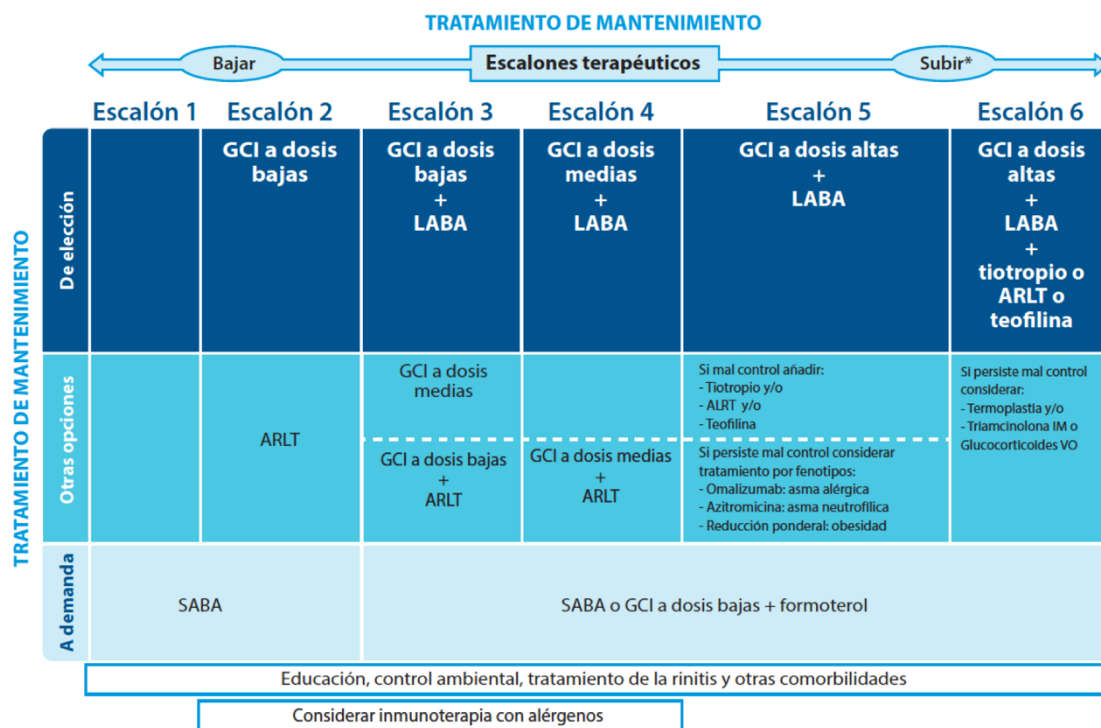
GRAVEDAD	INTERMITENTE	PERSISTENTE		
		Leve	Moderada	Grave
Necesidades mínimas de tratamiento para mantener el control	Escalón 1	Escalón 2	Escalón 3 o Escalón 4	Escalón 5 o Escalón 6

**Figura 1.12 Clasificación de la gravedad del asma cuando está bien controlada con el tratamiento.** Figura modificada de la referencia<sup>77</sup>.

### 1.4.6 Tratamiento

El tratamiento del asma tiene como objetivo mantener el control de los síntomas, evitar las exacerbaciones y mejorar la obstrucción crónica del flujo aéreo. Así pues, el tratamiento se debe ajustar continuamente en función de la gravedad del paciente en cada período, bajando o subiendo en los escalones terapéuticos según convenga. En la **Figura 1.13** se indican los escalones terapéuticos del asma del adulto y las aproximaciones farmacológicas más adecuadas en cada uno.





\*tras confirmar la correcta adhesión terapéutica y empleo del inhalador/es

ARLT: Antagonista de los receptores de los leucotrienos; GCI: Glucocorticoide inhalado, LABA: Agonista β<sub>2</sub>-adrenérgico de acción larga; SABA: Agonista β<sub>2</sub>-adrenérgico de acción corta.

**Figura 1.13 Escalones terapéuticos del tratamiento de mantenimiento del asma del adulto.** Figura modificada de la referencia<sup>77</sup>.

Los fármacos usados para tratar el ASMA pueden clasificarse en dos categorías:

- **Broncodilatadores:** tienen como objetivo aliviar el broncoespasmo mediante la relajación del músculo liso en las vías aéreas. Aunque existe una gran diversidad de mecanismos relajantes de músculo liso, en este caso sólo tres categorías farmacológicas han demostrado eficacia clínica:
  - Agonistas adrenérgicos β<sub>2</sub> de acción corta (Bambuterol, Salbutamol, Terbutalina) o prolongada (Formoterol, Salmeterol).
  - Antagonistas muscarínicos (Bromuro de Ipratropio o Tiotropio).
  - Metilxantinas (Teofilina).
  
- **Antiinflamatorios:** pueden resolver la inflamación bronquial preexistente y/o impedir el posterior desarrollo de inflamación en el asma. Dado que son incapaces de revertir el broncoespasmo no son útiles para el ataque agudo.

- Corticosteroides inhalados (Beclometasona, Budesonida, Fluticasona, etc) o sistémicos (Prednisona, Prednisolona, Deflazacort, etc).
- Inhibidores de leucotrienos (Montelukast, Zafirlukast).
- Anticuerpos monoclonales contra la unión de IgE (Omalizumab)

#### **1.4.7 Modelos animales en el estudio del asma**

Los modelos de experimentación animal han proporcionan desde finales del siglo XIX una imprescindible información acerca del desarrollo de gran variedad de enfermedades. A lo largo de los últimos años se han generado diferentes modelos animales de Asma, con el fin de estudiar su patofisiología, la actividad y función de diferentes genes y vías celulares, así como evaluar la eficacia y seguridad de nuevos fármacos en estadios pre-clínicos. Actualmente el más utilizado es el modelo de ratón, puesto que presenta múltiples ventajas respecto al resto de especies de mayor tamaño. Por ejemplo, existe una gran oferta a nivel mundial de cepas endogámicas de ratón previamente caracterizadas genéticamente y a bajo coste, así como el libre acceso al mapa del genoma murino. Además, la disponibilidad de ratones transgénicos modificados genéticamente junto con múltiples productos para análisis de mediadores celulares y moleculares especie-específicos consolidan al ratón como un modelo experimental óptimo, permitiendo investigar con sumo detalle los mecanismos involucrados en sus reacciones inmunológicas<sup>99,100</sup>.

Aunque los modelos murinos presenten muchas de las características del asma humano, como niveles elevados de IgE, inflamación de las vías aéreas, hiperplasia de las células caliciformes e hiperreactividad bronquial, un único modelo animal es incapaz de abarcar todas las características morfológicas y funcionales de esta enfermedad. En un gran número de estudios sobre asma se han empleado modelos con respuesta alérgica aguda, no obstante, los modelos de asma crónico con aspectos clínicos similares a la patología en humanos también han sido investigados por varios grupos<sup>101,102</sup>.

---

Generalmente en los modelos de asma los ratones se sensibilizan mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de una proteína presente en la clara de huevo llamada Ovoalbúmina (OVA) en asociación con un adyuvante como el hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>). Otros alérgenos naturales o proteínas purificadas de alérgenos como ácaros del polvo, ambrosía u hongos también se emplean para sensibilizar ratones en lugar de la Ovoalbúmina<sup>103-105</sup>. La sensibilización también se ha llevado a cabo mediante la administración repetida del alérgeno vía la piel (intradérmica, subcutánea o epicutánea) o por las vías aéreas (intranasal e intratraqueal). Tras el período de sensibilización las vías respiratorias de los ratones se exponen al alérgeno directamente vía intratraqueal, intranasal o por aerosol. Estas condiciones producen una respuesta eosinofílica robusta e hiperreactividad bronquial, producida por la presencia de linfocitos T-CD4+ y dependiente del componente humoral como IgE, células B o mastocitos<sup>106</sup>.

El análisis y seguimiento del asma en ratones se realiza normalmente a tiempo final del protocolo de inducción. Tras el sacrificio del animal se suele realizar un lavado broncoalveolar cuyo análisis de contenido en células y mediadores inflamatorios tiene un enorme valor diagnóstico. Por otro lado, el análisis histológico, génico y proteico del tejido pulmonar proporciona evidencia sobre las características del asma inducido y la influencia del tratamiento o las condiciones experimentales.

En la última década se han adaptado las técnicas de diagnóstico por imágenes a la experimentación animal gracias a los equipos de tomografía micro-computarizada (micro-CT). Esta técnica es idónea para la evaluación de la función pulmonar ya que, en particular en el pulmón, existe una diferencia de contraste entre aire y tejido pulmonar que permite cuantificar y comparar la función pulmonar de un mismo sujeto experimental. Además, permite realizar el seguimiento de la evolución animal *in vivo*, sin necesidad de sacrificar sujetos a lo largo del procedimiento experimental para verificar la correcta inducción de la enfermedad o el efecto de un nuevo fármaco en experimentación.

El micro-CT se emplea tanto en enfermedades agudas como crónicas, proporciona información complementaria a la evaluación histológica, dado que la técnica no es destructiva. También se emplean en estudios *in vivo* e *in vitro*. Los animales vivos evalúan la función pulmonar y los tejidos fijados se emplean para estudios estructurales. Recientemente los equipos de micro-CT se han combinado con la tecnología SPECT (Tomografía de Fotón Único) y Tomografía por Emisión de Positrones (PET) lo que permite fusionar imágenes anatómicas con imágenes funcionales capturadas al mismo tiempo además de la posibilidad de realizar estudios dinámicos.

## 1.5 RINOSINUSITIS CRÓNICA ASOCIADA A PÓLIPOS NASALES

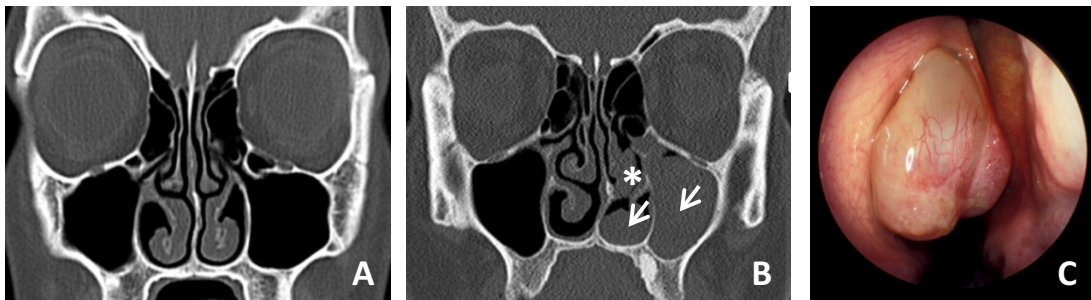
### 1.5.1 Definición

La Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales (RSC-PN) o poliposis nasal (PN) es un proceso inflamatorio crónico que cursa con una degeneración edematosa multifocal y bilateral de la mucosa de las masas laterales del etmoides. Esta degeneración provoca la formación de pólipos edematosos y fibrosos, que progresivamente van ocupando los meatos etmoidales hacia las fosas nasales. Tiene carácter benigno y nunca degenera. Es eminentemente crónica tanto en sus manifestaciones como en su tratamiento, siendo casi siempre médico, aunque a veces hay que recurrir al tratamiento quirúrgico<sup>107</sup>.

### 1.5.2 Clínica

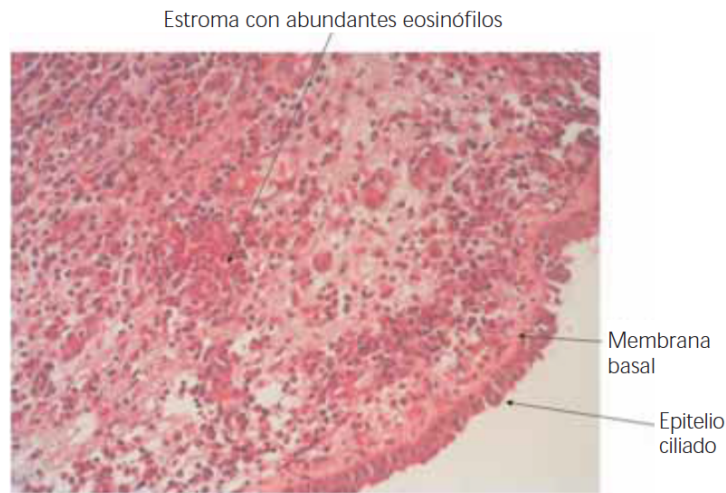
Desde un punto de vista clínico, la guía EPOS<sup>108</sup> (*European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps*) define la RSC-PN como un cuadro que cursa con inflamación de las fosas nasales y de los senos paranasales caracterizada por la presencia de dos o más síntomas, uno de los cuales debe ser o bien bloqueo/obstrucción/congestión nasal o bien secreción nasal (rinorrea anterior/posterior). Estos síntomas deben cursar con sensación de presión facial y pérdida total o parcial del sentido del olfato e ir acompañados de una de las siguientes características anatómicas:

- Presencia de pólipos nasales a nivel endoscópico (**Figura 1.14 C**).
- Secreción mucopurulenta principalmente en el meato medio.
- Edema/obstrucción mucosa principalmente en el meato medio.
- Cambios en la mucosa del complejo osteomeatal y/o de los senos paranasales observados por Tomografía Computerizada (**Figura 1.14 A y B**).



**Figura 1.14 Clínica de la Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales.** Las dos primeras imágenes corresponden a una sección coronal de una Tomografía Computerizada sin contraste de los senos paranasales de **A**, un individuo sano y **B**, un paciente de RSC-PN. Podemos observar la obliteración del seno nasal por la presencia del pólipo nasal (\*) y de una inflamación de la mucosa o rinosinusitis extensa (flechas). **C**, imagen endoscópica de un pólipo nasal. Figura adaptada de la referencia<sup>109</sup>.

Histopatológicamente los pólipos están constituidos por tejido conectivo laxo, edema, células inflamatorias, algunas glándulas, y capilares. El tipo de epitelio que los recubre es variable, aunque en la mayoría de los casos es respiratorio pseudoestratificado y está dotado de células ciliadas y caliciformes. Presenta una membrana basal engrosada y un estroma laxo, con escasas estructuras vasculares y glandulares, y ausencia de elementos nerviosos. Los eosinófilos son las células inflamatorias que aparecen con mayor frecuencia en los pólipos nasales (**Figura 1.15**), pero también se observan neutrofilos, mastocitos, células plasmáticas, linfocitos, monocitos y fibroblastos.



**Figura 1.15 Histopatología de un Pólipo Nasal.** La fotografía corresponde a un corte histológico de un Pólipo Nasal teñido por hematoxilina-eosina. Podemos observar el abundante infiltrado inflamatorio y el epitelio ciliado con un engrosamiento de la membrana basal. Figura adaptada de la referencia<sup>107</sup>.

### 1.5.3 Fisiopatología

Las fosas nasales y los senos paranasales constituyen un conjunto de espacios aéreos situado en la parte anterior del cráneo, que se comunican a través de pequeñas aberturas. Estos espacios están recubiertos por un epitelio columnar ciliado pseudoestratificado, que contiene células caliciformes y glándulas mucosas que producen una capa de moco que fluye continuamente. La función de este moco es atrapar a los patógenos y partículas inhaladas, inactivarlas por la acción de las enzimas que contiene (p. ej. la lisozima y la lactoferrina) y desplazarlas hacia el esófago mediante el aclaramiento mucociliar. No obstante, el moco presente en los senos tiene que eliminarse hacia la cavidad nasal atravesando pequeños orificios. Cuando el orificio es demasiado pequeño para la cantidad de moco presente, ya sea porque aumenta su producción (p. ej., en el curso de una infección del tracto respiratorio superior) o porque existen alteraciones de la función ciliar, se produce una estasis de las secreciones y cesa la eliminación de bacterias. En estas circunstancias, se inflama la mucosa o empeoran los procesos inflamatorios ya existentes y disminuye la ventilación, con lo que la disfunción ciliar se hace aun más pronunciada. Si la situación persiste puede desembocar en una rinosinusitis crónica acompañada de la formación de pólipos edematosos bilaterales benignos<sup>108,110</sup>.

La hipersecreción e hiperviscosidad mucosa que dificultan el aclaramiento mucociliar puede deberse a patrones alterados de expresión de mucinas. Estudios previos han demostrado que en los pólipos está alterada la expresión de las mucinas 1, 2, 4, 5AC, 5B, 8 y 16<sup>53,76,111</sup>. Entre estas, las mucinas 4 y 5AC son las más abundantes en glándulas submucosas y células epiteliales en los pólipos nasales<sup>111</sup>.

Por otro lado, actualmente se considera la inflamación eosinofílica persistente de la mucosa nasosinusal como el principal factor responsable de la formación del pólipo. Se ha sugerido que la acumulación de eosinófilos se deba en parte a la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas estimuladas por el Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) secretado por células epiteliales, fibroblastos y monocitos<sup>112-114</sup>. De hecho, las muestras de tejido de pólipos tenían mayores densidades tisulares de los transcritos de GM-CSF, así como de IL-3, IL-4 e IL-5. No obstante, de las citoquinas inflamatorias detectadas la más abundante fue la IL-5, que se ha considerado la más relevante debido a que el tratamiento del tejido de pólipo nasal con anticuerpos monoclonales anti-IL-5, pero no con anti-IL-3 o anti-GM-CSF *in vitro*, dio lugar a la apoptosis y la disminución de la eosinofilia tisular<sup>115</sup>. Esto se debe a que IL-5 provoca el reclutamiento, activación y maduración del eosinófilo, así como la inhibición de su apoptosis. Además, se sabe que la inflamación eosinofílica en los pólipos está orquestada por las células T activadas<sup>116</sup>. Estas representan una población mixta, que consta de células CD4+ y CD8+, y muestran un perfil mixto Th1 / Th2. Sin embargo, otras células inflamatorias también pueden contribuir a la liberación de citoquinas, como macrófagos, mastocitos o los propios eosinófilos, que liberan IL-4 e IL-5 de una manera autocrina. Otros trabajos han demostrado que los pólipos nasales también expresan altos niveles de RANTES y eotaxina, que actúan como quimioatrayentes de eosinófilos<sup>117</sup>. En cuanto a moléculas de adhesión se ha observado un incremento en la expresión de ICAM-1, E-selectina y P-selectina<sup>118,119</sup>.

Por otro lado, estudios recientes sugieren que la RSC-PN podría ser consecuencia de una disfunción del epitelio respiratorio nasal en su función como mediador y regulador de la respuesta inflamatoria. Uno de los mecanismos propuestos es la existencia de un déficit de la inmunidad innata que podrían favorecer la colonización microbiana y el desarrollo de una respuesta anormal<sup>120,121</sup>. En este sentido se ha

---

reportado una menor expresión en tejido de pólipos nasales de los péptidos antimicrobianos humanos, como las defensinas y las catelicidinas, y de los receptores de reconocimiento de patógenos, como los receptores tipo *Toll* (TLR)<sup>122</sup>.

#### 1.5.4 Epidemiología

Aunque su prevalencia exacta no se conoce, se estima, según diferentes estudios epidemiológicos, entre un 0,2-5,6% dentro de la población general, entre un 10-15% en los pacientes asmáticos y entre un 36-90% en los pacientes con intolerancia a los anti-inflamatorios no esteroideos o AINEs. Como se observa, existe una enorme variabilidad entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios, puesto que en ellos se emplean diferentes criterios diagnósticos. Sin embargo, el consenso general es que la RSC-PN se trata de un importante problema de salud, con un elevado coste socio-sanitario. De hecho, los pacientes afectados de RSC-PN demuestran peor calidad de vida que los que sufren enfermedades más severas como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) o la Insuficiencia Cardíaca Congestiva<sup>107</sup>.

#### 1.5.5 Factores asociados a la RSC-PN

Según varios estudios de prevalencia<sup>107,108</sup>, la RSC-PN es más frecuente en pacientes que presentan ciertas características:

- **Alergia.** La relación entre PN y alergia no está aclarada de forma adecuada. Por un lado, la frecuencia de poliposis en pacientes con rinitis alérgica es baja, alrededor del 1,5%. Sin embargo, el porcentaje de pacientes con PN y pruebas cutáneas o IgE específica positivas frente a aeroalérgenos ha sido, en general, superior al de la población general (19-63%), estando en la mayoría de los estudios por encima del 50%. No obstante, estos estudios no han sido realizados en población general sino en grupos evaluados en atención especializada.
- **Asma e intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE).** Los pacientes con PN presentan un mayor riesgo de desarrollar asma. En este sentido, en estudios con un amplio número de pacientes, el porcentaje con asma osciló entre un 30-70%. Por otra parte, un 5-15% de los pacientes



asmáticos puede desarrollar PN, y en un 36-96% de los casos cuando el asma coexiste con la intolerancia a AINE. El asma precede a la PN en un 70% de los casos, es simultánea en un 10% de casos y posterior en el 20%. Entre un 5% y un 8% de los pacientes con PN presentan intolerancia a los AINEs, habitualmente asociada a un asma no alérgica. Los pacientes con PN, especialmente los que padecen asma asociada, presentan un riesgo más elevado (10-26% de los casos) de desarrollar reacciones de intolerancia a los AINEs.

- **Genética.** Tampoco queda claro si la PN presenta un componente hereditario. Se ha descrito asociación de la PN con determinados HLA. Algunos estudios han encontrado antecedentes familiares de PN en pacientes afectos de esta enfermedad. Sin embargo, los estudios con gemelos homocigóticos no encuentran gran concordancia.

### 1.5.6 Diagnóstico

Las bases del diagnóstico son la historia clínica, de manera que la RSC-PN debe sospecharse ante un paciente que aqueja alteración del olfato, obstrucción nasal, dolor o presión facial (cefalea) y rinorrea anterior o posterior. Para afianzar el diagnóstico es esencial la visualización de las formaciones polipoideas que ocupan parcial o totalmente las cavidades nasales, por lo que se debe realizar una completa exploración otorrinolaringológica básica que incluya una rinoscopia anterior, en la que normalmente se observaría una masa semitransparente, blanda y móvil. La rinoscopia anterior no se considera suficiente para diagnosticar o excluir pólipos, y especialmente para el diagnóstico diferencial, es necesaria una investigación endoscópica de la nariz después de la descongestión tópica. Para investigar la extensión de la enfermedad dentro de los senos, se realiza una tomografía computarizada (TC).

Para determinar la extensión de los pólipos dentro de la nariz y los senos se utiliza el sistema de puntaje de Davos (**Tabla 1.1**), basado en la evidencia de la endoscopia y la TC<sup>107,123</sup>. Este sistema parte de la suposición de que el crecimiento del pólipo comienza desde el meato nasal medio y luego se extiende en una forma bidimensional hacia el suelo de la nariz. Este sistema puede ser útil para la

comunicación médica y para la evaluación de la respuesta terapéutica a un tratamiento.

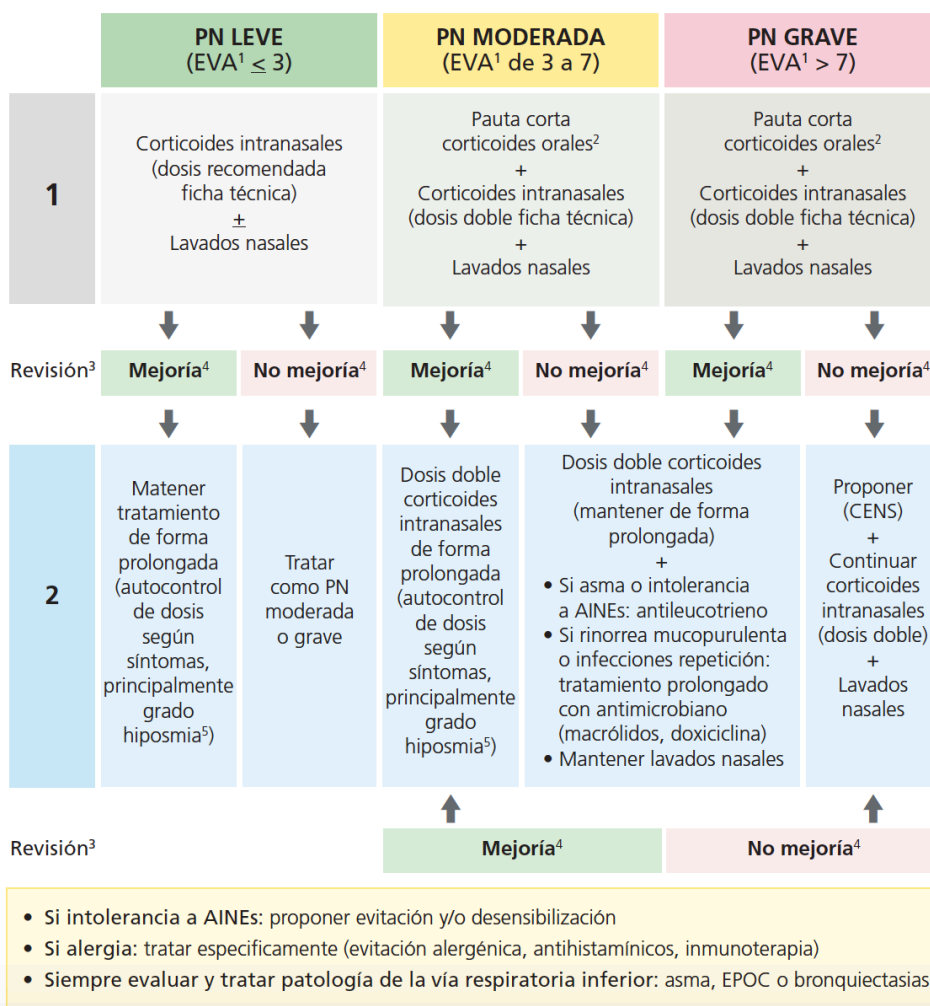
Puntuación	Observaciones endoscópicas
0	Sin pólipos.
1	Pequeños pólipos en el meato medio que no alcanzan el borde inferior del cornete medio.
2	Pólipos que alcanzan el borde inferior del cornete medio.
3	Pólipos grandes que alcanzan el borde inferior del cornete inferior o pólipos mediales al cornete medio.
4	Pólipos grandes que causan una congestión u obstrucción completa del meato inferior.

**Tabla 1.1 Sistema de puntuación de pólipos nasales.** La puntuación se asigna en función de las características observadas mediante endoscopia. Datos extraídos de la referencia<sup>123</sup>.

### 1.5.7 Tratamiento

Los objetivos del tratamiento de la poliposis nasal van destinados a eliminar la inflamación sinusal y los pólipos nasales, a restablecer la respiración nasal, restaurar el sentido del olfato y prevenir las recurrencias de los pólipos nasales. El tratamiento médico con corticoides intranasales o sistémicos es la primera línea terapéutica de la poliposis nasal, aconsejándose la cirugía endoscópica en el caso de fracaso del tratamiento médico.

A continuación, se transcribe el algoritmo de tratamiento propuesto en el Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal de las Sociedades Españolas de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC) y de Otorrinolaringología (SEORL)<sup>107</sup>:



1 En el manejo terapéutico de la PN se recomienda un enfoque escalonado, basado en la gravedad de la enfermedad. Para la valoración de la gravedad proponemos, siguiendo el criterio de la guía EPOS, utilizar la escala visual analógica.

2 0'5-1 mg/kg/día prednisona o equivalente durante 7 a 14 días. No es necesario reducir progresivamente la dosis si es menor a 50 mg diarios de prednisona o equivalente.

3 Aunque no hay pruebas científicas que permitan recomendar un periodo de revisión concreto, recomendamos inicialmente (paso 1) hacer la revisión al mes de tratamiento y posteriormente (paso 2) a los 3 (moderada o grave) o a los 6 meses (leve o controlada).

4 Definimos como mejoría (control o buena respuesta al tratamiento) el descenso en un escalón de gravedad en PN moderada o grave o la reducción en la puntuación de la EVA en la PN leve.

5 El grado de hiposmia puede medirse de forma subjetiva, con escala visual analógica o mediante olfatometría; correlaciona bien con la gravedad de la PN, es el síntoma más específico de PN y puede ayudar a controlar la enfermedad, indicando al paciente que aumente o

---

*disminuya la dosis de corticoide intranasal en función del empeoramiento o mejoría de su hiposmia.*

**Figura 1.16 Algoritmo de tratamiento del Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal (SEAIC-SEORL).** Figura adaptada de la referencia<sup>107</sup>.

A nivel sintomático los corticosteroides intranasales reducen significativamente el bloqueo nasal y la rinorrea; sin embargo, la recurrencia de los síntomas o el crecimiento del pólipo, puede ocurrir en semanas o meses<sup>124</sup>. Después de la cirugía, los corticosteroides tópicos también pueden reducir la incidencia de recurrencias de pólipos o prolongar el intervalo libre de síntomas<sup>125</sup>; Sin embargo, los corticosteroides tópicos pueden ser insuficientes en pólipos bilaterales severos<sup>126,127</sup>; y el crecimiento de pólipos puede observarse a pesar del tratamiento en estos pacientes. También se ha demostrado la eficacia de los corticoides intranasales en la mejoría de la función pulmonar en pacientes con asma o ASA triada.

El tratamiento con corticoides orales se ha analizado en un estudio no controlado, mostrando un efecto significativo durante algunos meses con una mejoría de los síntomas en el 72% de los pacientes y una reducción del tamaño del pólipo y de la oclusión sinusal en un 52% de pacientes<sup>128</sup>. En los sujetos que respondieron, las recurrencias ocurrieron en su mayor parte dentro de los 5 meses. Por lo tanto, los corticoides orales pueden ser indicados para retrasar la cirugía o para facilitarla. Sin embargo, no hay pruebas hasta el momento de que el curso natural de la enfermedad pueda verse influido por regímenes de tratamiento de dosis bajas a corto o largo plazo. Existen otros tratamientos de tipo anti-inflamatorio (antihistamínicos, antileucotrienos y anticuerpos monoclonales contra la unión de IgE) propuestos para la PN, pero no hay estudios clínicos que validen que su efectividad sea superior a los corticoides<sup>107,119</sup>.

La Polipectomía endoscópica intranasal debe ser considerada en caso del fracaso, los efectos secundarios o la falta de voluntad del paciente para cumplir con el tratamiento farmacológico, así como en caso de complicaciones. Es una intervención que puede practicarse bajo anestesia local o general, con un alcance espacial limitado y que permite extirpar los pólipos de la cavidad nasal<sup>107</sup>.

## **CAPÍTULO 2**

### **CORTICOIDES**

**Y**

### **CORTICORRESISTENCIA**

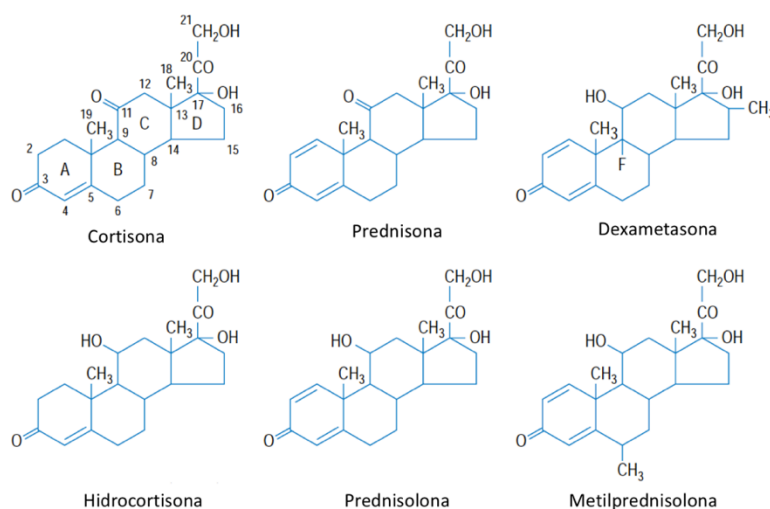


## CORTICOIDES Y CORTICORRESISTENCIA

### 2.1 QUÉ SON LOS CORTICOIDES

Los corticoides, también denominados glucocorticoides o corticosteroides, son hormonas de tipo esteroideo producidas por la corteza adrenal bajo la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal. Estos operan fisiológicamente en dosis pequeñas, como reguladores endocrinos de múltiples procesos fisiológicos, como la homeostasis metabólica, proliferación celular, respuesta inmune, desarrollo y reproducción<sup>129,130</sup>. Los principales corticoides endógenos son la Corticosterona y la Hidrocortisona o Cortisol<sup>43</sup>.

Por otro lado, existe una amplia oferta de corticoides sintéticos de uso clínico generados químicamente como derivados del núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno o esterano, modificado mediante la adición de grupos funcionales como carbonilos e hidroxilos (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1** Estructura molecular de la cortisone y los corticoides más utilizados. La nomenclatura de los carbonos y anillos se indica en la cortisone. Adaptado de la referencia<sup>43</sup>.

Estas modificaciones proporcionan diferentes potencias farmacológicas y vidas medias, por lo que los corticoides de uso clínico se clasifican en corticoides de acción corta, intermedia o prolongada, como se describe en la **Tabla 2.1**.

Clasificación	Corticoide	Dosis equivalente (mg)	Potencia anti-inflamatoria
<b>Acción corta</b> 8-12 horas	Hidrocortisona	20	1
	Cortisona	25	0.8
<b>Acción intermedia</b> 18-36 horas	Deflazacort	7,5	4
	Prednisolona	5	4
	Prednisona	5	4
	Metilprednisolona	4	5
	Triamcinolona	4	5
	Parametasona	2	10
	Fludrocortisona	2	10
<b>Acción prolongada</b> 36-54 horas	Dexametasona	0,75	25
	Betametasona	0,6	25-30

**Tabla 2.1** Clasificación de los corticoides según su potencia y vida media. Los valores están relativizados respecto a la hidrocortisona como fármaco de referencia<sup>131</sup>.

## 2.2 CÓMO ACTÚAN LOS CORTICOIDES

### 2.2.1 El receptor de glucocorticoides

El carácter esteroideo de los corticoides confiere propiedades lipofílicas que facilitan su paso a través de las membranas celulares al citoplasma, donde se unen al receptor de glucocorticoides o *glucocorticoid receptor* (GR), el cual actúa como un factor de transcripción inducible por ligando. El GR se expresa de manera constitutiva en todas las células humanas, pero existe un patrón de expresión dependiente de cada tejido que determina diferentes respuestas<sup>132</sup>.

#### 2.2.1.1 Regulación génica del receptor de glucocorticoides

El receptor de glucocorticoides en humanos está codificado por el gen NR3C1 (receptor nuclear 3, grupo C, miembro 1) que está localizado dentro de la región cromosómica 5q31Y32. Este gen tiene 9 exones y su proteína está codificada por



aquellos comprendidos entre el segundo y el noveno. No obstante, se han identificado hasta 13 variantes del exón 1 dependiendo del promotor *upstream*, lo que se asocia con diferentes niveles de expresión dependiente de tejido<sup>133-136</sup>. Además, sus promotores presentan múltiples lugares de unión para factores de transcripción que pueden incrementar (factor nuclear kappa beta, proteína activadora 1, receptor de estrógenos, etc.) o reprimir (Factor de respuesta a GC 1 y proteína C-Ets-1/2) su expresión. En este sentido, se han identificado diferentes secuencias en la región promotora del gen conocidas como elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y elementos de respuesta a glucocorticoides negativos (nGRE). Estos elementos permiten una regulación autocrina del GR solo o en combinación con otros factores de transcripción, lo que explicaría los efectos específicos para cada tejido en respuesta a los corticoides<sup>137-139</sup>. A nivel post-transcripcional se han descrito dos mecanismos que controlan la estabilidad del ARN mensajero de GR. Por un lado la presencia de elementos ricos en adenina y uracilo (AREs) en el 3'UTR del GR-ARNm podría participar en su desestabilización y afectar a su expresión proteica<sup>140,141</sup>, pero este mecanismo no está del todo claro. Por otro lado, múltiples estudios han demostrado la importancia de los micro ARNs (miRs), que son cadenas simples de ARN no codificante que controlan la estabilidad del GR-ARNm mediante la hibridación incompleta de bases<sup>140,141</sup>.

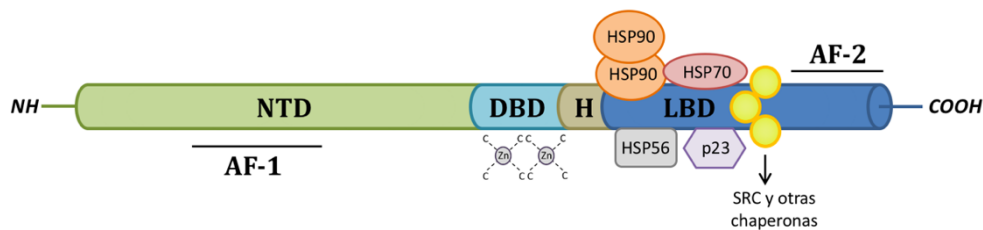
### 2.2.1.2 Variantes de splicing e isoformas de GR

Se han identificado varias isoformas del receptor de glucocorticoides en humanos, que son resultado de procesamientos alternativos del ARNm primario mediante splicing o traducción. Estas isoformas (hGR- $\alpha$  / $\beta$  / $\gamma$  /A /P / $\delta$  /S1 /NS1 /DL1) difieren en su regulación génica, patrón de expresión y otros aspectos funcionales<sup>134,140,142</sup>. El splicing alternativo cerca de la posición 3'UTR del transcrito primario genera las dos isoformas principales -GR $\alpha$  y GR $\beta$ -, que difieren en su región C-terminal. La proteína GR $\alpha$  contiene el final del exón 8 adyacente al exón 9a, mientras que en el GR $\beta$  el exón 8 está adyacente al 9b. Ambas isoformas comparten los mismos primeros 727 aminoácidos, pero difieren en la longitud de la región C-terminal, resultando en proteínas de 777 y 742 aminoácidos para GR $\alpha$  y GR $\beta$ , respectivamente. GR $\beta$  tiene el dominio de unión a ligando truncado, por lo que no se une a corticoides; no obstante,

se ha observado que es transcripcionalmente activo, aunque su ligando se desconoce todavía<sup>134,140,142-144</sup>.

### 2.2.1.3 Estructura del receptor de Glucocorticoides

En la mayoría de tipos celulares la isoforma predominante es la  $\alpha$ . Esta isoforma se compone de tres dominios funcionales (**Figura 2.2**): un dominio transcripcional N-terminal, que comprende 421 aminoácidos y contiene la función de activación transcripcional constitutiva independiente de ligando (AF1); un dominio central de unión a ADN y de dimerización, que contiene dos dedos de zinc en 65 aminoácidos (DBD); una región bisagra de 40 aminoácidos que confiere flexibilidad al receptor dimerizado para unirse al dominio GRE; y un dominio de unión a ligando (LBD) C-terminal con una función transcripcional llamada AF2. Esta última región también interactúa con chaperonas, co-reguladores y otros factores de transcripción. Adicionalmente, tanto el DBD como el LBD contienen secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2) y el DBD contiene además una secuencia de exporte nuclear entre los dedos de zinc<sup>145,146</sup>.



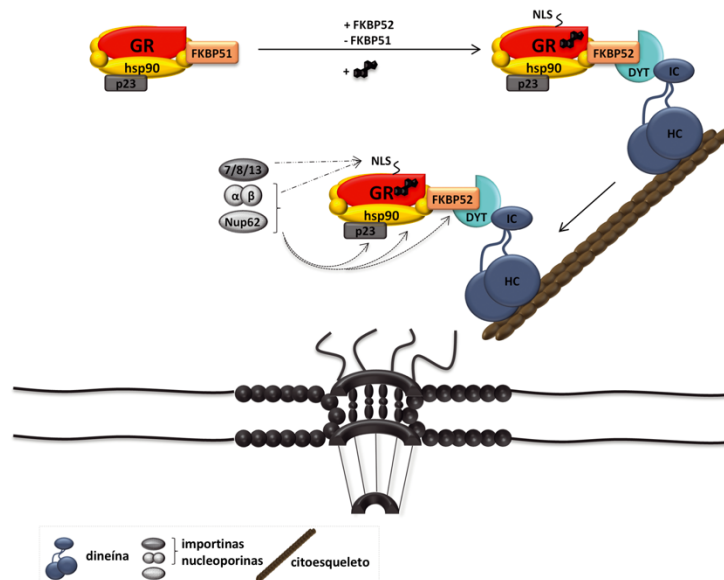
**Figura 2.2** Composición del receptor de glucocorticoides  $\alpha$  inactivo.

### 2.2.2 Mecanismos anti-inflamatorios de los corticoides

Los corticoides tienen propiedades lipofílicas que permiten que difunda fácilmente a través de la membrana celular al citoplasma y se una al  $GR\alpha$ , el cual actúa como factor de transcripción inducible por ligando. En ausencia de ligando, el  $GR\alpha$  permanece principalmente en el citoplasma ensamblado en un complejo de chaperonas (**Figura 2.3**) formado por múltiples proteínas de choque térmico (hsp), como hsp90, hsp70, hsp56, y hsp40.  $GR\alpha$  también interacciona con la proteína de unión a hsp90 (p23), inmunofilinas y quinasas del sistema de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo SRC, las cuales

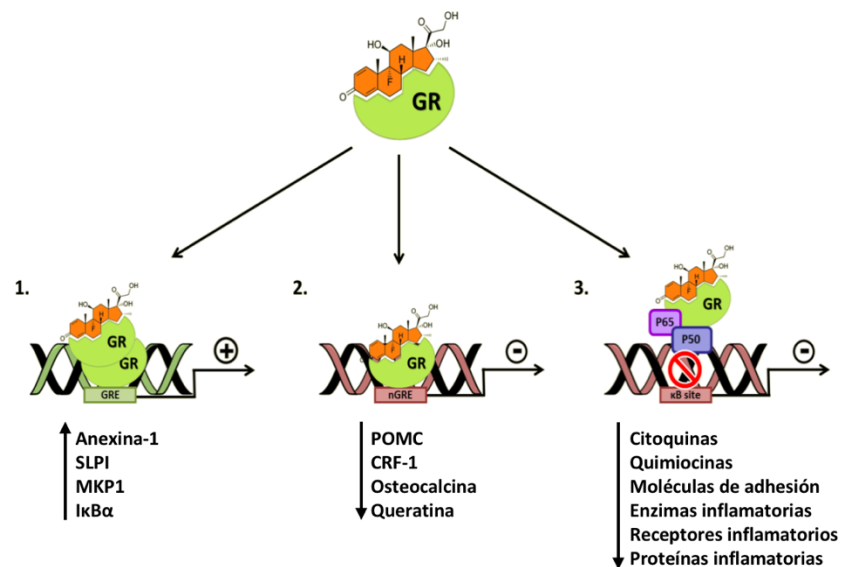
actúan como co-chaperonas moleculares<sup>147-150</sup>. Este complejo y sus interacciones proteicas previenen la degradación de GR $\alpha$  y guían, mediante la escisión de ATP, su conformación de un estado de baja a alta afinidad por ligando<sup>147,151</sup>.

La unión de un corticoide a GR $\alpha$  provoca su fosforilación por múltiples quinasas como MAPK, quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Estas fosforilaciones, así como otras modificaciones químicas como oxidación, sumoilación o ubiquitinación, pueden regular positiva o negativamente la translocación nuclear y la actividad transcripcional de GR $\alpha$ <sup>138,140,152</sup>. Se cree que la liberación de GR $\alpha$  del complejo de chaperonas es necesario para su translocación al núcleo, pero estudios han demostrado que componentes de este complejo participan del movimiento hacia el núcleo. La evidencia sugiere que la translocación nuclear del GR $\alpha$  puede implicar dos mecanismos: un transporte mediado por chaperonas a lo largo de los microtúbulos hasta el complejo de poro nuclear (NPC)(Figura) o la difusión por importinas<sup>147,153,154</sup>. No obstante, el consenso general sobre la translocación nuclear de GR $\alpha$  tras su unión a ligando es todavía una aproximación.



**Figura 2.3 Mecanismo de translocación nuclear de GR mediado por chaperonas.** Las importinas  $\alpha/\beta$ , 7, 8, 13 y la nucleoporina Nup62 interacciona con las secuencias de localización nuclear (NLS) en GR. Las importinas  $\alpha/\beta$  y Nup62 también interaccionan con p23, hsp90 y FKBP52 para facilitar la importación nuclear de GR a través del poro nuclear. HC, cadena pesada de dineína; IC, intercadena. Figura modifica de la referencia<sup>147</sup>.

Tras la unión del ligando, el complejo corticoide-receptor resultante transloca al núcleo celular donde ejerce una activación o represión transcripcional<sup>155</sup>. La transactivación implica una unión directa de alta afinidad entre el complejo y los GRE. La unión a las secuencias GRE provoca la síntesis de proteínas anti-inflamatorias como MKP1 (**Figura 2.4, 1**). Por otro lado, la unión de GR $\alpha$  a los GRE negativos inhibe la expresión de múltiples genes no relacionados con la inflamación como Osteocalcina o Queratina (**Figura 2.4, 2**), por lo que la transcripción de los GRE negativos se ha relacionado con los efectos secundarios de los corticoides<sup>138,156</sup>. A pesar de la interacción de los complejos de corticoides con GRE, la mayoría de sus efectos anti-inflamatorios implican la trans-represión mediante inactivación de factores de transcripción pro-inflamatorios como el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B), la proteína activadora 1 (AP-1) o de algunos Signal transducers and activators of transcription (STAT3 and STAT6) (**Figura 2.4, 3**), por lo que modifica la expresión génica sin contacto directo con el ADN<sup>156-159</sup>. Los corticoides pueden adicionalmente prevenir la transcripción génica modificando la estructura de la cromatina mediante diferentes mecanismos, como revertir la acetilación reclutando histona deacetilasas (HDAC2), lo que permite el acceso de factores de transcripción pro-inflamatorios a los elementos de respuesta del ADN<sup>160</sup>.



**Figura 2.4** Los glucocorticoides regulan la expresión génica por varias vías. SLPI: secretory leukoprotease inhibitor; MKP-1: mitogen-activated kinase phosphatase-1; I $\kappa$ B $\alpha$ : inhibidor de NF- $\kappa$ B; POMC: proopiomelanocortin; CRF-1: corticotrophin releasing factor.

A través de los mecanismos anteriores, los glucocorticoides median una gama fascinante de efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores cuando se usan terapéuticamente, con prácticamente todas las células inmunes primarias y secundarias afectadas en cierta medida, como se desprende de la siguiente tabla:

<b>Monocitos/macrófagos</b>
↓ número de células circulantes (↓mielopoyesis, ↓liberación) ↓ expresión de MHC tipo II, moléculas y receptores Fc ↓ síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , etc)
<b>Células T</b>
↓ número de células circulantes (efectos de redistribución) ↓ producción y acción de IL-2
<b>Granulocitos</b>
↓ número de eosinófilos y basófilos ↑ número de neutrófilos circulantes
<b>Células endoteliales</b>
↓ permeabilidad vascular ↓ expresión de moléculas de adhesión ↓ producción de IL-1 y prostaglandinas
<b>Epitelio respiratorio</b>
↓ expresión de moléculas de adhesión ↓ secreción mucosa ↓ síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, IL-6, GM-CSF, etc)

**Tabla 2.2 Principales efectos de los corticoides sobre las células inmunes primarias y secundarias. Datos extraídos de la referencia<sup>43</sup>.**

### 2.2.3 Vías de administración y dosificación

Los corticoides pueden ser administrados por diferentes vías<sup>161</sup>, las más comunes son:

- Administración sistémica:
  - Oral: la mayoría de los corticoides se absorben bien a través del tracto gastrointestinal (duodeno y yeyuno) y generalmente tardan unos 30 minutos en ser detectados en la circulación. La administración oral suele ser la vía de elección para tratamientos crónicos. Algunos ejemplos son: prednisona, prednisolona, betametasona y la dexametasona.

- Parenteral endovenosa o intramuscular: es la vía de elección en las emergencias (asma, shock séptico), o para la administración de pulsos de megadosis. Algunos ejemplos son metilprednisolona, triamcinolona y dexametasona.
- Administración local:
- Inhalada: varias preparaciones de esteroides artificiales han mostrado su eficacia como broncodilatadores cuando se administran inhalados mediante aerosoles. Tales son fármacos como dipropionato de beclometasona, budesonida o propionato de fluticasona. No obstante, está bien documentado que esta vía de administración puede tener efectos sistémicos.
  - Tópica (beclometasona, betametasona, clobetasol, etc).

La base para la dosificación sistémica de glucocorticoides en diferentes condiciones clínicas es esencialmente empírica, ya que la evidencia para apoyar preferencias en entornos clínicos específicos es escasa<sup>162</sup>. Sin embargo, está claro que las dosis de glucocorticoides aumentan con la actividad clínica y la gravedad de la enfermedad bajo tratamiento. La razón de este enfoque clínico (en gran medida exitoso) es que las dosis más altas aumentan la saturación de los receptores de glucocorticoides de una manera dependiente de la dosis, lo que intensifica las acciones genómicas terapéuticamente relevantes. Se ha calculado a partir de constantes de unión conocidas, niveles de corticoides libres y otros parámetros que las dosis orales de 7,5 mg y 15 mg de prednisolona dan como resultado niveles en sangre tras 8 horas que saturarían los receptores en un 42% y 63%, respectivamente. De acuerdo con estos cálculos, se necesitarían dosis más altas (100 mg o más) para dar como resultado una saturación casi completa del receptor<sup>43,163</sup>. Estas consideraciones han dado lugar a la terminología expuesta en la siguiente tabla:

Terminología	Equivalente en Prednisona (mg/día)	Saturación del receptor
Dosis baja	≤ 7.5	< 50%
Dosis media	>7.5 - ≤ 30	>50 - <100%
Dosis alta	>30 - ≤100	≈100%
Dosis muy alta	> 100	≈100%
Megadosis (pulsos)	≥ 250	100%

**Tabla 2.3 Dosificación sistémica de glucocorticoides y su capacidad de saturar el GR.**  
 Datos extraídos de la referencia<sup>43,163</sup>.

No obstante, se asume que con dosis crecientes entran en juego efectos adicionales, no específicos y principalmente no genómicos relacionados con los efectos secundarios.

#### 2.2.4 Efectos secundarios de los corticoides

Los efectos secundarios de los corticoides pueden aparecer por el uso continuado de dosis elevadas del fármaco o tras la supresión después de que se haya empleado durante largos periodos de tiempo sin pautas de descanso. Los efectos adversos destacan por la variedad de órganos a los que pueden afectar y la gravedad de estos, como se puede observar en la siguiente tabla:

Sistema	Efectos secundarios
Gastrointestinal	Úlcera péptica, hemorragia digestiva, pancreatitis
Endocrino	Síndrome de Cushing, trastornos menstruales, impotencia, hiperglucemia, supresión del eje hipotálamo hipofisario-suprarrenal, retraso del crecimiento
Músculo-esquelético	Osteoporosis, osteonecrosis aséptica, afectación muscular
Dermatológico	Acné, hirsutismo, fragilidad capilar, estrías violáceas, retraso en la curación de heridas
Ocular	Cataratas, glaucoma
Cardiovascular	Hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca
Neuropsiquiátrico	Alteraciones del humor y de la personalidad, hipertensión endocraneal benigna
Inmunológico	Alteraciones inmunológicas con susceptibilidad a desarrollar infecciones

**Tabla 2.4 Efectos secundarios de los glucocorticoides.** Datos extraídos de la referencia<sup>162</sup>.

---

## 2.3 LA CORTICORRESISTENCIA EN ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

La terapia con glucocorticoides ha demostrado ser notablemente exitosa en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Puesto que la inflamación eosinofílica es la característica etiológica principal en el asma y la RSC-PN, los corticoides son el tratamiento de primera elección<sup>77,108,164</sup>. Estos fármacos pueden suprimir muchas fases del proceso inflamatorio<sup>165,166</sup>, lo que puede explicar su fuerte efecto sobre la inflamación. Las células T son altamente sensibles al tratamiento con corticoides, reduciendo el número de células T de una manera dosis-dependiente, así como la expresión de ARNm y proteína de IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13 y sus receptores<sup>167</sup>. También se reduce la secreción de numerosas citoquinas y quimiocinas, entre ellas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, RANTES, y eotaxina<sup>168</sup>. Esto afecta el reclutamiento, localización, activación, síntesis de proteínas y supervivencia de células inflamatorias tales como los eosinófilos. El reclutamiento de células inflamatorias también se ve disminuido por la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1, que afecta la afluencia de basófilos y mastocitos en las capas epiteliales de la mucosa nasal. Los corticoides también puede reducir la liberación de mediadores preformados y recién generados, como histamina, prostanoides y leucotrienos<sup>164,167</sup>; sin embargo, esta acción puede deberse en parte a la reducción de las células inflamatorias en la mucosa. Por último, los corticoides también pueden actuar sobre la producción de IgE<sup>169</sup> y puede afectar la retención de proteínas plasmáticas. Sin embargo, los macrófagos y los neutrófilos no parecen estar influidos<sup>119,170</sup>, lo que podría explicar por qué los corticoides tópicos no tienen un efecto negativo sobre la inmunidad a las infecciones bacterianas.

No obstante, subgrupos de pacientes con grados de enfermedad entre moderada y grave muestran resistencia parcial o completa a las acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides, limitando el tratamiento. Otras enfermedades crónicas con un componente inflamatorio como la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis pulmonar intersticial parecen ser inherentemente resistentes a los glucocorticoides<sup>157</sup>, aunque las razones de esto no se conocen bien. Por lo tanto, una comprensión de los mecanismos moleculares de la resistencia a los glucocorticoides puede revelar nuevos objetivos farmacológicos que



---

pueden emplearse para revertir este fenómeno. La investigación en torno a la resistencia a corticoides se ha centrado principalmente en comprender sus mecanismos en células con una función inflamatoria<sup>171-172</sup>. Pero se acepta cada vez más que una parte sustancial de la eficacia de los tratamientos con glucocorticoides deriva de acciones sobre células estructurales (músculo liso, fibroblastos, epitelios). De hecho, es difícil discernir qué objetivos pueden ser de mayor importancia. Así pues, aunque las células estructurales e inflamatorias pueden presentar los mismos mecanismos de resistencia a los glucocorticoides, parece probable que los nuevos objetivos terapéuticos también irán dirigidos a la resistencia a los corticoides que se produce en células estructurales.

### **2.3.1 Resistencia a corticoides en Asma**

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica que combina la acción del epitelio respiratorio y el sistema inmune para causar obstrucción de las vías aéreas. En este proceso convergen síntomas muy importantes como la hiper-reactividad bronquial, sobreproducción de mucosidad y remodelado de las vías. En contextos severos, los pacientes pueden ser más susceptibles a toda una colección de componentes ambientales como alérgenos, polución y virus<sup>37,79</sup>.

Actualmente los corticoides están en la primera línea de tratamiento de los pacientes asmáticos. De hecho, los síntomas suelen controlarse con una baja dosis de corticoides inhalados (ICS), normalmente acompañada con  $\beta$ -agonistas de acción corta o larga (ayudando a relajar la musculatura lisa de los bronquios). No obstante, aproximadamente el 10% de los pacientes asmáticos requieren altas dosis, un 1% dosis regulares y un pequeño grupo son resistentes a corticoides. La resistencia clínica a los glucocorticoides se define como la presencia de obstrucción de las vías respiratorias que no se resuelve después de dos semanas de tratamiento con una dosis elevada de glucocorticoides<sup>77,142,172-174</sup>. El riesgo de efectos adversos aumenta en pacientes resistentes, por la necesidad de usar dosis más altas de glucocorticoide para lograr incluso una resolución incompleta de la obstrucción de las vías respiratorias. Estos efectos adversos son amplios y han sido bien documentados, incluso con el uso de glucocorticoides inhalados<sup>143,144</sup>.

---

### 2.3.2 Resistencia a corticoides en Rinosinusitis crónica asociada a Pólipos Nasales

La Rinosinusitis crónica asociada a Pólipos Nasales es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las cavidades nasales y los senos paranasales. La etiología todavía es desconocida y las características clínicas principales son la obstrucción nasal y la formación de pólipos edematosos bilaterales, acompañados con la consecuente rinorrea, dolor facial, pérdida de olfato e infecciones nasales concomitantes<sup>108</sup>.

Pese al consenso internacional sobre la eficacia de los corticoides tópicos en la RSC-PN<sup>175-178</sup> la remisión completa de los síntomas y el tamaño de los pólipos con este tratamiento sólo se alcanza en un 60-80% de los casos<sup>179</sup>. En el resto de los casos sólo el uso de corticoides sistémicos reduce significativamente los síntomas y el tamaño del pólipo<sup>180</sup>. Sin embargo, queda todavía un grupo de pacientes que no responden a los efectos de los corticoides. La caracterización clínica de este grupo se realiza si no se observa una reducción significativa del tamaño de los pólipos tras dos semanas de tratamiento con una dosis elevada de corticoide oral. Los pacientes corticorresistentes se ven muy limitados en su tratamiento farmacológico, por lo que deben exponerse a repetidas cirugías para controlar la enfermedad<sup>108,181</sup>.

### 2.3.3 Mecanismos moleculares de corticorresistencia

La resistencia a corticoides en enfermedades inflamatorias crónicas del sistema respiratorio se ha asociado con múltiples mecanismos moleculares (**Tabla 2.5**) que son comunes para el Asma y la RSC-PN. A continuación, se resumen los principales mecanismos descritos en la literatura y se introducen nuevas hipótesis.

Mecanismo	Efecto en GR $\alpha$
<b>Resistencia familiar a corticoides</b>	Alteraciones estructurales debidas a mutaciones
<b>Modificación de GR<math>\alpha</math></b> ↑ Fosforilación ↑ p38MAPK $\alpha$ ↑ p38MAPK $\gamma$ ↑ JNK1 ↑ ERK ↓ MKP-1 ↓ PP2A	Inhibición de la translocación nuclear
<b>Nitrosilación</b> <b>Oxidación</b>	Reduce la unión y afinidad por el ligando
<b>Ubiquitinación</b>	Degradación por el proteasoma
<b>Expresión de GR<math>\beta</math> aumentada</b>	Inhibición competitiva
<b>Aumento de factores de transcripción pro-inflamatorios</b> AP-1, JNK, NF- $\kappa$ B	Inhibición directa de la unión a ligando
<b>Acetilación de histonas defectiva</b> ↓ Acetilación de lys-5 en histona 4 ↓ HDAC-2	Menor acceso a los dominios de unión de ADN
<b>Expresión de mucinas alterada</b> ↓ MUC1	Menos protección frente a la fosforilación de Ser226

**Tabla 2.5 Mecanismos moleculares de resistencia a corticoides en asma y RSC-PN.**

Tabla adaptada de la referencia<sup>182</sup>.

### 2.3.3.1 Mecanismos de auto-regulación de los transcritos de GR

En la completa revisión de Vandevyver S. & Dejaner L. *et al.*<sup>140</sup>, los autores proponen dos posibles mecanismos de resistencia a corticoides a nivel de la regulación del transcrito de GR. La identificación de un GRE negativo funcional en el exón 6 del gen NR3C1<sup>183</sup> sugiere un sistema auto-regulatorio que constitutivamente reprime la expresión de GR debido a la administración crónica de corticoides. Por otro lado, se ha observado que algunos micro-ARNs o miRs (miR-96, miR-101a, miR-142-3p y miR-433) pueden inhibir la expresión de GR hasta en un 40%<sup>141</sup>. Estos miRs se sobre-expresan mediante un sistema auto-regulado y mediado por la estimulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, de manera que un tratamiento continuado de corticoides podría desarrollar una insensibilidad concomitante. Además, estudios recientes han empezado a mostrar perfiles de expresión de miARNs asociados a

---

varias enfermedades respiratorias, por lo que estas moléculas pueden ser relevantes en la comprensión del fenómeno de resistencia a corticoides en dicho contexto.

### 2.3.3.2 Mutaciones del receptor de Glucocorticoides

La resistencia a corticoides en pacientes asmáticos se correlacionó a nivel familiar por estudios genéticos que identificaron un total de 15 mutaciones con cambio de sentido, 3 sin sentido, 3 por desplazamiento de marco de lectura, 1 en punto de splice y 17 polimorfismos<sup>132,184,185</sup>. Sin embargo, el análisis de células mononucleares de sangre periférica de pacientes asmáticos corticorresistentes no mostraron alteraciones en la estructura<sup>186</sup>, constante de disociación (Kd), densidad o expresión del GR $\alpha$ <sup>187,188</sup>. No obstante, Sher *et al.*<sup>189</sup> encontraron una reducción de Kd y la densidad de GR $\alpha$  en células T y mononucleares totales, respectivamente, de asmáticos resistentes a corticoides. Puesto que estas diferencias se detectaron únicamente en el núcleo, Ito *et al.*<sup>190</sup> propusieron como posible explicación una conformación anormal de la proteína nuclear que transporta el GR $\alpha$  activado, la cual bloquea el centro de unión a ligando.

### 2.3.3.3 Expresión de diferentes isoformas del receptor de glucocorticoides

Uno de los mecanismos de corticorresistencia más descritos en el contexto del asma y la RSC-PN está relacionado con el ratio entre las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de glucocorticoides. La expresión de GR $\beta$  es considerablemente menor que la de GR $\alpha$  en múltiples tipos celulares<sup>191</sup> y está inducida por citoquinas pro-inflamatorias<sup>192</sup> y súper-antígenos microbianos<sup>193</sup>. No obstante, la isoforma  $\beta$  se considerado un inhibidor dominante negativo<sup>194</sup> puesto que, aunque se une a los elementos de respuesta GRE, bloqueando competitivamente la unión del GR $\alpha$  activado al ADN, no es capaz de ejercer ningún efecto transcripcional<sup>144,156</sup>. Además, se ha observado que GR $\beta$  es capaz de unirse a la isoforma  $\alpha$ , formando un complejo inactivo. Así pues, en el contexto del Asma y la RSC-PN cobra relevancia la expresión de las isoformas del receptor de glucocorticoides, ya sea por el incremento de la isoforma  $\beta$ <sup>191,195</sup>, la disminución de la isoforma  $\alpha$ <sup>191</sup> o el desajuste del ratio entre ambas<sup>160</sup>. En la misma línea, Zhou *et al.*<sup>132</sup> expuso que la variabilidad en la respuesta a corticoides dependía

---

de los niveles de por lo menos 7 isoformas por splicing alternativo de GR, las cuales deberían relacionarse también con la insensibilidad a corticoides.

#### 2.3.3.4 Actividad defectiva del GR $\alpha$

Algunos residuos específicos del GR $\alpha$  pueden ser fosforilados por múltiples quinasas, alterando su capacidad de unión a ADN, su estabilidad y su translocación nuclear<sup>196</sup>. En el caso de las quinasas *p38 Mitogen Activated Map Kinase* (p38MAPK), *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK) y *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), se ha descrito su capacidad para fosforilar GR $\alpha$  en Asma y RSC-PN, inhibiendo su actividad<sup>197,198</sup>. Así, por ejemplo, los súper-antígenos microbianos como la enterotoxina B estafilocócica, activan la señalización de ERK provocando la fosforilación del residuo serina-226 del receptor de glucocorticoides  $\alpha$  e impidiendo su translocación al núcleo<sup>199</sup>. *Papi et al.*<sup>200</sup> demostraron como la infección por Rinovirus del epitelio respiratorio puede inducir resistencia a corticoides mediante la activación de la cascada de señalización de JNK. De hecho, consiguieron revertir la corticorresistencia inhibiendo dicha vía en células epiteliales respiratorias *in vitro*. Este mecanismo es especialmente relevante en el contexto de las enfermedades inflamatorias respiratorias, en las que el epitelio puede colonizarse por diversas bacterias y virus patógenos que contribuyen al proceso inflamatorio, por lo que correlacionarían con su severidad y menor sensibilidad a corticoides.

Otras modificaciones moleculares que pueden reducir la actividad del GR $\alpha$  y se han asociado a la resistencia a corticoides son la Ubiquitinación, Nitrosilación y Oxidación<sup>140</sup>. Por otro lado, algunos estudios han descrito la interferencia que ejercen factores de transcripción inflamatorios, como NF- $\kappa$ B y AP-1, en la activación del GR $\alpha$  por corticoides. De manera que la excesiva actividad de NF- $\kappa$ B y AP-1 es capaz de generar una peor respuesta al tratamiento con corticoides<sup>181,201,202</sup> junto a una menor capacidad de GR $\alpha$  para inhibir la propia actividad de AP-1<sup>203</sup>.

#### 2.3.3.5 Estrés oxidativo y acetilación anormal de Histonas

Se ha observado que el estrés oxidativo genera resistencia a corticoides mediante la activación de factores de transcripción, incrementando la acetilación de histonas y

activando la expresión de genes inflamatorios<sup>204-205</sup>. Más específicamente, el estrés oxidativo activa la Fosfatidilinositol 3-Quinasa  $\delta$  (PI3K $\delta$ ), la cual fosforila otras quinasas en cascada, como Akt, provocando la inactivación de las histonas deacetilasas (HDAC2) por fosforilación. Además, el estrés oxidativo y nitrativo genera peroxinitrito, el cual nitrata residuos de tirosina en las HDAC2, inhibiendo su actividad. Estas modificaciones en las histonas deacetilasas resultan en su ubiquitinación, marcándolas para su degradación por el proteasoma, lo que concuerda con su menor expresión en pacientes asmáticos severos y asmáticos fumadores<sup>172</sup>. Teniendo en cuenta que las HDAC2 se encargan de descondensar la cromatina para la interacción de factores de transcripción como el GR $\alpha$  activado, su defecto explicaría la resistencia a esteroides.

## 2.4 Corticoides y mucinas

Existen estudios *in vitro* que han descrito los efectos de los corticosteroides sobre la expresión de mucinas en el epitelio de las vías respiratorias. Estos estudios se centraron principalmente en las mucinas secretadas, aunque en los últimos años las mucinas de membrana están adquiriendo igual o mayor relevancia<sup>76</sup>. Se ha descrito que la dexametasona disminuye la expresión de MUC5AC en líneas de células epiteliales humanas y en las células epiteliales bronquiales primarias<sup>206-208</sup>. Por otra parte, se ha observado que la budesonida inhibe la inducción de las mucinas gelificantes del moco por mediadores inflamatorios en las células epiteliales respiratorias<sup>209-210</sup>.

Respecto a las mucinas de membrana, la dexametasona aumenta la expresión de MUC1 en líneas celulares cancerígenas<sup>211-212</sup>. Además, este corticoide provoca la sobre-expresión de MUC1 y MUC16 y reduce la de MUC4 en células epiteliales corneales humanas *in vitro*<sup>213</sup>. Pocos estudios han evaluado los efectos de los corticosteroides en la expresión de mucinas de membrana en los pólipos nasales y el asma, así como sus posibles interacciones moleculares. Por ejemplo, se ha observado un aumento en la expresión de MUC16, tanto en ARNm como en los niveles de proteínas, en las células epiteliales de pólipo nasal tratadas con dexametasona; pero sin efecto significativo en la expresión de MUC4<sup>76</sup>. Por otro lado, otro trabajo

---

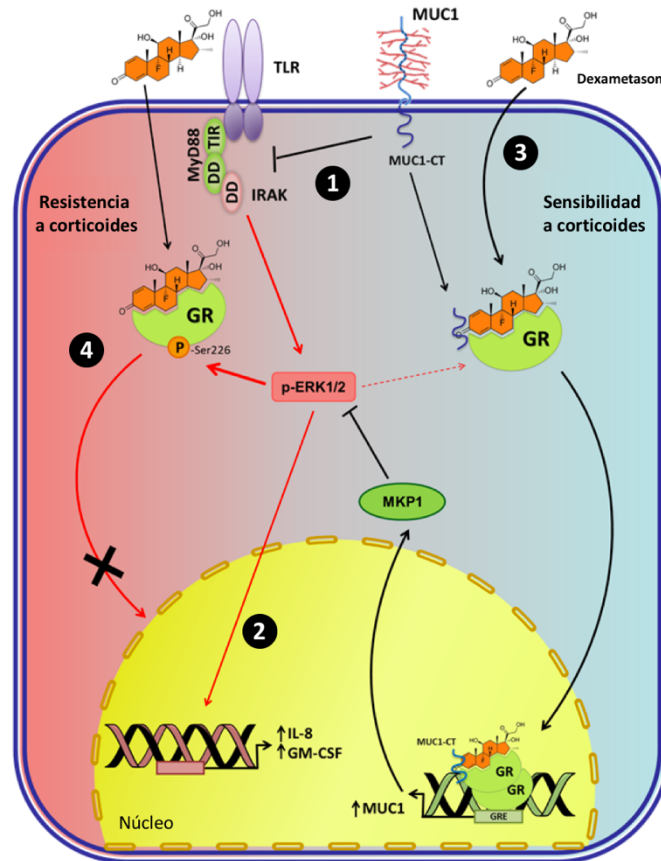
describió una mayor expresión de MUC4 en los pólipos nasales y el efecto inhibitorio de los corticosteroides sobre la expresión del ARNm de MUC4<sup>214</sup>.

Por otro lado, Martínez-Antón *et al*<sup>215</sup> con sus estudios *in vivo*, evaluaron los efectos de estos fármacos en pacientes con pólipos nasales después de un curso de dos semanas con corticosteroides orales. Se demostró que el tratamiento aumentaba la expresión de mucinas de membrana (MUC1 y MUC4) y disminuía la expresión de mucinas secretadas (MUC5AC y MUC5B) en pólipos nasales, evidenciando así un efecto regulador diferencial de los corticoides según el tipo de mucina. Estos resultados reforzaban la idea que sugiere que los corticoides podrían ser considerados una terapia beneficiosa contra la hipersecreción mucosa en esta enfermedad. En este sentido, señalaron que la regulación negativa de mucinas secretadas inducida por los corticoides, podría resultar en una disminución de la hipersecreción mucosa y, por el contrario, la regulación positiva de las mucinas de membrana se relacionaría con su participación en la reparación y remodelado del epitelio.

Como ya se comentó en el anterior capítulo, se ha demostrado que MUC1-CT puede interactuar con el receptor de estrógeno (ER) $\alpha$ , tras lo que se transloca al núcleo como un complejo de transcripción en respuesta a 17 $\beta$ -estradiol<sup>66</sup>. Resultados similares se observaron para un complejo de transcripción  $\beta$ -catenina-MUC1-CT como modulador de la morfogénesis<sup>67,68</sup>. Estas evidencias indican que MUC1-CT, al formar complejos de transcripción, podría tener un papel protector. En este contexto, el complejo MUC1-CT-ER $\alpha$  protege y estabiliza ER $\alpha$ , atenuando su ubiquitinación y degradación<sup>66</sup>. Fenómenos similares se propusieron para el complejo de transcripción  $\beta$ -catenina-MUC1-CT y un rol protector ante la degradación de  $\beta$ -Catenina<sup>67</sup>.

En base a la evidencia sobre MUC1, nuestro grupo realizó un estudio<sup>216</sup> sobre la implicación de MUC1 en la Rinosinusitis Crónica asociada a pólipos nasales resistente a corticoides. En este trabajo proporcionamos una primera evidencia de la unión constitutiva de MUC-CT y GR $\alpha$ , así como un rol protector frente a la fosforilación de GR-Ser226, que inhibe la translocación al núcleo de GR $\alpha$  (**Figura 2.5**). Además, la exposición a dexametasona promovía la translocación nuclear del complejo MUC1-CT-GR $\alpha$  para inducir sus efectos anti-inflamatorios. Estos

resultados se observaron *in vitro* y en pacientes con RSC-PN, sugiriendo que los corticoides no pudieron reducir la inflamación y la consecuente poliposis nasal por una deficiencia en la formación del complejo MUC1-CT-GR $\alpha$ .



**Figura 2.5 Implicación de MUC1 en la resistencia a corticosteroides.** 1, MUC1-CT tiene la capacidad de inhibir la señalización de TLR mediante el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88. Esto evita 2, la fosforilación y activación de ERK1/2, que mantiene la inflamación mediante la transcripción de diferentes genes pro-inflamatorios, como IL-8 y GM-CSF. 3, por otro lado, los corticoides como dexametasona aumentan la expresión de proteínas con efecto anti-inflamatorio como MKP1 y MUC1. 4, en el caso de pacientes de RSC-PN resistentes a corticoides, la menor expresión de MUC1 permite una mayor fosforilación del residuo Ser226 en GR $\alpha$ , inhibiendo su translocación nuclear y por tanto la efectividad anti-inflamatoria de los corticoides.



# **METODOLOGÍA**



## **CAPÍTULO 3**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



---

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 3.1 HIPÓTESIS

- En trabajos previos nuestras investigaciones se centraron en la hipótesis de que la mucina 1, que es un receptor con propiedades anti-inflamatorias<sup>54,59-63</sup>, podía participar en la señalización del Receptor de Glucocorticoides  $\alpha$  ( $GR\alpha$ )<sup>218</sup> y de este modo influir en la eficacia anti-inflamatoria de los corticoides.
- Nuestros resultados previos<sup>216</sup> demostraron como MUC1 modula la translocación nuclear de  $GR\alpha$ , y cómo su baja expresión podía explicar la corticorresistencia de células epiteliales respiratorias procedentes de pacientes con RSC-PN.
- Un estudio demostró que el uso de epitelio respiratorio nasal podría sustituir al de broncoscopias, puesto que el perfil de respuesta inflamatoria era muy similar<sup>219</sup>. En este sentido, las cohortes de pacientes empleadas en nuestros experimentos incluían asmáticos con y sin corticorresistencia.
- Todavía se desconoce la implicación de MUC1 en la respuesta a corticoides de otros componentes del asma, como las células inflamatorias y el endotelio.
- Al igual que MUC1, la mucina de membrana MUC4 también tiene una expresión alterada en el epitelio respiratorio inflamado<sup>53</sup>. Además los corticoides disminuyen su expresión *in vitro*<sup>76,213,214</sup>. Sin embargo, la asociación de los corticoides con la expresión de MUC4 y su posible interacción con  $GR\alpha$  son todavía desconocidas.
- El gen de MUC4 codifica una proteína transmembrana compuesta de dos subunidades,  $MUC4\alpha$  and  $MUC4\beta$ <sup>220</sup>.  $MUC4\beta$  es la subunidad transmembrana y contiene un fragmento C-terminal capaz de interactuar con otras proteínas<sup>48</sup>.

---

Así pues, nuestra hipótesis plantea que **MUC1 y MUC4 podrían modular la eficacia anti-inflamatoria de los corticoides en el contexto del Asma y la Poliposis Nasal, respectivamente.**

### 3.2 OBJETIVOS

Ante los supuestos planteados anteriormente, los objetivos de la presente tesis doctoral fueron analizar:

- La caracterización clínica y *ex vivo* de resistencia a corticoides en pacientes asmáticos.
- La expresión diferencial de MUC1 entre sujetos sensibles a corticoides y pacientes asmáticos corticorresistentes.
- Los efectos del silenciamiento de MUC1 en la eficacia anti-inflamatoria de la dexametasona sobre células inflamatorias *in vitro*.
- La implicación de MUC1 en la respuesta a corticoides *in vivo*, mediante un modelo murino MUC1-Knock Out de asma agudo tratado con dexametasona.
- La caracterización clínica y *ex vivo* de resistencia a corticoides en pacientes con Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales.
- La expresión diferencial de MUC4 entre los diferentes fenotipos de pacientes con RSC-PN.
- Los efectos de modular la expresión de MUC4 sobre la eficacia anti-inflamatoria de la dexametasona *in vitro*.
- Evidenciar la posible interacción molecular entre MUC4 y GR $\alpha$

## **CAPÍTULO 4**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Reactivos utilizados

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ácido acético glacial	Panreac	Ref. 361008
Ácido cítrico anhidro	Panreac	Ref. 141808
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	Ref. 131020
Ácido fosfomolibdico	VWR Prolabo	Ref. 20616184
Ácido tricloroacético (cloroformo)	Panreac	Ref. 151067
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Ref. A3574
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Applied Biosystems	Ref. AM9906
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Ref. A7906
Amonio persulfato	Sigma-Aldrich	Ref. A3678
Anfotericina B	Lonza Group LTD	Ref. 17-836E
ARN interferente control negativo	Ambion	Ref. AM4611
ARN interferente de MUC1	Ambion	Ref. 4392420
ARN interferente de MUC4	Ambion	Ref. s9073
Azul de anilina	VWR Prolabo	Ref. 21999183
Azul de tripano	Molecular Probes, Invitrogen	Ref. T10282
BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium	Lonza	Ref. CC-2540B
Carbonato de litio	Sigma-Aldrich	Ref. 100979413
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	Panreac	Ref. 141396
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac	Ref.141659
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	Ref. P8340
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific	Ref. 1856210
DMEM	Lonza	Ref. BE12-614F
Dexametasona	Sigma-Aldrich	Ref. D2915

Dextrano	Sigma-Aldrich	Ref. 9004-54-0
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	Ref. L3771
DPBS	Thermo Fisger Scientific	Ref. 17-513F
DPX	Panreac	Ref. 255254
ECL plus	Amersham GE Healthcare	Ref. RPN2132
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	Sigma	Ref. ED2SC
EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)	Sigma	Ref. E3889
EGM-MV <sup>TM</sup> Microvascular Endothelial Cell Growth Medium	Lonza	Ref. CC-3202
Eosina amarillenta	Panreac	Ref. 251299
Etanol absoluto	Panreac	Ref. 361086
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Life Science	Cat. 17-1440-02
Flagelina aislada de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	InvivoGen	Cat. tlrl-pafla
Formaldehido 3.7-4%	Panreac	Ref. 143091
Glicerol	Sigma-Aldrich	Ref. G5516
Glicógeno	Calbiochem	Ref. 361507
Hematoxilina de Ehrlich	Sigma-Aldrich	Ref. GHS322
HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico)	Sigma-Aldrich	Ref. H4034
Hidróxido de Aluminio Al(OH) <sub>3</sub>	Merck	Ref. 101091
Hidróxido sódico (NaOH)	Panreac	Ref. 131687
Isoflurano	Baxter SL.	ARREANE
Isopropranol	Sigma	Ref. I9516
Ketamina	(Imalgene <sup>®</sup> ) Merial	904886
Kit "Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System"	GE Healthcare	Ref. RPN225
Kit "Taq Man para la transcripción reversa"	Applied Biosystems	Ref. N8080234
Kit BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific	Ref. 23225
Kit de tinción panóptica	Panreac	Ref. 254807.0922
Lipofectamina 2000	Thermo Fisher Scientific	Cat. 11668027
Lipopolisacárido de <i>Salmonella enterica</i> minnesota mutante R595	InvivoGen	Cat. tlrl-smlps
Marcador de peso molecular Amersham High-Range Rainbow	GE Healthcare	Ref. RPN756E

<b>Medetomidina</b>	(Domtor®) Esteve	Cat. 135089-1
<b>Medio de montaje rápido para microscopía óptica</b>	FLUOPREP Biomerieux	Cat. 75521
<b>Metanol</b>	Sharlab	Ref. ME03262500
<b>Methocel</b>	Colorcon	ID 34538P
<b>Nonidet P 40</b>	Sigma	Ref. 74385
<b>Opti-MEM</b>	Thermo Scientific	Cat. 11058021
<b>Ovoalbúmina</b>	Sigma	Ref. A5503
<b>Parafina</b>	Sigma-Aldrich	Ref.P3683
<b>Paraformaldehído 4%</b>	Panreac	Ref.252931
<b>Peptidoglicano aislado de <i>Escherichia coli 111:B4</i></b>	InvivoGen	Cat. t1rl-pgneb
<b>Percoll</b>	GE Healthcare Life Science	Cat. 17-0891-01
<b>Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)</b>	Sigma	Ref. P7626
<b>Polietilenglicol 400</b>	Panreac	Ref. 162436
<b>Ponceau de silidina</b>	Merk	Ref. 1159270025
<b>Recombinant Human CXCL12</b>	R&D Systems	Ref. 350-NS
<b>Recombinant Mouse CXCL12</b>	R&D Systems	Ref. 460-SD
<b>RPMI</b>	Lonza	Ref. BE12-167F
<b>Tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos</b>	Applied Biosystems	Ref. 4305895
<b>Tampón salino fosfato (PBS)</b>	Sigma-Aldrich	Ref. P4417
<b>TaqMan® Gene Expression Master Mix</b>	Applied Biosystems	Ref. 4369016
<b>Tetramethylethylenediamine para electroforesis (TEMED)</b>	Sigma-Aldrich	Ref. T9281
<b>TrypLE Express Enzyme</b>	Thermo Fisher Scientific	Ref. 11528856
<b>Triton X-100</b>	Panreac	Ref. 142314
<b>Trizol</b>	Roche Diagnostics	Ref. 1667157001
<b>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math> human</b>	Sigma	Ref. T0157
<b>Tween20</b>	Sigma-Aldrich	Ref. P1379
<b>Xileno</b>	Merck	Ref. 481769
<b><math>\beta</math>-Mercaptoetanol</b>	Sigma-Aldrich	Ref. M6250

## 4.1.2 Pacientes

### 4.1.2.1 Asma

Para el presente estudio se reclutaron 27 pacientes con Asma de la unidad de Neumología del Hospital La Fe de Valencia a lo largo del año 2016. El estudio fue aprobado por el comité ético de investigación con medicamentos (CEIm) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (**Anexo 1**) y todos los sujetos proporcionaron su consentimiento informado.

El criterio de clasificación de los pacientes fue la reversibilidad de la limitación al flujo aéreo, medida mediante la prueba de broncodilatación, tras 2 semanas de tratamiento con glucocorticoides inhalados (1.500-2.000 mg/día de fluticasona o equivalente) o sistémicos (40 mg/día de prednisona o equivalente).

La prueba de broncodilatación consiste en la comparación de la espirometría forzada basal con una segunda espirometría forzada que se realiza a los 15-20 minutos de haber administrado un broncodilatador. La espirometría forzada emplea un espirómetro que grafica la velocidad del flujo de aire en función del volumen pulmonar. De este modo se obtiene el valor de Volumen Espiratorio Forzado (VEF1), que es la cantidad de aire expulsado durante el primer segundo de la espiración máxima, realizada tras una inspiración máxima.

Así pues, para la prueba de broncodilatación se realizó una espirometría basal a los pacientes y seguidamente se les administraron 4 inhalaciones sucesivas de 100 µg de salbutamol, o su equivalente de terbutalina, mediante un inhalador presurizado con cámara espaciadora. Tras 15 minutos se repitió la espirometría<sup>77</sup>.

Se consideraron asmáticos respondedores a corticoides cuando la reversibilidad fue positiva (o broncodilatación significativa) con un aumento del FEV<sub>1</sub> posterior a la broncodilatación ( $FEV_1 postBd \geq 12\%$  y  $\geq 200\text{ ml}$  respecto al valor previo o basal ( $FEV_1 preBD$ ), calculados según las siguientes fórmulas<sup>77</sup>:

$$\frac{FEV_1 postBd - FEV_1 preBd}{FEV_1 preBd} \times 100 \geq 12\%$$

$$FEV_1 postBd - FEV_1 preBd \geq 200\text{ ml}$$

Por tanto, se consideraron como asmáticos corticorresistente a los pacientes que tras 2 semanas de tratamiento con glucocorticoides no tuvieron reversibilidad positiva con un aumento del FEV<sub>1</sub> < 12 % y < 200 ml respecto al valor basal.

A todos los pacientes se les extrajo sangre periférica por punción venosa empleando 2 tubos Vacutainer™ de 10 ml con EDTA (tapón violeta) para el aislamiento de células inflamatorias y su posterior análisis.

#### 4.1.2.2 Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales

Este trabajo analizó datos procedentes de 81 pacientes con Rinosinusitis Crónica con Pólipos Nasales (RSC-PN) de la unidad de Rinología del Hospital General Universitario de Valencia durante un período de 4 años (2010-2014). El estudio fue aprobado por el comité ético local (**Anexo 1**) y todos los sujetos proporcionaron su consentimiento informado. Los sujetos RSC-PN sin evidencias clínicas y endoscópicas de respuesta a corticosteroides durante 3 meses fueron reclutados. En el presente estudio los Pólipos Nasales (PN) se clasificaron basándose en observaciones endoscópicas bilaterales del meato medio y/o con su detección por tomografía computerizada (CT), en base a la guía *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012*<sup>108</sup> (**Tabla 4.2**).

Puntuación	Observaciones endoscópicas
0	Sin pólipos.
1	Pequeños pólipos en el meato medio que no alcanzan el borde inferior del cornete medio.
2	Pólipos que alcanzan el borde inferior del cornete medio.
3	Pólipos grandes que alcanzan el borde inferior del cornete inferior o pólipos mediales al cornete medio.
4	Pólipos grandes que causan una congestión u obstrucción completa del meato inferior.

---

**Tabla 4.2 Sistema de puntuación de pólipos nasales.** La puntuación se asigna en función de las características observadas mediante endoscopia. Datos extraídos de la referencia<sup>123</sup>.

Todos los pacientes mostraron grandes pólipos (puntuación de 2 a 4 en ambos costados). El estado de atopia se evaluó mediante el test del pinchazo en la piel o mediante ensayos para Inmunoglobulinas E específicas contra los alérgenos inhalables más comunes. El diagnóstico de la intolerancia a Aspirina se confirmó mediante las medias de provocación nasal por lisina-aspirina, descrito previamente<sup>221</sup>. El diagnóstico de Asma fue determinado por un Neumólogo. Todos los sujetos estaban libres de infecciones del tracto respiratorio superior durante las 4 semanas previas al tratamiento con corticosteroides orales. Ninguno de los sujetos empleó otra medicación durante el mismo período.

En el momento del reclutamiento los pacientes iniciaron la terapia con corticosteroide oral (Deflazacort) a 1 mg/kg/día durante 8 días seguido de 0.5 mg/kg/día durante otros 7 días. La resistencia a corticosteroides fue evaluada a día 15 después del tratamiento. Los pacientes que no presentaron una reducción de los pólipos nasales mayor a una puntuación de endoscopia después del tratamiento de corticosteroide oral fueron considerados resistentes y clasificados como grupo PN corticorresistente (PN-CR).

A fin de obtener muestras de tejido, se realizaron biopsias o resecciones quirúrgicas de los Pólipos Nasales antes y después del tratamiento con corticosteroide oral. Los fragmentos obtenidos se fragmentaron para aislar células epiteliales nasales y analizar la expresión de ARNm y proteínas, así como su distribución en el epitelio mediante inmunohistoquímica/inmunofluorescencia.

#### **4.1.3 Animales de experimentación**

Todos los procedimientos realizados con animales de experimentación fueron previamente evaluados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de València, que aprobó la realización del procedimiento animal con título “Determinación de la implicación de MUC1 en la respuesta a Dexametasona en un modelo de Asma agudo en ratón” y código 2017/VSC/PEA/00064 (**Anexo 2**).

---

Se emplearon ratones machos C57BL/6 Wild Type (Harlan®) y C57BL/6 MUC1 Knock Out de 12 semanas de edad y de un peso aproximado de entre 15-22 g. La cepa C57BL/6-MUC1-KO fue desinteresadamente cedida por el grupo de la Dra. Sandra J. Gendler de la Clínica Mayo (Minnesota, EEUU), que generó esta línea MUC1 (-/-) mediante la técnica de recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón, como se describe en Andrew P. Spicer *et al*<sup>222</sup>.

Los animales permanecieron siete días en cuarentena previamente al inicio del experimento (periodo de aclimatación). Además, fueron estabulados a lo largo de todo el estudio con comida (dieta Harlan® Ref. 2014) y agua *ad libitum*. Se repartieron de forma aleatoria en jaulas y éstas a su vez en grupos experimentales distintos. Para realizar un seguimiento individualizado de cada ratón, se identificó al animal mediante crotales insertados en la oreja numerados consecutivamente. Las condiciones estándar del animalario fueron:

- Humedad relativa  $55 \pm 10\%$ .
- Temperatura  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Renovación del aire a 15 ciclos por hora.
- Ciclo luz/oscuridad 12/12 horas.

---

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Cultivos celulares

#### 4.2.1.1 Aislamiento de neutrófilos humanos de sangre periférica.

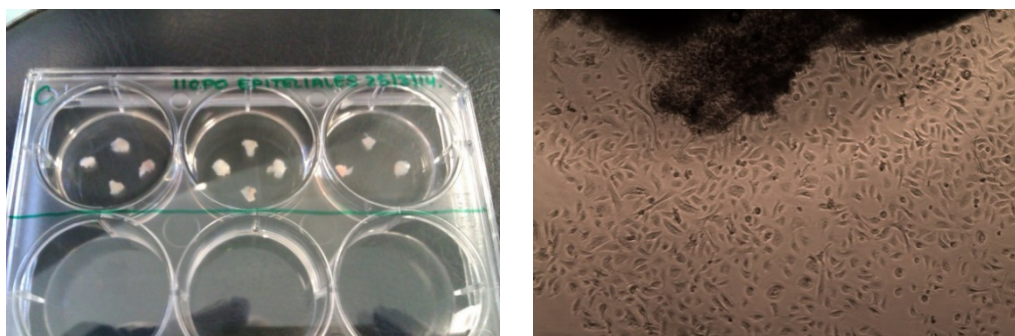
La sangre periférica de los sujetos en estudio se obtuvo por punción venosa y empleando 2 tubos Vacutainer™ de 10 ml con EDTA (tapón violeta). Para el aislamiento de neutrófilos, el volumen total de sangre se mezcló con Dextrano 500 al 3% en la proporción 2:1 y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos. El dextrano sedimenta los eritrocitos, generando una fase superior de plasma rico en leucocitos. Entonces la fase superior se aisló y pipeteó sobre un volumen equivalente de Ficoll-Paque y se centrifugó a 150 x g, 4°C, durante 30 minutos. Se desechó el sobrenadante por decantación quedando el sedimento que contiene los neutrófilos. Los neutrófilos fueron lavados con 5 ml de PBS y centrifugados a 150 x g, 4°C, durante 5 minutos. Se desechó de nuevo el sobrenadante por decantación y se resuspendió el sedimento con 5 ml de solución de lisis celular. Se dejó reposar en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se desechó el sobrenadante y se resuspendieron los neutrófilos ya purificados en medio de cultivo DMEM.

#### 4.2.1.2 Aislamiento y cultivo de células primarias epiteliales de Pólipos Nasales.

Los fragmentos de Pólipo Nasal (~5x5 mm) se lavaron con suero fisiológico estéril y se incubaron en placas de cultivo previamente colagenizadas (10 µg/cm<sup>2</sup> de colágeno tipo I de rata, Sigma) con medio de crecimiento para epitelio bronquial (BEGM, compuesto de medio basal para epitelio bronquial (BEBM) suplementado con extracto de pituitaria bovina 52 µg/mL, hidrocortisona 0.5 µg/mL, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF) 25 ng/mL, epinefrina 0.5 µg/mL, transferrina 10µg/mL, insulina 5 µg/mL, ácido retinoico 50 nM, triiodo-L-tironina 6.5 ng/mL, Gentamicina 40 µg/mL, Amfotericina B 50 ng/mL y albúmina sérica bovina 1.5 µg/mL.



Los NP se orientaron de manera que la capa epitelial estuviera en contacto con la placa de cultivo. Los cultivos se guardaron en un incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Después de un período aproximado de 1-2 semanas pudieron observarse células epiteliales en torno a los fragmentos de pólipo (**Figura 4.1**) y se aislaron para experimentos *in vitro*.



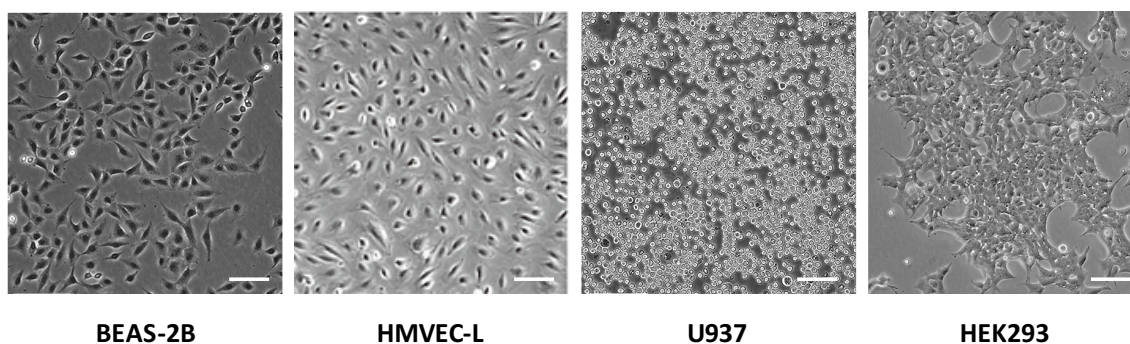
**Figura 4.1** Aislamiento y cultivo de células epiteliales de Pólipos Nasales. En la fotografía de la izquierda se observan fragmentos de pólipo nasal adheridos a la superficie colagenizada de tres pocillos de cultivo celular. La fotografía de la derecha corresponde a un aumento 40x de la superficie circundante a un fragmento de pólipo tras 1 semana de cultivo, dónde se observan células epiteliales que han crecido en monocapa a partir del explante (parte superior de la fotografía).

La identificación de la monocapa celular como células epiteliales nasales se realizó mediante criterios morfológicos y la expresión de citoqueratina 18 (KRT18) por inmunofluorescencia, así mismo dichas células se diferenciaron *in vitro* mediante una interfase aire-líquido en un epitelio pseudoestratificado de Pólipo Nasal con células basales, ciliadas, columnares y globulares, como se ha descrito previamente<sup>223</sup>. La viabilidad celular se determinó por análisis de exclusión con Azul de Tripano mediante el contador celular automático Countness® (life technologies). La viabilidad celular fue >98% en todos los cultivos celulares empleados en este trabajo.

#### 4.2.1.3 Cultivo de líneas celulares inmortalizadas.

Para el presente trabajo se emplearon diferentes líneas celulares inmortalizadas de origen comercial (**Figura 4.2**):

- **Línea celular primaria e inmortalizada de epitelio bronquial humano (BEAS-2B).** Fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC® CRL-9609™) y cultivada en placa colagenizada (10 µg/cm<sup>2</sup> de colágeno tipo I de rata, Sigma) con medio BEGM™ a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.
- **Línea celular endotelial de microvasos pulmonares (HMVEC-L).** Fue suministrada por Clonetics®-Lonza y cultivada en placa con medio de crecimiento endotelial Clonetics® EGM®-2-MV, a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.
- **Línea celular monocítica U937.** Fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1593.2™) y cultivada en suspensión sobre placa con medio RPMI 10% FBS, a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. El medio fue reemplazado mediante centrifugación cada 48 horas.
- **Línea celular de epitelio renal embrionario 293 (HEK293).** La línea celular HEK293 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1573™) y cultivada en placa con *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con 10% FBS, G418 0.4 mg/ml (Geneticina®, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y puromicina 0.8 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado.

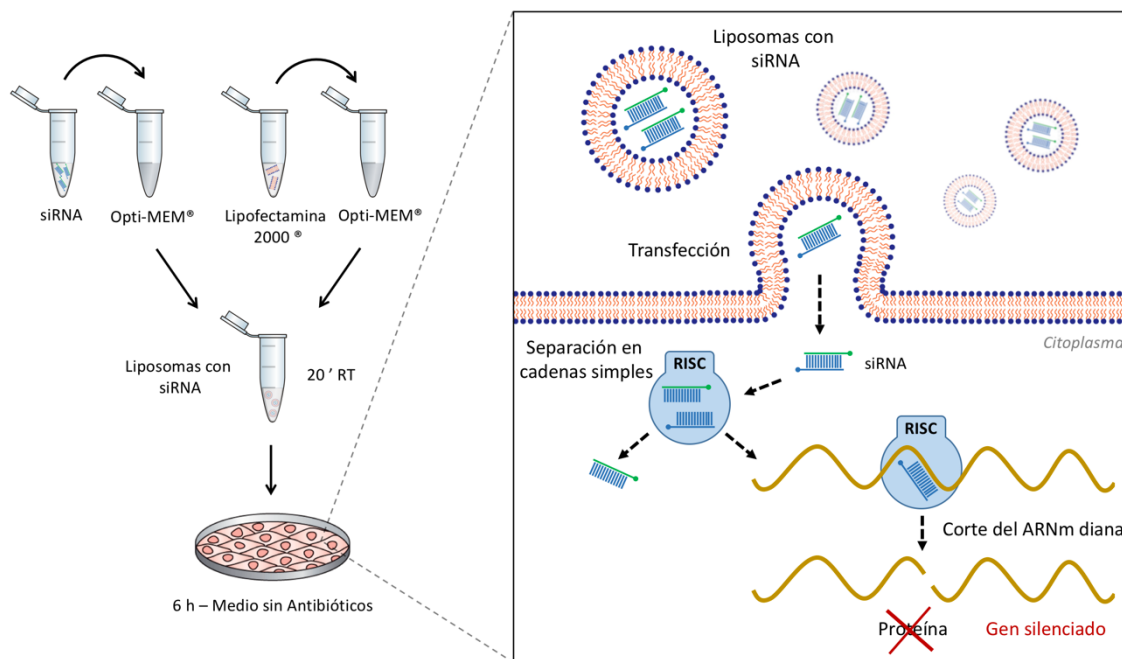


**Figura 4.2 Morfología de las líneas celulares inmortalizadas.** Las fotografías muestran cultivos en monocapa con alta confluencia. La barra de escala corresponde a 100 µm.

#### 4.2.1.4 Silenciamiento génico mediante ARN interferente

El small interfering RNA (siRNA) o ARN de interferencia es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, de modo que pequeñas moléculas de ARN complementarias a un ARNm conducen a la degradación de éste, impidiendo su traducción en proteínas (**Figura 4.3**).

Para transfectar los siRNA al interior celular es necesario cargarlos dentro de liposomas capaces de fusionarse con la membrana celular. Así pues, se prepararon dos soluciones por separado: una solución que contenía el siRNA diluido en medio Opti-MEM® (las proporciones se pueden consultar en la **Tabla 4.3**); y una solución de Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) diluida en medio Opti-MEM® e incubada 5 minutos a temperatura ambiente. Ambas soluciones se mezclaron suavemente y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió sobre las células a una confluencia del 90% y en medio libre de antibióticos, puesto que estos pueden interferir en la transfección. Se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado durante 6 horas (**Figura 4.3**). Pasado este tiempo se renovó el medio de cultivo y se incubaron 24 horas hasta el inicio del procedimiento experimental.



**Figura 4.3 Silenciamiento génico mediante ARN interferente.** En el lado izquierdo se ilustra el protocolo para generar liposomas con siRNA mediante Lipofectamina 2000®. Cuando

se cultivan las células en presencia de estos liposomas (cuadro derecho) sus cubiertas lipídicas se fusionan con la membrana celular e introducen su contenido al citoplasma. Entonces el complejo RISC (RNA-induced silencing complex) provoca el desapareamiento de las dos hebras del siRNA y utiliza la hebra antisentido como guía para seleccionar el ARNm complementario de la hebra de siRNA presente en el complejo. Finalmente, RISC promueve el corte y posterior destrucción del ARNm diana, provocando la supresión de la expresión del gen.

En este trabajo se realizó silenciamiento génico para el gen de MUC1 (nº Ref. 4392420), MUC4 (nº Ref. s9073) y con un ARN control negativo o siRNA(-) (nº Ref. AM4611); todos ellos fueron obtenidos de Ambion® (Huntingdon, Cambridge, UK).

En la siguiente tabla se concretan las proporciones de los compuestos descritos en el protocolo de silenciamiento, optimizadas según el tipo celular empleado. Los volúmenes se escalaron en función de la superficie de cultivo y el número de experimentos.

Línea celular	Área de cultivo	Células sembradas	Medio de cultivo	siRNA en Opti-MEM®	Lipofectamina 2000® en Opti-MEM®
BEAS-2B	5 cm <sup>2</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>	BMEM (2 ml)	5 nmol / 200 µl	14 µl / 200 µl
HMVEC-L	5 cm <sup>2</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>	EGM2-MV (2ml)	500 pmol / 50 µl	5 µl / 250 µl
U937	5 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	RPMI (2 ml)	10 nmol / 200 µl	12.8 µl / 200 µl

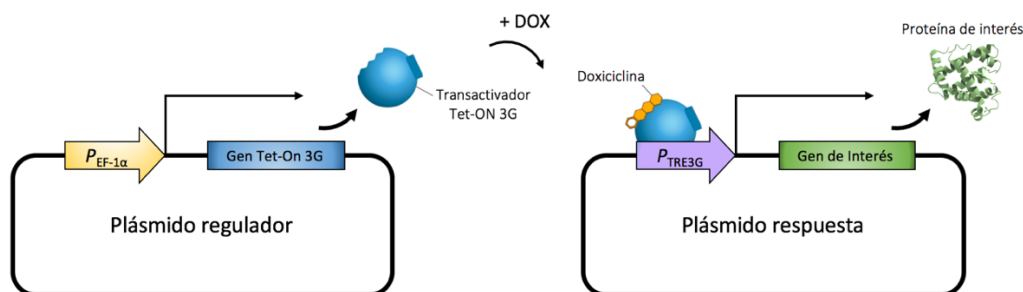
**Tabla 4.3 Indicaciones del protocolo de silenciamiento según línea celular.**

#### 4.2.1.5 Transformación de células HEK293 para la expresión inducible de MUC4 (HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4)

Con el fin de sobre-exresar la proteína MUC4 de una manera controlada y cuantificable se generó una línea estable de HEK293 que contenía un sistema de expresión génica inducible por Doxiciclina, basándose en el trabajo previo de Komatsu *et al*<sup>224</sup>. Este sistema se denomina Tet-On® 3G Inducible Expression System y está comercializado por Clontech® Laboratories Inc. (cat. nº PT5148-1 010814).

El sistema consiste en un plásmido regulador y otro de respuesta. El plásmido regulador expresa de manera constitutiva la proteína transactivadora Tet-ON 3G,

que sólo es activa en presencia de una tetraciclina. Cuando se activa se une a su promotor TRE3G presente en el plásmido de respuesta e induce la transcripción del transgen insertado en dirección 3' (**Figura 4.4**).



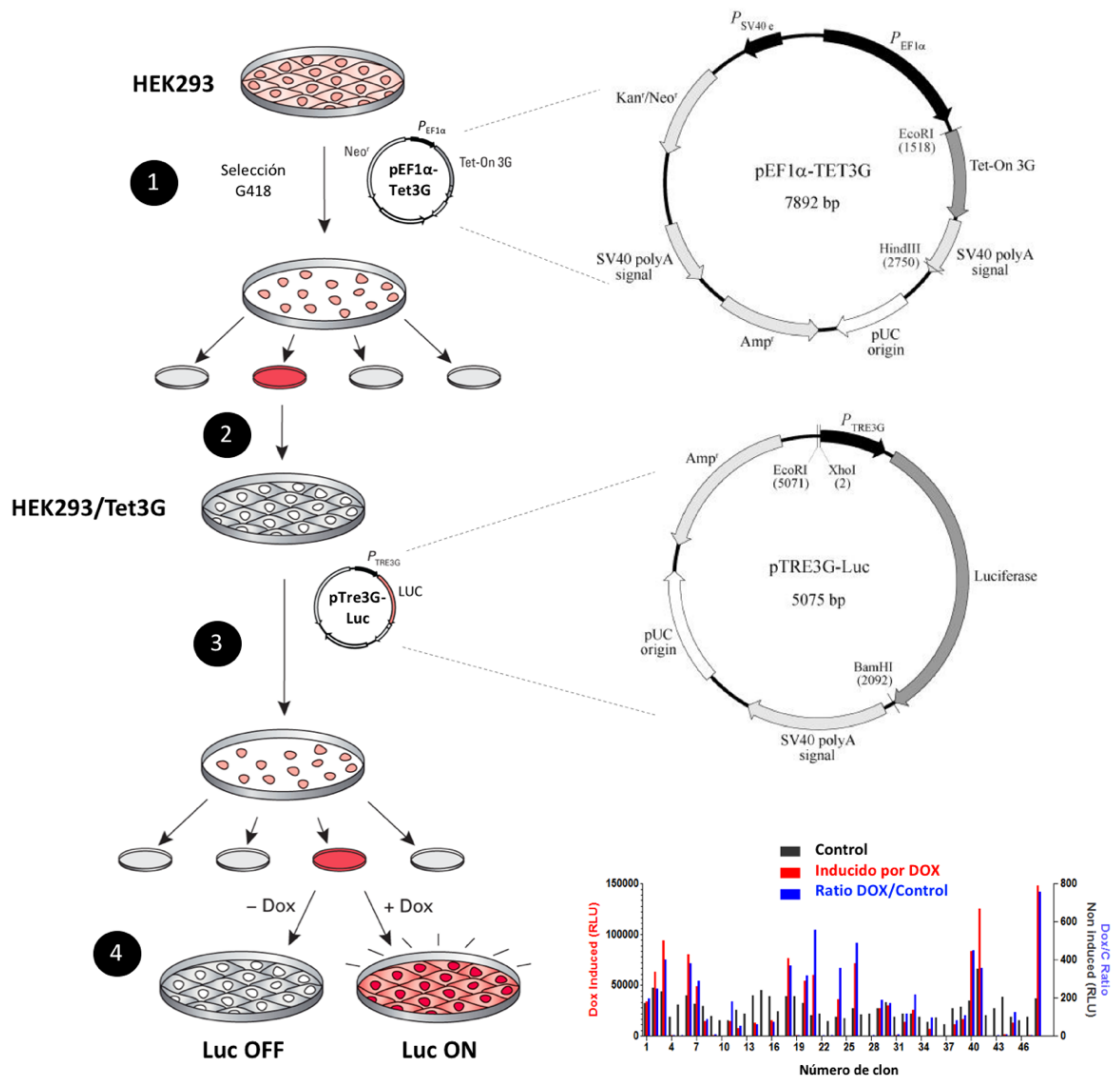
**Figura 4.4 Tet-On® 3G Inducible Expression System.** El plásmido regulador contiene un promotor que induce la expresión constitutiva de la proteína transactivadora Tet-On 3G, pero esta es incapaz de unirse al promotor TRE3G del plásmido respuesta en ausencia de doxiciclina (DOX). Cuando se une a doxiciclina (aportada en el medio de cultivo), el transactivador sufre un cambio conformacional que le permite unirse al promotor TRE3G y activar la transcripción del gen de interés.

Así pues, el primer paso para la transformación de las células HEK293 consistió en transfectar el plásmido regulador en varias colonias celulares y detectar las que tuvieran una inducción estable mediante un sistema reportero (**Figura 4.5**). En nuestro caso el plásmido regulador es el pEF-1 $\alpha$ -Tet3G, que contiene un promotor EF1-alfa derivado del gen humano EEF1A1 que expresa la subunidad alfa del factor de elongación eucariótico 1. Para transfectar este plásmido se prepararon dos soluciones por separado; una solución que contenía 2.4  $\mu$ g del plásmido pEF-1 $\alpha$ -Tet3G diluidos en 125  $\mu$ l de medio Opti-MEM®. Y una solución con 5  $\mu$ l de Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) diluida en 125  $\mu$ l de medio Opti-MEM® e incubada 5 minutos a temperatura ambiente. Ambas soluciones se mezclaron suavemente y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió en un pocillo de placa de seis con células HEK293 a una confluencia del 90% y 2 ml de medio DMEM + 10% FBS; se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado durante 40 horas.

---

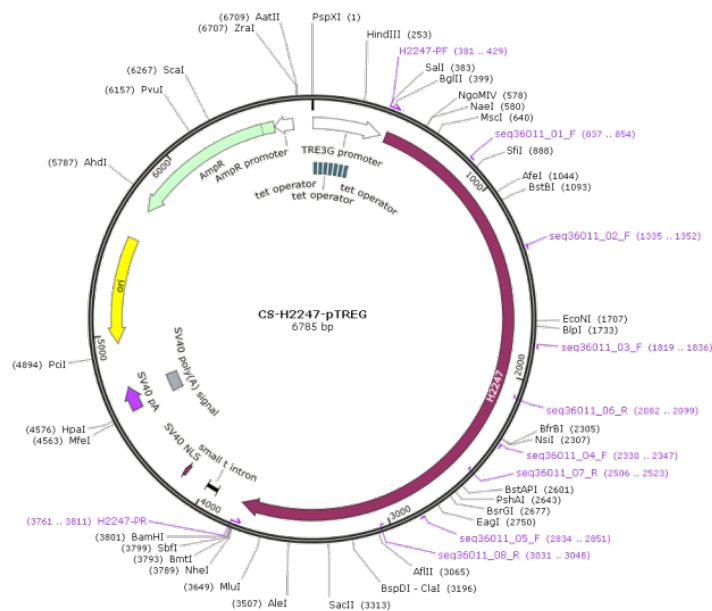
Tras este periodo, las células fueron tripsinizadas y diluidas de forma seriada para cultivar en placas de 10 cm con medio selectivo durante 2 semanas. Este medio consistió en DMEM 10% FBS y 0.4 mg/ml de G418 (Geneticina®, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), un análogo de la Neomicina sulfato, que interfiere con la subunidad 80S de los ribosomas inhibiendo la síntesis proteica en células eucariotas. Puesto que el plásmido pEF-1 $\alpha$ -Tet3G contiene el gen de resistencia a Neomicina (Neo<sup>r</sup>) aquellas colonias celulares que proliferaron habían sido correctamente transfectadas. De estas colonias se seleccionaron 80 clones con un cilindro de clonaje. Cada clon se repartió en tres siembras en placas de 96 pocillos; una siembra se mantuvo en cultivo, mientras que las otras dos se transfectaron con el plásmido reportero pTRE3G-Luc. Este sistema reportero contiene el promotor pTRE3G, inducible por la proteína Tet-On 3G, seguido del gen de la Luciferasa en 3' (Figura). 24 horas tras la transfección, una siembra se incubó con 1  $\mu$ g/ml de doxiciclina (inducida) y la otra sin (no inducida) durante otras 24 horas. Entonces se midió la emisión fluorescente de la Luciferasa mediante el kit Genecopoeia Firefly Luciferase (Luc-Pair<sup>TM</sup> Firefly Luciferase HS Assay Kit, cat. nºLF007, Genecopoeia, Inc.). El clon que mostró la mayor actividad Luciferasa inducida por doxiciclina se seleccionó como línea celular HEK293/Tet3G.





**Figura 4.5 Generación y comprobación de la línea HEK293/Tet3G.** 1, las células HEK293 se transfectan con el plásmido regulador pEF1α-Tet3G y se cultivan con G418. El plásmido contiene un gen de resistencia a Neomicina (Neo<sup>r</sup>) y el promotor pEF1α que transcribe de manera constitutiva el gen Tet-On 3G. 2, los clones resistentes a G418 se seleccionan y expanden como línea HEK293-Tet3G. 3, las células HEK293-Tet3G se transfectan con un sistema reportero pTRE3G-Luc que induce la expresión de Luciferasa por el promotor Tre3G. 4, se comprueba la capacidad inductora del sistema Tet-On 3G; en presencia de doxiciclina se induce la expresión de Luciferasa, cuya actividad genera fluorescencia medible mediante un kit comercial. En la gráfica se observan las fluorescencias emitidas por cada clon en presencia y ausencia de doxiciclina, de manera que el mayor ratio de fluorescencia entre ambas condiciones corresponde al clon con una mayor efectividad del sistema de inducción Tet-On 3G.

Seguidamente se volvió a la siembra restante (sin pTRE3G-Luc) del clon HEK293/Tet3G seleccionado y se expandió. Después se co-transfectaron, con el mismo método descrito previamente, 2.4  $\mu\text{g}$  de el plásmido CS-H2247-pTRE3G y 0.12  $\mu\text{g}$  de un marcador lineal SV40 de Puromicina. El plásmido CS-H2247-pTRE3G (**Figura 4.6**) contiene el promotor pTRE3G y la secuencia del transcrito de MUC4 (H2247, **Anexo 5**) en 3'. Por otro lado, el marcador SV40-Pur<sup>r</sup> confería resistencia a Puromicina. 40 horas después de la transfección, las células se aislaron y diluyeron de forma seriada para sembrar a poca confluencia en placas de 10 cm; el medio de cultivo se complementó con 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de G418 y 0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de puromicina. Tras 2 semanas se seleccionaron 20 clones de entre todas las colonias resistentes.



**Figura 4.6** Mapa genético del plásmido CS-H2247-pTRE3G. El plásmido CS-H2247-pTRE3G contiene el promotor pTRE3G y la secuencia del transcrito de MUC4 (H2247) en 3'. Se indican además sitios de restricción y posiciones de la secuencia de H2247 (en lila), cuya secuencia completa se puede consultar en el **Anexo 5**.

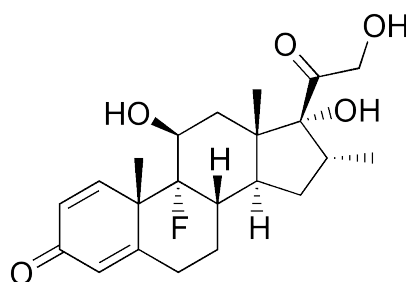
Cada clon se dividió en tres siembras, una para mantener el cultivo como línea celular HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 y las otra dos para testar la actividad Tet-On 3G; para ello se incubaron con o sin doxiciclina 1  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y se extrajo el ARN para medir la expresión del transcrito de MUC4 por RT-PCR. La doxiciclina en las concentraciones empleadas para este trabajo no produjo cambios en la viabilidad celular como se pudo observar mediante marcaje con Azul de Tripano.



#### 4.2.1.6 Estimulación *in vitro*

Todos los estudios *in vitro* tuvieron por objetivo determinar la efectividad antiinflamatoria de los corticoides sobre estímulos inflamatorios. A continuación, se describen las características biológicas y técnicas de los compuestos empleados *in vitro*:

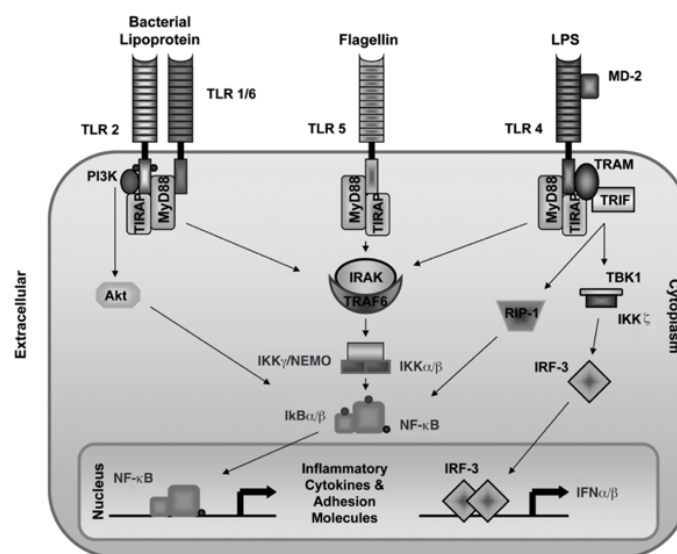
- **Dexametasona:** ((11 $\beta$ ,16 $\alpha$ )-9-Fluoro-11,17,21-trihydroxy-16-methylpregna-1,4-diene-3,20-dione, C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>, **Figura 4.7**) es un potente glucocorticoide sintético con acciones que se asemejan a las de las hormonas esteroideas. Su potencia es de unas 20-30 veces la de la hidrocortisona y 4-5 veces mayor que la prednisona. Actúa como antiinflamatorio e inmunosupresor, por lo que se emplea para tratar patologías de origen inflamatorio y enfermedades autoinmunes. En este trabajo se utilizó el compuesto en polvo comercializado por Sigma-Aldrich (nº Ref. D4902) y se reconstituyó con agua para preparaciones inyectables B. Braun. Las concentraciones de dexametasona testadas fueron desde 0.1 nM a 1  $\mu$ M.



**Figura 4.7 Estructura química de la Dexametasona.**

- **Lipopolisacárido (LPS):** es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que activa la inmunidad innata. Está compuesto por una parte lipídica y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos. Es reconocido por el TLR4, cuya unión provoca la señalización por MyD88 desencadenando la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (**Figura 4.8**). En este trabajo se empleó la forma ultrapura de *Salmonella enterica* minnesota mutante R595, de InvivoGen, a una concentración de 1  $\mu$ g/ml.

- **Flagelina (Flag):** es la principal proteína estructural que compone el flagelo de las bacterias Gram negativas. Es detectada por el TLR5, provocando la activación de NF- $\kappa$ B mediada por MyD88 y la producción de de citoquinas pro-inflamatorias (**Figura 4.8**). En este trabajo se utilizó flagelina aislada de *Pseudomonas aeruginosa*, comercializada por InvivoGen, a una concentración de 1  $\mu$ g/ml.
- **Peptidoglicano (PGN):** es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram positivas que activa la inmunidad innata. Estimula la respuesta inmune a través del TLR2. provocando la activación de NF- $\kappa$ B mediada por MyD88 y la producción de de citoquinas pro-inflamatorias (**Figura 4.8**). Se utilizó PGN procedente de la cepa 0111:B4 de *Escherichia coli*, comercializada por InvivoGen, a una concentración de 10  $\mu$ g/ml.



**Figura 4.8 Activación de la señalización de TLRs por ligandos bacterianos.** Cuando se activan los TLR2, 4 y 5, se recluta la proteína MyD88 a sus dominios intracelulares TLR/TIR para activar cascadas de señalización e inducir la translocación nuclear de NF $\kappa$ B. Una vez en el núcleo, NF $\kappa$ B regula la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión. Figura extraída de referencia<sup>36</sup>.

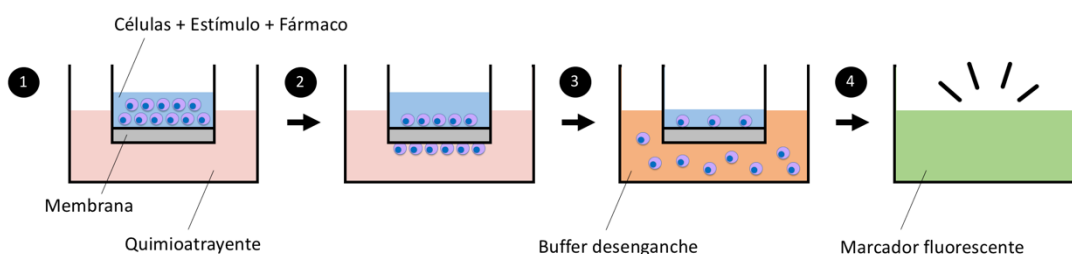
- **CXCL12/SDF-1:** esta quimiocina se une al receptor CXCR4 y media la movilización de células inflamatorias hacia tejidos periféricos cuando se produce un daño o estrés. En este trabajo se empleó como quimioatrayente en los experimentos de migración quimiotáctica con monocitos humanos U937 y neutrófilos de ratón, así que se utilizaron formas recombinantes humana (Recombinant Human CXCL12, Ref. 350-NS, R&D Systems) y murina (Recombinant Mouse CXCL12 460-SD, R&D Systems). La concentración en los experimentos fue de 20 nM.
- **Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ):** es una quimiocina que produce la activación local del endotelio vascular, vasodilatación y aumento de la permeabilidad, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias en los tejidos inflamados. Se empleó para estimular las monocapas de células endoteliales HMVEC-L en los experimentos de adhesión celular. Se utilizó la proteína recombinante Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  human, nº Ref. T0157, de Sigma, a una concentración de 2.5 ng/ml.

En todos los experimentos con estímulos inflamatorios se realizó una incubación previa con concentraciones de dexametasona entre 0.1 nM – 1  $\mu$ M, durante 30, 60 o 120 minutos, según el tiempo del estímulo.

#### 4.2.1.7 Ensayo de migración quimiotáctica

Para cuantificar el efecto anti-inflamatorio de la Dexametasona sobre la migración quimiotáctica empleamos el kit comercial CytoSelect™ 96-Well Cell Migration Assay (Cell Biolabs, San Diego, CA). Este kit consistía en una placa superior con 96 pocillos cuya base era una membrana de policarbonato (**Figura 4.9**) con poros de diámetro determinado, en el caso de monocitos humanos U937 se empleó un diámetro de poro de 5  $\mu$ m, mientras que para neutrófilos de ratón el diámetro fue de 3  $\mu$ m. Sobre estas membranas se situaron las células con medio RPMI 0.1% FBS y se trataron con Dexametasona 1  $\mu$ M durante 1 hora, 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. Seguidamente se añadieron los estímulos Peptidoglicano (PGN; Invivo Gen; 10  $\mu$ g/ml), Lipopolisacárido (LPS; Invivo Gen; 1  $\mu$ g/ml) o Flagelina (Invivo Gen; 1  $\mu$ g/ml).

Simultáneamente la placa superior con las células se acopló a una placa inferior cuyos pocillos contenían RPMI y el quimioatrayente CXCL12 (Recombinant Human CXCL12, Ref. 350-NS o Recombinant Mouse CXCL12 460-SD, R&D Systems) a una concentración 20 nM. Las placas se incubaron durante 6 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. Tras este tiempo la placa superior se separó y se acopló a una nueva placa inferior con un buffer de desenganche, para que aquellas células que hubieran migrado a través de la membrana de policarbonato se despegaran. Estas células despegadas se lisaron y se añadió el marcador CyQUANT® GR, un tinte que genera fluorescencia cuando se enlaza con ácidos nucleicos. Finalmente se cuantificó la fluorescencia mediante un espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) a 480 nm/520 nm.



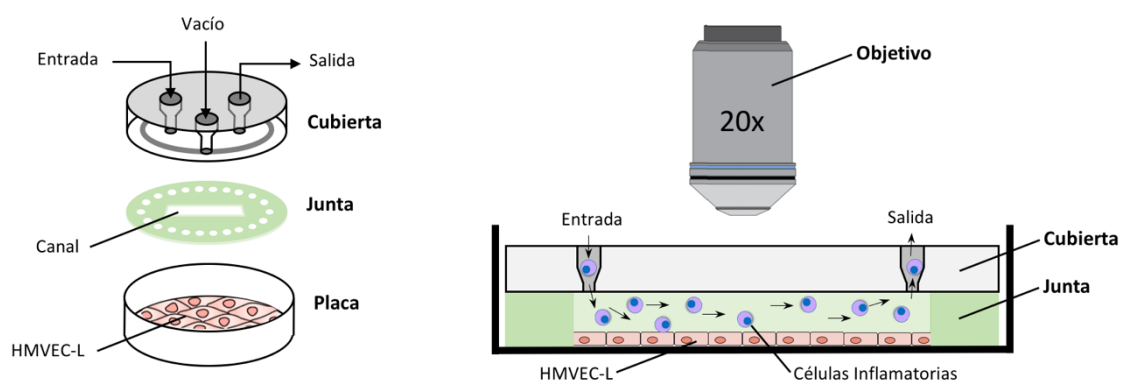
**Figura 4.9 Esquema del ensayo de migración quimiotáctica.** 1, Las células inflamatorias estimuladas en la placa superior se acoplaron a una placa inferior con el quimioatrayente. 2, tras 6 horas de incubación, las células han migrado a través de los poros y se encuentran bajo la membrana de policarbonato. 3, la placa superior se acopla a una nueva placa con buffer de desenganche, que despegará las células que han migrado de la membrana de policarbonato. 4, finalmente las células despegadas se lisan y marcan con un tinte que emite fluorescencia en proporción a la concentración de ácidos nucleicos.

#### 4.2.1.8 Flow Chamber

La técnica Flow chamber permite cuantificar la adhesión de células inflamatorias sobre un sustrato celular. El sistema consiste en mimetizar el interior de los vasos sanguíneos mediante un flujo dinámico de células en suspensión sobre una monocapa de endotelio.

En primer lugar, se forró una placa de cultivo de 35 mm con 1 ml de Fibronectina de plasma humano (nº Cat.F2006, Sigma) 10 µg/ml y 0.05% (p/v) gelatina en agua para preparaciones inyectables B. Braun. Se cubrió toda la placa con la solución, se retiró y se dejó secar durante 30 minutos en campana de flujo laminar. Tras esterilizar la placa con UV, se sembraron  $3 \times 10^5$  células HMVEC-L en 2 ml de medio EGM2-MV y se cultivaron 24 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. Alcanzada una confluencia del 90% se procedió a silenciar MUC1 en las células con siRNA (explicado previamente). Una vez silenciadas, las monocapas de HMVEC-L-siRNA(-) y HMVEC-L-siRNA-MUC1 se incubaron con 2.5 ng/ml de Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  recombinante (TNF $\alpha$ , nº Ref. T0157, Sigma) durante 24 horas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dexametasona (10 nM - 1 µM).

El elemento central del sistema de Flow chamber es la cámara de flujo propiamente dicha, que está constituida por la placa de 35 mm que contiene la monocapa de endotelio y que funciona como base; una junta de silicona intermedia con un canal rectangular (GlycoTech, EEUU) y la cubierta de la cámara de flujo (GlycoTech, EEUU) (Figura 4.10). La junta de silicona, al estar intercalada entre la placa y la cubierta forma un espacio cerrado por donde se genera el flujo de células; este espacio mide 0,0254 cm de espesor, 0,5 cm de ancho y 2 cm de largo. La cubierta posee tres orificios con conexión a tubos de silicona; dos orificios dispuestos en línea con una separación de 2 cm corresponden a la entrada y salida en el espacio de flujo, mientras que el orificio restante conecta una incisión circular en torno a dicho espacio que conectada a una bomba de vacío presuriza la cámara.



**Figura 4.10 Componentes y montaje de la Flow Chamber.** En la figura de la izquierda se indican los componentes de la cámara y su disposición. En la figura de la derecha se representa

el espacio generado al montar la Flow Chamber, cuya base está formada por la monocapa de HMVEC-L y por donde discurren las células inflamatorias en suspensión dirigidas por un flujo laminar. La adhesión celular se visualiza mediante un microscopio directo o invertido con el eje de visión perpendicular a la placa.

El estrés de rozamiento sobre la monocapa de endotelio, provocado por el flujo volumétrico a través del espacio de la cámara, debía de permanecer dentro de rangos fisiológicos, por lo que se aplicó la siguiente fórmula:

$$\tau_w = \mu\gamma = 6\mu Q/a^2b$$

Donde:

$\tau_w$  = Estrés de rozamiento deseado = 0,5 dynes/cm<sup>2</sup>.

$\mu$  = viscosidad aparente (para H<sub>2</sub>O a 37°C = 0,0076 P)

$\gamma$  = ratio de rozamiento, 1/seg

$a$  = grosor del espacio, 0,0250 cm

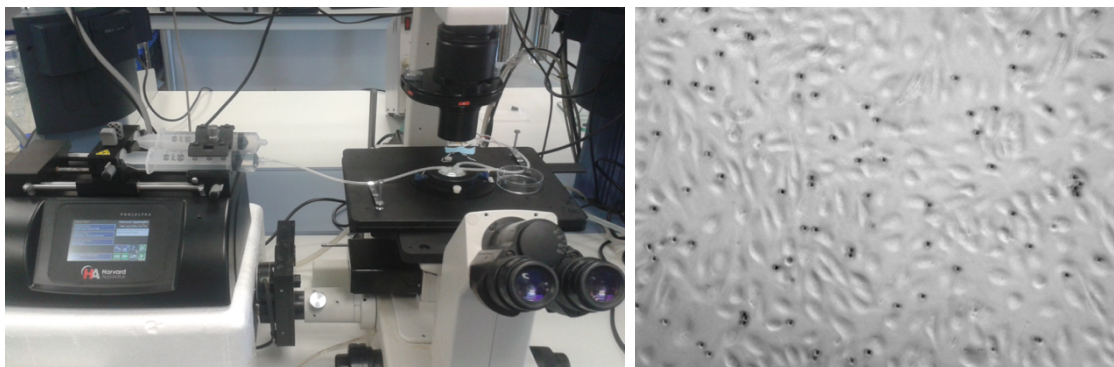
$b$  = anchura del espacio, 0,5 cm

$Q$  = Flujo volumétrico, ml/seg

Por tanto, el flujo volumétrico que se debió generar fue de  $1,75 \times 10^{-3}$  ml/s = 0,1 ml/min.

Se preparó una suspensión celular de monocitos U937 a  $10^6$  células/mL en medio de cultivo RPMI 10% FBS. Para cada placa con HMVEC-L se usó una Jeringa BD Emerald estéril de 10 ml con 3 ml de suspensión celular y se ajustó en el Programmable Syringe Pump (Harvard Apparatus) (**Figura 4.11**), que presiona el émbolo para mantener el flujo constante programado. La Flow Chamber se colocó en un soporte calefactor de placas (Harvard Apparatus) que mantuvo una temperatura constante de 37°C. Finalmente los orificios de entrada, salida y vacío de la cubierta se conectaron mediante tubos de silicona a la jeringa con la suspensión celular, a un contenedor y a una bomba de vacío (Harvard Apparatus), respectivamente.

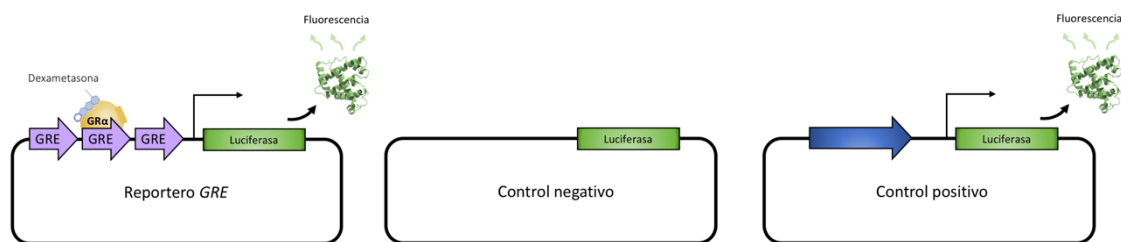
Para observar la adhesión se empleó un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, Barcelona) con un objetivo de 20X y se ajustó el campo y el enfoque para contrastar las células en suspensión con la monocapa de endotelio. La perfusión de células duró 6 minutos con un flujo de 0,1 ml/min. Pasados 5 minutos, el minuto restante se empleó para hacer tomas de varios segundos, sobre cinco regiones diferentes del canal (**Figura 4.11**) con una cámara de vídeo CCD adaptada y conectada al software MetaFluor. Para el conteo se empleó el software MetaMorph.



**Figura 4.11 Sistema de perfusión y visualización del sistema Flow Chamber.** En la fotografía de la izquierda se observan la jeringa con suspensión de células U937 acoplada a la Programmable Syringe Pump y conectada a la cámara de flujo. Ésta última a su vez se sitúa en una placa calefactora en la platina de un microscopio invertido. La imagen de la derecha es un fotograma de la adhesión de monocitos U937 (esferas negras) a células endoteliales.

#### 4.2.1.9 Sistema reportero de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE)

Para monitorizar la actividad transcritora del receptor de glucocorticoides  $\alpha$  en células *in vitro* se empleó el kit Cignal GRE Reporter Assay (QIAGEN, nº Cat. 336841). La técnica consiste en transfectar un constructo génico con un sistema reportero, formado básicamente por el gen de la Luciferasa bajo el control de un promotor (m)CMV y de repeticiones en tándem de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). De modo que la activación como factor de transcripción de GR $\alpha$  por dexametasona provoca su unión a los GRE del sistema reportero y la síntesis de Luciferasa, que generará fluorescencia de manera proporcional. El sistema también incluye una mezcla de constructos del gen de la Luciferasa no inducible, como control negativo; y una mezcla de constructos que expresan constitutivamente el gen de la Luciferasa, como control positivo (**Figura 4.12**).



**Figura 4.12 Constructos del kit Signal GRE Reporter Assay.**

Esta técnica se empleó para determinar la influencia de la expresión de MUC4 sobre la actividad de  $GR\alpha$ , tanto por exceso como por defecto. De modo que se emplearon dos modelos celulares: las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 para analizar el efecto de la sobre-expresión de MUC4; y las células BEAS-2B silenciadas para MUC4 con ARN interferente. En ambos casos las células se incubaron en placas de 96 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 90%. En el caso de las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 se cultivaron 24 horas en ausencia o presencia de doxiciclina 100 nM y 1  $\mu$ M. Seguidamente se transfectaron 100 ng del constructo reportero, del control negativo o del control positivo mediante Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) en medio Opti-MEM® libre de suero. Se incubaron 16 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. Tras este tiempo las células se trataron con diferentes concentraciones de dexametasona (0.1 nM- 1  $\mu$ M) durante 6 horas en DMEM.

Con el fin de inducir y medir la fluorescencia de la Luciferasa se empleó el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, nº Ref. 1910). Siguiendo las instrucciones del fabricante, tras el experimento las células fueron lavadas con PBS y lisadas con Passive Lysis Buffer 1X en agitación suave durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Mientras, se resuspendió el sustrato liofilizado Luciferase Assay Reagent II (LAR II) en 10 ml del Luciferase Assay Buffer II. Se prepararon los pocillos necesarios con 100  $\mu$ l de LAR II en una placa blanca de 96 pocillos y se les añadió 20  $\mu$ l del lisado celular, mezclando bien mediante 3 pipeteos. La fluorescencia en la placa se midió mediante un espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los datos se expresaron como la inducción de la actividad GRE proporcional a la luminiscencia producida por la luciferasa respecto a las células no estimuladas con dexametasona.

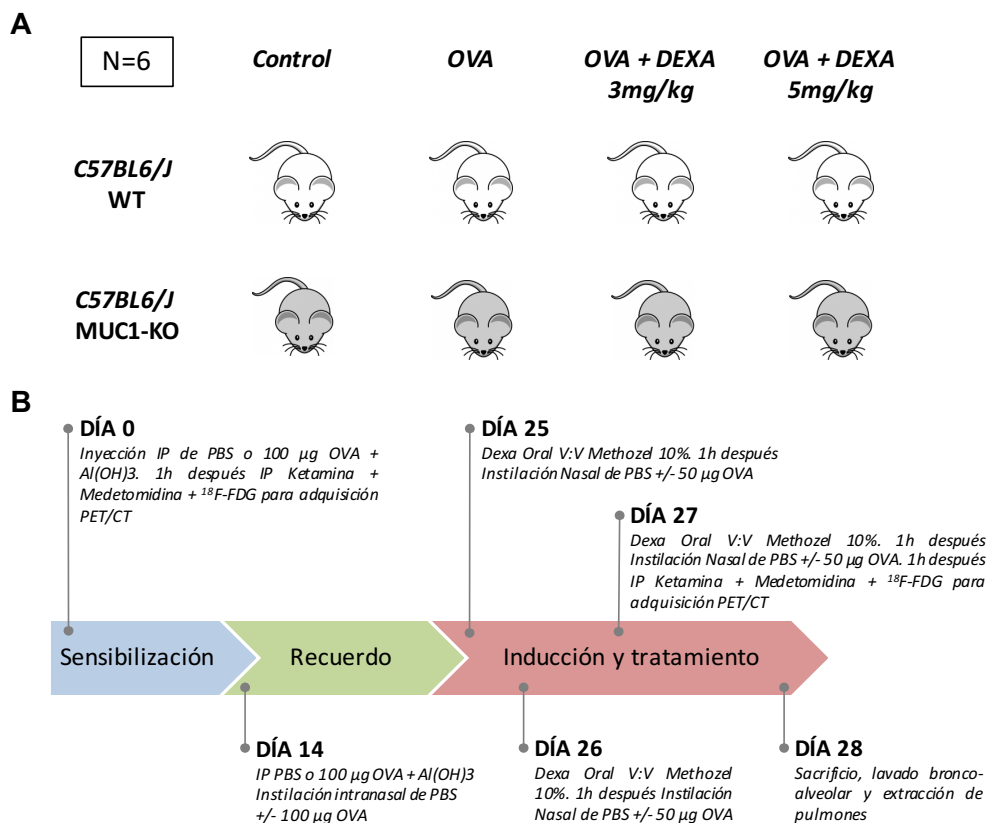


## 4.2.2 Modelo de Asma agudo en ratón

### 4.2.2.1 Protocolo

El modelo de Asma agudo se generó por sensibilización y exposición pulmonar a Ovoalbúmina en ratones, siguiendo las directrices de un modelo ya establecido por *Henderson WR et al.*<sup>102</sup> (**Figura 4.13 B**). El objetivo de este estudio era comparar la respuesta al tratamiento con Dexametasona entre ratones C57BL6/J-WT y C57BL6/J-MUC1-KO mediante las técnicas de imagen PET (Tomografía por Emisión de Positrones) y CT (Tomografía computerizada), histología, cuantificación de citoquinas y análisis de expresión génica y proteica.

Se utilizaron 48 ratones macho con fenotipo C57BL6/J-WT (n=24) y C57BL6/J-MUC1-KO (n=24) de 8 semanas de edad divididos en cuatro grupos homogéneos (n=6): Control, OVA, OVA + Dexametasona 3 mg/kg y OVA + Dexametasona 5 mg/kg (**Figura 4.13 A**).



**Figura 4.13** Esquema del modelo de asma agudo murino para comparar la respuesta al tratamiento con Dexametasona entre el fenotipo C57BL6/J-WT y C57BL6/J-MUC1-KO.

*A, distribución de los ratones en grupos, siendo n=6 ratones en cada uno. B, línea temporal del protocolo desde la sensibilización a OVA hasta el sacrificio de los animales. IP = Intraperitoneal.*

El protocolo experimental resumido en la figura anterior se describe a continuación en detalle, siendo su duración de un total de 28 días.

-A **día 0** todos los individuos C57BL6/J -WT o C57BL6/J-MUC1-KO fueron anestesiados por vía intraperitoneal con ketamina/medetomidina 75/0,5 mg/kg, respectivamente. Seguidamente se les inyectó también por vía intraperitoneal el radiofármaco <sup>18</sup>F-FDG para la medición con PET-CT de la caja torácica, a fin de determinar el estado óptimo de los pulmones previo al procedimiento. Este mismo día se inició la sensibilización a OVA mediante la inyección intraperitoneal de 0.2 ml de PBS con 100 µg de OVA conjugada con Hidróxido de Aluminio Al(OH)<sub>3</sub> en todos los grupos salvo el control, al que se le inyectó el mismo volumen, pero de PBS/Al(OH)<sub>3</sub>.

-A **día 14** se inoculó una dosis de recuerdo mediante la inyección intraperitoneal de 100 µg de PBS con OVA conjugada con Hidróxido de Aluminio Al(OH)<sub>3</sub> o el mismo volumen de PBS + Al(OH)<sub>3</sub> en los controles. Además, se inició la respuesta inflamatoria local mediante la infusión intranasal de 100 µg de OVA disueltos en 0.05 ml de PBS filtrado; en los controles fue únicamente PBS.

-A **día 25, 26 y 27** los grupos con tratamiento recibieron por vía oral forzada con sonda oro-esofágica una dosis terapéutica de Dexametasona (3 mg/kg o 5 mg/kg) vehiculizada con Methocel® 10% (1:1); en el caso del grupo control y OVA se empleó PBS + Methocel® 10% (1:1). Una hora después de la toma oral del fármaco se realizó la inducción propiamente dicha de la patología asmática mediante la infusión intranasal de 50 µg de OVA disueltos en 0.05 ml de PBS filtrado. Los controles recibieron PBS solo. El **día 27**, una hora después de la infusión intranasal, se procedió al marcaje con <sup>18</sup>F-FDG y a la toma de imágenes mediante PET-CT.

-A **día 28** tras 24 horas de decaimiento radioactivo de la <sup>18</sup>F-FDG, los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria en una cámara con Isoflurano al 5% y sacrificados por exanguinación. Se realizó un lavado broncoalveolar (LBA) para

---

evaluar la presencia de células inflamatorias en el pulmón y analizar la expresión de citoquinas. Se extrajeron los pulmones, que fueron divididos en fragmentos para aislamiento de RNA, proteína y fijación en formaldehído para histología. También se extrajeron los huesos largos de las patas traseras de los sujetos control para el aislamiento de células inflamatorias de médula ósea.

#### 4.2.2.2 Preparación y administración de sustancias, fármacos y radiofármacos

- **Ovoalbúmina:** se preparó en campana de flujo laminar una solución stock estéril de 1 mg/ml con agua para preparaciones inyectables B. Braun. Para la sensibilización por vía intraperitoneal la solución stock se mezcló en proporción de volumen 1:1 con Hidróxido de Aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ; la inoculación se realizó con 0.2 ml de OVA +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  con jeringas tuberculina de polipropileno de 1 ml y aguja de 25 G (B. Braun). Para la administración por vía intranasal el ratón fue anestesiado con Isoflurano y colocado en decúbito supino, seguidamente se le aplicó lentamente con pipeta un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de OVA 1 mg/ml sobre las fosas nasales de manera que el animal inspirara todo el volumen.
- **Isoflurano:** es un éter halogenado usado como anestésico inhalatorio y se empleó para anestesiar durante breves períodos de tiempo a los ratones, principalmente para las administraciones intranasales. Los ratones se situaron dentro de una cámara estanca con entrada de oxígeno y una atmósfera de Isoflurano al 5% generada por un vaporizador (Harvard Apparatus), tras unos minutos los animales quedaban dormidos.
- **Dexametasona:** se prepararon dos soluciones stock -1,75 mg/ml y 0,625 mg/ml- con agua para preparaciones inyectables B. Braun. Para cada ratón se tomaron los volúmenes de dexametasona indicados en la tabla y se vehiculizó con Methocel® al 10% tras mezclarse en proporción 1:1 de volumen. Finalmente se administró por vía oral forzada con sonda oro-esofágica.

DEXAMETASONA 5mg/1kg/día (1,75 mg/ml)			DEXAMETASONA 3mg/1kg/día (0,625 mg/ml)		
PESO g	peso kg	uL adm oral	PESO g	peso kg	uL adm oral
10	0,01	10	10	0,01	10
11	0,01	11	11	0,01	11
12	0,01	12	12	0,01	12
13	0,01	13	13	0,01	13
14	0,01	14	14	0,01	14
15	0,02	15	15	0,02	15
16	0,02	16	16	0,02	16
17	0,02	17	17	0,02	17
18	0,02	18	18	0,02	18
19	0,02	19	19	0,02	19
20	0,02	20	20	0,02	20
21	0,02	21	21	0,02	21
22	0,02	22	22	0,02	22
23	0,02	23	23	0,02	23
24	0,02	24	24	0,02	24
25	0,03	25	25	0,03	25
26	0,03	26	26	0,03	26
27	0,03	27	27	0,03	27
28	0,03	28	28	0,03	28
29	0,03	29	29	0,03	29
30	0,03	30	30	0,03	30

**Tabla 4.4** *Tabla de administración oral forzada de dexametasona.* En las dos primeras columnas se indica el peso aproximado del ratón y en la tercera el volumen correspondiente a administrar. En el grupo con dosis de 5 mg/kg se utilizó una solución stock de dexametasona 1,75 mg/ml disuelta en agua, mientras que el grupo con dosis de 3 mg/kg se utilizó una solución stock de dexametasona 0,625 mg/ml.

- **Methocel®:** la solución se preparó disolviendo el producto al 10% en agua destilada previamente calentada a 90°C según ficha técnica.
- **Ketamina y Medetomidina:** la combinación de ambas drogas se empleó como anestesia, analgesia y miorrelajante. Se empleó para mantener a los ratones anestesiados e inmóviles durante la toma de imágenes en el equipo PET/CT. Se suministraron conjuntamente a una dosis de Ketamina 75 mg/kg y Medetomidina 0,5 mg/kg con jeringas tuberculina de polipropileno de 1 ml y aguja de 25 G (B. Braun). El control de la profundidad anestésica se realizó comprobando la ausencia de reflejos tras el pinzamiento de las patas.

- **$^{18}\text{F}$ -FDG:** este radiofármaco fue suministrado por la Unidad de Radiofarmacia Centralizada de I.B.A. Molecular Molypharma. A cada sujeto se le administró por vía intraperitoneal con aguja de 25 G aproximadamente 300  $\mu\text{Ci}$  para las pruebas de imagen.

### 4.2.2.3 Imagen Molecular

#### 4.2.2.1.1 Adquisición PET/CT

La adquisición de las imágenes se realizó mediante el sistema multimodal micro-PET/SPECT/CT (Albira II de Oncovisión S.A.). Para los estudios programados se emplearon las modalidades de PET y CT según se detalla a continuación.

Previa a la inyección del radiofármaco se anestesiaron los sujetos con ketamina/medetomidina 75/0,5 mg/kg respectivamente vía intraperitoneal. Se inyectaron con jeringas de tuberculina desprovistas de émbolo de 0,5 ml aproximadamente 300  $\mu\text{Ci}$  vía intraperitoneal de  $^{18}\text{F}$ -FDG. La jeringa que contiene el radiofármaco se midió en el activímetro tras la administración para calcular la dosis exacta de radiofármaco inyectado y se anotó junto con la hora de administración. Tras media hora de incorporación del radiofármaco el sujeto se colocó en decúbito prono en la camilla de ratón estándar del Albira II® (**Figura 4.14**), equipo multimodal de adquisición micro-PET/SPECT/CT. Todos los ratones fueron sometidos a las pruebas de PET/CT a día 0 y 27.



**Figura 4.14** Equipo microPET/SPECT/CT Albira II® de Oncovisión S.A.

---

Una vez finalizadas las adquisiciones, los ratones fueron retirados de la camilla y estabulados bajo observación. Los sujetos permanecieron en la instalación radiactiva con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas hasta el decaimiento total de la actividad inyectada.

#### **4.2.2.1.2 Adquisición de imágenes**

Las adquisiciones tanto de PET como de CT se realizaron con un offset de 10 mm de longitud para visualizar la región pulmonar. La adquisición mediante CT (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT) se realizó con buena calidad de adquisición, dosis alta (400 $\mu$ A) y voltaje alto (45Kv) con la modalidad de adquisición Step&Shoot y algoritmo de reconstrucción FBP (Filtered Back Projection). En la modalidad de PET, los estudios se programaron con un campo de visión (Field Of View (FOV)) de 80 mm, un tiempo de adquisición de 90 segundos por proyección durante 15 min. Las imágenes fueron reconstruidas mediante el algoritmo OSEM Cross con un número de iteraciones de 3 utilizando los parámetros de reconstrucción estándar del Albira Suite 5.0 Reconstructor.

El procesado y análisis de las imágenes de alta calidad del CT se emplearon para proporcionar información estructural basada en la correlación con las imágenes PET, así como para ensayos densitométricos del entorno pulmonar.

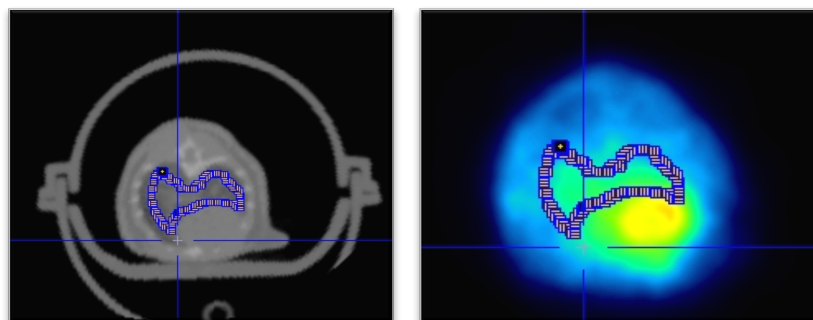
#### **4.2.2.1.3 Análisis de imágenes**

Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas mediante el software de análisis PMOD versión 3.2 (PMOD Technologies LTD, Zurich, Switzerland). Una vez adquiridas, las imágenes de PET/CT fueron reconstruidas y fusionadas.

Para las imágenes CT se determinaron volúmenes de interés (VOI) de la región pulmonar. El VOI fue analizado para cada sujeto para sus distintos días de adquisición. Se calculó la media de unidades Hounsfield (HU) por unidad de pixel.

Para las imágenes PET se tomó como plantilla el VOI obtenido en la imagen CT de cada sujeto y se extrapolo a la imagen PET y posteriormente se procedió a su cuantificación. La cuantificación de imágenes proporcionó el número de cuentas

adquiridas por unidad de pixel. Dicho valor se relativizó por la dosis inyectada y por peso de sujeto dando como resultado el SUV (Standard Uptake Value).



**Figura 4.15** *VOI (Volumen de Interés) de la imagen CT y de la imagen PET. Volúmenes de interés utilizados para la cuantificación en el CT (izquierda) extrapolado a la imagen PET (derecha).*

#### 4.2.2.4 Extracción de muestras

Una vez transcurridas 20-24 horas de la última dosis de  $^{18}\text{F}$ -FDG, se procedió al sacrificio de los animales mediante anestesia con Isoflurano inhalado al 5% y sangría. Se llevó a cabo una traqueotomía para realizar el lavado broncoalveolar (BAL). Se realizaron 3 lavados mediante la infusión y recuperación de 0,6 mL de Tampón Fosfato Salino (PBS) a través de una cánula de 24G. El BAL recogido se empleó para hacer ensayos de recuento y diferenciación celular. Se centrifugó el volumen total de BAL (13000 rpm, 10 min) y el sedimento y el sobrenadante se alicuotaron por separado, se congelaron con nitrógeno líquido inmediatamente y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Finalmente se llevó a cabo una toracotomía para extraer los pulmones. Los pulmones y la tráquea se extrajeron en bloque, separando el pulmón derecho para el estudio histológico, por lo que se fijó el tejido en una solución de Formaldehído 3.7-4%.

El pulmón izquierdo se empleó para analizar la expresión génica y proteica. Para ello se diseccionó y almacenó en viales de 1 ml con RNeasy<sup>®</sup> o en seco, respectivamente. Los viales con RNeasy<sup>®</sup> se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras que las muestras en seco se congelaron con nitrógeno líquido y fueron posteriormente almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día del análisis.

#### 4.2.2.5 Recuento de células totales en el lavado broncoalveolar (BAL)

Para determinar la respuesta inflamatoria pulmonar generada en la inducción de la enfermedad y compararla con el grupo tratado con dexametasona, se procedió al recuento de células totales extravasadas. Previa a la extracción de los pulmones, se lavaron ambos pulmones por triplicado con 0,6 ml de PBS. El volumen recogido de BAL se anotó y se almacenó en hielo. 10  $\mu$ l de cada muestra se marcaron con el mismo volumen de Azul de Tripano y se realizó un contaje de células totales en cámara Bürker.

Otros 100  $\mu$ l se emplearon para realizar un citospin mediante Cytospin™ 4 Cytocentrifuge (Thermo Fisher), centrifugando la muestra a 1500 rpm, 10 minutos. La muestra de células concentrada sobre el portaobjetos se sometió a tinción de panóptico rápido (Panreac), que es un método de tinción diferencial que permite la observación de las células sanguíneas. Seguidamente las muestras se incluyeron con medio de montaje y se cubrieron con un cubre-objetos. Los citospines se visualizaron mediante luz visible en un microscopio vertical Leica DM6000B y se tomaron fotografías representativas.

El volumen restante se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm para separar el componente celular del sobrenadante, y este último se almacenó rápidamente por separado a -80°C para la cuantificación de citoquinas.

#### 4.2.2.6 Aislamiento de neutrófilos de ratón.

Para la obtención de un pul de neutrófilos maduros y funcionales a partir de médula ósea de ratón, se empleó el protocolo descrito por *Mócsai et al*<sup>225</sup>. Se obtuvieron dos pules de neutrófilos correspondientes a 6 ratones del grupo control C57BL6/J-WT y 6 del grupo control C57BL6/J-MUC1-KO.

Una vez sacrificados los ratones se cortaron las epífisis de los fémures y tibias, y se separaron de los músculos mediante un fórceps. Los huesos se almacenaron en HBSS-Prep (HBSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ , 20 mM Na-HEPES, pH 7.4 y 0.5% Suero Fetal de Ternero) mientras se completaba el proceso con todos los ratones. En un tubo de 50 ml se orientó en vertical cada hueso y se extrajo la médula inyectando HBSS-Prep



a través del espacio medular con una aguja de 25 G y una jeringa de 10 ml. La médula ósea aislada se disgregó aspirándola a través de una aguja de 18 G. Esta solución se centrifugó a 400xg durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de una solución de lisis 0.2% NaCl. Tras un lisado de 30 segundos se restableció la osmolaridad de la solución añadiendo 10 ml de 1.6% NaCl. A continuación, se pasó la suspensión celular a un nuevo tubo de 50 ml a través de un filtro celular de 70  $\mu\text{m}$  y se llevó a un volumen de 5 ml con HBSS-Prep. En un tubo de 15 ml se añadieron 5 ml de Percoll® 62.5% (en HBSS-Prep) y cuidadosamente se le pipeteó encima los 5 ml de la suspensión celular, luego se centrifugó a 1000 x g, 30 minutos, sin freno.

Al final de la centrifugación en gradiente se observó una fina fase sobre el Percoll® 62.5% (correspondiente a células inmaduras y líneas no granulocíticas) y un sedimento más denso conteniendo los neutrófilos. Con mucho cuidado se extrajo la fase de células inmaduras, luego el HBSS-Prep y la parte superior del Percoll® 62.5%, dejando unos 2 ml del gradiente para no alterar el pellet de neutrófilos. El pellet se trasladó a un nuevo tubo y se lavó dos veces con HBSS-Prep, para finalmente resuspender los neutrófilos en medio RPMI.

### 4.2.3 Histología

#### 4.2.3.1 Fijación y deshidratación de tejidos

Para técnicas histológicas todos los tejidos humanos o de ratón empleados en este trabajo fueron fijados con Formaldehído 3,7-4,0% (pH=7) durante 48 horas. Seguidamente los tejidos se incluyeron en cassettes de inclusión, se rotularon con lápiz y se deshidrataron mediante los siguientes tratamientos:

Tratamiento	Tiempo	Repeticiones
<b>Etanol 70%</b>	60 minutos	x1
<b>Etanol 95%</b>	60 minutos	x2
<b>Etanol 100%</b>	60 minutos	x3
<b>Xileno</b>	60 minutos	x2
<b>Parafina</b>	60 minutos	x1

**Tabla 4.5 Protocolo de deshidratación de tejidos.**

A continuación, se procedió a la inclusión en bloques de parafina con un inclusor EC350-1 Myr (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza). A partir de los bloques obtenidos, se cortaron secciones (4-6  $\mu\text{m}$  de espesor) con un micrótomo HM 340 E (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza) y se adhirieron a portaobjetos, dejándose en secado a temperatura ambiente durante 48 horas.

#### 4.2.3.2 Tinción Hematoxilina-Eosina de tejido pulmonar de ratón.

Para realizar la tinción con hematoxilina-eosina de los cortes de tejido pulmonar de ratón se siguió el siguiente esquema de tratamientos:

Tratamiento	Tiempo	Repeticiones
Xileno	2 minutos	x3
Etanol 100%	2 minutos	x3
Etanol 95%	2 minutos	x1
Etanol 70%	2 minutos	x1
Agua destilada	2 minutos	x1
Hematoxilina	3 minutos	x1
Agua corriente	5 minutos	x1
Agua corriente	Hasta eliminar exceso de hematoxilina	
Agua + HCl	Hasta que el porta quede limpio	
Carbonato de Litio	Viraje a color violeta	
Eosina	2 minutos	x1
Etanol 95%	1 segundo	x20
Etanol 95%	2 minutos	x1
Etanol 100 %	2 minutos	x2
Xileno	2 minutos	x3

**Tabla 4.6 Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina de tejido pulmonar de ratón.**

La secuencia corresponde a los procesos de hidratación del tejido (morado), tinción (naranja) y deshidratación (azul).

Tras este protocolo los cortes teñidos se dejaron secar y se cubrieron con el medio de montaje DPX y con un cubreobjetos. Los cortes se visualizaron mediante luz visible en un microscopio vertical Leica DM6000B y se tomaron fotografías representativas que incluyeran parénquima, estructuras vasculares y bronquios.

#### 4.2.3.3 Inmunohistoquímica de tejido de Pólipo Nasal.

Para el análisis inmunohistoquímico de los Pólipos Nasaes las secciones de tejido se incubaron con el anticuerpo primario rabbit anti-human polyclonal MUC4 $\beta$  (Novus Biologicals (NBP1-52193) durante 24h a 4°C. Como anticuerpo secundario se empleó anti-IgG (H + L) rabbit (1:100; Vector Laboratories, Burlingame, CA) conjugado al complejo avidina-biotina unido a peroxidasa de rabano, que cataliza la conversión de sustratos cromógenos en depósitos permanentes de color marrón. Tras el marcaje los cortes fueron expuestos durante unos segundos al sustrato 3,3-Diaminobencidina (DAB) de peroxidasa de rabano para revelar la coloración y se tiñeron con Hematoxilina durante 1 minuto para diferenciar los componentes celulares.

Los cortes marcados fueron puntuados mediante un microscopio de luz Nikon Eclipse TE200 (Tokyo, Japón) *a partir de* fotografías representativas de 10 cortes por cada paciente. La intensidad del marcaje se analizó en el epitelio de los NP. La intensidad de MUC4 $\beta$  se puntuó en una escala 0-3 de Inmunoreactividad (0-negativa, 1-débil, 2-moderada, 3-fuerte). El porcentaje de células positivas para MUC4 $\beta$  dentro del epitelio de NP se puntuó en una escala 1-4, siendo 1:0-24% de células positivas; 2: 26-50%; 3: 51-75%; y 4: 76-100%. La puntuación de la intensidad de marcaje y el porcentaje de células positivas fueron multiplicados para obtener una puntuación combinada de 0 a 12.

#### 4.2.3.4 Co-Inmunofluorescencia

##### 4.2.3.4.1 Células

Tras sus respectivos experimentos, las células primarias epiteliales de Pólipos Nasaes y las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 se lavaron 3 veces con DPBS (Lonza®, Barcelona, España) y se fijaron con Formaldehído 3,7-4,0% (pH=7), 30 minutos, a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS, las células fueron permeabilizadas (20 mM HEPES, pH 7.6, 300 mM sucrosa, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100) durante 8 minutos y bloqueadas con suero de cabra al 10% en PBS durante 1 hora. Seguidamente se incubaron con los anticuerpos

primarios (**Tabla 4.7**) toda la noche a 4°C en oscuridad. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS frío, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (**Tabla 4.7**) durante 2 horas, a 4°C en oscuridad. Tras otros 3 lavados de 5 minutos con PBS frío, los núcleos celulares se marcaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, dilución 1:10000) durante 3 minutos y se lavaron de nuevo.

Epítipo	Origen	Fluorocromo	Referencia	Dilución	Buffer
MUC4β	Conejo	-	Novus (NBP1-52193)	1:100	BSA 0.1% / PBS
GRα Humano	Ratón	-	BD (nº Cat. 611227)	1:100	BSA 0.1% / PBS
IgG (H+L) Conejo	Burro	Alexa Fluor® 488	Invitrogen (nº Cat. 65-6111)	1:200	BSA 0.1% / PBS
IgG (H+L) Ratón	Burro	Rhodamina® 555	Invitrogen (nº Cat. 31660)	1:200	BSA 0.1% / PBS

**Tabla 4.7** Anticuerpos primarios y secundarios en inmunofluorescencia celular.

Finalmente se cubrieron con el medio de montaje Fluoprep (bioMérieux®, Madrid, España) y un cubreobjetos. Las células se visualizaron con un Microscopio confocal Leica TCS SP2 a una magnificación x1000 y 3x zoom. Para visualizar MUC4β marcado con el fluorocromo FITC se empleó el láser Azul Argón 488 nm; para GRα marcado con Rodamina se empleó el láser Verde Helio Neón 543 nm; y para visualizar los núcleos marcados con DAPI el láser UV BP 340-380 nm. Los estudios de co-localización se realizaron mediante el software Leica confocal v2.61 y consistieron en generar citofluorogramas bidimensionales que indican los puntos de co-localización de dos fluorescencias diferentes en color blanco.

#### 4.2.3.4.2 Tejido pulmonar de ratón

Los cortes de tejido pulmonar de ratón se incubaron en una estufa a 60°C durante 45 minutos. Seguidamente se desparafinaron y rehidrataron siguiendo el siguiente protocolo:

Tratamiento	Tiempo	Repeticiones
<b>Xileno</b>	5 minutos	x3
<b>Etanol 100%</b>	10 minutos	x3
<b>Etanol 95%</b>	10 minutos	x2
<b>Etanol 80%</b>	3 minutos	x1
<b>Agua destilada</b>	5 minutos	x1

**Tabla 4.8** Protocolo de desparafinado y rehidratación de tejido para inmunofluorescencia.

Los portaobjetos con los cortes se sumergieron en Citrato de Sodio 0.01M (pH6) a 100°C durante 15-20 minutos. Después se dejaron enfriar en Citrato de Sodio 0.01M (pH6) a temperatura ambiente 30 minutos. Seguidamente se lavaron en buffer Tris-Salino con Tween20 (TBST, pH7.4) durante 5 minutos. El tejido se bloqueó con 5% BSA en PBS durante 2 horas y se incubó con los anticuerpos primarios (**Tabla 4.9**) durante 1 hora a 37°C. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con TBST y se incubó con los anticuerpos secundarios (**Tabla 4.9**) durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. Tras otros 3 lavados de 5 minutos con TBST, los núcleos celulares se marcaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, dilución 1:10000) durante 3 minutos y se lavaron de nuevo.

Epítipo	Origen	Fluorocromo	Referencia	Dilución	Buffer
<b>MUC1-CT</b>	Conejo	-	Novus (NBP1-60046)	1:25	BSA 0.1% / TBST
<b>GR<math>\alpha</math> Ratón</b>	Conejo	-	US Biological (140431)	1:25	BSA 0.1% / TBST
<b>IgG (H+L) Conejo</b>	Burro	Alexa Fluor® 488	Invitrogen (nº Cat. 65-6111)	1:100	BSA 0.1% / TBST
<b>IgG (H+L) Ratón</b>	Burro	Rhodamina® 555	Invitrogen (nº Cat. 31660)	1:100	BSA 0.1% / TBST

**Tabla 4.9** Anticuerpos primarios y secundarios en inmunofluorescencia tisular.

Finalmente se cubrieron con el medio de montaje Fluoprep (bioMérieux®, Madrid, España) y un cubreobjetos. Los tejidos se visualizaron y analizaron del mismo modo que en células (apartado anterior).

## 4.2.4 Estudio de la expresión génica

### 4.2.4.1 Extracción de ARN total y cuantificación

Para aislar el ARN total de células en cultivo se procedió a la lisis celular utilizando el tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos. El ARN total se aisló mediante el sistema de extracción *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid Prep Station* (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) (**Figura 4.16**), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar el ARN total de las muestras de tejido se utilizó el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics), que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol), que permite separar ARN, ADN y proteínas. Las muestras conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 0.5 ml de Trizol se descongelaron y se disgregaron con el sistema TissueLyser II (Qiagen) empleando bolas de hierro. En la suspensión con Trizol se separaron las fases con cloroformo y se precipitó el ARN total de la muestra con isopropanol. A fin de facilitar dicha precipitación se le añadió a la fase acuosa 1  $\mu\text{l}$  de glicógeno. Tras una centrifugación de 5 minutos a 7500 rpm, se resuspendió el ARN en 20  $\mu\text{l}$  de agua DEPC en un Termobloque seco a  $60^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos.

Una vez resuspendido, se determinó la concentración del ARN extraído mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), (**Figura 4.16**) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) mediante medidas de absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ), a partir del espectro de absorción de las muestras. También se obtuvo el valor de la pureza de las muestras, determinado por el ratio  $A_{260}/A_{280}$ .



**Figura 4.16 Extracción de ARN total y cuantificación.** La fotografía de la izquierda corresponde al Sistema ABI Prism TM 6100 Nucleic Acid Prep Station para la extracción de ácidos nucleicos. La fotografía de la derecha muestra el Espectrofotómetro NanoDrop 2000C para la cuantificación de ácidos nucleicos.

La integridad del ARN extraído fue confirmada con el sistema electroforético capilar 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 4.2.4.2 Transcripción reversa (RT)

En la reacción de transcripción reversa o retrotranscripción (RT), la enzima transcriptasa inversa sintetiza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero molde (**Figura 4.17**). Este paso fue necesario para realizar la cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real.

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit TaqMan® para la transcripción inversa. Se realizó este proceso en un termociclador 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU) (**Figura 4.17**) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , ciclo de 30 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$  e inactivación de la enzima durante 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . El ADNc sintetizado se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.



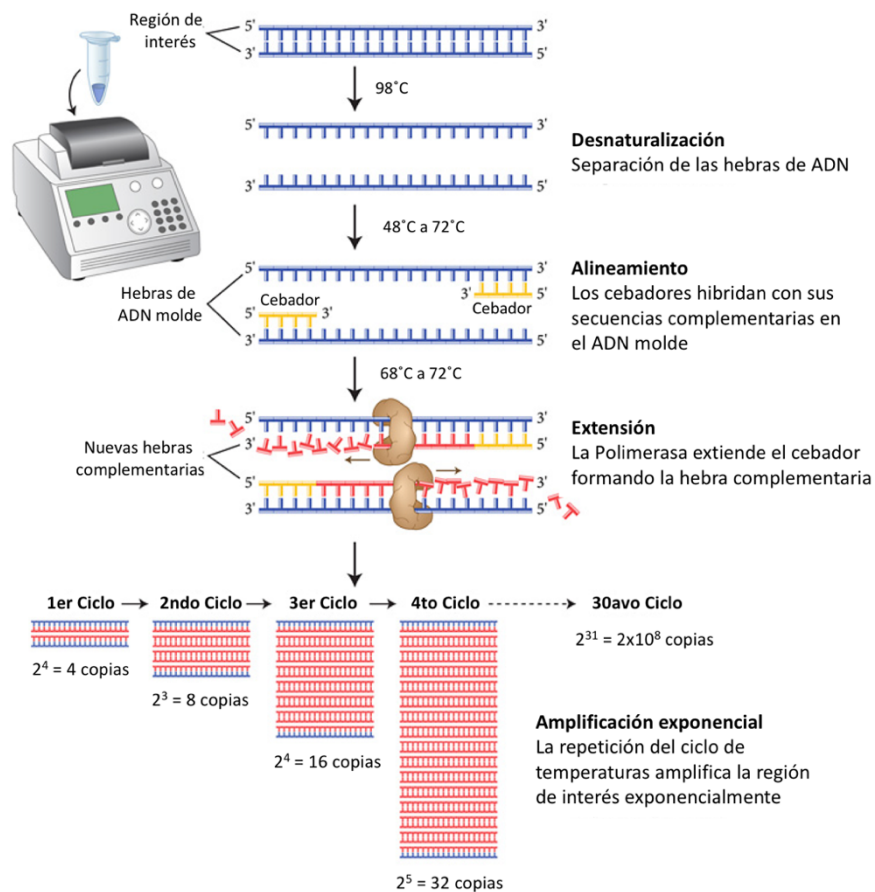
**Figura 4.17 Transcripción reversa.** La fotografía de la izquierda muestra el Termociclador 9800 Fast Thermal Cycler empleado para la reacción de transcripción reversa. La figura de la derecha muestra las etapas de la reacción.

**4.2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas a diferentes temperaturas:

- Desnaturalización del ADN molde (98°C)
- Hibridación de cebadores (48°C a 72°C)
- Extensión (68°C a 72°C)

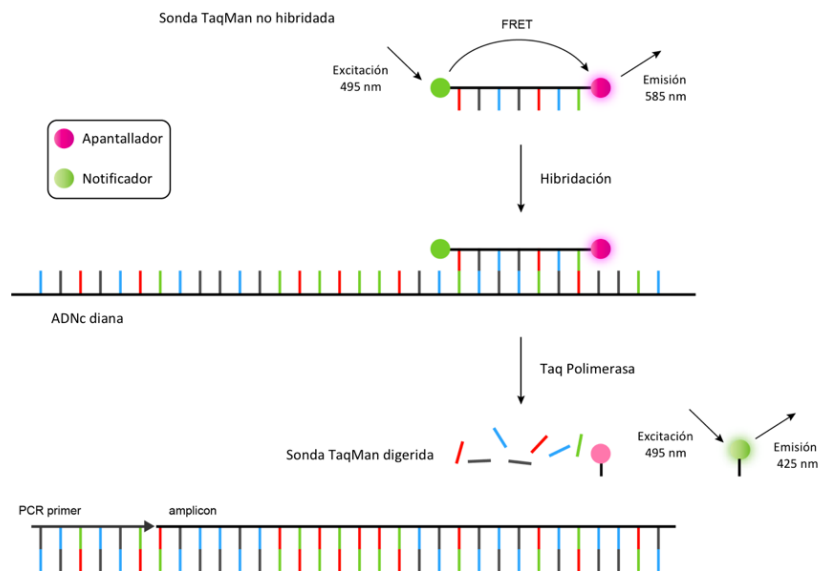
Cada repetición del ciclo produce un aumento exponencial en el número de copias de ADN de la región de interés (**Figura 4.18**).



**Figura 4.18** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Figura adaptada de referencia<sup>226</sup>.



La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la reacción. Para ello se utilizaron *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®*, que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan® utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq Polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la siguiente figura:



**Figura 4.19 Sistema TaqMan® de cuantificación fluorométrica de la expresión génica.** La sonda TaqMan® no hibridada contiene una molécula notificadora en 5' y una apantalladora en 3'. El equipo de PCR excita la muestra con una longitud de onda de 495 nm, que genera una emisión en el notificador que mediante el fenómeno de transmisión de energía de resonancia (FRET) es absorbido por el apantallador. Una vez hibridada con su ADNc diana, la Taq Polimerasa digiere la sonda durante la polimerización de la hebra complementaria, liberando la molécula notificadora y permitiendo que emita fluorescencia a una longitud de onda de 425 nm, detectable por la PCR. De este modo, la fluorescencia detectada será proporcional al número de copias de ADNc presentes en la muestra e hibridadas con la sonda TaqMan®. Figura adaptada de referencia<sup>227</sup>.

La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En la siguiente tabla se enumeran las *Sondas de Expresión Génica TaqMan®* utilizadas para el estudio de la expresión de los genes de interés en este trabajo.

Gen	Símbolo del gen	Referencia	Longitud del amplicón (pb)
<b>MUC1 Humano</b>	MUC1	Hs00159357_m1	84
<b>GR<math>\alpha</math> Humano</b>	GR $\alpha$	Hs00353740_m1	73
<b>MUC4 Humano</b>	MUC4	Hs00366414_m1	55
<b>MKP1 Humano</b>	DUSP1	Hs00610256_g1	63
<b>IL-8 Humano</b>	CXCL15	Hs00174103_m1	101
<b>GADPH Humano</b>	GAPDH	4310884E	118
<b>Muc1 Ratón</b>	MUC1	Mm00449604_m1	71
<b>GR<math>\alpha</math> Ratón</b>	GR $\alpha$	Mm00433832_m1	68
<b>MKP1 Ratón</b>	DUSP1	Mm00457274_g1	65
<b>IL-8 Ratón</b>	CXCL15	Mm04208136_m1	76
<b>IL-6 Ratón</b>	IL-6	Mm00446190_m1	78
<b>MUC5B Ratón</b>	MUC5B	Mm00466391_m1	65
<b>GAPDH Ratón</b>	GAPDH	4352339E	107

**Tabla 4.10** *Sondas de Expresión Génica TaqMan®* utilizados en la PCR a tiempo real.

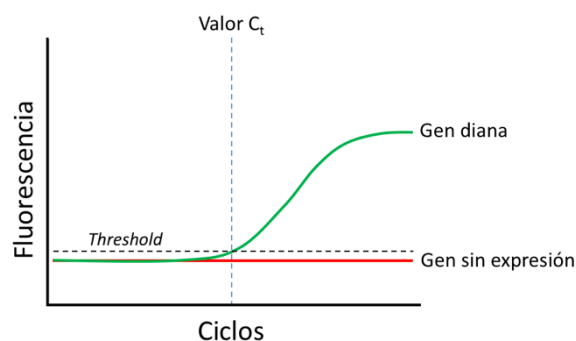
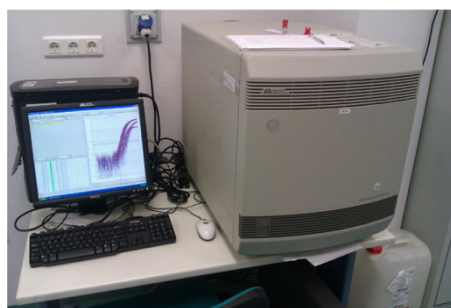
Definición de abreviaturas: GR- $\alpha$ :- Receptor de Glucocorticoide  $\alpha$ ; MKP1: proteína quinasa (MAP) fosfatasa activada por mitógenos 1, IL-8: Interleuquina 8, IL-13: Interleuquina 13, IL-6: Interleuquina 6, GADPH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenas; (pb): pares de bases.

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

- 1  $\mu$ L de ADNc sintetizado en la transcripción reversa
- 5  $\mu$ L de *TaqMan® Gene Expression Master Mix*
- 0,5  $\mu$ L de la sonda *TaqMan®* del gen a analizar
- 3,5  $\mu$ L de agua dietilpirocarbonato (DEPC).

El proceso de PCR-RT se desarrolló en un termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) (**Figura 4.20**) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C y 45 ciclos formados por las siguientes etapas: 10 minutos a 95°C (desnaturalización), 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (Hibridación y extensión).

A partir de los datos de fluorescencia registrados se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos (**Figura 4.20**). Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral o threshold. El threshold es el nivel determinado automáticamente o manualmente y fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación; por encima de esta línea el nivel de fluorescencia se considera significativamente superior a la fluorescencia basal. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la transcripción reversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.



**Figura 4.20 PCR a tiempo real.** En la fotografía de la izquierda se observa el Termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). La figura de la derecha corresponde a la gráfica obtenida tras el proceso de RT-PCR, en la que el gen diana ha sido amplificado. Mediante el Software RQ Manager se determina la posición del Threshold, que corta la curva de amplificación por el valor  $C_t$ , proporcionando un dato numérico de la expresión génica.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó con el método de comparación de Ct, utilizando el gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen housekeeping y el grupo control como calibrador.

En este método se utiliza la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{experimental}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

Siendo:

$$\Delta Ct_{\text{experimental}} = (\text{Ct gen problema} - \text{Ct housekeeping}) \text{ de la muestra}$$

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = \frac{\Sigma \text{Ct Housekeeping}}{n} \text{ del grupo control}$$

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen housekeeping sea aproximadamente igual. Para comprobarlo se estudió cada muestra por duplicado, obteniendo dos valores Ct cuya media se consideró válida cuando su desviación estándar fue  $\leq 1$ . En las gráficas de expresión génica se expresó como valor  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que equivale a la expresión relativa del ARNm de un determinado gen.

## 4.2.5 Estudio de la expresión proteica

### 4.2.5.1 Western Blot

La técnica de Western Blotting permite detectar y cuantificar una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas; en el presente trabajo fue utilizada para detectar cambios en la expresión proteica tanto en células como en tejido.

En células en cultivo, el aislamiento de la proteína total se realizó lisando y homogeneizando la muestra en hielo con el Buffer C (20 mM Tris base, 0.9% NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM Ditiotreitól, 1 mg/ml Pepstatina A, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) complementado con un cóctel de Inhibidores de proteasas (nº Cat. P8340, Sigma Aldrich) y Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (nº Cat. 36978, Thermo Fisher). En otros casos se extrajo por separado la proteína

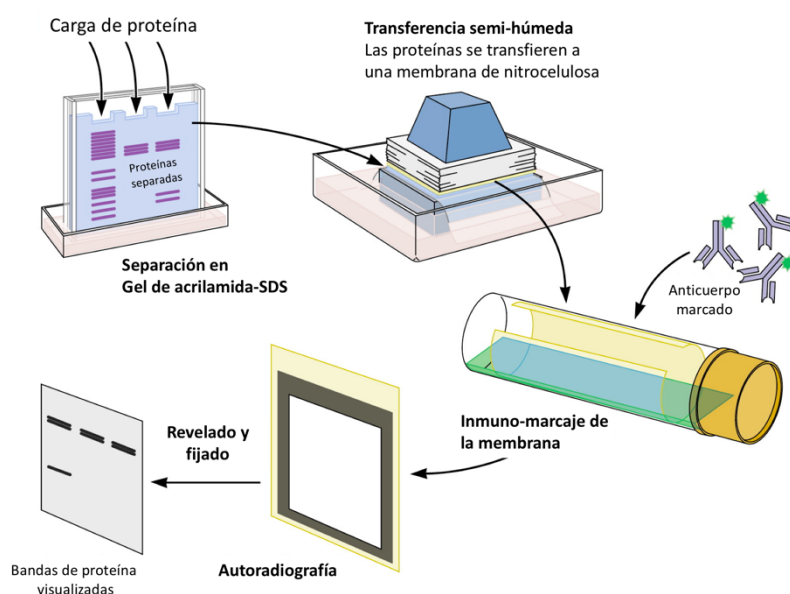
---

nuclear y citoplasmática con el kit de extracción *Nuclear active motif kit* (Active Motif, Europa, Rixensart, Bélgica) de acuerdo al protocolo del fabricante.

En el caso de las muestras de tejido de Pólipo Nasal humano y de pulmón de ratón, que habían sido congeladas previamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  en seco, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de Buffer C. Seguidamente se disgregaron en el sistema Tissuelyser II (Qiagen®) con bolas de hierro a una frecuencia de 30 Hz durante 3 minutos. Los disgregados se pasaron a nuevos eppendorfs y se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min. Se descartó el sedimento, mientras que el sobrenadante se sometió a tres ciclos de choque térmico por congelación-descongelación con  $\text{N}_2$  líquido y con agitación a  $37^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. A continuación, se le adicionó el detergente NP40 al 1% y durante 15 minutos se mantuvo en hielo con agitación enérgica cada 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recogió el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total mediante el kit del método de ácido bicinconínico (BCA). El ensayo BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) fue utilizado, siguiendo las instrucciones del fabricante, para cuantificar el nivel de proteína y así garantizar una cantidad equivalente de proteína cargada para cada muestra.

Para detectar la presencia del epítipo deseado se separaron las proteínas de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS). Para ello primero se desnaturalizaron las proteínas en presencia de buffer de carga SDS-PAGE (1:1 en volumen) a  $95^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos. 15 o 20  $\mu\text{g}$  de la proteína desnaturalizada y del marcador de peso molecular *Amersham High-Range Rainbow* se cargaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida (**Figura 4.21**), formado por un gel de apilamiento (acrilamida al 5%) situado encima de un gel de resolución (acrilamida al 10%). Se aplicó al gel una corriente eléctrica de 100V durante 1 hora, provocando que las proteínas migrasen a su través. Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane* (Amersham GE Healthcare) utilizando un método de transferencia semi-húmeda (Figura). La membrana con las proteínas fue bloqueada con BSA o Leche al 5% en PBS o TBS con 0,1% de TWEEN®20 durante 2 horas e incubada con el anticuerpo primario (**Tabla 4.11**) durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo

secundario correspondiente (**Tabla 4.11**), conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora. Las proteínas marcadas se detectaron realizando autoradiografías (Figura) en cámara oscura con película fotográfica (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), que recoge la emisión de quimioluminiscencia inducida por el kit ECL plus (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La densitometría de las películas se midió mediante Image J 1.42q software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, USA). Los resultados se expresaron como ratios respecto a controles endógenos de  $\beta$ -Actina, ERK1/2 total o p38 según corresponda, y normalizados respecto al grupo control.



**Figura 4.21** Esquema de la técnica de Western Blotting.

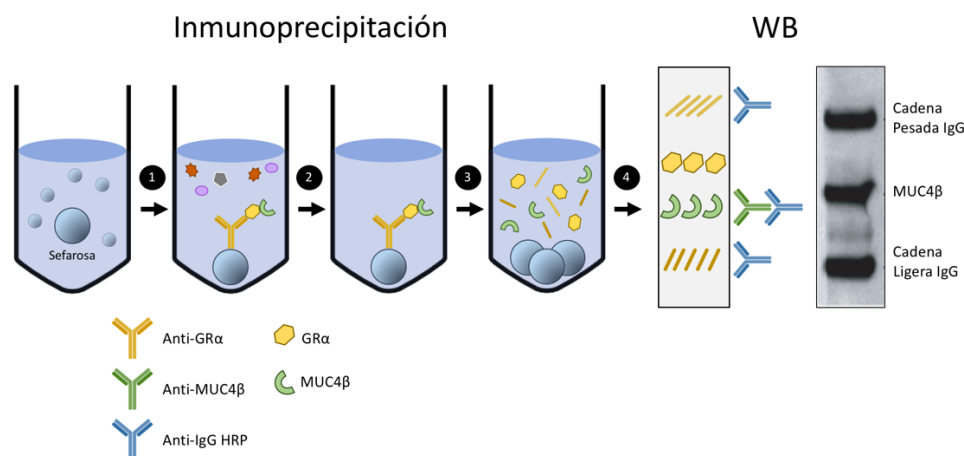
Epítopo	Origen	Referencia	Dilución	Buffer
MUC1-CT (H, R)	Conejo	Novus (NBP1-60046)	1:1000	BSA 5% / PBST
GR $\alpha$ Humano	Ratón	BD Biosciences (611227)	1:1000	Leche 5% / PBST
GR $\alpha$ Ratón	Conejo	US Biological (140431)	1:1000	Leche 5% / PBST
MUC4 $\beta$	Conejo	Novus (NBP1-52193)	1:1000	BSA 5% / PBST
MKP1	Conejo	Assay Biotech (B1099)	1:1000	BSA 5% / PBST
fosfo-ERK1/2	Ratón	Sigma Aldrich (M9692)	1:1000	BSA 5% / TBST

ERK1/2	Conejo	Cell Signaling (4695)	1:1000	BSA 5% / PBST
fosfo-p38	Conejo	Cell Signaling (4511)	1:1000	BSA 5% / TBST
p38	Conejo	Cell Signaling (9212)	1:1000	BSA 5% / PBST
IL-13	Cabra	R&D (AB-413-NA)	1:500	Leche 5% / PBST
$\beta$ -Actina	Ratón	Sigma Aldrich (A1978)	1:10000	Leche 5% / PBST
HRP - IgG (H+L) Conejo	Burro	Thermo Sci. (SA1-100)	1:10000	BSA 5% / PBST
HRP - IgG (H+L) Ratón	Burro	Thermo Sci. (SA1-200)	1:10000	BSA 5% / PBST
HRP - IgG (H+L) Cabra	Conejo	Thermo Sci. (31402)	1:10000	BSA 5% / PBST

**Tabla 4.11** Anticuerpos primarios y secundarios para Western Blotting. HRP: peroxidasa de rábano.

#### 4.2.5.2 Inmunoprecipitación

Una cantidad similar (200 $\mu$ g) de proteína total, citoplasmática o nuclear fue incubada con 2  $\mu$ g de los anticuerpos anti-GR $\alpha$ , anti-MUC1-CT o el isotipo control IgG. Los inmunocomplejos se precipitaron con proteína G en microesferas de *Sepharose 4B fast flow* (Sigma (P-3296)) toda la noche a 4°C (**Figura 4.22 1**). Tras 3 lavados con NET buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, y 0.1% Nonidet P-40) (**Figura 4.22 2**), el material unido se aisló de los inmunoprecipitados en buffer de carga SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 2% bromophenol blue) a 100°C durante 10 minutos (**Figura 4.22 3**). Los complejos proteicos inmunoprecipitados fueron analizados por western blot como se ha descrito previamente y expuestos a los anticuerpos anti-GR $\alpha$  o anti-MUC4 $\beta$  según correspondiera (**Figura 4.22 4**).



**Figura 4.22** Esquema de la técnica de Inmunoprecipitación de complejos GR $\alpha$ -MUC4 $\beta$

#### 4.2.5.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA se empleó para cuantificar la liberación de citoquinas, inducida por estímulos inflamatorios en células en cultivo o en el contexto de la inflamación pulmonar del modelo de Asma murino.

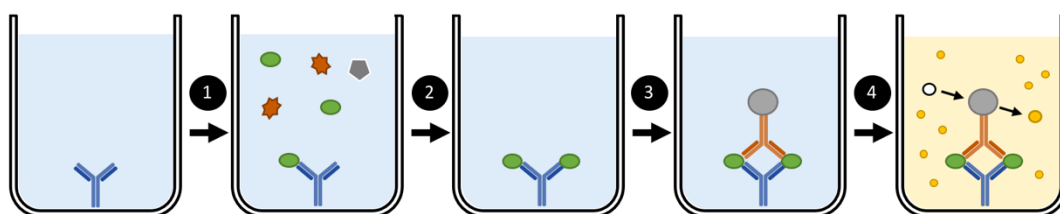
En el caso de experimentos *in vitro* se analizó la liberación de IL-8, GM-CSF y MMP9 en sobrenadante según ficha técnica mediante kits ELISA comerciales: Human GM-CSF Immunoassay Quantikine® ELISA kit (nº Cat. DGM00, R&D); Human CXCL15/IL-8 Immunoassay Quantikine® ELISA kit (nº Cat. DY208, R&D); Human MMP-9 Immunoassay Quantikine® ELISA kit (nº Cat. DY911, R&D).

Mientras que en el lavado broncoalveolar del modelo de Asma murino se analizaron IL-13, IL-8 e IL-5 según ficha técnica mediante kits ELISA comerciales: Mouse IL-13 DuoSet ELISA kit (nº Cat. DY413, R&D); Mouse CXCL15/Lungkine DuoSet ELISA (nº Cat. DY442, R&D); Mouse IL-5 Quantikine® ELISA kit (nº Cat. M5000, R&D).

Los kits empleados utilizan la técnica de ELISA cuantitativo por inmuno-detección indirecta de proteínas o sistema “sándwich” en fase sólida. En este sistema los pocillos tienen adheridos a su base anticuerpos específicos contra nuestra proteína de interés (**Figura 4.23**). A los pocillos necesarios se añadieron 50  $\mu$ L de diluyente y posteriormente 50  $\mu$ L del estándar (en concentraciones seriadas para la recta patrón), las muestras por duplicado (**Figura 4.23 1**) y el blanco (diluyente solo). Se incubó la placa durante 2 horas, durante las cuales la proteína de interés presente se unió al



anticuerpo inmovilizado (**Figura 4.23 2**). Se realizaron lavados, para eliminar uniones inespecíficas, y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo específico conjugado a una enzima, y se incubó durante 30 minutos más (**Figura 4.23 3**). Se realizaron lavados, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de sustrato y se incubó 30 minutos en oscuridad. La enzima asociada al segundo anticuerpo modifica el sustrato produciendo un producto coloreado (**Figura 4.23 4**), cuya intensidad será proporcional a la concentración de anticuerpo unido en el paso inicial. Se detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los datos de concentración de la proteína se extrapolaron de la recta patrón del estándar y se relativizaron respecto al grupo control.



**Figura 4.23** Esquema de la técnica de ELISA cuantitativo por inmunodetección indirecta de proteínas o sistema “sándwich” en fase sólida.

#### 4.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se resolvió mediante análisis paramétricos o no paramétricos según el caso.  $P < 0.05$  fue considerado significativo. Cuando las comparaciones concernían a varios grupos (Sanos/Asmáticos respondedores/Asmáticos corticorresistentes o PN<sub>s</sub>A/PN-AT/PN-AIA/PN-CR), se empleó un análisis no paramétrico de varianza (test Kruskal-Wallis). En el caso de una diferencia significativa global, entre las comparaciones de los grupos se empleó el test Dunn's post-hoc, el cual generaliza el procedimiento de ajuste Bonferroni.

En los experimentos *in vitro* e *in vivo* los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM) de  $n$  experimentos hasta que se confirmó la distribución normal para cada grupo de datos mediante análisis de histogramas y el test de Kolmogorov-Smirnov. En este caso, el análisis estadístico se resolvió por análisis paramétrico. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas

---

empleando una prueba bilateral t de Student apareada para muestras dependientes, o un t-test no apareado para muestras independientes. Las comparaciones múltiples fueron analizadas mediante test ANOVA de una o dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni.

## **RESULTADOS**



## **CAPÍTULO 5**

### **ANÁLISIS DE MARCADORES DE CORTICORRESISTENCIA EN ASMA Y CORRELACIÓN CON MUC1**



## ANÁLISIS DE MARCADORES DE CORTICO-RESISTENCIA EN ASMA Y CORRELACIÓN CON MUC1

### 5.1 Caracterización de los sujetos donantes de sangre periférica

Los sujetos donantes de sangre periférica para el aislamiento de neutrófilos se dividieron según los datos clínicos presentes en la **Tabla 5.1**. Los pacientes con asma se clasificaron según reversibilidad de la limitación al flujo aéreo, medida mediante la prueba de broncodilatación, tras 2 semanas de tratamiento con glucocorticoides.

Cohortes	Sin asma	Asma respondedor	Asma corticorresistente
Número de pacientes	13	16	11
Media de edad en años (rango)	57.1 (23-71)	56 (23-73)	57 (26-71)
Sexo (hombre/mujer)	5/8	8/8	7/4
Duración del Asma [años](SEM)	na	20.13 (3.49)	24 (5.45)
Tratados con corticoides inhalados (%)	0 (0)	16 (100)	11 (100)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Fluticasona [mg] (SEM)</li> <li>Budesonida [mg] (SEM)</li> <li>Foster® [mg] (SEM)</li> </ul>	na na na	900 (100) 600 (40) 200 (0)	750 (144.34) 544 (224) 200 (0)
Tratados con corticoides orales (sí/no)	0	4/12	6/5
<ul style="list-style-type: none"> <li>Dosis/día [mg] (SEM)</li> </ul>	na	16.25 (2.77)	20.83 (3.36)
Media %FEV1 basal (SEM)	na	48.75 (4.13)	77.64 (8.49)
Media %FEV1 postBd (SEM)	na	61.81 (4.51)	82.27 (8.29)
Variación de la media del %FEV1 (SEM)	na	29.92 (3.43)	7.19 (2.30)
Variación de la media del FEV1 [ml] (SEM)	na	343.75 (36.99)	60 (32.02)

---

**Tabla 5.1. Clasificación de los sujetos donantes y datos clínicos de los pacientes asmáticos.** Los pacientes se han distribuido en sus respectivas cohortes y los datos se expresan en número de sujetos que presentan la característica indicada. Los valores de parámetros clínicos se indican con su media para cada grupo de asmáticos y el correspondiente Error Estándar de la Media (SEM) entre paréntesis. *postBd* = posterior a la broncodilatación.

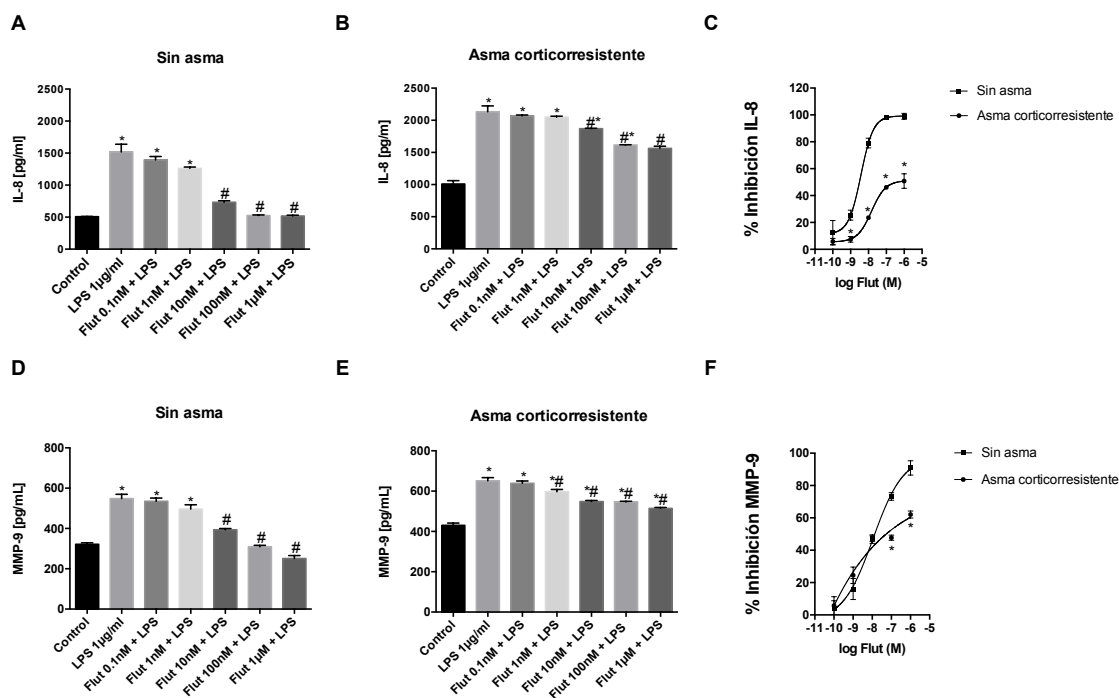
Como se desprende de los datos de la **Tabla 5.1**, tras el tratamiento 11 pacientes asmáticos se clasificaron como resistentes a corticoides, puesto que el aumento del FEV<sub>1</sub> posterior a la broncodilatación (*FEV<sub>1</sub>postBd*) respecto al valor basal (*FEV<sub>1</sub>preBD*) no fue superior al 12% ni a los 200 ml, siendo la variación media del FEV<sub>1</sub> de este grupo del 7.19% y de 60 ml. Por otro lado, se clasificaron 16 sujetos como pacientes respondedores puesto que tras el tratamiento con corticoides su variación del FEV<sub>1</sub> se incrementó en un 29.92% y en 343.75 ml de media. Los sujetos sanos no requirieron datos clínicos de función pulmonar al no estar diagnosticados de enfermedad asmática.

## 5.2 Efectos de la fluticasona en neutrófilos de sangre periférica

Para corroborar la resistencia a corticoides *in vitro*, los neutrófilos aislados de pacientes sanos y asmáticos corticorresistentes fueron estimulados con LPS (1µg/ml) en presencia de concentraciones crecientes de fluticasona (0.1nM-1µM) durante 6 horas, tras lo que los sobrenadantes se recogieron para medir la concentración de IL-8 y MMP9 por ELISA (**Figura 5.1**).

La fluticasona inhibió de manera muy significativa la liberación de IL-8 y MMP9 en neutrófilos de pacientes sanos (**Figura 5.1 A y D**), alcanzando en su dosis máxima un % de inhibición del 99% y el 90% respectivamente (**Figura 5.1 C y F**). En cambio, los neutrófilos de asmáticos corticorresistentes mostraron una menor sensibilidad a la fluticasona, siendo su % de inhibición de IL-8 y MMP9 en la máxima dosis del 50.8% y el 62% respectivamente (**Figura 5.1 B, C, E y F**).



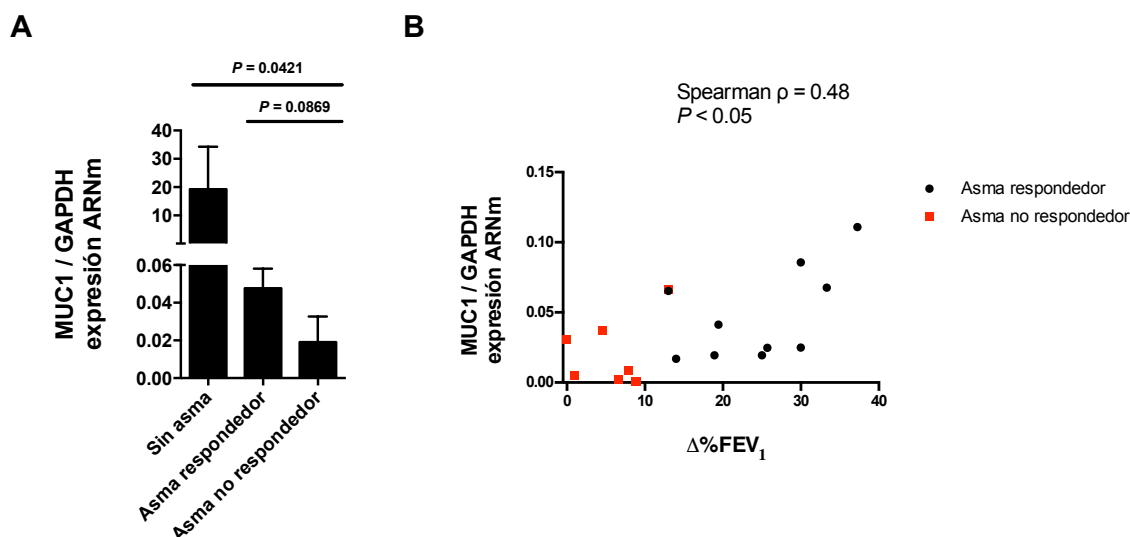


**Figura 5.1** Los neutrófilos de pacientes asmáticos corticorresistentes son menos sensibles al efecto de la dexametasona. Los neutrófilos de sangre periférica de (A-C) pacientes sin asma (n=3) y (D-F) pacientes asmáticos clínicamente corticorresistentes fueron estimulados con LPS en presencia o ausencia de diferentes dosis de fluticasona (0.1 nM- 1µM) durante 6 horas. En A, B, D y E, curvas de respuesta a fluticasona en concentraciones de IL-8 y MMP9 medidas por ELISA. En C y F, se comparan ambas curvas en porcentaje de inhibición respecto al estímulo con LPS 1µg/mL. Todos los resultados están expresados como la media ± SEM de tres experimentos independientes por condición. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. A, B, D y E, \*P<0.05 respecto al grupo control; #p<0.05 respecto al estímulo LPS; C y F, \*P<0.05 respecto al grupo sin asma.

### 5.3 La expresión de MUC1 en neutrófilos es menor en asmáticos corticorresistentes y correlaciona con la reversibilidad tras el tratamiento

Una vez caracterizados los pacientes corticorresistentes y observada la menor sensibilidad a corticoides de sus neutrófilos *in vitro*, se procedió a analizar la posible asociación de la expresión de MUC1 con la respuesta a corticoides. Se aisló el ARN total de los neutrófilos de sangre periférica procedente de pacientes sanos (n=13), asmáticos respondedores (n=12) y asmáticos corticorresistentes (n=9). La expresión del ARNm de MUC1 se cuantificó mediante PCR a tiempo real. Como se desprende

de la **Figura 4.2 A** la expresión del ARNm de MUC1 fue significativamente menor en pacientes asmáticos no respondedores si la comparamos con el grupo de sujetos sanos, y aunque no hubo una diferencia significativa entre los asmáticos respondedores y corticorresistentes, sí que se observa una correlación positiva entre la expresión de MUC1 y la reversibilidad ( $\Delta\%FEV_1$ ) tras el tratamiento con corticoides (**Figura 4.2 B**).



**Figura 5.2** La expresión de MUC1 está disminuida en neutrófilos de asmáticos corticorresistentes y correlaciona con la reversibilidad tras el tratamiento con corticoides. **A**, expresión del ARNm de MUC1 en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos ( $n= 14$ ), asmáticos respondedores ( $n= 13$ ) y asmáticos corticorresistentes ( $n= 9$ ). **B**, correlación entre la expresión génica de MUC1 y la reversibilidad ( $\Delta\%FEV_1$ ) tras la prueba de broncodilatación para cada paciente asmático. Los datos están expresados como el ratio respecto a los niveles del ARNm de GAPDH y se representan como barras proporcionales a la media  $\pm$  SEM o símbolos. Los valores  $P$  se obtuvieron por el test de Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's post-hoc. Las correlaciones se establecieron mediante el coeficiente  $\rho$  de Spearman.

#### 5.4 El silenciamiento de MUC1 reduce el efecto anti-inflamatorio de la dexametasona sobre la adhesión y la migración de células inflamatorias.

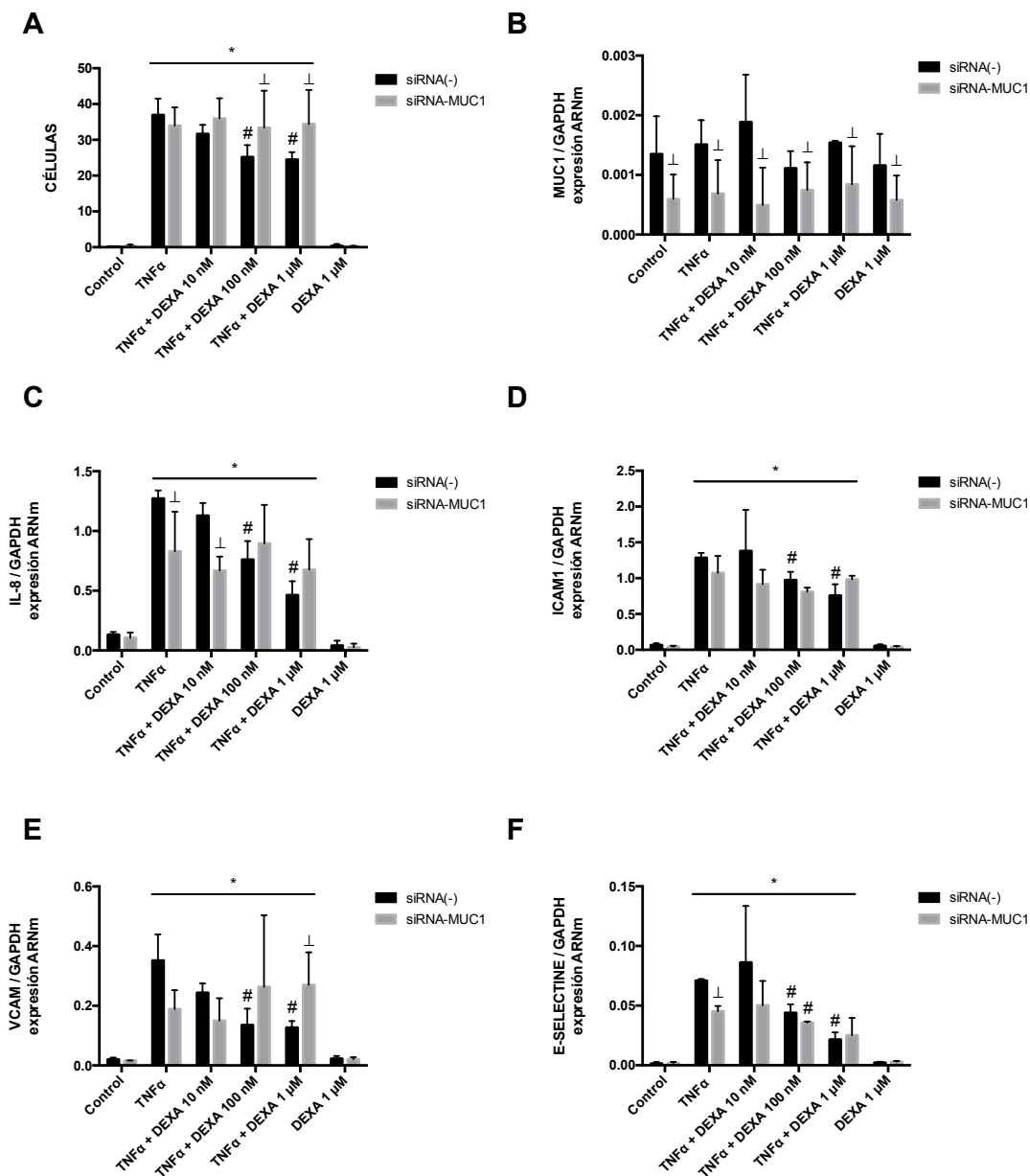
Una vez correlacionada la menor expresión de MUC1 con la corticorresistencia en neutrófilos, era necesario determinar su implicación en la capacidad de los corticoides para reducir la inflamación en el contexto del asma. En este sentido uno de los procesos más determinantes es la adhesión y migración quimiotáctica de

células inflamatorias desde el torrente sanguíneo al tejido pulmonar. Así que se propuso analizar la importancia de MUC1 en la capacidad de los corticoides para inhibir los procesos de adhesión y migración de células inflamatorias *in vitro*.

Para simular la menor expresión de MUC1 en el endotelio se empleó una línea de células endoteliales de microvasos pulmonares (HMVEC-L) silenciadas para MUC1 mediante ARN interferente (siRNA-MUC1). El ensayo de adhesión consistió en la técnica de *Flow Chamber* por la que células inflamatorias en suspensión, en este caso la línea celular tipo monocito U937, son perfundidas sobre una monocapa de endotelio y se contabilizan el número de células adheridas. Previamente al ensayo, las monocapas de HMVEC-L-siRNA-MUC1 o siRNA(-) fueron tratadas con 2.5 ng/ml de Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) durante 24 horas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dexametasona (10 nM - 1  $\mu$ M). Tras perfundir y contabilizar las células U937 adheridas en cada condición, las monocapas de HMVEC-L fueron lavadas y lisadas para extraer ARN y analizar la expresión de marcadores inflamatorios por RT-PCR.

En la **Figura 5.3 A** se observa como el número de monocitos U937 adheridos disminuye significativamente en presencia de dexametasona en las monocapas HMVEC-L-siRNA(-), en cambio cuando se silencia MUC1 la adhesión se mantiene en los mismos niveles que el estímulo inflamatorio TNF $\alpha$ . Este hecho concuerda con la expresión génica de marcadores inflamatorios. En primer lugar, la **Figura 5.3 B** confirma que la expresión de MUC1 en las monocapas HMVEC-L-siRNA-MUC1 está silenciada y significativamente disminuida respecto al silenciamiento negativo. De la **Figura 5.3 C** se desprende que la expresión de la interleuquina inflamatoria IL-8 es inducida por TNF $\alpha$  y que es inhibida por dexametasona de forma dosis dependiente, aunque sólo de manera significativa en el caso de HMVEC-L-siRNA(-). Un efecto similar se observa en el caso de proteínas de adhesión como ICAM1, VCAM y E-Selectina (**Figura 5.3 D-F**), cuya expresión es significativamente inducida por TNF $\alpha$  e inhibida proporcionalmente a la concentración de dexametasona en el caso de monocapas HMVEC-L-siRNA(-). Estos patrones de expresión de proteínas de adhesión celular concuerdan con la adhesión de los monocitos U937 en la técnica de flow chamber, observándose en todo momento que las monocapas HMVEC-L-siRNA-MUC1 son insensibles al efecto anti-inflamatorio de la dexametasona. Cabe

destacar además que el silenciamiento de MUC1 parece reducir significativamente la expresión de IL-8 y E-Selectina inducida por TNF $\alpha$  respecto a siRNA(-), pero sin dejar de estar claramente aumentada respecto al control (Figura 5.3 C y F).

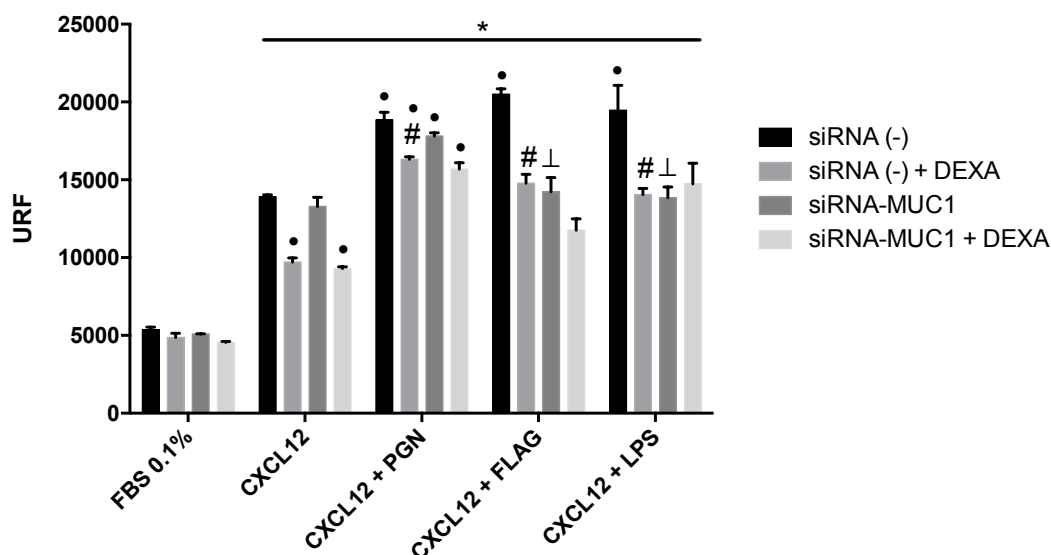


**Figura 5.3** El silenciamiento de MUC1 en células endoteliales HMVEC-L reduce el efecto anti-inflamatorio de la dexametasona sobre la adhesión celular. Las células endoteliales HMVEC-L se cultivaron en placas de 35 mm de diámetro formando una monocapa y se silenciaron para MUC1 mediante ARN interferente (siRNA-MUC1) o con silenciamiento control (siRNA(-)). Las monocapas fueron incubadas con 2.5 ng/ml de TNF $\alpha$  durante 24 horas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de dexametasona (10 nM - 1  $\mu$ M). A, las placas de HMVEC-L tratadas se montaron en la flow chamber y se les perfundió una solución

---

de monocitos U937 ( $10^6$  células/ml) a un flujo constante de 0.1 ml/min durante 5 minutos. Pasado este tiempo se hicieron tomas sobre 5 planos diferentes de cada monocapa con un microscopio Nikon Eclipse TE200 y se contabilizaron las células totales adheridas. **B-F**, seguidamente las monocapas se perfundieron con PBS para limpiar los monocitos adheridos y se lisaron para aislar ARN mediante un kit comercial. Se analizó la expresión de **B) MUC1**, **C) IL-8**, **D) ICAM1**, **E) VCAM** y **F) E-Selectina**. Los datos corresponden al ratio respecto a los niveles del ARNm de GAPDH. Todos los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes por condición. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0.05$  respecto al control dentro del mismo grupo; # $P < 0.05$  respecto al estímulo  $TNF\alpha$ .  $\perp P < 0.05$  respecto al grupo siRNA(-).

Con el fin de mimetizar la menor expresión de MUC1 en células inflamatorias, se empleó la línea celular tipo monocito U937 para silenciar MUC1 mediante ARN interferente (siRNA-MUC1). Se realizó un ensayo de migración quimiotáctica empleando la quimiocina CXCL12 junto con agonistas de TLR de membrana (lipopolisacárico, peptidoglicano y flagelina) y en presencia o ausencia de dexametasona durante 6 horas. En la **Figura 5.4** se observa como, a diferencia de las células con silenciamiento negativo (siRNA(-)), las células siRNA-MUC1 estimuladas con agonistas de los TLR no muestran una reducción significativa de la migración en presencia de dexametasona. Cabe destacar que el silenciamiento de MUC1 parece inhibir significativamente el incremento de la migración por flagelina y LPS, así como no parece afectar a la capacidad quimio-atrayente del CXCL12 y su inhibición por dexametasona.



**Figura 5.4** Las células U937-siRNA-MUC1 son insensibles al efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la migración quimiotáctica. Las células tipo monocito U937 fueron silenciadas para MUC1 mediante ARN interferente (siRNA-MUC1) o con silenciamiento control (siRNA(-)). Se realizó un ensayo de migración quimiotáctica a través de membranas de policarbonato con un poro de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. La migración basal se determinó a una concentración de 0.1% FBS, el estímulo quimio-atrayente fue la quimiocina CXCL12 (20 nM) y los estímulos inflamatorios fueron Flag (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o PGN (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se comparó la migración entre células siRNA(-) y siRNA-MUC1 en presencia o ausencia de dexametasona 1  $\mu\text{M}$  durante 6 horas. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de la fluorescencia en unidades relativas (URF) para tres experimentos independientes para cada condición. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de doble vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0.05$  respecto a FBS 0.1%; • $P < 0.05$  respecto al estímulo quimio-atrayente CXCL12; # $P < 0.05$  respecto al estímulo inflamatorio;  $\pm P < 0.05$  respecto al grupo siRNA(-).

## **CAPÍTULO 6**

### **MODELO MURINO MUC1-KO DE ASMA TRATADO CON DEXAMETASONA**





---

## MODELO MURINO MUC1-KO DE ASMA TRATADO CON DEXAMETASONA

---

### 6.1 Cuantificación del efecto de la dexametasona sobre la inflamación pulmonar en ratones asmáticos con la técnica de imagen diagnóstica PET/CT.

La combinación de la tecnología multimodal PET/CT nos permitió evaluar la progresión de la enfermedad asmática en el modelo murino, así como certificar la correcta inducción de la misma. Las imágenes de PET y CT se obtuvieron consecutivamente a día 0 (antes de la inducción de la enfermedad) y a día 27 (24 horas antes de llevar a cabo sacrificio de los ratones), siendo fusionadas, analizadas y posteriormente cuantificadas. Teniendo en cuenta el protocolo de inducción del Asma agudo, la última toma de imágenes se realizó tras tres días de exposición pulmonar a PBS (grupo control) o a la proteína Ovoalbúmina (grupo OVA) en ratones MUC1-KO y WT previamente sensibilizados. Además, dos grupos experimentales expuestos a OVA fueron tratados con Dexametasona (3 y 5 mg/kg) con el fin de comparar su efectividad anti-inflamatoria entre los dos fenotipos murinos.

En la **Figura 6.1** observamos una representación cualitativa (A) y cuantitativa (B) de la técnica de imagen PET en el modelo murino de Asma. Se analizaron tres planos de la región torácica en cada imagen anatómica obtenida: el plano frontal, sagital y transversal. Los valores de SUV (*Standard Uptake Value*) corresponden con la captación de <sup>18</sup>Fluorodesoxiglucosa en el tejido. En roedores sanos de pequeño tamaño el valor de captación obtenida en una región de interés (ROI) pulmonar rondaría un SUV de 0,5-0,6 tal como podemos observar en los controles de MUC1-KO y Wild Type, ambos con una n=6. En cambio, el tejido inflamado al igual que el oncológico tiene el metabolismo glucémico aumentado, así que como se desprende de las imágenes del PET, la captación de <sup>18</sup>F-FDG a nivel pulmonar en el grupo sensibilizado y estimulado con OVA fue claramente superior respecto al grupo control, para ambos fenotipos. Además, la cuantificación del SUV en los grupos OVA es significativamente mayor que en los controles, triplicando sus valores de media. Estos resultados validarían el modelo de inducción de Asma en los ratones tratados,

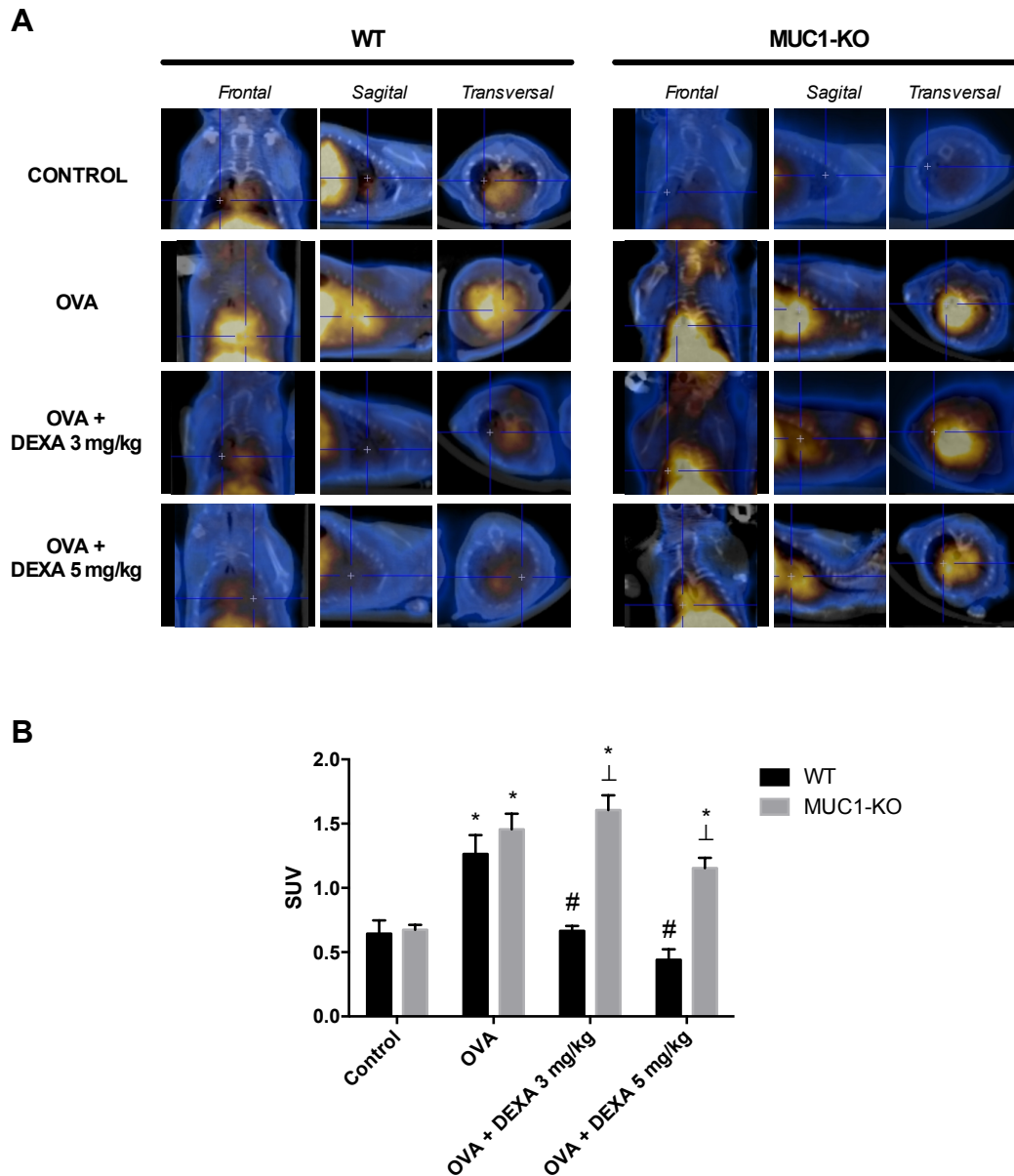
---

puesto que la inflamación pulmonar se ha incrementado de manera significativa con la exposición a OVA.

En cuanto a los grupos tratados con dexametasona, puesto que los glucocorticoides son altamente hiperglucemiantes, nuestro grupo de investigación realizó previamente un grupo control tratado con dexametasona a dosis altas (10 mg/kg). El objetivo fue comprobar que la  $^{18}\text{F}$ -FDG no estaba siendo desplazada por la glucosa endógena y garantizar que nuestra técnica de imagen no nos estaba dando falsos negativos. El tratamiento con dexametasona 10 mg/kg no supuso ningún cambio significativo en la captación pulmonar de  $^{18}\text{F}$ -FDG respecto al grupo control en ninguno de los fenotipos (datos no presentados).

En los grupos WT tratados con dexametasona (3 y 5 mg/kg) la disminución del SUV y por lo tanto de la inflamación fue significativa y dosis-dependiente, retornando a los valores del grupo control. En cambio, en los ratones MUC1-KO los valores de SUV se mantuvieron significativamente elevados respecto a sus controles y a los homólogos WT, pese al tratamiento con dexametasona.

También se llevó a cabo una cuantificación del CT en las mismas regiones de interés (ROIs) del PET (datos no presentados), en este caso la cuantificación medida en Unidades Hounsfields se mantuvo constante a lo largo del procedimiento en cada uno de los grupos de ambos fenotipos. Esto es debido a que, al ser un modelo de inflamación aguda, no da tiempo a que se produzca remodelado, alterando la morfología pulmonar. En cambio, el SUV si que se modifica porque los cambios metabólicos preceden a los morfológicos.



**Figura 6.1** La técnica PET/CT muestra que los ratones asmáticos MUC1-KO no presentan sensibilidad al efecto anti-inflamatorio de la dexametasona ligado a una disminución de la captación pulmonar de  $^{18}\text{F}$ -FDG. Para generar el modelo murino de Asma agudo, a día 0 se inició la sensibilización a OVA mediante la inyección intraperitoneal de 100  $\mu\text{g}$  de OVA conjugada con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . A día 14 se inyectó una dosis de recuerdo mediante la inyección intraperitoneal de 100  $\mu\text{g}$  de OVA conjugada con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Además, se inició la respuesta inflamatoria local mediante la infusión intranasal de 100  $\mu\text{g}$  de OVA disuelto en PBS. A día 25, 26 y 27 los grupos con tratamiento recibieron una dosis oral de Dexametasona de 3 y 5 mg/kg, 1 hora antes de la inducción propiamente dicha de la patología asmática mediante la infusión intranasal de 50  $\mu\text{g}$  de OVA. Los grupos sin tratamiento recibieron PBS. A día 27, una hora después de la infusión intranasal, se procedió a la toma de imágenes mediante PET-CT. En

la figura se muestra el análisis cualitativo y cuantitativo de la captación pulmonar de  $^{18}\text{F}$ -FDG en ratones Control ( $n=6$ ), OVA ( $n=6$ ), OVA + DEXA 3 mg/kg ( $n=6$ ), OVA + DEXA 5 mg/kg ( $n=6$ ) y DEXA 10 mg ( $n=6$ ) a día 27 tanto para el grupo WT como MUC1-KO. **A**, la figura muestra la fusión de imágenes PET/CT para un mismo sujeto representativas de los grupos experimentales en cada fenotipo. La combinación de las imágenes PET/CT permite localizar la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG por cada sujeto, situando anatómicamente las regiones hipercaptantes del pulmón. Las imágenes nos permiten visualizar los resultados obtenidos en la cuantificación. **B**, la gráfica representa la cuantificación del PET, correspondiente a la media de cuentas por voxel (cpv) corregida por peso y dosis inyectada obteniendo el SUV (Standard Uptake Value). La cuantificación se realizó mediante un ROI que engloba la región de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG por el pulmón. La media de cuentas por voxel cuantificada se corrigió mediante el cálculo de dosis inyectada corregida por el tiempo de decaimiento del radiofármaco. Los resultados se expresaron como la media +/- SEM de  $n=6$  por grupo experimental. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0.05$  respecto al control dentro del mismo fenotipo; # $P < 0.05$  respecto al grupo OVA dentro del mismo fenotipo.  $\perp P < 0.05$  respecto al grupo WT.

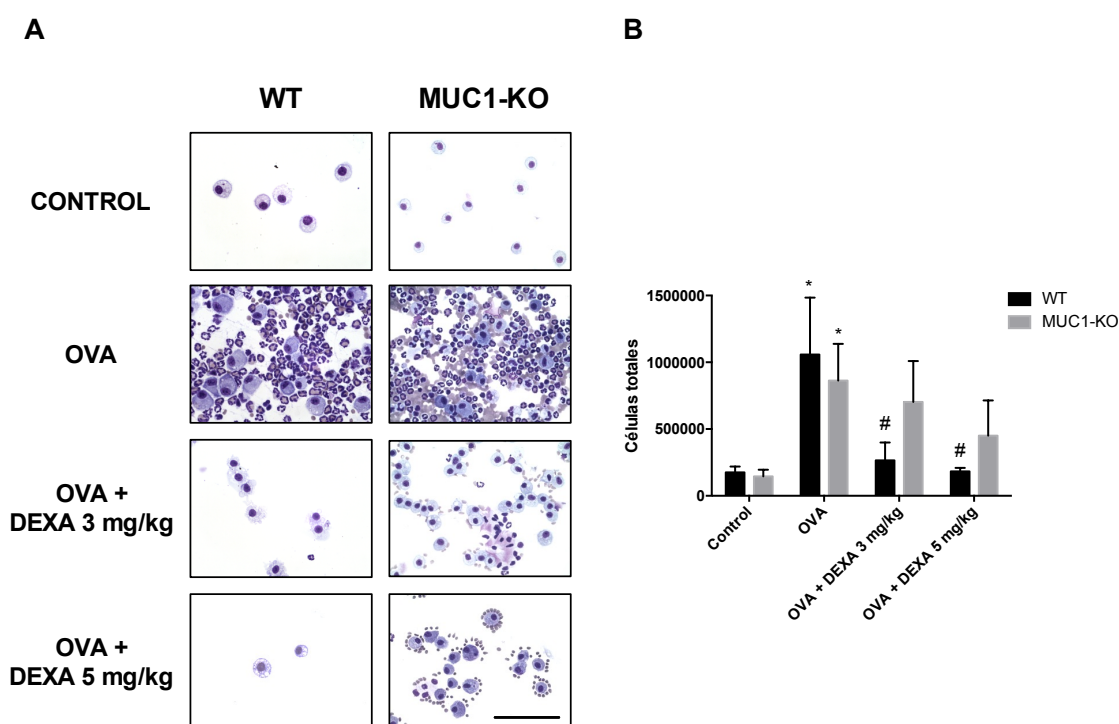
## 6.2 Los marcadores inflamatorios en el lavado broncoalveolar de ratones asmáticos MUC1-KO no se reducen con el tratamiento con dexametasona

Para determinar la respuesta inflamatoria pulmonar generada en la inducción de la enfermedad asmática y compararla con los grupos tratados con dexametasona, se realizó un lavado broncoalveolar (BAL) a todos los ratones a día 28. El BAL es un procedimiento diagnóstico mediante el que las células y componentes biológicos presentes en los espacios alveolares y bronquiales del pulmón son extraídos mediante varios lavados con solución salina (PBS). Esta técnica es de gran utilidad en el contexto del asma, puesto que una de sus principales características fisiopatológicas es el infiltrado de células inflamatorias en el tejido pulmonar.

En la **Figura 6.2** se muestran fotografías representativas de las células presentes en los BAL de cada grupo experimental, analizado mediante la técnica del citospin, que es un método de tinción diferencial que permite la observación de las células sanguíneas. Como se puede observar a simple vista, el conjunto de células presentes en los grupos control es muy reducido si lo comparamos con el grupo OVA, en ambos fenotipos. Esta diferencia cuadra con la figura, que muestra que el contaje de

células totales en los grupos OVA es significativamente mayor a los controles. Puesto que los ratones han sido sensibilizados a la Ovoalbúmina, la exposición repetida a este antígeno a nivel pulmonar desencadena la infiltración de células inflamatorias.

En cambio, los ratones WT tratados con dexametasona muestran una reducción significativa y dosis-dependiente del número de células totales. Mientras que los ratones MUC1-KO tratados con dexametasona, aunque sí muestran una reducción visible del número total de células, las diferencias respecto a su grupo OVA no son significativas como en los WT. La menor respuesta a dexametasona es todavía más evidente si comparamos los grupos tratados con dexametasona entre ambos fenotipos.

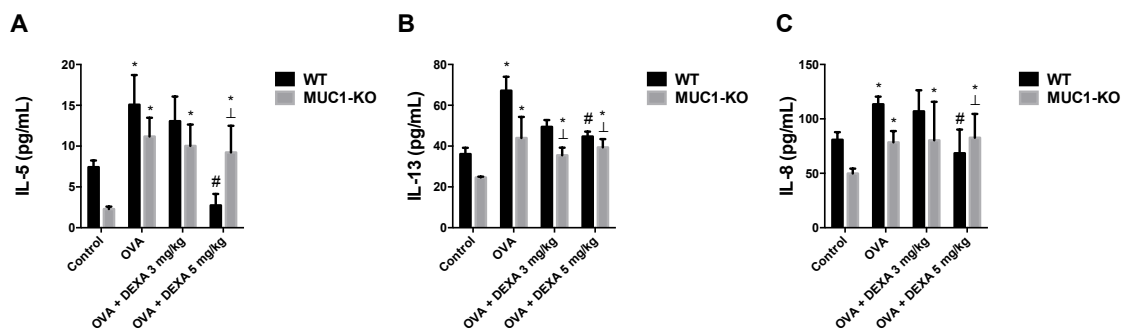


**Figura 6.2** La reducción del número de células totales en los BAL de ratones MUC1-KO asmáticos tratados con dexametasona no es significativa. A día 28, los pulmones de los ratones Control (n=6), OVA (n=6) OVA + DEXA 3 mg/kg (n=6) y OVA + DEXA 5 mg/kg (n=6) de ambas cepas se lavaron por triplicado con 0,6 ml de PBS. A, 100  $\mu$ l de cada BAL se emplearon para realizar un citospin y hacer una tinción diferencial de panóptico rápido. Se muestran fotografías representativas de cada grupo experimental. La barra de escala = 50  $\mu$ m. B, las barras representan la media  $\pm$  SEM del número de células totales contadas en cámara Bürker con Azul de tripano, ajustado en función del volumen total de BAL. Las comparaciones

*fueron analizadas mediante test ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P < 0.05 respecto al control dentro del mismo fenotipo; #P < 0.05 respecto al grupo OVA dentro del mismo fenotipo.*

Por otro lado, el sobrenadante del BAL se utilizó para cuantificar la concentración de citoquinas inflamatorias, que es un marcador de gran valor diagnóstico en la progresión del Asma. Estas moléculas son clave en la fisiopatología del asma. Así, por ejemplo, la interleuquina 5 (IL-5) actúa como mediador en la activación de los eosinófilos, que es el tipo celular más abundante en procesos de tipo alérgico como el desarrollado en este modelo contra la Ovoalbúmina. La interleuquina 13 (IL-13) se encarga de inducir la expresión de moco y proteinasas, como parte de un mecanismo de aclaramiento que protege el parénquima pulmonar de una inflamación excesiva. Mientras que la interleuquina 8 (IL-8) promueve la extravasación de células inflamatorias hacia el tejido pulmonar, actuando como quimioatrayente de neutrófilos y aumentando la permeabilidad del endotelio.

En la **Figura 6.3** se representan las concentraciones de las interleuquinas IL-5, IL-13 e IL-8 en el sobrenadante del BAL, obtenidas mediante la técnica ELISA. Como se desprende de los gráficos, los grupos OVA muestran un aumento significativo de las tres interleuquinas respecto al control. En el caso de los ratones WT la administración de dexametasona a 3 mg/kg no redujo de forma estadísticamente significativa la concentración de ninguna de las citoquinas analizadas, en cambio con una dosis de 5 mg/kg sí que hubo una reducción significativa en todas ellas, alcanzando niveles similares a los controles (IL-13 e IL-8) o incluso inferiores (IL-5). En cambio, los ratones MUC1-KO no mostraron una reducción significativa en la concentración de interleuquina en ningún caso, ni siquiera a una dosis de dexametasona de 5 mg/kg. De hecho, se observan diferencias significativas entre ambos fenotipos en los grupos DEXA 5 mg/kg.



**Figura 6.3** La concentración de IL-5, IL-13 e IL-8 en los BAL de ratones asmáticos tratados con dexametasona no disminuye de manera significativa en el fenotipo MUC1-KO. Las concentraciones de las interleuquinas A, IL-5, B, IL-13 y C, IL-8 en el sobrenadante de los BAL Control (n=6), OVA (n=6) OVA + DEXA 3 mg/kg (n=6) y OVA + DEXA 5 mg/kg (n=6) de ambas cepas se midieron por duplicado mediante kits ELISA comerciales. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0.05$  respecto al control dentro del mismo fenotipo; # $P < 0.05$  respecto al grupo OVA dentro del mismo fenotipo. ⊥ $P < 0.05$  respecto al grupo WT.

### 6.3 La inflamación del tejido pulmonar en ratones asmáticos MUC1-KO no se resuelve tras el tratamiento con dexametasona

Como hemos visto la técnica de imagen diagnóstica PET/CT y el análisis de marcadores inflamatorios en el lavado broncoalveolar han demostrado la validez del modelo murino de Asma agudo, que mimetiza las características del asma humano. En conjunto hemos observado una mayor inflamación pulmonar en los grupos OVA, con incremento de captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG en la región pulmonar y un BAL con más presencia de células inflamatorias y concentración de interleuquinas inflamatorias. Mientras que la inducción del modelo de asma agudo ha sido similar entre los ratones WT y MUC1-KO, el efecto anti-inflamatorio de la dexametasona oral ha sido en comparación inexistente o muy reducido en el fenotipo MUC1-KO. Así pues, el siguiente paso fue analizar las muestras de tejido pulmonar y consolidar la evidencia encontrada hasta ahora.

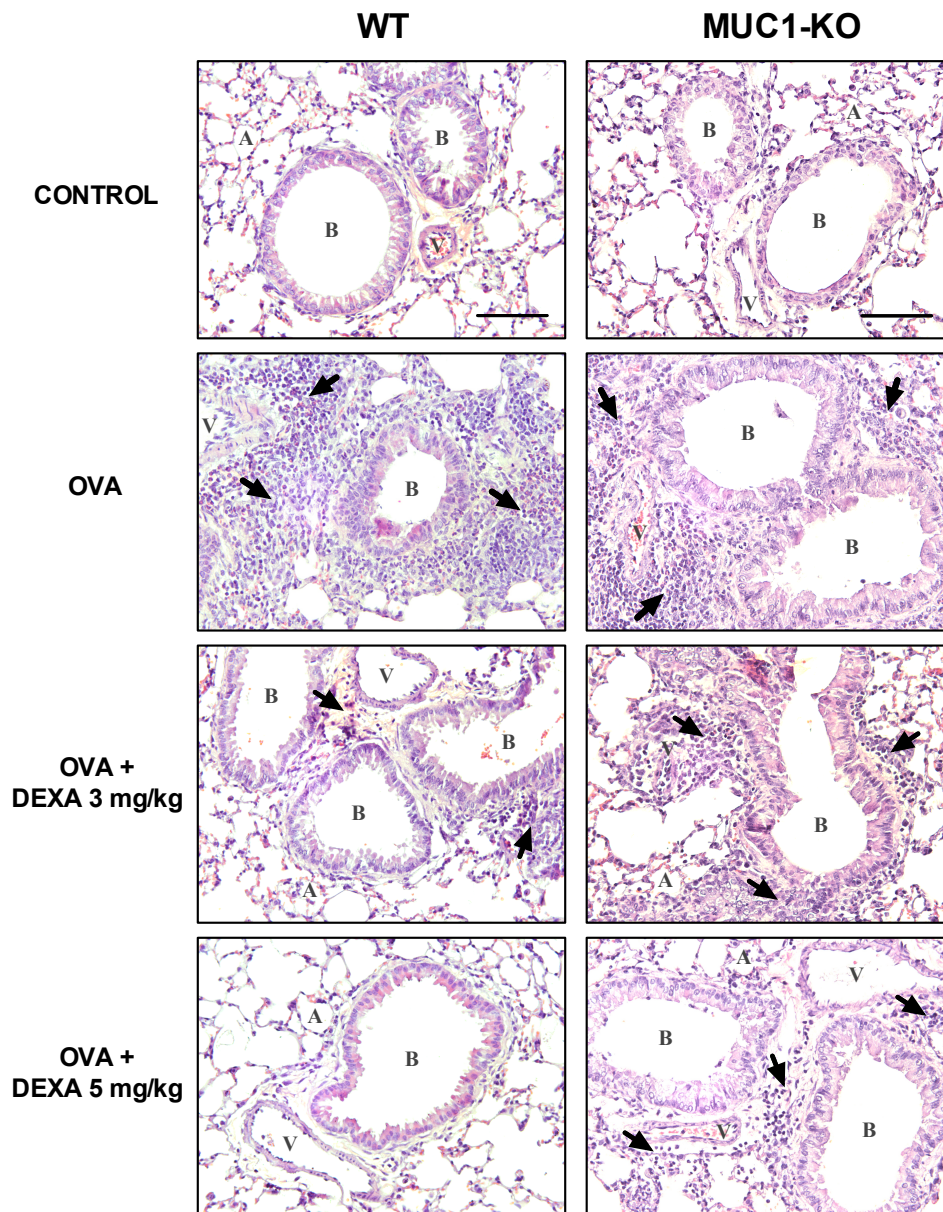
Tras el sacrificio de los animales uno de los pulmones se fijó en formaldehído 4% para realizar cortes histológicos. En la **Figura 6.4** observamos fotografías representativas de la morfología del parénquima pulmonar. Los controles presentan una anatomía normal llena de espacios aéreos limpios, con bronquiolos (B) cubiertos

---

por un epitelio cuboidal, flanqueados por vasos sanguíneos (V) y rodeados por alveolos (A). En cambio, el parénquima pulmonar del grupo OVA muestra numerosos cúmulos de células inflamatorias extravasadas (Flechas) de los vasos sanguíneos, que invaden las membranas basales de los bronquiolos. Estas células son principalmente eosinófilos, que se distinguen por su núcleo poli-lobulado y un citoplasma rojizo. Además, se observa un engrosamiento de las paredes de los bronquiolos por un incremento en el número y tamaño de las células epiteliales (hiperplasia). Las células epiteliales de los bronquiolos coexisten con células de Clara no ciliadas que secretan surfactante pulmonar y mucinas MUC5AC y MUC5B. En este caso no se observan secreciones mucosas en el lumen bronquial, seguramente debido al lavado broncoalveolar previo a la fijación del tejido.

En los grupos tratados con dexametasona observamos una disminución dosis-dependiente de las características histopatológicas de los grupos OVA. Esta disminución atañe principalmente a las infiltraciones de células inflamatorias (flechas). En el parénquima de los ratones WT la dexametasona 3 mg/kg reduce los cúmulos de células inflamatorias a meros residuos, mientras que la dexametasona 5 mg/kg los previene por completo. Los epitelios todavía muestran cierta hiperplasia respecto a los controles, pero menos acusada que en el grupo OVA. Sin embargo, en comparación con los WT, los ratones MUC1-KO muestran mayor número de infiltraciones de células inflamatorias, así como una hiperplasia más acusada del epitelio bronquial. Estas diferencias son especialmente evidentes entre los grupos tratados con dexametasona 5 mg/kg.





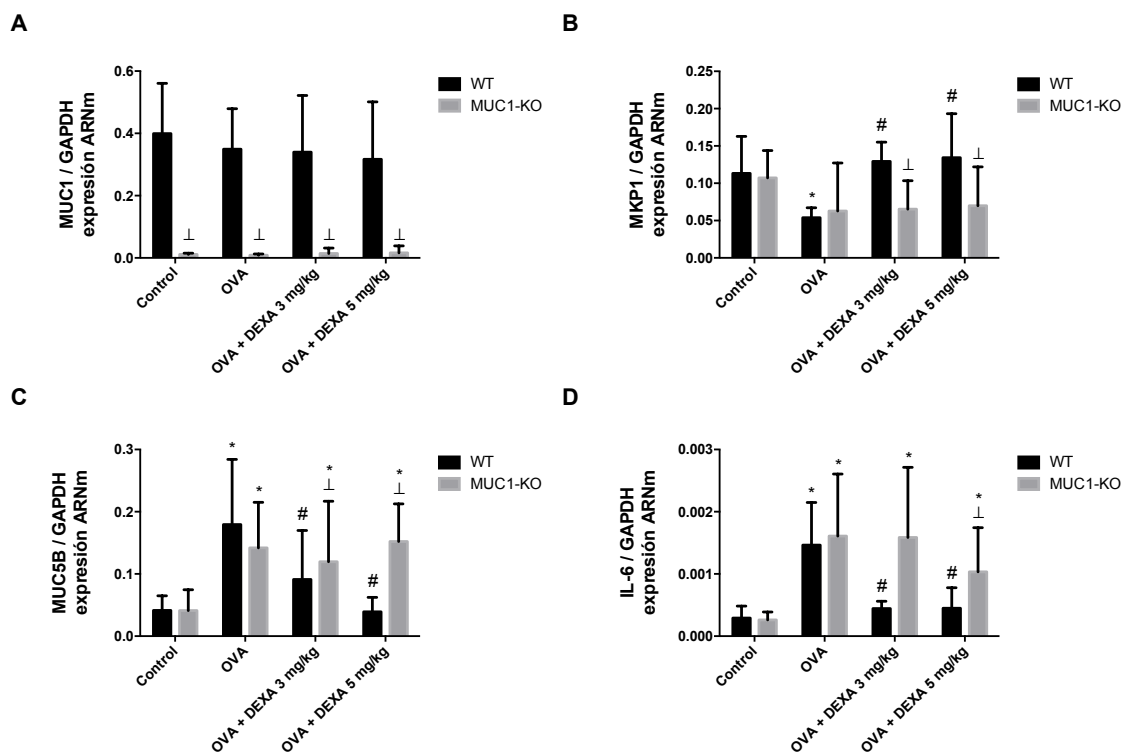
**Figura 6.4** Los cortes histológicos del tejido pulmonar de ratones asmáticos MUC1-KO muestran más inflamación que los WT tras el tratamiento con dexametasona. Las fotografías corresponden a cortes histológicos representativos, teñidos por el protocolo de Hematoxilina-Eosina y visualizados con un objetivo 20x. La barra de escala corresponde a 200  $\mu$ m. A = Alveolo; B = Bronquiolo; V = Vaso sanguíneo;  $\rightarrow$  = Infiltraciones de células inflamatorias.

La evidencia experimental demuestra que los ratones asmáticos MUC1-KO son menos sensibles al efecto anti-inflamatorio de la dexametasona que los WT. Teniendo en cuenta los mecanismos moleculares que relacionan MUC1 con la efectividad de los corticoides descritos por Milara *et al.*<sup>216</sup>, el siguiente paso fue

---

analizar marcadores inflamatorios y de corticorresistencia en el tejido pulmonar que corroboren la implicación directa de MUC1.

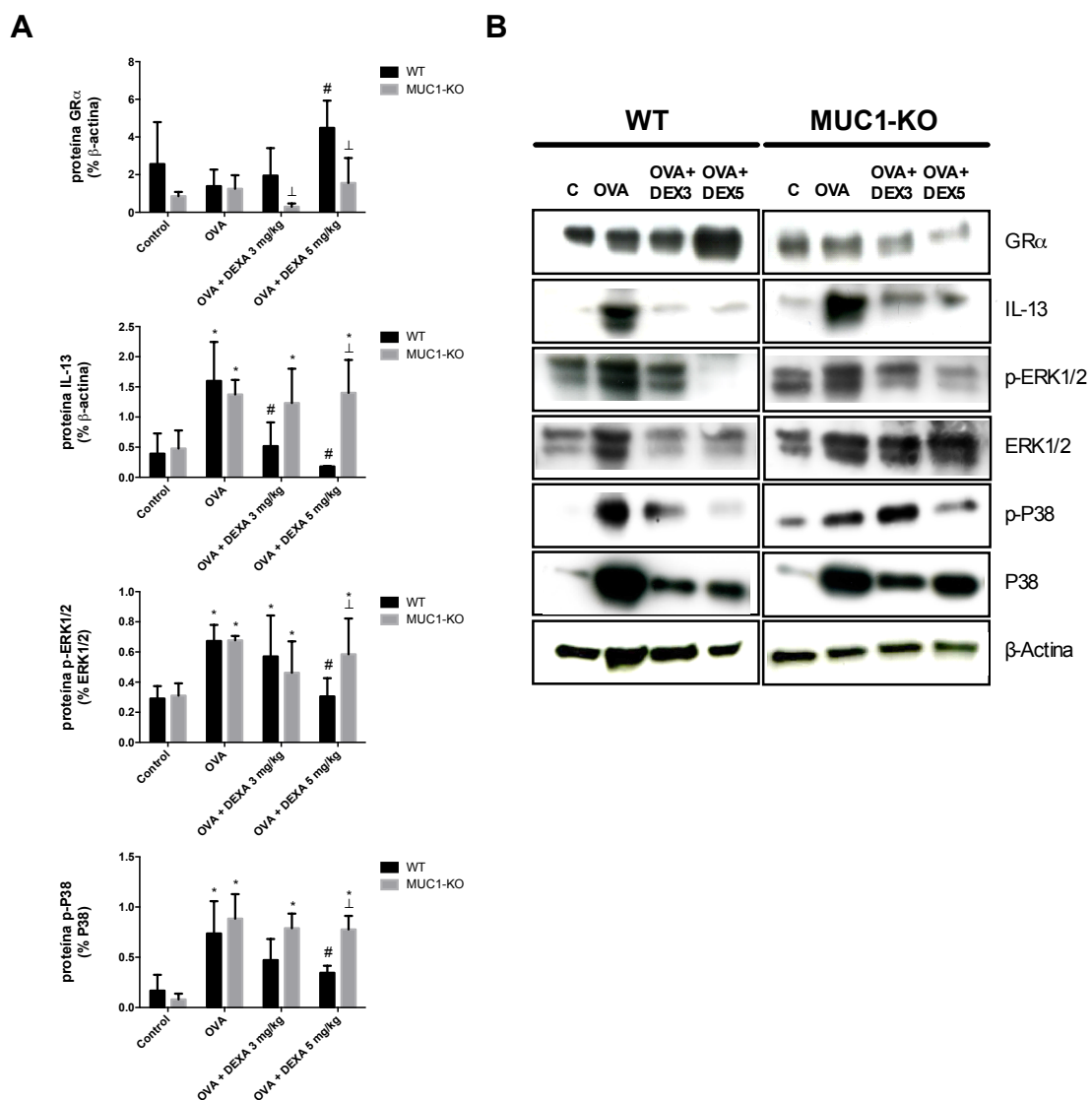
El análisis de la expresión génica en el tejido pulmonar de los ratones modelo mostró en primer lugar que la expresión de MUC1 en los Knock Out está efectivamente inhibida en todos los sujetos en comparación con los WT (**Figura 6.5 A**). MAP Kinasa fosfatasa 1 (MKP-1) es un gen anti-inflamatorio inducido por los elementos GRE tras la unión del GR $\alpha$  activado, de manera que su expresión es un indicador de la efectividad de los corticoides. En condiciones inflamatorias la expresión de MKP1 se ve reducida, como se observa en el grupo OVA de ratones WT (**Figura 6.5 B**). En cambio, el tratamiento con dexametasona revirtió el efecto de la inflamación e indujo la expresión de MKP1 de forma significativa en ratones WT. Estos cambios no se observan en los ratones MUC1-KO, cuya expresión de MKP1 no se ve alterada por dexametasona. En el apartado de la histología se ha comentado que las células de Clara no ciliadas secretan mucosidad, pero no se observó en el lumen bronquial debido al lavado broncoalveolar. El análisis de expresión génica muestra que efectivamente las condiciones inflamatorias inducidas por OVA como alérgeno incrementaron significativamente la secreción de mucina 5B (MUC5B) (**Figura 6.5 C**), un componente fundamental del moco bronquial. Además, la dexametasona revierte la expresión de MUC5B de manera dosis-dependiente en los ratones WT, hasta alcanzar niveles del grupo control. Los ratones MUC1-KO en cambio no muestran ninguna reducción en presencia de dexametasona. Por otro lado, la citoquina inflamatoria Interleuquina 6 (IL-6) actúa como marcador inflamatorio, al ser secretada por células inmunitarias y epiteliales respiratorias en respuesta a alérgenos. Así pues, en los grupos OVA la expresión de IL-6 (**Figura 6.5 D**) está significativamente incrementada, mientras que el tratamiento con dexametasona en el fenotipo WT reduce dicha expresión a niveles del control. De nuevo los ratones MUC1-KO tratados no muestran ninguna reducción significativa respecto al grupo OVA.



**Figura 6.5** La expresión génica en tejido pulmonar de ratones asmáticos muestra la insensibilidad del fenotipo MUC1-KO a dexametasona. A día 28, el ARN total del tejido pulmonar de ratones Control ( $n=6$ ), OVA ( $n=6$ ) OVA + DEXA 3 mg/kg ( $n=6$ ) y OVA + DEXA 5 mg/kg ( $n=6$ ) de ambas cepas, se extrajo mediante Trizol y se analizó mediante RT-PCR. Las barras representan la expresión del ARNm de **A**, MUC1, **B**, MKP1, **C**, MUC5B y **D**, IL-6. Los datos corresponden al ratio respecto a los niveles del ARNm de GAPDH. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0.05$  respecto al grupo control dentro del mismo fenotipo; # $P < 0.05$  respecto al grupo OVA dentro del mismo fenotipo.  $\perp P < 0.05$  respecto al fenotipo WT.

El siguiente nivel de expresión fue el proteico, que permite analizar fenómenos post-transcripcionales implicados en la mecánica molecular de los corticoides. El receptor de glucocorticoides  $\alpha$  se une a los corticoides y actúa como factor de transcripción, de manera que es un buen marcador de la efectividad de los corticoides. En la **Figura 6.6** se representa la cuantificación por Western Blot de la proteína  $GR\alpha$  en el tejido pulmonar de los ratones asmáticos. Se desprende que la cantidad de  $GR\alpha$  en el fenotipo WT aumenta significativamente con dexametasona 5 mg/kg, mientras que en los ratones MUC1-KO no solo no hay inducción, si no que los niveles de  $GR\alpha$  son más bajos. La expresión de IL-13 como marcador inflamatorio concuerda con los

resultados observados en el lavado broncoalveolar. Por otro lado, la forma fosforilada de las quinasas ERK1/2 y p38 median las cascadas de señalización inducidas por estímulos inflamatorios, de manera que analizamos el grado de fosforilación de estas proteínas como medida de la efectividad anti-inflamatoria de la dexametasona. En ambas proteínas se observa que la forma fosforilada aumenta significativamente en los grupos OVA, mientras que el tratamiento con dexametasona la reduce de forma dosis-dependiente en los WT, aunque sólo de manera significativa con la dosis 5 mg/kg. Sin embargo, en los ratones MUC1-KO no se produce una reducción significativa de la fosforilación de ERK1/2 y p38 con el tratamiento.



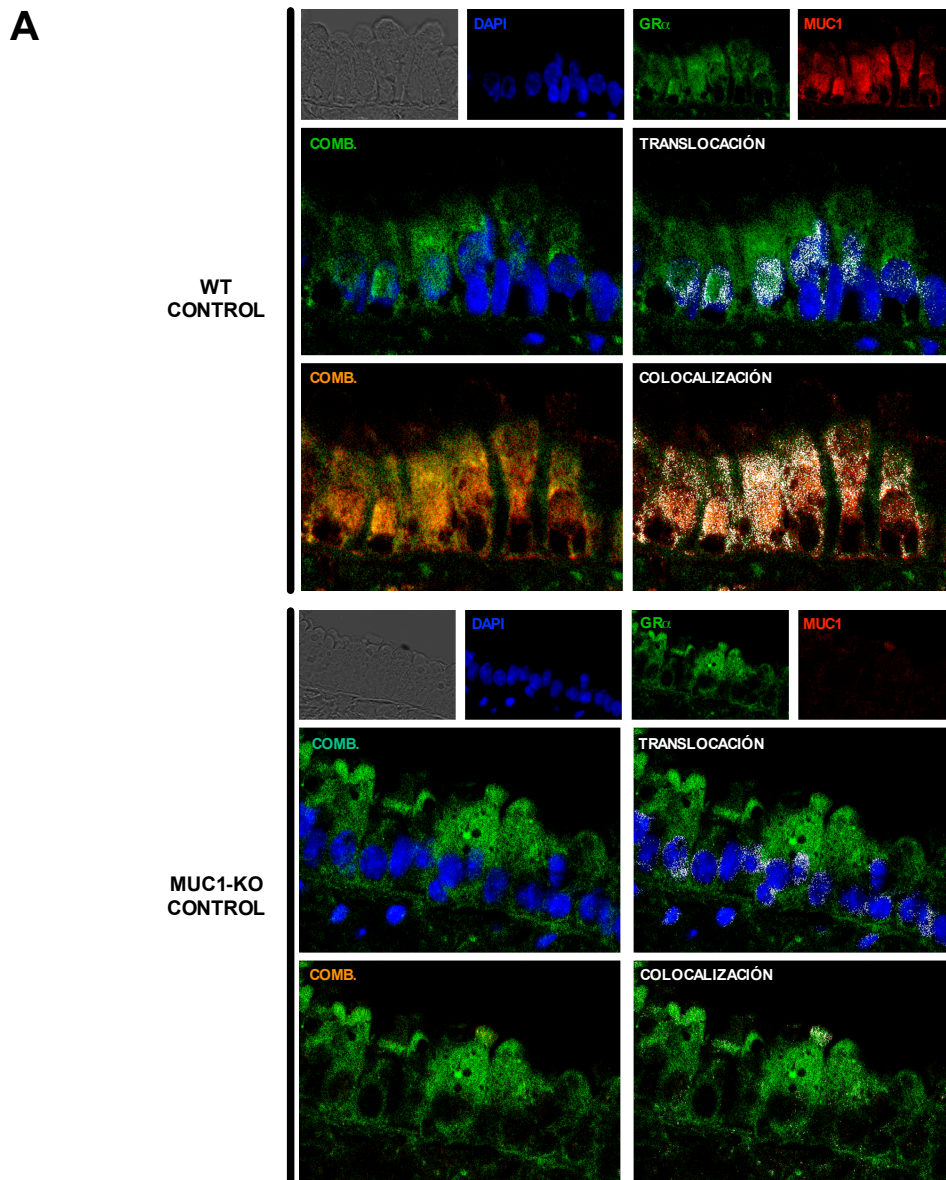
**Figura 6.6** La expresión proteica y la fosforilación de quinasas confirman la insensibilidad del fenotipo MUC1-KO a dexametasona. Se extrajo la proteína total del tejido pulmonar de ratones Control (n=6), OVA (n=6) OVA + DEXA 3 mg/kg (n=6) y OVA +

DEXA 5 mg/kg ( $n=6$ ) de ambas cepas. Se midieron mediante western los niveles de las proteínas GR $\alpha$  e IL-13, y el grado de fosforilación de ERK1/2 y p38. **A**, los diagramas de barras representan los datos de densitometría en porcentaje respecto a los niveles de  $\beta$ -Actina, ERK1/2 y p38, respectivamente. **B**, se muestran western blots representativos de las proteínas analizadas y sus respectivos controles endógenos. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0.05$  respecto al grupo control dentro del mismo fenotipo; # $P < 0.05$  respecto al grupo OVA dentro del mismo fenotipo.  $\perp P < 0.05$  respecto al fenotipo WT.

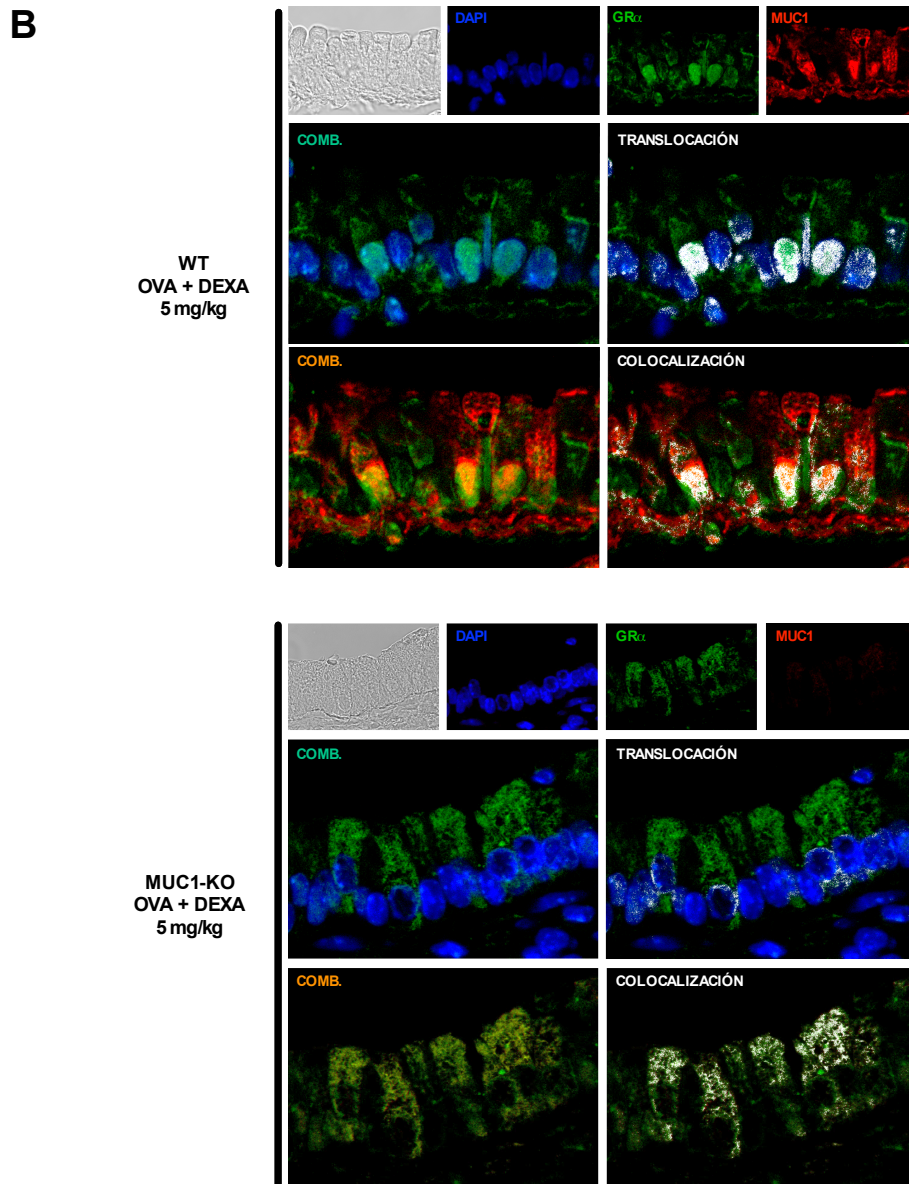
#### 6.4 La translocación nuclear del GR $\alpha$ inducida por dexametasona está inhibida en ratones MUC1-KO

En Milara J et al.<sup>216</sup> se proporcionó una primera evidencia de la unión constitutiva de MUC1-CT y GR $\alpha$ , que ejerce un rol protector contra la fosforilación inhibitoria del residuo serina-226 en GR $\alpha$ . Además, la exposición a Dexametasona promueve la translocación nuclear del complejo de transcripción MUC1-CT-GR $\alpha$  para inducir sus efectos anti-inflamatorios. Estos resultados se observaron en células epiteliales primarias de pacientes con Polipósis Nasal, sugiriendo que aquellos pacientes resistentes a corticoides expresan menos complejos MUC1-CT-GR $\alpha$ . En este sentido, se quiso determinar si en el epitelio respiratorio de ratones defectivos en MUC1 también disminuía la translocación nuclear de GR $\alpha$  inducida por el tratamiento con dexametasona. En la **Figura 6.7** se observan imágenes representativas de co-inmunofluorescencias confocales de MUC1 y GR $\alpha$  en tejido pulmonar de ratones control y tratados con dexametasona 5 mg/kg, para las cepas WT y MUC1-KO. Las regiones analizadas corresponden al epitelio respiratorio bronquial. Los citofluorogramas bidimensionales muestran la co-localización (blanco) de GR $\alpha$  (verde) con las regiones nucleares (azul), de manera que en ambos controles (**Figura 6.7 A**) GR $\alpha$  permanece exclusivamente en el citoplasma y apenas se observa co-localización. En cambio, en los ratones WT tratados con dexametasona 5 mg/kg (**Figura 6.7 B**) observamos mucho más puntaje blanco en los núcleos y menos fluorescencia verde en los citoplasmas, lo que indicaría que la proteína GR $\alpha$  se ha translocado al núcleo. No obstante, en el caso de MUC1-KO (**Figura 6.7 B**) los núcleos permanecen vacíos de fluorescencia verde y por tanto no se ha producido translocación nuclear de GR $\alpha$ . En cuanto a la co-localización de MUC1 (rojo) y GR $\alpha$

(verde) observamos un patrón similar en los WT. En el control, MUC1 permanece únicamente en el citoplasma, principalmente en la región perinuclear, donde co-localiza con GR $\alpha$ . Con dexametasona la co-localización se concentra en las regiones nucleares, de manera que el complejo MUC1-GR $\alpha$  ha translocado al núcleo en respuesta al corticoide. En los ratones MUC1-KO, como sería de esperar, no se observa marcaje de la proteína MUC1 y además GR $\alpha$  sólo se observa en el citoplasma, tanto en el control como con dexametasona. Por lo tanto, los ratones MUC1-KO, al carecer de MUC1 no forman complejos proteicos de GR $\alpha$  que puedan translocar al núcleo en respuesta a corticoides.



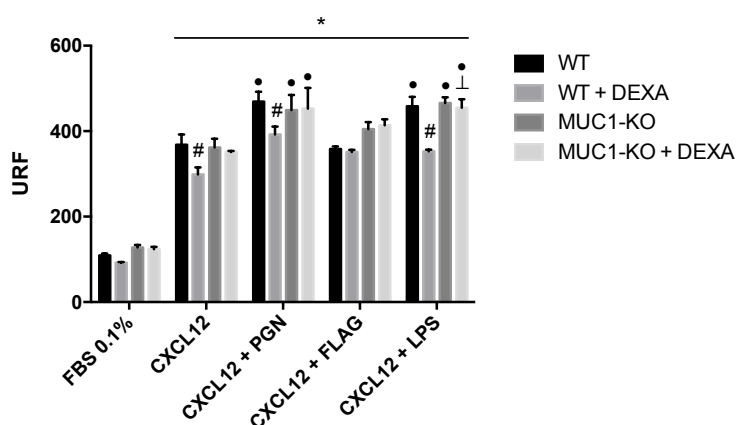




**Figura 6.7** La ausencia de MUC1 en el epitelio respiratorio de ratones KO impide la translocación nuclear de GR $\alpha$  inducida por dexametasona. Los cortes histológicos de tejido pulmonar de ratones A, Control y B, OVA + DEXA 5 mg/kg de ambas cepas, se permeabilizaron y se marcaron con anticuerpos fluorescentes contra MUC1-CT (rojo) y GR $\alpha$  (verde). Los núcleos se marcaron con colorante Dapi. La co-localización se analizó empleando un microscopio confocal Leica TCS SP2 con magnificación 1000 y zoom 3. Se muestran fotografías representativas del epitelio bronquial. La translocación nuclear (segunda línea) se ha analizado mediante citofluorogramas bidimensionales que indican los puntos de co-localización entre la señal fluorescente verde de GR $\alpha$  y las regiones nucleares marcadas con azul dapi (color blanco). Del mismo modo, se muestran citofluorogramas bidimensionales (tercera línea) con la co-localización (blanco) entre la señal fluorescente verde de GR $\alpha$  y la roja de MUC1. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

### 6.5 Los neutrófilos de ratones MUC1-KO son insensibles al efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la migración quimiotáctica

Del mismo modo que en el capítulo anterior, se analizó la capacidad de la dexametasona de inhibir la migración quimiotáctica de células inflamatorias defectivas en MUC1. En este caso se comparó la respuesta en neutrófilos aislados de médula ósea de ratones WT y MUC1-KO. Para ello se realizó un ensayo de migración quimiotáctica empleando la quimiocina CXCL12 murina junto con agonistas de TLR de membrana (lipopolisacárico, peptidoglicano y flagelina) y en presencia o ausencia de dexametasona durante 6 horas. En la **Figura 6.8** se observa como, a diferencia de los ratones WT, los neutrófilos de ratones MUC1-KO estimulados con CXCL12, PGN y LPS no mostraron una reducción significativa de la migración en presencia de dexametasona.



**Figura 6.8** Los neutrófilos de ratones MUC1-KO son insensibles al efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la migración quimiotáctica. Los neutrófilos fueron extraídos de la médula ósea de ratones control WT ( $n=3$ ) y MUC1-KO ( $n=3$ ). Se realizó un ensayo de migración quimiotáctica a través de membranas de polycarbonato con un poro de  $3 \mu\text{m}$  de diámetro. La migración basal se determinó a una concentración de 0.1% FBS, el estímulo quimio-atrayente fue la quimiocina CXCL12 murina (20 nM) y los estímulos inflamatorios fueron Flag ( $1 \mu\text{g/mL}$ ), LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) o PGN ( $10 \mu\text{g/mL}$ ). Se comparó la migración entre neutrófilos WT y MUC1-KO en presencia o ausencia de dexametasona  $1 \mu\text{M}$  durante 6 horas. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de la fluorescencia en unidades relativas (URF) para tres experimentos independientes para cada condición. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de doble vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \* $P < 0.05$  respecto a FBS 0.1%; • $P < 0.05$  respecto al estímulo quimio-atrayente CXCL12; # $P < 0.05$  respecto al estímulo inflamatorio; ± $P < 0.05$  respecto al grupo WT.



## **CAPÍTULO 7**

### **ANÁLISIS DE MARCADORES DE CORTICORRESISTENCIA EN RSC-PN Y CORRELACIÓN CON MUC4**



## ANÁLISIS DE MARCADORES DE CORTICORRESISTENCIA EN RSC-PN Y CORRELACIÓN CON MUC4

### 7.1 Caracterización de los pacientes con RSC-PN

En base a las características clínicas y el puntaje endoscópico bilateral de los Pólipos Nasales descritos en la **Tabla 7.1**, los pacientes de Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales se clasificaron en las siguientes cohortes:

- PN sin Asma y sin intolerancia a Aspirina (PN-sA; n=14)
- PN con Asma tolerante a Aspirina (PN-ATA; n=12)
- PN con Asma intolerante a Aspirina (PN-AIA; n=33)
- PN corticorresistente (PN-CR; n=22).

Cohortes	PN-sA	PN-ATA	PN-AIA	PN-CR
Número de pacientes	14	12	33	22
Media de edad en años (rango)	57.1 (39-71)	55 (41-68)	49.1 (23-73)	54.2 (26-71)
Sexo (hombre/mujer)	9/5	5/7	9/24	10/12
Asmáticos (%)	0 (0)	12 (100)	33 (100)	16 (72.2)
Intolerantes aspirina (%)	0 (0)	0 (0)	33 (100)	14 (63.6)
Atópicos (%)	5 (35.7)	4 (33.3)	15 (45.5)	8 (36.4)
Tratados con corticoides nasales (%)	14 (100)	12 (100)	33 (100)	22 (100)
Fumadores (%)	3 (25%)	2 (16.6)	6 (18.2)	3 (13.6)
Media puntaje endoscópico bilateral de PN antes del tratamiento (SEM)	5.52 (0.41)	5.72 (0.51)	5.82 (0.27)	5.58 (0.52)
Media puntaje endoscópico bilateral de PN después del tratamiento (SEM)	4.01 (0.10) *	4.11 (0.22) *	4.31 (0.12) *	5.49 (0.24) #
Variación de la media del puntaje endoscópico bilateral (SEM)	-1.51 (0.12)	-1.61 (0.30)	-1.51 (0.28)	-0.09 (0.02) #

**Tabla 7.1. Características de los pacientes con PN al inicio y tras 15 días de corticoides orales.** Los pacientes se han distribuido en sus respectivas cohortes y los datos se expresan en número de sujetos que presentan la característica indicada y su porcentaje dentro del grupo en paréntesis. Los puntajes endoscópicos bilaterales de PN se indican con su media para cada grupo y el correspondiente Error Estándar Medio (SEM) entre paréntesis. Los valores de  $P$  menores a 0.05 se consideraron significativos y se obtuvieron por el test de Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's post-hoc. \* $P < 0.05$  respecto antes del tratamiento; # $P < 0.05$  respecto el resto de cohortes.

Como se desprende de los datos de la **Tabla 7.1**, tras el tratamiento de 15 días con el corticoide oral Deflazacort, 22 pacientes se clasificaron como resistentes a corticoides puesto que la reducción de la media del puntaje endoscópico bilateral no fue superior a 1 unidad, siendo la variación media de este grupo de sólo 0.09.

A continuación, en la **Tabla 7.2** se detallan las características de los pacientes PN-CR o corticorresistentes:

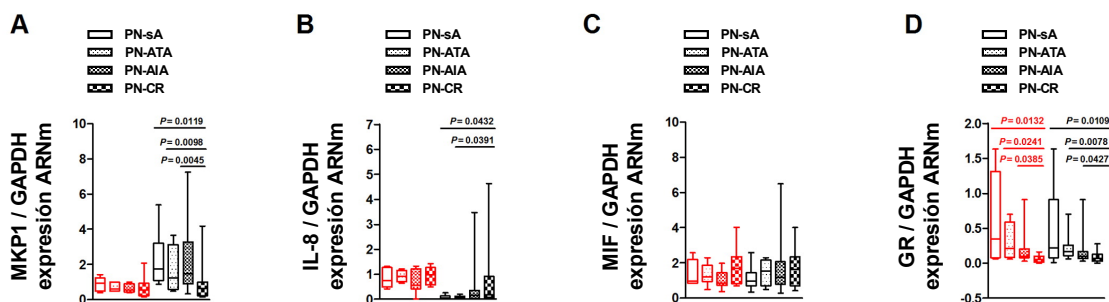
Número de pacientes totales	PN-sA (n=20)	PN-ATA (n=14)	PN-AIA (n=47)
Número de pacientes PN-CR (%)	6 (30)	2 (14.3)	14 (29.8)
Variación de la media del puntaje endoscópico bilateral (SEM)	-0.11 (0.1)	-0.09 (0.04)	-0.07 (0.05)
Media de edad en años (rango)	50.13 (26-58)	66.5 (60-71)	55.2 (34-68)
Sexo (hombre/mujer)	4/2	1/1	4/10
Asmáticos (%)	0 (0)	2 (110)	14 (100)
Intolerantes aspirina (%)	0 (0)	0 (0)	14 (100)
Atópicos (%)	2 (9.1)	1 (50)	5 (35.7)
Fumadores (%)	2	0	1

**Tabla 7.2 Características de los pacientes con PN resistentes a la terapia con corticoides orales.** Los pacientes se han dividido en sus respectivas cohortes y los datos se expresan en número de sujetos que presentan la característica indicada y su porcentaje dentro

del grupo en paréntesis. Los puntajes endoscópicos bilaterales de PN se indican con su media para cada grupo y el correspondiente Error Estándar Medio (SEM) entre paréntesis.

## 7.2 Expresión de marcadores de resistencia a corticoides

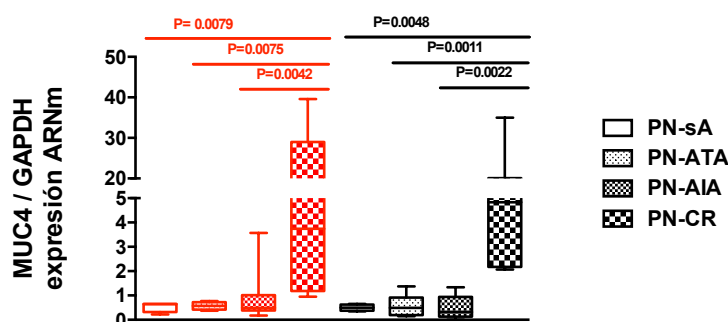
Los corticoides median algunas de sus propiedades anti-inflamatorias mediante mecanismos post-transcripcionales, incluyendo la sobre expresión de MAP [mitogen-activated protein] quinasa fosfatasa 1 (MKP1), que a su vez inhibe la activación de múltiples MAP quinasas. En este estudio, se observó una disminución en la expresión del ARNm en pólipos nasales de pacientes PN-CR comparada con PN-sA, PN-ATA y PN-AIA (**Figura 7.1 A**). Como interleucina representativa de la resistencia al efecto de los corticoides, la expresión de interleucina 8 (IL-8) fue significativamente mayor en pólipos de pacientes NP-CR comparada con PN-sA y PN-ATA, pero no con PN-AIA (**Figura 7.1 B**). Sin embargo, la expresión del Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) fue similar en todos los grupos de pacientes (**Figura 7.1 C**). Del mismo modo que MKP1, la expresión de ARNm del Receptor de glucocorticoides  $\alpha$  (GR $\alpha$ ) disminuía significativamente en NP-CR respecto al resto de grupos (**Figura 7.1 D**).



**Figura 7.1. Expresión de marcadores de resistencia a corticoides en NP de pacientes RSC-PN.** Expresión del ARNm de A) MKP1, B) IL-8, C) MIF y D) GR $\alpha$  en tejido de NP procedente de pacientes PN-sA (n= 14), PN-ATA (n= 12), PN-AIA (n= 33) and NP-CR (n= 22). Los datos están expresados como el ratio respecto a los niveles del ARNm de GAPDH y se han normalizado en función del grupo PN-sA. Los datos están representados como Diagramas de Caja que incluyen la media, el rango de cuartiles (IQR) y los valores mínimo y máximo. Los valores P se obtuvieron por el test de Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's post-hoc.

### 7.3 La expresión y distribución de MUC4 está alterada en pacientes con RSC-PN resistente a corticoides orales

Una vez caracterizadas las muestras de pólipos nasales se procedió a analizar la posible asociación de la expresión de MUC4 con la respuesta a corticoides. La expresión del ARNm de MUC4 fue significativamente mayor en los PN de pacientes PN-CR comparado con los otros grupos, tanto antes como después del tratamiento. En cambio, no se observaron diferencias entre los grupos respondedores PN-A, PN-ATA y PN-AIA (Figura 7.2).



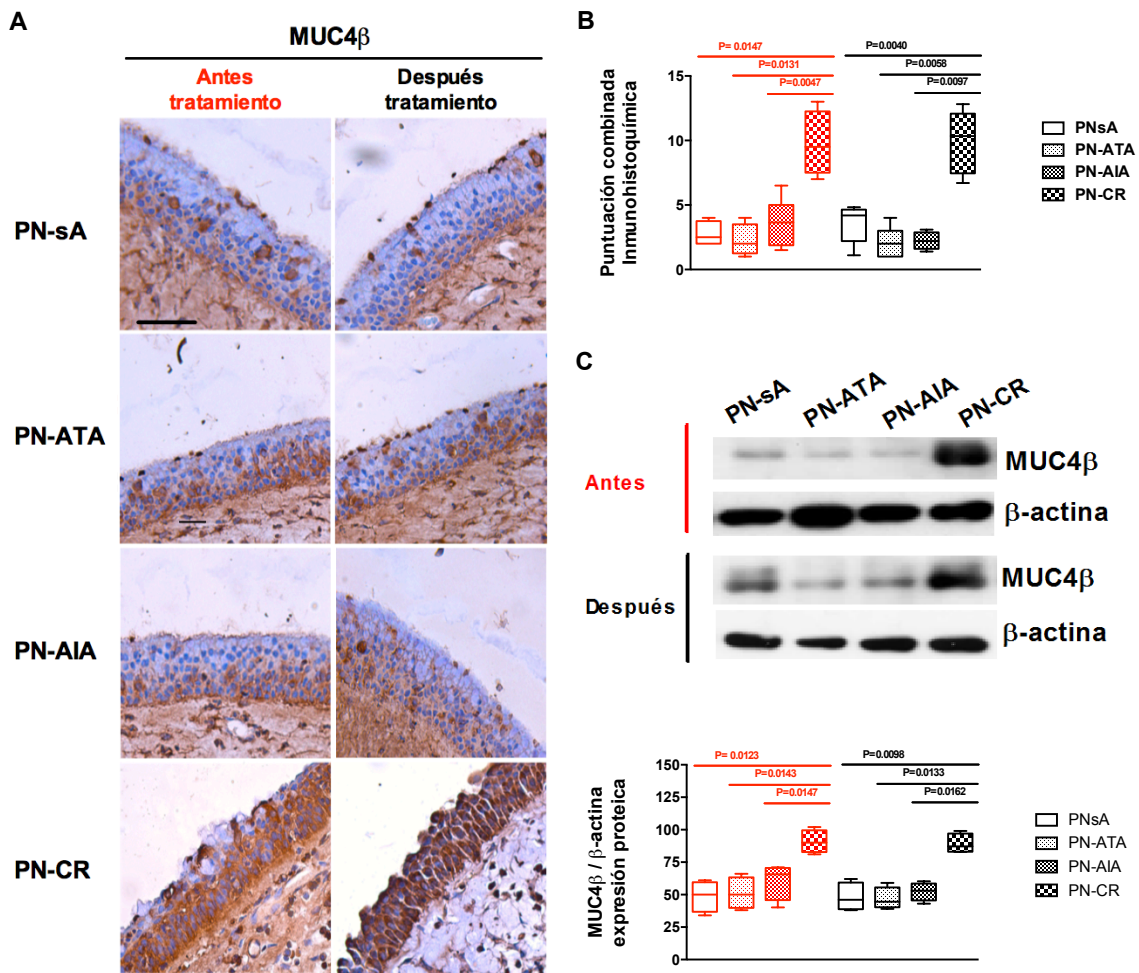
**Figura 7.2** El ARNm de MUC4 se sobre-expresa en tejido de NP de pacientes RSC-PN. Expresión del ARNm de MUC4β en tejido de NP procedente de pacientes PN-sA (n= 14), PN-ATA (n= 12), PN-AIA (n= 33) and NP-CR (n= 22). En rojo están representados los valores previos al tratamiento con corticoides, mientras que en negro se representan los valores posteriores. Los datos están expresados como el ratio respecto a los niveles del ARNm de GAPDH y se han normalizado en función del grupo PN-sA. Los datos están representados como Diagramas de Caja que incluyen la media, el rango de cuartiles y los valores mínimo y máximo. Los valores P se obtuvieron por el test de Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's post-hoc.

Además, el patrón de expresión de MUC4 fue similar entre los diferentes fenotipos de pacientes corticorresistentes, como se indica en la siguiente tabla:

	PN-sA	PN-ATA	PN-AIA
Número de pacientes PN-CR (%)	6 (30)	2 (14.3)	14 (29.8)
Media del valor $2^{-\Delta Ct}$ de expresión del ARNm de MUC4 en PN antes del tratamiento (SEM)	9.95 (2.24)	12.91 (4.31)	12.42 (5.13)
Media del valor $2^{-\Delta Ct}$ de expresión del ARNm de MUC4 en PN después del tratamiento (SEM)	10.80 (3.61)	10.29 (5.71)	11.57 (4.19)

**Tabla 7.3. Características de los pacientes con PN resistentes a la terapia con corticoides orales.** Los pacientes se han dividido en sus respectivas cohortes y los datos se expresan en número de sujetos que presentan la característica indicada y su porcentaje dentro del grupo en paréntesis. Los puntajes endoscópicos bilaterales de PN se indican con su media para cada grupo y el correspondiente Error Estándar Medio (SEM) entre paréntesis.

Del mismo modo, la expresión proteica de MUC4 $\beta$  fue significativamente mayor en pacientes PN-CR (Figura 7.3 A) y su presencia en tejido de pólipo nasal se concentraba casi exclusivamente en el epitelio (Figura 7.3 B).



**Figura 7.3 La proteína MUC4 $\beta$  se sobre-expresa en tejido de NP de pacientes RSC-PN.** A, Las inmunohistoquímicas de NP fueron marcadas para MUC4 $\beta$  (marrón) y definidas con hematoxilina. Se muestran fotografías representativas de las inmunohistoquímicas. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. B, los diagramas de caja representan la puntuación compuesta de

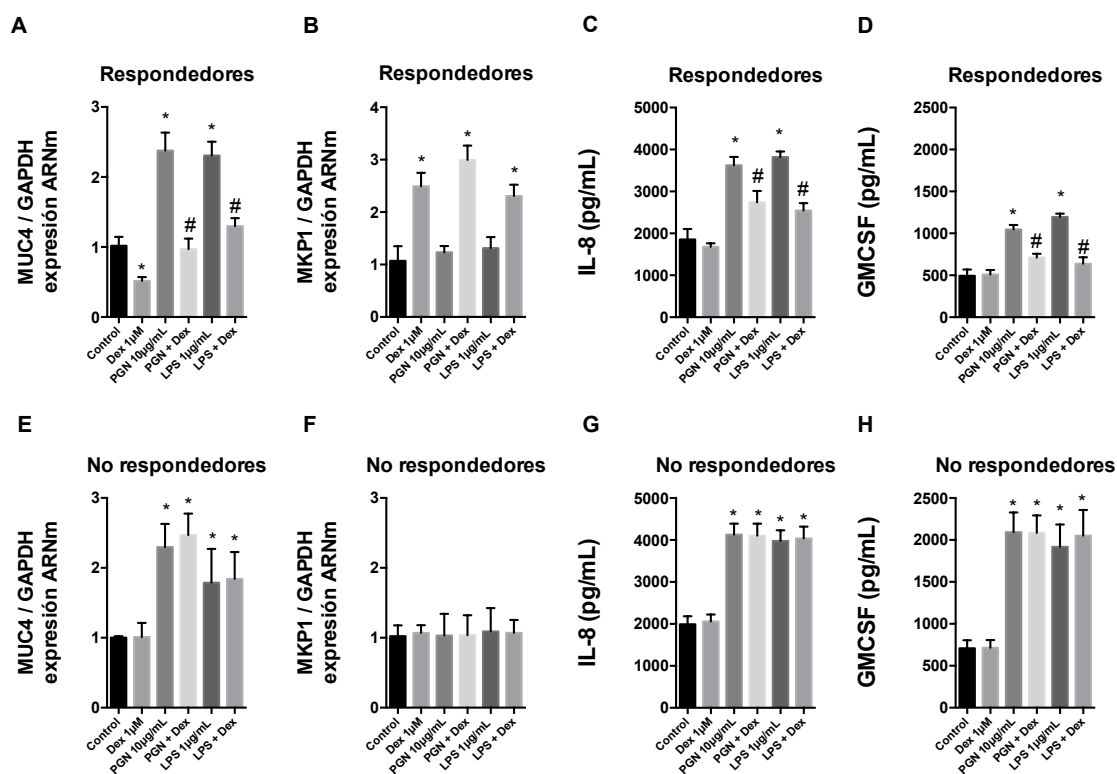
*MUC4 $\beta$  en NP. C, análisis western blot de la expresión de la proteína MUC4 $\beta$  en tejido de NP procedente de pacientes PN-sA (n= 14), PN-ATA (n= 12), PN-AIA (n= 33) and NP-CR (n= 22). Arriba se muestran los westerns más representativos y abajo los datos de densitometría expresados como ratios respecto la proteína  $\beta$ -actina y normalizados con el grupo control. B-C, En rojo están representados los valores previos al tratamiento con corticoides, mientras que en negro se representan los valores posteriores. Los datos están representados como Diagramas de Caja que incluyen la media, el rango de cuartiles (IQR) y los valores mínimo y máximo. Los valores P se obtuvieron por el test de Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's post-hoc.*

#### 7.4 Efectos de la Dexametasona en células epiteliales de NP

Para determinar el efecto anti-inflamatorio de la dexametasona *in vitro*, se aislaron células epiteliales de pólipos nasales procedentes de pacientes PN-sA (respondedores a corticoides) y NP-CR (no respondedores). Como ya se ha comentado, en el contexto de la RSC-PN la presencia de microorganismos patógenos puede contribuir a la progresión y severidad de la enfermedad. En este sentido, es común la presencia de bacterias gram positivas y negativas en tejido de pólipo nasal, que promueven la inflamación mediante la activación de los TLR. Particularmente los TLR2 y TLR4 son activados por el peptidoglicano (PGN) de gram positivas y el lipopolisacárido (LPS) de gram negativas, respectivamente. En las células aisladas de pacientes respondedores, tras 24 horas de exposición a PGN 10  $\mu$ g/ml o LPS 1 $\mu$ g/ml, la expresión de MUC4 se vio significativamente incrementada, efecto que fue inhibido en presencia de dexametasona (1 $\mu$ M) (**Figura 7.4 A**). Por otro lado, la expresión de MKP1 fue inducida por dexametasona en presencia o ausencia del estímulo bacteriano (**Figura 7.4 B**). Además, la dexametasona inhibió la secreción de IL-8 inducida por PGN y LPS en un 49.9 $\pm$ 16.6% y un 64.7 $\pm$ 15.2%, y la secreción de GM-CSG en un 60.5 $\pm$ 14.3% y un 79.4 $\pm$ 19.3%, respectivamente (**Fig 7.4 C y D**). En cambio, las células epiteliales procedentes de pacientes resistentes a corticoides no respondieron a dexametasona. En presencia del corticoide no se observó ninguna inhibición del incremento en la expresión de MUC4 tras los estímulos bacterianos (**Figura 7.4 E**). Además, la dexametasona fue incapaz de inducir la expresión de MKP1 o de inhibir la secreción de IL-8 y GM-CSF (**Figura 7.4 F-H**). Cabe destacar que las células epiteliales de pacientes no respondedores liberaron mayores



cantidades de IL-8 y GM-CSF que los pacientes respondedores, tanto en presencia como ausencia de PGN y LPS (Figura 7.4 C, D, G y H).



**Figura 7.4** Las células epiteliales de NP procedentes de pacientes NP-CR son insensibles a la Dexametasona. Las células epiteliales primarias de NP obtenidas de (A-D) pacientes respondedores (n=9) y (E-H) pacientes no respondedores NP-CR (n=8) fueron incubadas con y sin Dexametasona 1µM durante 2 horas previamente a la estimulación con lipopolisacárido (LPS; 1µG/mL) o flagelina (Flag; 1µg/mL) durante 24 horas. A y E, expresión del ARNm de MUC4 en células epiteliales primarias de NP. B y F, expresión del ARNm de MKP1 en células epiteliales primarias de NP. C, D, G y H, las barras representan la concentración de IL-8 y GM-CSF liberada medida por ELISA. Los resultados están expresados como la media (SEM) de n=3 experimentos independientes para cada condición. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P < 0.05 respecto a la liberación de la citosina en el control dentro del mismo grupo; #P < 0.05 respecto al estímulo de LPS o Flag.

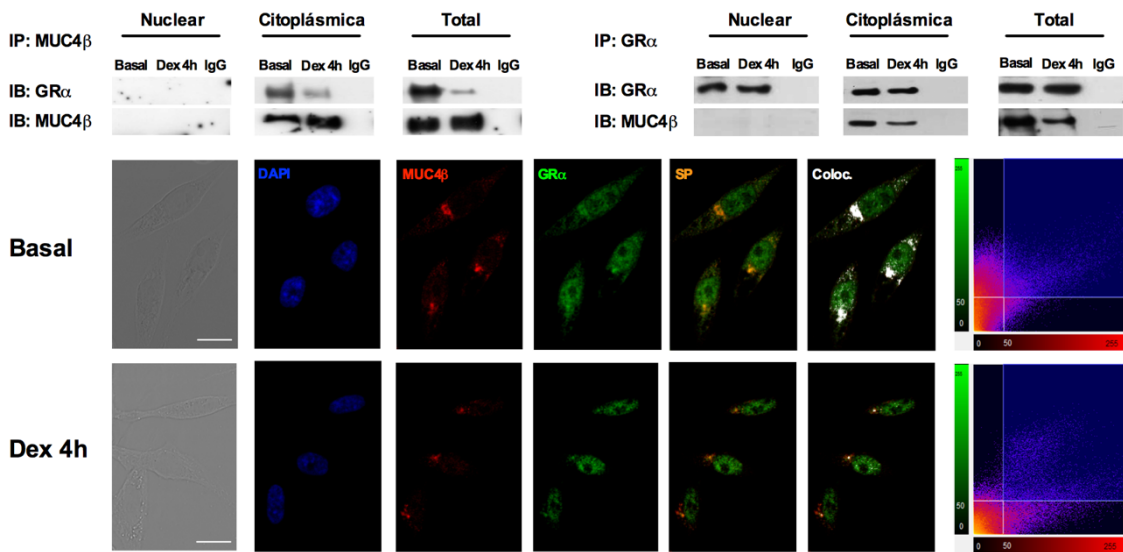
### 7.5 La interacción de MUC4 $\beta$ con el complejo de GR $\alpha$ difiere entre células epiteliales de pacientes RSC-PN respondedores y no respondedores

Las células epiteliales primarias de pólipo nasal fueron tratadas con o sin Dexametasona 1  $\mu$ M durante 4 h para promover la translocación nuclear de GR $\alpha$ . La proteína total, nuclear y citoplasmática se extrajo e inmunoprecipitó para MUC4 $\beta$ , seguido de un inmunoblot con el anticuerpo contra GR $\alpha$  o MUC4 $\beta$  (a modo de control positivo). En las células de pacientes respondedores (**Figura 7.5 A**) la co-inmunoprecipitación mostró como MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  no estaba presente en la fracción nuclear, independientemente del tratamiento con Dexametasona. En cambio, el complejo MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  estaba disminuido en la fracción citoplasmática tras el tratamiento con Dexametasona.

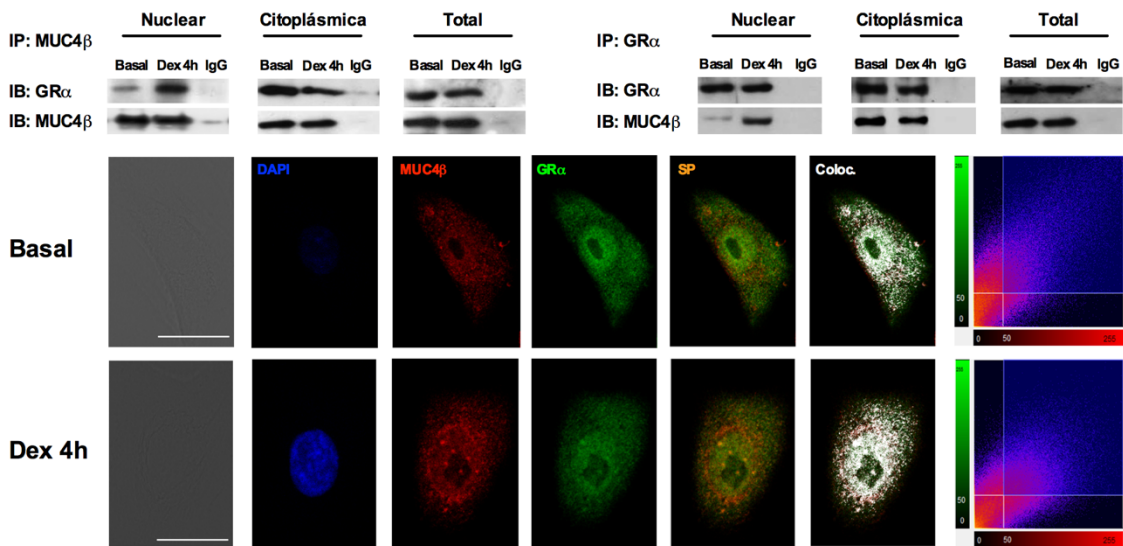
Este fenómeno se corroboró con una inmunofluorescencia confocal con marcaje para GR $\alpha$  y MUC4 $\beta$ , que mostró como ambas proteínas se co-expresan en el citoplasma de las células epiteliales de pacientes respondedores, específicamente en torno al núcleo. En cambio, en células tratadas con Dexametasona, este complejo se disociaba puesto que GR $\alpha$  se observaba en núcleo mientras MUC4 $\beta$  permanecía en el citoplasma. Así mismo, en los diagramas de puntos se observa como la distribución de los puntos de co-localización es lineal en estado basal, mientras que en presencia de dexametasona la distribución de puntos se divide en dos líneas, lo que implica una segregación de ambas fluorescencias y por tanto de ambas proteínas.

No obstante, tanto la disminución como la segregación del complejo MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  observada por inmunoprecipitación y co-inmunofluorescencia respectivamente tras la estimulación con dexametasona, no se observó en las células de pacientes no respondedores, en las que además el complejo MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  era claramente más abundante y también invadía la región nuclear (**Figura 7.5 B**). Esto sugiere que una mayor expresión de MUC4 $\beta$ , como la observada en pacientes no respondedores, dificultaría la disociación del complejo GR $\alpha$ -MUC4 $\beta$  en respuesta a Dexametasona, impidiendo la translocación nuclear de GR $\alpha$ .

A) Células epiteliales primarias de pólipos nasales de pacientes respondedores



B) Células epiteliales primarias de pólipos nasales de pacientes no respondedores



**Figura 7.5** *MUC4β co-localiza con GRα en células epiteliales primarias de PN. Las células epiteliales primarias de NP obtenidas de A, pacientes respondedores (n=4) y B, pacientes no respondedores (n=8) fueron incubadas con y sin dexametasona 1 μM durante 4 horas. Seguidamente se extrajo su fracción proteica nuclear, citoplasmática y total para inmunoprecipitar (IP) las proteínas GRα o MUC4β. A continuación, se hizo un inmunoblot (IB) de los inmunoprecipitados con los anticuerpos opuestos MUC4β o GRα, o con los mismos empleados en el IP a modo de control. El isotipo IgG se empleó como control negativo de la inmunoprecipitación. Se muestran inmunoblots representativos. En otro experimento similar las células se fijaron y permeabilizaron para realizar una co-inmunofluorescencia con anticuerpos para MUC4β y GRα, así como con sus anticuerpos secundarios marcados con*

---

*rodamina (rojo) o fluoresceína (verde), respectivamente. La co-localización se analizó empleando un microscopio confocal Leica TCS SP2 y se representa como citofluorogramas bidimensionales que indican los puntos de co-localización de ambos anticuerpos en color blanco (sexta columna). Así mismo, en la última columna los diagramas de puntos muestran la cantidad de co-localización en su cuadrante superior-derecho, siendo la región de la línea diagonal inferior-izquierda-superior-derecha la de mayor intensidad y por tanto mayor co-localización. La barra de escala equivale a 10  $\mu\text{m}$ .*

## **CAPÍTULO 8**

### **LA MODULACIÓN DE MUC4 ALTERA LA RESPUESTA A DEXAMETASONA *IN VITRO***



---

## LA MODULACIÓN DE MUC4 ALTERA LA RESPUESTA A DEXAMETASONA *IN VITRO*

---

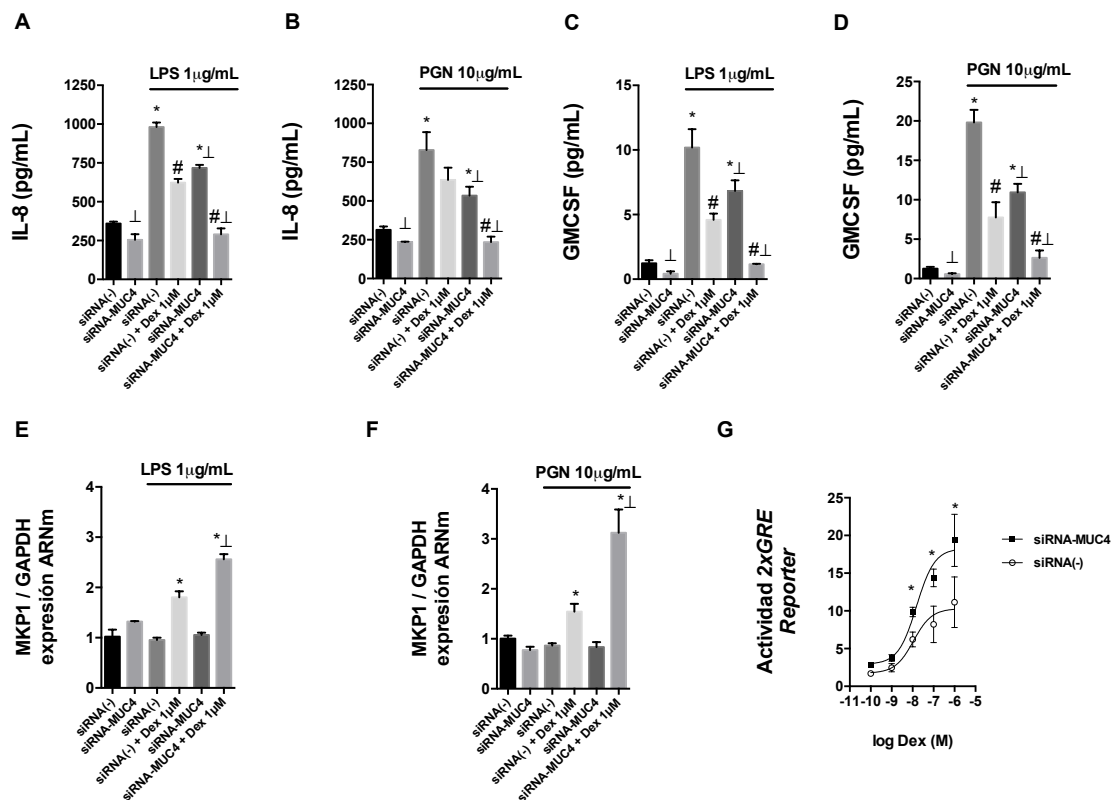
### 8.1 El silenciamiento de MUC4 aumenta los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona en las células epiteliales BEAS-2B

Para analizar la contribución de MUC4 a los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona, se llevó a cabo el silenciamiento de MUC4 mediante ARN de interferencia en células BEAS-2B, seguido de la estimulación con LPS o PGN en presencia o ausencia de dexametasona. Las células silenciadas para MUC4 mostraron una disminución significativa en la liberación de IL-8 y GM-CSF tras la estimulación con LPS o PGN comparado con las células silenciadas con el siRNA(-) (**Figura 8.1 A-D**). La Dexametasona inhibió la secreción de IL-8 en un 57.7±6.6% y un 37.3±16.1% tras el estímulo con LPS y PGN respectivamente en células siRNA(-). En cambio, el poder inhibitorio de la Dexametasona sobre las células siRNA-MUC4 fue significativamente mayor, alcanzando un 92.3±14.4% y un 99.5±20.9% tras la estimulación con LPS y PGN, respectivamente (**Figura 8.1 A y B**). En el caso de GM-CSF se observaron resultados similares. La dexametasona inhibió la secreción de GM-CSF en un 62.3±9.3% y un 65.3±18% en células siRNA(-), y un 88.2±1% y un 80.3±5% en células siRNA-MUC1 tras la estimulación con LPS y PGN respectivamente (**Figura 8.1 C y D**).

El análisis de la expresión génica en estos experimentos mostró que la expresión de MKP1 inducida por dexametasona fue mayor en células siRNA-MUC4 respecto a las células control siRNA(-), lo que sugiere que la expresión génica de MUC4 modula los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona (**Figura 5.1 E y F**).

Como se ha descrito previamente, los corticoides median parte de sus efectos mediante la trans-activación de genes que codifican proteínas con propiedades anti-inflamatorias, vía la unión del receptor de glucocorticoides activado a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). Para analizar esta activación, las células BEAS-2B siRNA-MUC4 y siRNA(-) fueron transfectadas con un constructo reportero de GRE e incubadas con dexametasona 1 µM durante 6 horas. Este tratamiento

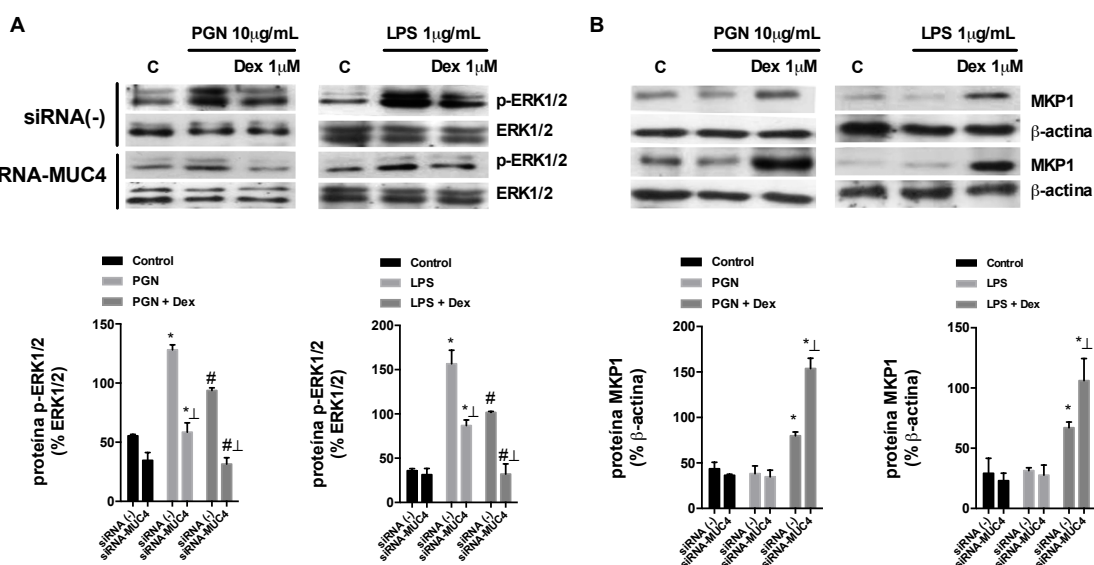
indujo una transcripción en GRE de manera dosis dependiente que fue significativamente mayor en células siRNA-MUC4 que en siRNA(-) (Figura 8.1 G).



**Figura 8.1 El silenciamiento de muc4 aumenta los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona.** Células epiteliales BEAS-2B cuya expresión de MUC4 fue silenciada (siRNA-MUC4) o no (siRNA(-)) fueron incubadas con y sin Dexametasona 1 μM durante 2 horas previamente a la estimulación con lipopolisacárido (LPS; 1 μg/mL) o peptidoglicano (PGN; 10 μg/mL) durante 24 horas. A-D, las barras representan la concentración de IL-8 y GM-CSF liberada obtenida por ELISA. E y F, las barras representan la expresión génica de MKP1 medida por PCR a tiempo real. G, se compara la inducción nuclear del elemento de respuesta a corticoides (GRE) a diferentes dosis de dexametasona (0.1 nM- 1 μM). Todos los resultados están expresados como la media (SEM) de tres experimentos independientes por condición. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni. A-F, \*P < 0.05 respecto a la liberación de la citosina en el control dentro del mismo grupo; #P < 0.05 respecto al estímulo de LPS o PGN. ⊥P < 0.05 respecto al grupo siRNA(-). G, \*P < 0.05 respecto al grupo siRNA(-).



Un análisis más exhaustivo de las líneas BEAS-2B silenciadas mostró que la estimulación tanto con PGN como LPS elevaba los niveles de fosforilación de la proteína ERK1/2 en mayor medida para células control siRNA(-) que en células siRNA-MUC4 (**Figura 8.2 A**). Además, la presencia de dexametasona inhibía parcialmente la fosforilación de ERK1/2 inducida por PGN y LPS en células siRNA(-), mientras que en células siRNA-MUC4 la fosforilación fue completamente suprimida (**Figura 8.2 A**). En el caso de la expresión de la proteína MKP1 el efecto observado fue justo el contrario. En células siRNA(-) la expresión de MKP1 inducida por dexametasona fue significativamente mayor que en las células siRNA-MUC4 (**Figura 8.2 B**).



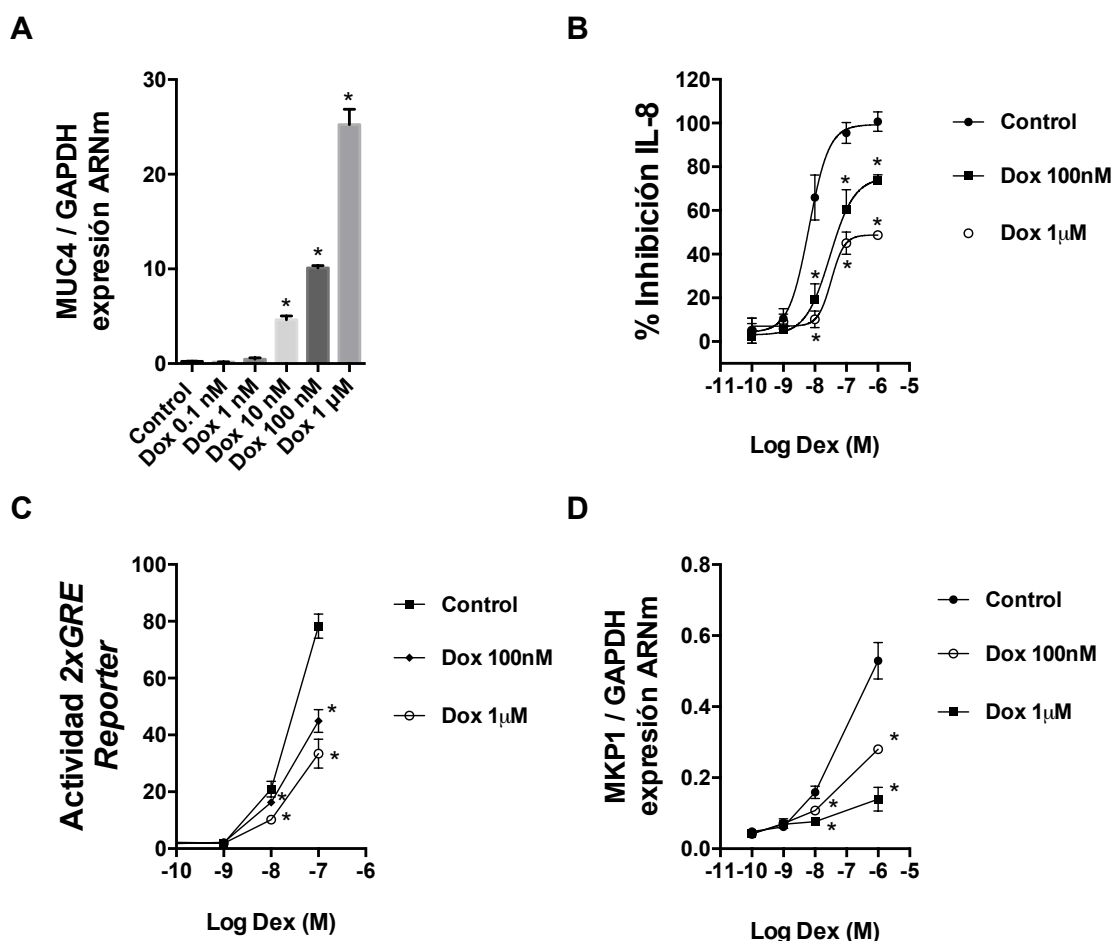
**Figura 8.2** El silenciamiento de MUC4 aumenta el efecto de la dexametasona sobre la fosforilación de ERK1/2 y la inducción de MKP1. Células epiteliales BEAS-2B cuya expresión de MUC4 fue silenciada (siRNA-MUC4) o no (siRNA(-)) se incubaron con y sin Dexametasona 1 μM durante 2 horas previamente a la estimulación con lipopolisacárido (LPS; 1 μg/mL) o peptidoglicano (PGN; 10 μg/mL) durante (A) 20 minutos o (B) 4 horas. Tras los tiempos de estimulación se midieron mediante western blotting los niveles de las proteínas p-ERK1/2 y MKP1 para cada tiempo, respectivamente. En la figura se muestran western blots representativos y diagramas de barras con los datos de densitometría en porcentaje respecto a los niveles de β-Actina. Todos los resultados están expresados como la media (SEM) de tres experimentos independientes por condición. Los datos se analizaron por test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P < 0.05 respecto al control; #P < 0.05 respecto al estímulo de LPS o PGN. ⊥P < 0.05 respecto al grupo siRNA(-).

## 8.2 La sobre-expresión de MUC4 disminuye los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona en la línea celular HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4

La línea celular HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 se generó empleando un plásmido inducible CS-H2247-pTREG con capacidad para expresar la proteína MUC4 de manera proporcional a la concentración de doxiciclina. Como se observa en la **Figura 8.3 A**, tras 24 horas de incubación de la línea celular con doxiciclina a 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M se produjo un incremento de la expresión de MUC4 en un x2, x19, x42 y x100 veces respecto a la expresión basal. Esto nos permitió establecer las concentraciones de doxiciclina 100 nM y 1  $\mu$ M como óptimas para evaluar los efectos de un incremento significativo de la expresión de MUC4 en las células HEK293.

Así pues, las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 fueron incubadas con o sin doxiciclina 100 nM y 1  $\mu$ M durante 24 horas, seguido de la adición de dexametasona (0.1 nM - 1 $\mu$ M) por 2 horas previas a la estimulación con LPS durante otras 24 horas. El porcentaje de inhibición de la secreción de IL-8 alcanzado por la máxima dosis de dexametasona en células control fue del 100%, mientras que en células pre-tratadas con doxiciclina 100 nM y 1  $\mu$ M la inhibición fue significativamente menor, alcanzando un 76.3 $\pm$ 4% y un 48.7 $\pm$ 0.8% de inhibición respectivamente (**Figura 8.3 B**). En la misma línea, la expresión del gen anti-inflamatorio MKP1 fue inducido de manera dosis-dependiente por dexametasona, pero inhibido en presencia de doxiciclina (**Figura 8.3 C**).

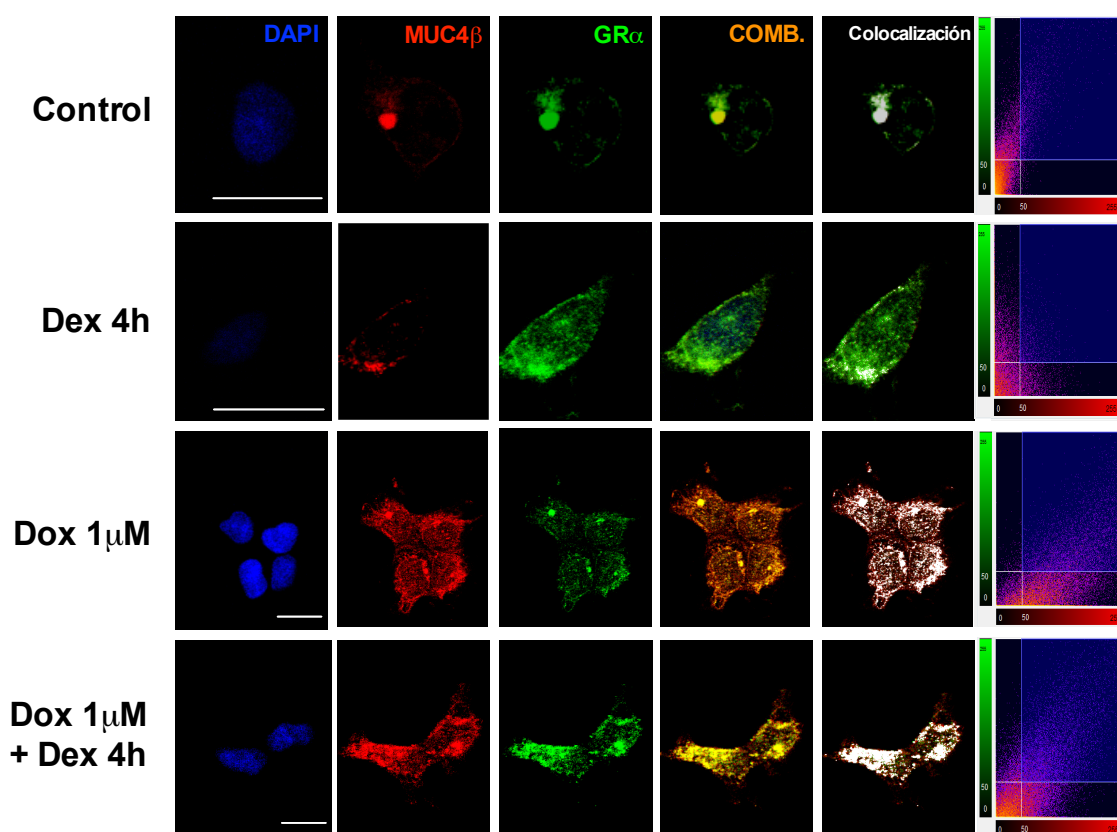
En otro experimento las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 fueron transfectadas con el sistema reportero de GRE e incubadas con doxiciclina 100 nM y 1  $\mu$ M por 24 horas, tras lo que se trataron con diferentes concentraciones de dexametasona (1 nM - 100nM) durante 6 horas. Tras este tiempo, la actividad en GRE fue inducida de manera dosis-dependiente a la dexametasona, siendo significativamente menor en presencia de doxiciclina (**Figura 8.3 D**).



**Figura 8.3** La sobre-expresión de MUC4 disminuye los efectos anti-inflamatorios de la dexametasona en la línea celular HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4. **A**, las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 fueron estimuladas con concentraciones crecientes (0.1 nM – 1 μM) de doxiciclina (Dox) durante 24 horas y la expresión absoluta del ARNm de MUC4 se analizó por PCR a tiempo real. **B**, las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 se incubaron con doxiciclina 100 nM y 1 μM durante 24 horas, seguido de la adición de dexametasona (0.1 nM – 1 μM) por 2 horas previas a la estimulación con LPS durante otras 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron para medir la secreción de IL-8 por ELISA y el porcentaje de inhibición se calculó respecto al estímulo con LPS 1 μg/mL. **C**, las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 se incubaron con doxiciclina 100 nM y 1 μM durante 24 horas, seguido de la adición de dexametasona (0.1 nM – 1 μM) por otras 24 horas, tras lo que se midió la expresión de MKP1 por PCR a tiempo real. **D**, se midió la activación nuclear de los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) inducida tras 6 horas con diferentes dosis (1 nM – 100nM) de dexametasona (Dex) en células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 pre-tratadas con doxiciclina 100 nM y 1 μM durante 24 horas. Todos los resultados están expresados como la media (SEM) de tres experimentos independientes por condición. Los datos se analizaron por test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni. **A-D**, \*P < 0.05 respecto al grupo control.

### 8.3 La sobre-expresión de MUC4 impide la translocación nuclear del GR $\alpha$ inducida por dexametasona

El análisis por co-inmunofluorescencia (**Figura 8.4**) mostró que en condiciones basales en el citoplasma de las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 la proteína MUC4 $\beta$  co-localiza con GR $\alpha$ . No obstante, después de la adición de dexametasona 1  $\mu$ M el receptor de glucocorticoides  $\alpha$  se disocia de MUC4 $\beta$  y transloca al núcleo. Tras pre-incubar con doxiciclina 1  $\mu$ M durante 24 horas, se incrementó muy significativamente la presencia en el citoplasma de MUC4 $\beta$  y la dexametasona fue incapaz de disociar la unión con el receptor de glucocorticoides  $\alpha$ , observándose una consecuente menor translocación al núcleo.



**Figura 8.4** La sobre-expresión de MUC4 secuestra a GR $\alpha$  e impide su translocación nuclear inducida por dexametasona. Las células HEK293/TET3G/TRE3G-MUC4 se incubaron con doxiciclina 1  $\mu$ M durante 24 horas, seguido de la adición de dexametasona 1  $\mu$ M durante 4 horas. Las células se fijaron, permeabilizaron y se marcaron con anticuerpos fluorescentes contra MUC4 $\beta$  (rojo) y GR $\alpha$  (verde). La co-localización se analizó empleando un microscopio confocal Leica TCS SP2 y se representa como citofluorogramas bidimensionales

---

que indican los puntos de co-localización en color blanco de ambos anticuerpos (quinta columna). Así mismo, en la sexta columna los diagramas de puntos muestran la cantidad de co-localización en su cuadrante superior-derecho y se corresponden con las fotografías a su izquierda. La barra de escala equivale a 10  $\mu\text{m}$ .



## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**





## **CAPÍTULO 9**

### **DISCUSIÓN**



---

## DISCUSIÓN

---

En este capítulo se discuten los planteamientos y evidencias experimentales con las que se pretende implicar a las mucinas 1 y 4 en el asma y la poliposis nasal resistentes a corticosteroides, respectivamente. Para ello este capítulo se ha dividido en tres secciones, una primera sobre mucina 1, una segunda sobre mucina 4 y una última sobre la posible relación entre ambas en el contexto de la resistencia a corticoides.

### 9.1 Implicación de la mucina 1 en el asma resistente a corticosteroides

Los resultados experimentales descritos en los capítulos 5 y 6 consolidan la evidencia de la participación de MUC1 en la resistencia a corticoides, en este caso de manera específica para el asma. Como ya se comentó, el presente es un estudio de extensión de una investigación clínica sobre la Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales previamente publicada por nuestro grupo<sup>216</sup> (**Anexo 3**). En esta publicación se demostró la participación de la región C-terminal de MUC1 en la translocación nuclear del receptor de glucocorticoides  $\alpha$  inducida por dexametasona. En este sentido, los pacientes de RSC-PN resistentes al efecto de los corticoides mostraban significativamente una menor expresión de MUC1-CT en el epitelio de los pólipos nasales, acompañada de una menor expresión de MKP1 y GR $\alpha$ , así como el incremento en la fosforilación de ERK1/2. Experimentos mecanísticos revelaron una interacción entre MUC1-CT y GR $\alpha$ , que protegía de la hiper-fosforilación del residuo Serina-226 en GR $\alpha$  inducida por los agonistas de TLR, ayudando a GR $\alpha$  a translocarse al núcleo y de ese modo realizar sus efectos anti-inflamatorios. Estos resultados fueron relevantes para la comprensión de la pérdida de eficacia de los corticosteroides en pacientes RSC-PN.

Un estudio demostró que el uso de epitelio respiratorio nasal podría sustituir al de muestras de broncoscopias, puesto que el perfil de respuesta inflamatoria era muy similar<sup>219</sup>. En este sentido, puesto que las cohortes de pacientes empleadas en nuestros experimentos incluían grupos de no asmáticos y asmáticos con y sin corticorresistencia, decidimos orientar nuestros resultados hacia el campo del Asma, puesto que se trata de una enfermedad con más incidencia y gravedad.

Estudios previos indicaban que existen tipos celulares en el asma que son particularmente resistentes al efecto anti-inflamatorio de los corticoides. Por ejemplo, el efecto *in vitro* de los corticoides sobre la producción de citoquinas en macrófagos alveolares y monocitos está reducido en pacientes con asma severo<sup>228-230</sup>. Además, nuestro grupo demostró que la inflamación neutrofílica que caracteriza la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, a diferencia de la inflamación eosinofílica en el asma, es insensible a los corticoides<sup>231</sup>. En este sentido, aquellos pacientes asmáticos con altas proporciones de neutrófilos en el esputo eran más insensibles al efecto de dichos fármacos<sup>232,233</sup>. Estos neutrófilos mostraban un perfil específico de secreción y expresión de mediadores inflamatorios como IL-8 y MMP-9<sup>234-236</sup>, entre otros. Estas observaciones indicaban que los neutrófilos humanos y los monocitos/macrófagos son especialmente resistentes al efecto anti-inflamatorio de los corticoides en asma y que podrían ser útiles para estudiar marcadores y mecanismos de corticorresistencia.

Para este estudio se reclutaron un total de 27 pacientes asmáticos y 13 no asmáticos. Los asmáticos fueron diagnosticados mediante la prueba de broncodilatación tras dos semanas de tratamiento con altas dosis de corticoides. Un total de 16 pacientes se diagnosticaron como respondedores a corticoides y 11 como no respondedores a corticorresistentes. Con los neutrófilos de sangre periférica de sanos y asmáticos corticorresistentes se midió, mediante curvas dosis-respuesta, la capacidad inhibitoria de la dexametasona sobre la secreción de IL-8 y MMP-9 inducidas por LPS. En los neutrófilos de pacientes asmáticos corticorresistentes, la dexametasona apenas mostró inhibición respecto a los sanos, por lo que la caracterización clínica de insensibilidad a corticoides se mantuvo *ex vivo*. De manera análoga a los resultados con células epiteliales respiratorias, los neutrófilos de los pacientes asmáticos resistentes a corticoides expresaron significativamente menos MUC1 que los sanos. Y aunque la diferencia con la expresión de MUC1 en los pacientes asmáticos respondedores no fue significativa, sí que se observó una correlación positiva entre la expresión de MUC1 y la reversibilidad ( $\Delta\%$ FEV1) tras el tratamiento con corticoides.

En el contexto del asma, una vez correlacionada la menor expresión de MUC1 con la resistencia a corticoides en células epiteliales respiratorias<sup>216</sup> y neutrófilos, el siguiente paso fue determinar la implicación del componente vascular. En el asma, el

---

endotelio tiene un papel crítico para el desarrollo de la inflamación, puesto que las citoquinas inflamatorias regulan su expresión de proteínas de adhesión y su permeabilidad, lo que permite la adhesión y trans migración de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo al tejido bronco-alveolar<sup>90</sup>. Se empleó la línea celular de endotelio micro-vascular de pulmón (HMVEC-L) para silenciar MUC1 mediante ARN interferente. El objetivo fue ensayar el efecto de la dexametasona sobre la inducción del TNF $\alpha$  en la expresión de moléculas de adhesión, así como la adhesión de monocitos U937 mediante la técnica flow chamber. Los resultados en las células HMVEC-L-siRNA(-) y siRNA-MUC1 cuadraron con la secuencia de acontecimientos de la reacción inflamatoria en el asma bronquial.

El TNF $\alpha$  incrementó la expresión de las moléculas de adhesión E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1. Fisiológicamente, el incremento de estas moléculas conducen secuencialmente a la adhesión, primero de los neutrófilos y después de los linfocitos y monocitos en respuesta al estímulo antigénico. En este caso la adhesión de monocitos U937 aumentó muy significativamente respecto al control sin estímulo. El TNF $\alpha$  también indujo a las células endoteliales a expresar la interleucina-8 (IL-8) que actúa sobre los leucocitos favoreciendo la extravasación. El tratamiento con varias concentraciones de dexametasona inhibió de manera dosis-dependiente la expresión de moléculas de adhesión y el número de monocitos U937 adheridos en las células HMVEC-L-siRNA(-). Sin embargo, en las células con MUC1 silenciado, la dexametasona no produjo cambios significativos. Esto indicaría que MUC1 es necesario para la eficacia de los corticoides también en el endotelio vascular.

En el contexto del asma, el resultado de la expresión de moléculas de adhesión es el rodamiento del leucocito esférico a lo largo de la superficie del endotelio y su activación. Posteriormente se produce la trans migración del leucocito hacia los tejidos. Los monocitos activados que se localizan en los tejidos extravasculares se diferencian a macrófagos que son las células efectoras finales de la reacción inflamatoria. Así pues, se ensayó el efecto del silenciamiento de MUC1 en la trans migración quimiotáctica de monocitos U937. La dexametasona redujo la migración de monocitos U937-siRNA(-) activados por los ligandos de TLR2, 4 y 5 y atraídos por el quimioatrayente CXCL12. En cambio, en los monocitos U937-siRNA-MUC1 la dexametasona no mostró ningún efecto sobre la migración. Estos

---

resultados amplían la evidencia de cómo MUC1 es necesario para la efectividad anti-inflamatoria de los corticoides en todos los niveles celulares estudiados de la patología del asma.

El objetivo del modelo murino MUC1-KO de asma agudo fue completar el estudio y aportar evidencias *in vivo* de una pérdida de respuesta a corticoides en sujetos con menor expresión de MUC1. Tras la inducción de la enfermedad asmática en los ratones, el análisis de los resultados demostró que el desarrollo y prevención de la enfermedad por corticoides cuadraba con la fisiopatología del asma alérgico humano. El análisis de la región pulmonar de los ratones mediante PET-CT mostró como los grupos expuesto a OVA incrementaban muy significativamente la captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG y por tanto la inflamación del tejido pulmonar; el tratamiento con la dexametasona inhibió de manera dosis dependiente la inflamación en ratones WT, mientras que en el fenotipo MUC1-KO fue incapaz de reducir la inflamación.

La sensibilización a ovoalbúmina genera una inmunidad adaptativa, de manera que cuando la OVA se inocula en el lumen bronquial mediante la instilación nasal, actúa como un alérgeno<sup>101,102</sup>. La OVA atraviesa el epitelio bronquial y se une a los receptores de IgE en la superficie de los mastocitos, induciendo su degranulación. Los mediadores liberados (Histamina, Leucotrienos, quimioatrayentes, etc) provocan la quimioatracción de eosinófilos, aumento de la permeabilidad vascular, broncoconstricción y la hipersecreción de moco<sup>89,94,96,237</sup>. Además, los linfocitos Th2 secretan IL-13, que aumentan la secreción mucosa<sup>91,92</sup>, e IL-5, esencial para la maduración de los eosinófilos<sup>79,81</sup>. Todos estos eventos cuadraron con las características de los lavados broncoalveolares y la histopatología de los grupos OVA: un mayor conteo celular, cúmulos de eosinófilos y otras células inflamatorias infiltradas en la base de los bronquios, epitelios hiperplásicos con abundantes gránulos secretores de moco y concentraciones elevadas de las citoquinas inflamatorias IL-8, IL-13 e IL-5. Además, el ensayo de migración quimiotáctica mostró que los neutrófilos de ratones MUC1-KO son insensibles a corticoides, lo que explicaría la persistencia de células inflamatorias en el tejido pulmonar de los sujetos tratados con dexametasona. En la misma línea que lo observado con el PET-CT, mientras los WT prácticamente resolvían el cuadro inflamatorio con la

---

dexametasona, en los sujetos asmáticos MUC1-KO tratados no hubo una disminución significativa en los marcadores inflamatorios respecto a los OVA.

El análisis de la expresión génica y proteica en el tejido pulmonar consolidaron las observaciones previas en el pulmón *in vivo*. MUC5B es una mucina muy abundante en la mucosidad bronquial de asmáticos severos; en los grupos OVA se observó un incremento significativo en la expresión de su ARNm, que se redujo hasta niveles basales en los WT tratados con dexametasona. En cambio, en fenotipo MUC1-KO la expresión de MUC5B se mantuvo en los niveles del grupo OVA pese al tratamiento. Este mismo patrón de expresión se observó para el ARNm de interleucina 6 y la proteína interleucina-13.

Una de las señales downstream activada por interleuquinas es la fosforilación de quinasas como p38 y ERK1/2<sup>238</sup>. De hecho, en Milara *et al.*<sup>216</sup> se demostró que la resistencia a corticosteroides en RSC-PN implica la hiper-fosforilación de ERK1/2, que lleva a la fosforilación de GR $\alpha$  y la consecuente inhibición de la translocación al núcleo inducida por dexametasona. Además, evidencias recientes muestran que p38 o JNK1 puede mediar la insensibilidad a corticoides en asmáticos a través del mismo mecanismo<sup>239,240</sup>. El análisis del grado de fosforilación de quinasas en el tejido pulmonar de ratones OVA mostró un incremento significativo de la fosforilación de ERK1/2 y p38 comparado con los controles. La dexametasona 5 mg/kg logró inhibirlo, pero de nuevo solo en el fenotipo WT. Además, el ARNm de MKP1, un inhibidor endógeno de la fosforilación de p38 y ERK1/2 inducido por corticosteroides, no se vio aumentado en los ratones MUC1-KO, mientras que en los WT el incremento fue dosis-dependiente y correlativo al menor grado de fosforilación. Así pues, la insensibilidad a dexametasona en los ratones MUC1-KO estaría impidiendo que MKP1 se exprese, bloquee la fosforilación de quinasas y resuelva la inflamación. Esto a su vez permitiría que estas quinasas puedan inactivar a GR $\alpha$ , contribuyendo a la resistencia a corticosteroides.

La interacción de MUC1-CT con transductores de señales y su translocación al núcleo y subsecuente respuesta biológica se cree debe estar regulada por interacciones proteína-proteína específicas, pero el mecanismo preciso que subyace no se conoce. De hecho, se ha demostrado que MUC1-CT puede interactuar con el receptor de estrógeno (ER) $\alpha$ , tras lo que se transloca al núcleo como un complejo de

---

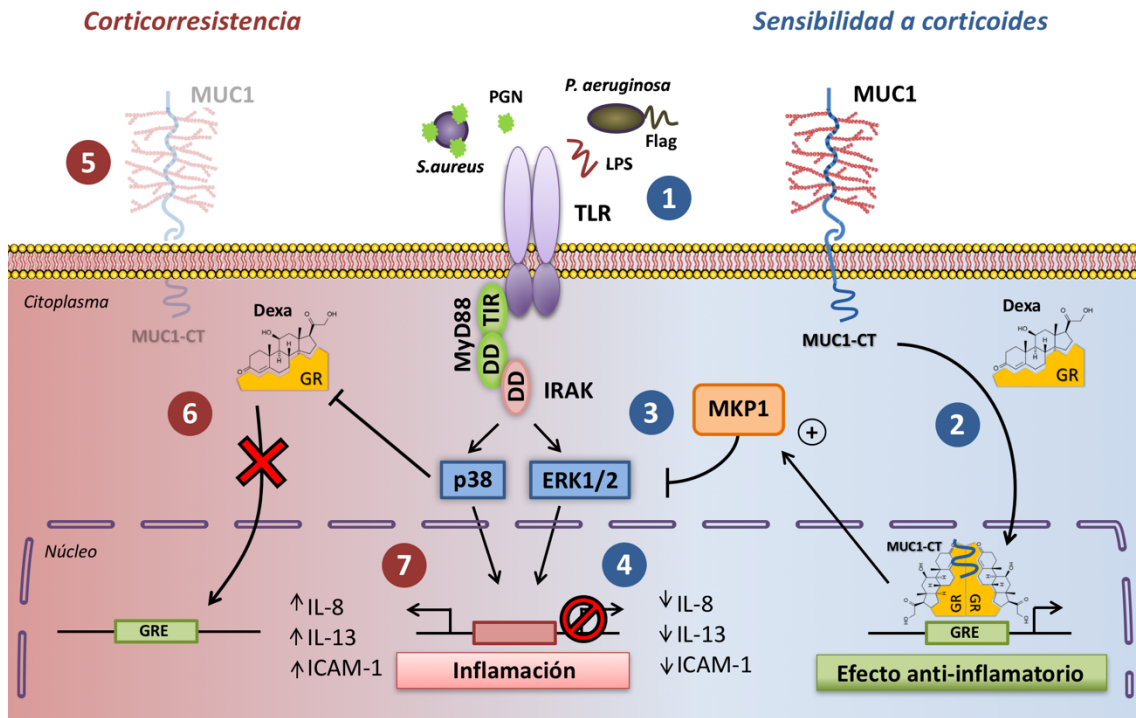
transcripción en respuesta a  $17\beta$ -estradiol<sup>66</sup>. Resultados similares se observaron para un complejo de transcripción  $\beta$ -catenina-MUC1-CT como modulador de la morfogénesis<sup>67,68</sup>. Estas evidencias indican que MUC1-CT, al formar complejos de transcripción, podría tener un papel protector. En este contexto, el complejo MUC1-CT-ER $\alpha$  protege y estabiliza ER $\alpha$  atenuando su ubiquitinación y degradación<sup>66</sup>. Fenómenos similares se propusieron para el complejo de transcripción  $\beta$ -catenina-MUC1-CT y un rol protector ante la degradación de  $\beta$ -Catenina<sup>67</sup>.

En Milara et al. proporcionamos una primera evidencia de la unión constitutiva de MUC-CT y GR $\alpha$ , así como un rol protector para la fosforilación de GR-Ser226 y la translocación al núcleo de GR $\alpha$ . Además, la exposición a Dexametasona promovía la translocación nuclear del complejo de transcripción MUC1-CT-GR $\alpha$  para inducir sus efectos anti-inflamatorios. Estos resultados se observaron *in vitro* y en pacientes con poliposis nasal, sugiriendo que aquellos pacientes resistentes a corticosteroides expresan menos complejos MUC1-CT-GR $\alpha$  y por ello menos protección ante la inactivación de GR $\alpha$ .

En el análisis del epitelio bronquial de ratón mediante co-inmunofluorescencia también observamos que MUC1 interacciona con GR $\alpha$  y transloca al núcleo en respuesta al tratamiento con dexametasona. En los ratones MUC1-KO, la ausencia de MUC1 impide la formación de este complejo y por tanto la translocación nuclear de GR $\alpha$ . Ante la incapacidad de localizarse nuclearmente, el receptor de glucocorticoides unido al corticoide es incapaz de activar la expresión de los dominios GRE e inducir efectos anti-inflamatorios. Por tanto, el modelo animal de asma agudo presentó el fenómeno de corticorresistencia en base a la ausencia únicamente de la proteína MUC1.

En resumen, hemos consolidado la evidencia sobre el rol de MUC1 como modulador de los efectos anti-inflamatorios de los corticosteroides en pacientes RSC-PN y asmáticos. Los resultados sugieren que una posible explicación de por qué los corticosteroides no pueden reducir la inflamación, se debe, en parte, a una deficiencia en la formación del complejo MUC1-GR $\alpha$  (**Figura 9.1**).





**Figura 9.1 MUC1 como modulador de los efectos anti-inflamatorios de los corticosteroides en pacientes RSC-PN y asmáticos.** 1, en un contexto inflamatorio como las infecciones del sistema respiratorio, el reconocimiento de patrones asociados a patógenos como LPS o PGN por los receptores tipo Toll (TLR) inicia la señalización del adaptador MyD88, que a su vez activa a las quinasas p38 y ERK1/2, desencadenando la transcripción de genes pro-inflamatorios (7) como IL-8 e ICAM-1. 2, la región citoplasmática de MUC1 (MUC1-CT) se une al receptor de glucocorticoides  $\alpha$  (GR) activado por dexametasona. Esta unión permite la translocación al núcleo y la dimerización del receptor, que se une a los dominios de respuesta a glucocorticoides (GRE) e inicia la transcripción de genes anti-inflamatorios. 3, entre los genes expresados por GRE destaca MKP1, que actúa inhibiendo la activación de las quinasas que median los TLR, (4) reduciendo de este modo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias por esta vía. 5, no obstante, cuando la expresión de MUC1 está reducida la unión de dexametasona al GR es incapaz de translocar el receptor al núcleo (6). Esto unido a la capacidad de las quinasas activadas por TLR para inhibir a GR, se produce un estado de corticorresistencia, en el que los corticoides son incapaces de reducir la expresión de genes pro-inflamatorios y la consecuente inflamación del tejido (7).

## 9.2 Implicación de la mucina 4 en la Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasales resistente a corticosteroides

En base a las evidencias sobre MUC1 se propuso que otras mucinas de membrana como MUC4 pudieran estar relacionadas con la eficacia de los corticoides en la RSC-PN. A diferencia de MUC1, el rol de MUC4 sólo se había descrito en el contexto de diferentes tipos de cáncer<sup>46</sup>. Evidencias experimentales indicaban que el dominio MUC4 $\beta$  se une al receptor ErbB2 en la membrana citoplasmática y modula su localización<sup>72</sup>, fosforilación y señalización celular<sup>241</sup>, promoviendo el crecimiento, motilidad o diferenciación de células tumorales<sup>73</sup>. Sin embargo, MUC4 $\beta$  podía jugar roles independientes de ErbB2, como por ejemplo activando la señalización celular de la vía JNK que provoca también la migración celular<sup>74</sup>. Eso sí, del mismo modo que MUC1, la mucina 4 también se expresaba en células nasales y epiteliales bronquiales de sujetos sanos<sup>51</sup>. Publicaciones previas mostraban que MUC4 se sobre-expresaba en pólipos nasales si se comparaba con la mucosa sana<sup>53,214</sup>, y su expresión estaba regulada al alza en condiciones inflamatorias<sup>76,242</sup> y tras la infección por hongos, bacterias o rinovirus<sup>242,243</sup>. Recientemente también se ha indicado que MUC4 está sobre-expresada en el epitelio bronquial de pacientes asmáticos severos si lo comparamos con sujetos sanos o pacientes de asma medio-moderado<sup>75</sup>.

Los resultados experimentales descritos en el capítulo 7 muestran como MUC4 está significativamente sobre-expresada en pólipos nasales de pacientes clínicamente resistentes a corticoides, que a su vez presentan marcadores génicos de corticorresistencia como una mayor expresión de IL-8 y una menor expresión de MKP1 y GR $\alpha$ , si lo comparamos con pacientes respondedores. Además, en células epiteliales primarias de pacientes con RSC-PN respondedores, la estimulación con agonistas de TLR2 y TLR4 incrementan la expresión de MUC4 y la liberación de IL-8 y GM-CSF, posteriormente inhibida significativamente por dexametasona. Esta última a su vez incrementa la expresión de MKP1, que actúa como un factor anti-inflamatorio inducible por corticoides. Resultados similares se habían observado previamente en células epiteliales primarias de pólipos nasales, que mostraban un efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la sobre-expresión de MUC4 inducida por IL-1 $\beta$  y LPS<sup>76,214</sup>. Sin embargo, el tratamiento con dexametasona de células epiteliales primarias de pacientes clínicamente resistentes no muestra una reducción

---

en la expresión de MUC4 o en la liberación de IL-8 y GM-CSF, así como tampoco aumenta la expresión de MKP1, por lo que podemos confirmar que la resistencia a corticoides observada clínicamente se mantiene en condiciones *in vitro*. Aunque el efecto de MUC4 en la eficacia de los corticoides no se conociera todavía, existían observaciones previas que podían indicar cierta correlación. Por ejemplo, la colonización de las vías aéreas por bacterias (principalmente *staphylococcus aureus*) o rinovirus, incrementaba la insensibilidad a corticoides<sup>199,200</sup> y la expresión de MUC4<sup>213,214</sup>. Además, la mayor incidencia de resistencia a corticoides<sup>172</sup> parecía coincidir con la sobre-expresión de MUC4 en asmáticos severos<sup>75</sup>.

No obstante, la asociación entre la mayor expresión de MUC4 y la corticorresistencia podía tratarse únicamente de una observación concomitante a la inflamación en la poliposis nasal, sin una causalidad directa en la mecánica celular de los corticoides. En este sentido, como se describe en el capítulo 2, se han propuesto múltiples mecanismos que podrían contribuir a la pérdida de eficacia de los corticoides en la RSC-PN, como la menor expresión de MUC1, GR $\alpha$  y MKP1 en tejido de pólipo nasal<sup>216</sup>, o el incremento de NF- $\kappa$ B, GR $\beta$ , fosfo-ERK1/2, JNK y la hiper-fosforilación de GR-Ser226<sup>181,195,216,244</sup>. Este hecho indica que la resistencia a corticoides es una condición principalmente adquirida y progresiva que depende de múltiples mecanismos moleculares. Así pues, el siguiente objetivo era determinar la correlación directa entre la expresión de MUC4 y la efectividad de los corticoides.

Del mismo modo que MUC1, la mucina 4 también contiene un dominio citoplasmático (MUC4 $\beta$ ) que podía interactuar con otras proteínas intracelulares para modular diversas vías de señalización<sup>46</sup>. De manera que las proteínas MUC4 $\beta$  y GR $\alpha$  se inmunoprecipitaron o visualizaron por microscopia confocal en células epiteliales primarias de PN de pacientes respondedores y no respondedores, tras una exposición de 4 horas a dexametasona. La evidencia de ambas técnicas experimentales muestra como en células de respondedores se forma un complejo entre MUC4 $\beta$  y GR $\alpha$ , cuya localización se restringe al citoplasma y más específicamente al área peri-nuclear. Tras la exposición a dexametasona, el complejo se disocia y el GR $\alpha$  liberado transloca al núcleo. No obstante, en células de pacientes no respondedores el complejo MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  está presente tanto en citoplasma como en núcleo, y la dexametasona no provoca su disociación. Estos resultados podrían

---

indicar que MUC4 $\beta$  es capaz de “secuestrar” GR $\alpha$  e impedir su interacción con las regiones GRE en el ADN. Como se vio en el capítulo 2, el receptor de glucocorticoides  $\alpha$  forma complejos dinámicos con múltiples proteínas que modulan su correcto funcionamiento. En ausencia de corticoides, GR $\alpha$  reside en el citoplasma dentro de un complejo que incluye chaperonas, inmunofilinas, MUC1-CT y otros factores que previenen su degradación y asisten su maduración<sup>72,216,245</sup>. Este complejo de GR $\alpha$  transloca al núcleo en respuesta a corticoides y con la participación del complejo de poro nuclear, importinas y nucleoporinas. GR $\alpha$  también interacciona con la chaperona Calreticulina, formando un complejo inactivo en el núcleo para exportar el receptor de glucocorticoides  $\alpha$  de nuevo al citoplasma<sup>246,247</sup>. En este punto interesa añadir que MUC4 $\beta$  también interacciona con Calreticulina, lo que podría explicar en parte el “secuestro” de GR $\alpha$  dentro de un complejo multimérico formado por MUC4 $\beta$ -Calreticulina-GR $\alpha$ <sup>248</sup>. No obstante, este mecanismo propuesto es solo una especulación y revela la necesidad de avanzar en los estudios sobre la relación entre la mucina 4 y el receptor de glucocorticoides  $\alpha$ .

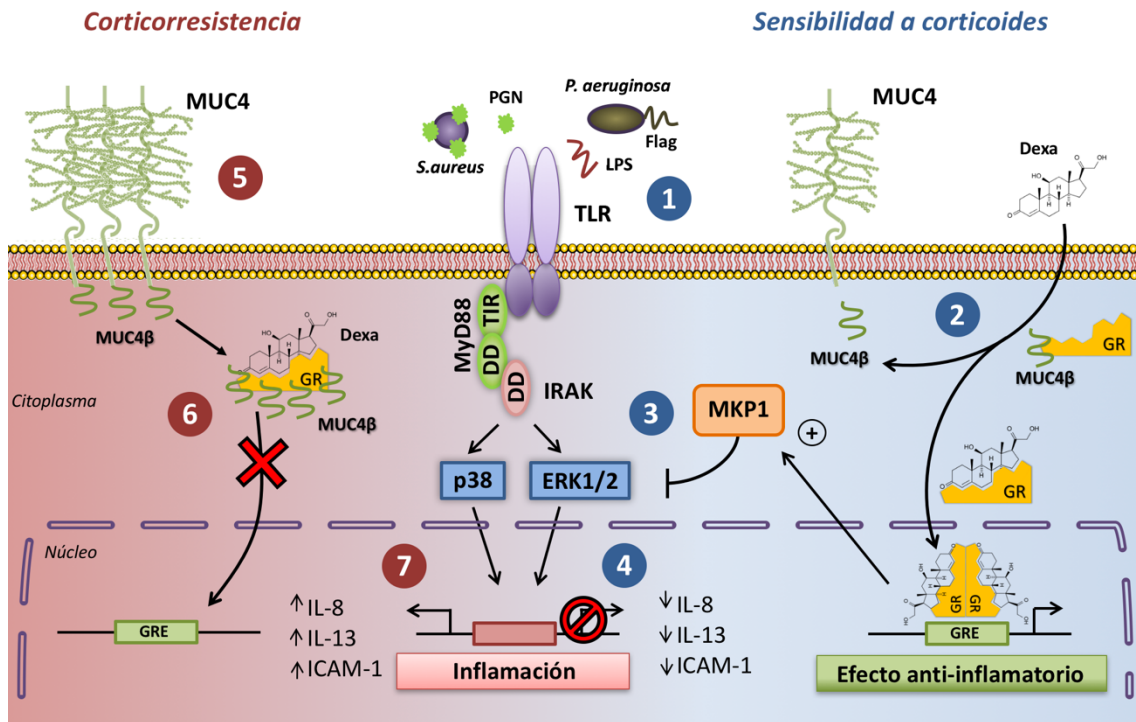
Una vez demostrada la correlación entre la mayor expresión de MUC4 y la falta de respuesta tanto clínica como *in vitro* a los corticoides, era necesario indagar en una posible causalidad y determinar si realmente MUC4 es partícipe en la eficacia anti-inflamatoria de los corticoides. En el capítulo 8 se expone la evidencia de cómo la modulación de MUC4 altera dicha eficacia. En primer lugar, tras el silenciamiento de MUC4 mediante ARN interferente (siRNA-MUC4) en una línea de células epiteliales bronquiales (BEAS-2B), el estímulo con agonistas de TLR2 y TLR4 incrementa de manera significativa la secreción de IL-8 y GM-CSF respecto al silenciamiento negativo (siRNA(-)). Este hecho se corrobora analizando la señalización celular en células siRNA-MUC4, en las que la activación de TLR2 y TLR4 induce una menor fosforilación de ERK1/2 y es prácticamente suprimida en presencia de dexametasona. Dichos resultados sugieren que MUC4 $\beta$  puede participar en la activación de los TLR o inhibiendo la eficacia de los corticoides. Esta última hipótesis se testó midiendo tanto la expresión de MKP1 como la interacción entre GR $\alpha$  y los dominios GRE que provoca dicha expresión con el fin de bloquear la fosforilación de EKR1/2 y la consecuente inflamación<sup>147</sup>. Así pues, se observa que la dexametasona aumenta significativamente la expresión de MKP1 y la señal reportera de unión a dominios

---

GRE en células siRNA-MUC4 en comparación con las células siRNA(-), confirmando la hipótesis de que MUC4 puede inhibir la trans-activación de GR $\alpha$ .

Finalmente, para comprender mejor el efecto directo de la sobre-expresión de MUC4 en la resistencia a corticoides, se generó una línea celular HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 que contiene un sistema de expresión génica inducible por doxiciclina y cuya secuencia codifica el ARNm de MUC4. De este modo, tras incubar estas células con doxiciclina la expresión de MUC4 se incrementa hasta 100 veces. Tras incubar las células HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 con doxiciclina, el tratamiento con dexametasona muestra menos efecto inhibitorio sobre la liberación de IL-8 inducida por LPS, así como la inducción de GRE y expresión de MKP1 están disminuidas. Además, el complejo MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  no se disocia en las células HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 tratadas con doxiciclina, que al sobre-expresar MUC4 mimetizan las observaciones en células de PN de pacientes no respondedores y corroboran el efecto de MUC4 sobre la sensibilidad a corticoides. No obstante, existe todavía una falta de evidencia sobre la función de MUC4 en la eficacia de los corticoides en otros tejidos o células inflamatorias, así como en otras enfermedades donde también se observa el fenómeno de corticorresistencia como el asma severo y la EPOC<sup>172</sup>. Se debe enfatizar que los experimentos aquí discutidos se han realizado con células epiteliales bronquiales (BEAS-2B) y en una línea HEK293 que sobre-expresa MUC4. Ambas presentan diferencias biológicas con las células epiteliales primarias de NP, lo que representa una potencial limitación en este trabajo.

En resumen, se ha demostrado un nuevo rol para MUC4 en la modulación de los efectos anti-inflamatorios de los corticoides (**Figura 9.2**) en pacientes con RSN-PN que puede ayudar a explicar y diagnosticar las diferencias inter-individuales en la respuesta a corticoides.



**Figura 9.2 MUC4 como modulador de los efectos anti-inflamatorios de los corticosteroides en pacientes RSC-PN.** 1, en un contexto inflamatorio como las infecciones del sistema respiratorio, el reconocimiento de patrones asociados a patógenos como LPS o PGN por los receptores tipo Toll (TLR) inicia la señalización del adaptador MyD88, que a su vez activa a las quinasas p38 y ERK1/2, desencadenando la transcripción de genes pro-inflamatorios (7) como IL-8 e ICAM-1. 2, la región citoplasmática de MUC4 (MUC4β) forma un complejo con el receptor de glucocorticoides α (GR) en el citoplasma. La dexametasona provoca la separación de este complejo, liberando a GR para su translocación al núcleo y la dimerización del receptor, que se une a los dominios de respuesta a glucocorticoides (GRE) e inicia la transcripción de genes anti-inflamatorios. 3, entre los genes expresados por GRE destaca MKP1, que actúa inhibiendo la activación de las quinasas que median los TLR, (4) reduciendo de este modo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias por esta vía. 5, no obstante, cuando la expresión de MUC4 está aumentada, la dexametasona es incapaz de disgregar los complejos MUC4β-GR y de este modo permitir la translocación nuclear del receptor (6). De este modo, se produce un estado de corticorresistencia, en el que los corticoides son incapaces de reducir la expresión de genes pro-inflamatorios y la consecuente inflamación del tejido (7).

### 9.3 Relación entre la mucina 1 y la mucina 4 en el contexto de la resistencia a corticoides

En los dos apartados previos se ha discutido la hipótesis de que las mucinas MUC1 y MUC4 podían participar en la señalización del Receptor de Glucocorticoides  $\alpha$  (GR $\alpha$ ) y de este modo influir en la eficacia anti-inflamatoria de los corticoides. Los resultados, en su mayoría publicados en Milara J *et al.* en 2015<sup>216</sup> (**Anexo 3**) y 2016<sup>249</sup> (**Anexo 4**), demuestran como MUC1 y MUC4 modulan la translocación nuclear de GR $\alpha$ , positiva y negativamente, respectivamente. Puesto que la implicación de MUC1 y MUC4 es totalmente antagónica, quedaría por discutir si existe una relación entre MUC1 y MUC4. Para ello, en Milara *et al.*<sup>249</sup> (**Anexo 4**) se analizó el ratio de expresión de ambas mucinas en los pacientes de RSC-PN. Los pacientes corticorresistentes presentaron una proporción MUC1/MUC4 significativamente más baja que los grupos respondedores. Por otro lado, estudios previos demostraron que la terapia con corticosteroides aumenta la expresión de MUC1 y disminuyen la de MUC4 en pólipos nasales. Esta relación con los corticoides tiene sentido teniendo en cuenta la regulación positiva de su actividad por MUC1 y negativa por MUC4. De manera que un ratio MUC1/MUC4 bajo podría considerarse anómalo y un posible marcador de corticorresistencia.

Por tanto, una posibilidad era que la disminución en la expresión de MUC1 incrementara MUC4, o viceversa. Sin embargo, los estudios de silenciamiento génico en células BEAS-2B mostraron que la modulación de cualquiera de las dos mucinas no alteraba la expresión de la otra<sup>249</sup> (**Anexo 4**). Por lo tanto, la expresión alterada de la mucina 1 y 4, inducida o no por corticoides, parece independiente la una de la otra y de causa desconocida, quedando pendiente de estudio.





## **CAPÍTULO 10**

## **CONCLUSIONES**



---

## CONCLUSIONES

---

- Los neutrófilos de pacientes asmáticos resistentes a corticoides mostraron insensibilidad a la dexametasona *ex vivo* y una correlación positiva entre la expresión de MUC1 y la reversibilidad de la limitación al flujo aéreo tras el tratamiento con corticoides.
- El silenciamiento génico de MUC1 en células endoteliales HMVEC-L y monocitos U937 redujo la eficacia inhibitoria de la dexametasona sobre la adhesión y migración celular, respectivamente.
- El modelo murino MUC1-KO de asma agudo mimetizó la fisiopatología del asma alérgico humano y presentó insensibilidad a dexametasona *in vivo* y *ex vivo* en base a la ausencia únicamente de la proteína MUC1.
- La insensibilidad a corticoides en sujetos asmáticos se debería, en parte, a la ausencia del complejo MUC1-GR $\alpha$ , que media la translocación nuclear de GR $\alpha$  en presencia de corticoides.
- Los pacientes RSC-PN que no respondieron a corticoides orales mostraron una mayor expresión de MUC4 comparada con el tejido de pólipos nasal de pacientes respondedores.
- El silenciamiento y la sobre-expresión de MUC4 *in vitro*, aumentó y redujo la eficacia anti-inflamatoria de la dexametasona, respectivamente.
- MUC4 $\beta$  forma un complejo con GR $\alpha$  en el citoplasma que se disgrega en respuesta a dexametasona, permitiendo la translocación al núcleo de GR $\alpha$ .
- Nuestros resultados sugieren que los corticoides no pueden reducir la inflamación en la poliposis nasal corticorresistente debido, en parte, al exceso en la formación del complejo MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$ .



## **BIBLIOGRAFÍA**



---

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Hall 1946-, J. E. (John E. *Guyton and Hall textbook of medical physiology* / John E. Hall. *Textbook of medical physiology* (2011).
2. Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikström, M. E. & Jahnsen, F. L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 142–152 (2008).
3. Ganesan, S., Comstock, A. T. & Sajjan, U. S. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue barriers* **1**, e24997 (2013).
4. Fehervari, Z. & Kiyono, H. The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends Immunol.* **29**, 503–504 (2008).
5. Kierszenbaum, A. L. Histology and Cell Biology—An Introduction to Pathology. *Tissue and Cell* 157–163 (2006). doi:10.1016/S0040816602000733
6. nhlbi.nih.gov. NHLBI. *health-topics* (2012). Available at: <https://www.nlm.nih.gov/health/health-topics/topics/hlw/system>.
7. Knight, D. a & Holgate, S. T. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* **8**, 432–446 (2003).
8. Whitsett, J. A. & Alenghat, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* **16**, 27–35 (2014).
9. Pohl, C. *et al.* Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **72**, 339–349 (2009).
10. Parker, D. & Prince, A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 189–201 (2011).
11. Knowles, M. R. & Boucher, R. C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* **109**, 571–577 (2002).
12. Hogg, J. C. & Timens, W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 435–59 (2009).
13. Shaykhiev, R. *et al.* Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 877–92 (2011).
14. de Boer, W. I. *et al.* Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 105–112 (2008).
15. Whitsett, J. a & Alenghat, T. IMMUNOLOGY OF THE LUNG Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Publ. Gr.* **16**, 27–35 (2015).

- 
16. Coyne, C. B. *et al.* Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3218–3234 (2002).
  17. Ibrahim, H. R., Aoki, T. & Pellegrini, A. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 671–693 (2002).
  18. Ellison, R. T. & Giehl, T. J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* **88**, 1080–1091 (1991).
  19. Ganz, T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 693–697 (2002).
  20. Van der Strate, B. W. A., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M. C. & Meijer, D. K. F. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research* **52**, 225–239 (2001).
  21. Bals, R. & Hiemstra, P. S. Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal* **23**, 327–333 (2004).
  22. Puchelle, E., de Bentzmann, S. & Zahm, J. M. Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches. *Respiration*. **62 Suppl 1**, 2–12 (1995).
  23. Tarran, R., Grubb, B. R., Gatzky, J. T., Davis, C. W. & Boucher, R. C. The Relative Roles of Passive Surface Forces and Active Ion Transport in the Modulation of Airway Surface Liquid Volume and Composition. *J. Gen. Physiol.* **118**, 223–236 (2001).
  24. Rose, M. C., Nickola, T. J. & Voynow, J. A. Airway mucus obstruction: Mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 533–537 (2001).
  25. Thornton, D. J., Rousseau, K. & McGuckin, M. A. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 459–486 (2008).
  26. Rose, M. C. Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **86**, 245–278 (2006).
  27. Wickström, C., Davies, J. R., Eriksen, G. V., Veerman, E. C. & Carlstedt, I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem. J.* **334 ( Pt 3)**, 685–93 (1998).
  28. Hovenberg, H. W., Davies, J. R. & Carlstedt, I. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem. J.* **318 ( Pt 1)**, 319–324 (1996).
  29. Rogers, D. F. The airway goblet cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **35**, 1–6 (2003).
  30. Dohrman, A. *et al.* Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-
-



- 
- positive and Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1406**, 251–259 (1998).
31. Gensch, E. *et al.* Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK. *J. Biol. Chem.* **279**, 39085–39093 (2004).
  32. Shao, M. X. G. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L420–L427 (2004).
  33. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R. & Huffnagle, G. B. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev. Respir. Med.* **7**, 245–257 (2013).
  34. Sze, M. A. *et al.* The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 1073–1080 (2012).
  35. Hansel, T. T., Johnston, S. L. & Openshaw, P. J. Microbes and mucosal immune responses in asthma. *The Lancet* **381**, 861–873 (2013).
  36. Arancibia, S. A. *et al.* Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biological Research* **40**, 97–112 (2007).
  37. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The airway epithelium in asthma. *Nat. Med.* **18**, 684–692 (2012).
  38. Cleaver, J. O., You, D., Duggan, J. & Evans, S. E. Lung epithelial TLR signaling is essential to inducible resistance to pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, (2012).
  39. Van Maele, L. *et al.* Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol.* **7**, 489–500 (2014).
  40. Hammad, H. *et al.* House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* **15**, 410–416 (2009).
  41. Greene, C. M. & McElvaney, N. G. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **53**, 418–427 (2005).
  42. Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M. R. & Regamey, N. The airway epithelium: Soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 210–229 (2011).
  43. Rich, R. *Clinical immunology. Clinical immunology* (2013). doi:10.1080/01422419908228843
  44. Voynow, J. A. & Mengr, B. K. R. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* **135**, 505–512 (2009).
  45. Hollingsworth, M. A. & Swanson, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 45–60 (2004).
-

- 
46. Bafna, S., Kaur, S. & Batra, S. K. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* **29**, 2893–2904 (2010).
  47. Ponnusamy, M. P. *et al.* Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition. *Curr Cancer Drug Targets* **13**, 945–956 (2013).
  48. Carraway, K. L., Funes, M., Workman, H. C. & Sweeney, C. Contribution of Membrane Mucins to Tumor Progression Through Modulation of Cellular Growth Signaling Pathways. *Current Topics in Developmental Biology* **78**, 1–22 (2007).
  49. Carraway, K. L., Ramsauer, V. P., Haq, B. & Carothers Carraway, C. A. Cell signaling through membrane mucins. *BioEssays* **25**, 66–71 (2003).
  50. Van Klinken, B. J., Dekker, J., Büller, H. a & Einerhand, a W. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am. J. Physiol.* **269**, 613–627 (1995).
  51. Jonckheere, N. & Van Seuningen, I. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie* **92**, 1–11 (2010).
  52. Article, O. Expression of Membrane-Bound Mucins in Human Nasal Mucosa. **136**, 603–609 (2014).
  53. Martínez-Antón, a *et al.* Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 448–57 (2006).
  54. Kim, K. C. Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **25**, 415–419 (2012).
  55. Singh, A. P. *et al.* Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas. *Prostate* **66**, 421–429 (2006).
  56. Singh, A. P., Chaturvedi, P. & Batra, S. K. Emerging roles of MUC4 in cancer: A novel target for diagnosis and therapy. *Cancer Research* **67**, 433–436 (2007).
  57. Agrawal, B., Krantz, M. J., Parker, J. & Longenecker, B. M. Expression of MUC1 Mucin on Activated Human T Cells : Implications for a Role of MUC1 in Normal Immune Regulation Advances in Brief Expression of MUC1 Mucin on Activated Human T Cells : Implications for a Role of MUC1 in Normal Immune Regulation. 4079–4081 (1998).
  58. Kim, K. C. & Lillehoj, E. P. MUC1 mucin: A peacemaker in the lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **39**, 644–647 (2008).
  59. Zrihan-Licht, S., Baruch, A., Elroy-Stein, O., Keydar, I. & Wreschner, D. H. Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins Cytokine receptor-like molecules. *FEBS Lett.* **356**, 130–136 (1994).
  60. Li, Y., Dinwiddie, D. L., Harrod, K. S., Jiang, Y. & Kim, K. C. Anti-inflammatory
-

- 
- effect of MUC1 during respiratory syncytial virus infection of lung epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **298**, L558-63 (2010).
61. Ueno, K. *et al.* MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **38**, 263–268 (2008).
62. Kyo, Y. *et al.* Anti-inflammatory role of MUC1 mucin during nontypeable Haemophilus influenzae infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1–34 (2011). doi:10.1165/rcmb.2011-0142OC
63. Kato, K. *et al.* Membrane-Tethered MUC1 Mucin Is Phosphorylated by Epidermal Growth Factor Receptor in Airway Epithelial Cells and Associates with TLR5 To Inhibit Recruitment of MyD88. *J. Immunol.* **188**, 2014–2022 (2012).
64. Bendouah, Z., Barbeau, J., Hamad, W. A. & Desrosiers, M. Biofilm formation by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **134**, 991–996 (2006).
65. Iikura, M. *et al.* The importance of bacterial and viral infections associated with adult asthma exacerbations in clinical practice. *PLoS One* **10**, (2015).
66. Wei, X., Xu, H. & Kufe, D. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell* **21**, 295–305 (2006).
67. Chen, Y.-T. *et al.* Cigarette smoke induces epidermal growth factor receptor-dependent redistribution of apical MUC1 and junctional beta-catenin in polarized human airway epithelial cells. *Am. J. Pathol.* **177**, 1255–64 (2010).
68. Wen, Y., Caffrey, T. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R. & Hollingsworth, M. A. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and  $\beta$ -catenin. *J. Biol. Chem.* **278**, 38029–38039 (2003).
69. Chaturvedi, P., Singh, A. P. & Batra, S. K. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB J.* **22**, 966–981 (2007).
70. Riese, D. J. & Stern, D. F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays* **20**, 41–48 (1998).
71. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
72. Ramsauer, V. P., Carraway, C. A. C., Salas, P. J. I. & Carraway, K. L. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 30142–30147 (2003).
73. Carraway, K. L., Theodoropoulos, G., Kozloski, G. A. & Carothers Carraway, C. A. Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncol.* **5**, 1631–40 (2009).
74. Jonckheere, N. *et al.* The mucin muc4 and its membrane partner erbb2
-

- 
- regulate biological properties of human capan-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS One* **7**, (2012).
75. Hattori, T., Zhou, X., Trudeau, J. B. & Wenzel, S. E. MUC4 Protein Is Increased In Severe Asthmatic Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, A2404 (2013).
  76. Woo, H.-J., Bae, C. H., Song, S.-Y., Lee, H.-M. & Kim, Y.-D. Expression of membrane-bound mucins in human nasal mucosa: different patterns for MUC4 and MUC16. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **136**, 603–609 (2010).
  77. Aguilar, A. J., Domínguez, J., Lobo, M. Á. & Crespo, A. *Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA)*. (2017).
  78. Editor, A. R. B. Heterogeneity in Asthma. 233–254 (2014). doi:10.1007/978-1-4614-8603-9
  79. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* **16**, 45–56 (2014).
  80. Holgate, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* **18**, 673–683 (2012).
  81. Erle, D. J. & Sheppard, D. The cell biology of asthma. *J. Cell Biol.* **205**, 621–631 (2014).
  82. Wenzel, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* **18**, 716–725 (2012).
  83. Al-Muhsen, S., Johnson, J. R. & Hamid, Q. Remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 451–462 (2011).
  84. Halwani, R., Al-Muhsen, S. & Hamid, Q. Airway remodeling in asthma. *Current Opinion in Pharmacology* **10**, 236–245 (2010).
  85. Royce, S. G., Cheng, V., Samuel, C. S. & Tang, M. L. K. The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma. *Molecular and Cellular Endocrinology* **351**, 167–175 (2012).
  86. Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 430–438 (2001).
  87. Kumar, R. Understanding airway wall remodelation in asthma: a basis for improvement in therapy? *Pharmacol. Ther.* **91**, 93–104 (2001).
  88. Polosa, R. *et al.* Expression of c-erbB receptors and ligands in the bronchial epithelium of asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 75–81 (2002).
  89. Barnes, P. J. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol. Rev.* **242**, 31–50 (2011).
  90. Wilson, J. W. & Kotsimbos, T. Airway vascular remodeling in asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 153–8 (2003).
-

- 
91. Kanoh, S., Tanabe, T. & Rubin, B. K. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells. *Clin. Exp. Allergy* **41**, 1747–1756 (2011).
  92. Wynn, T. A. IL-13 effector functions. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 425–56 (2003).
  93. Ingram, J. L. & Kraft, M. IL-13 in asthma and allergic disease: Asthma phenotypes and targeted therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **130**, 829–842 (2012).
  94. Ordoñez, C. L. *et al.* Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 517–23 (2001).
  95. Seow, C. Y., Schellenberg, R. R. & Paré, P. D. Structural and Functional Changes in the Airway Smooth Muscle of Asthmatic Subjects. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, 179–186 (1998).
  96. Hogg, J. C., Pare, P. D., Boucher, R. C. & Michoud, M. C. The pathophysiology of asthma. *Canadian Medical Association Journal* **121**, 409–414 (1979).
  97. Beasley, R., Crane, J., Lai, C. K. & Pearce, N. Prevalence and etiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, S466–S472 (2000).
  98. Urrutia, I. *et al.* Cambios en la prevalencia de asma en la población española del Estudio de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea (ECRHS-II). *Arch. Bronconeumol.* **43**, 425–430 (2007).
  99. Taube, C., Dakhama, A. & Gelfand, E. W. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *International Archives of Allergy and Immunology* **135**, 173–186 (2004).
  100. Shin, Y. S., Takeda, K. & Gelfand, E. W. Understanding asthma using animal models. **1**, 10–18 (2009).
  101. Nials, A. T. & Uddin, S. Mouse models of allergic asthma : acute and chronic allergen challenge. **220**, 213–220 (2008).
  102. Henderson, W. R. *et al.* The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. *J. Exp. Med.* **184**, 1483–94 (1996).
  103. Johnson, J. R. *et al.* Continuous Exposure to House Dust Mite Elicits Chronic Airway Inflammation and Structural Remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 378–385 (2004).
  104. Leino, M. S. *et al.* Intranasal exposure to *Stachybotrys chartarum* enhances airway inflammation in allergic mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 512–518 (2006).
  105. Chapoval, S. P. *et al.* Allergic inflammatory response to short ragweed allergenic extract in HLA-DQ transgenic mice lacking CD4 gene. *J Immunol* **168**, 890–899 (2002).
  106. Corry, D. B. *et al.* Interleukin 4, but Not Interleukin 5 or Eosinophils, Is
-

- 
- Required in a Murine Model of Acute Airway Hyperreactivity. *J. Exp. Med.* **183**, 109–117 (1996).
107. POLINA. Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal SEAIC-SEORL PROYECTO POLINA. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **21**, (2011).
108. Fokkens, W. J. *et al.* EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* **50**, 1–12 (2012).
109. Connor, S. E. J., Hussain, S. & Woo, E. K. F. Sinonasal imaging. *Imaging* **19**, 39–54 (2007).
110. AH, M. in *Goldman L, Schafer AI, eds. Goldman's Cecil Medicine. 25th ed.* chap 426 (2016).
111. Ali, M. S., Wilson, J. a, Bennett, M. & Pearson, J. P. Mucin gene expression in nasal polyps. *Acta Otolaryngol.* **125**, 618–24 (2005).
112. Denburg, J. A. *et al.* Contribution of basophil/mast cell and eosinophil growth and differentiation to the allergic tissue inflammatory response. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **82**, 321–326 (1987).
113. Ohno, I. *et al.* Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor beta 1 gene (TGF beta 1). *J Clin Invest* **89**, 1662–1668 (1992).
114. Xaubet, A. *et al.* Comparison of the role of nasal polyp and normal nasal mucosal epithelial cells on in vitro eosinophil survival. Mediation by GM-CSF and inhibition by dexamethasone. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 307–317 (1994).
115. Simon, H. U. *et al.* Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J. Immunol.* **158**, 3902–8 (1997).
116. Sanchez-Segura, A., Brieva, J. A. & Rodriguez, C. T lymphocytes that infiltrate nasal polyps have a specialized phenotype and produce a mixed T(H1)/T(H2) pattern of cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 953–960 (1998).
117. Bartels, J. *et al.* Increased eotaxin-mRNA expression in non-atopic and atopic nasal polyps: Comparison to RANTES and MCP-3 expression. *Rhinology* **35**, 171–174 (1997).
118. Symon, F. A., Walsh, G. M., Watson, S. R. & Wardlaw, A. J. Eosinophil adhesion to nasal polyp endothelium is P-selectin-dependent. *J. Exp. Med.* **180**, 371–6 (1994).
119. GEVAERT, P. EOSINOPHILIC INFLAMMATION IN NASAL POLYPOSI: REGULATION OF INTERLEUKIN 5 AND INTERLEUKIN 5 RECEPTOR  $\alpha$  ISOFORMS. (Universiteit Gent, 2004).
120. Bachert, C., Zhang, N., Patou, J., van Zele, T. & Gevaert, P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr.Opin.Allergy*
-

- 
- Clin. Immunol.* **8**, 34–38 (2008).
121. Shin, S. H. *et al.* Chronic rhinosinusitis: An enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 1369–1375 (2004).
  122. Zhang, Q. *et al.* Differential expression of Toll-like receptor pathway genes in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps. *Acta Otolaryngol* **133**, 165–173 (2013).
  123. Lund, V. J. Management of nasal polyps: is objective assessment possible? *Acta Otorhinolaryngol Belg* **49**, 219–224 (1995).
  124. Lund, V. J., Flood, J., Sykes, a P. & Richards, D. H. Effect of fluticasone in severe polyposis. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **124**, 513–8 (1998).
  125. Virolainen, E. & Puhakka, H. The effect of intranasal beclomethasone dipropionate on the recurrence of nasal polyps after ethmoidectomy. *Rhinology* **18**, 9–18 (1980).
  126. Mygind, N. & Lildholdt, T. Nasal polyps treatment: medical management. *Allergy Asthma Proc* **17**, 275–282 (1996).
  127. Krouse, H. A., Phung, N. D. & Klaustermeyer, W. B. Intranasal beclomethasone in severe rhinosinusitis and nasal polyps. *Ann. Allergy* **50**, 385–388 (1983).
  128. van Camp, C. & Clement, P. A. Results of oral steroid treatment in nasal polyposis. *Rhinology* **32**, 5–9 (1994).
  129. Beato, M. & Klug, J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update* **6**, 225–236 (2000).
  130. Whitfield, G. K., Jurutka, P. W., Haussler, C. a & Haussler, M. R. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J. Cell. Biochem. Suppl* **32-3**, 110–22 (1999).
  131. Lipwort, B. Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity. *Lancet* **356**, 87–89 (2000).
  132. Zhou, J. & Cidlowski, J. A. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* **70**, 407–17 (2005).
  133. Hollenberg, S. M. *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635–41 (1985).
  134. Duma, D., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**, 11–21 (2006).
  135. Presul, E., Schmidt, S., Kofler, R. & Helmbert, A. Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor. *J. Mol. Endocrinol.* **38**, 79–90 (2007).
  136. Turner, J. D. & Muller, C. P. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1)
-

- 
- gene 5' untranslated region: Identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J. Mol. Endocrinol.* **35**, 283–292 (2005).
137. Burnstein, K. L., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. **265**, 7284–7291 (1990).
  138. Stahn, C. & Buttgereit, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pr. Rheumatol* **4**, 525–533 (2008).
  139. Schoneveld, O. J. L. M., Gaemers, I. C. & Lamers, W. H. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1680**, 114–128 (2004).
  140. Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C. Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr. Rev.* **35**, 671–693 (2014).
  141. Riestter, A. *et al.* ACTH-dependent regulation of microRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland. *Endocrinology* **153**, 212–22 (2012).
  142. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* **286**, 3177–3184 (2011).
  143. Lu, N. Z. & Cidlowski, J. A. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* **16**, 301–307 (2006).
  144. Lewis-Tuffin, L. J. & Cidlowski, J. A. The Physiology of Human Glucocorticoid Receptor beta (hGRbeta) and Glucocorticoid Resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1069**, 1–9. DOI: 10.1196/annals.1351.001 (2006).
  145. Kumar, R. & Thompson, E. B. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64**, 310–319 (1999).
  146. Luisi, B. F. *et al.* Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**, 497–505 (1991).
  147. Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C. On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. *Traffic* **13**, 364–374 (2012).
  148. Cheung, J. & Smith, D. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol. Endocrinol.* **14**, 939–46 (2000).
  149. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306–360 (1997).
  150. Morishima, Y., Murphy, P. J. M., Li, D. P., Sanchez, E. R. & Pratt, W. B. Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *J. Biol. Chem.* **275**, 18054–18060 (2000).
-



- 
151. Rexin, M., Busch, W. & Gehring, U. Protein components of the nonactivated glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 24601–24605 (1991).
  152. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 950–964 (2004).
  153. Pratt, W. B., Silverstein, A. M. & Galigniana, M. D. A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50(cdc37). *Cell. Signal.* **11**, 839–851 (1999).
  154. Tao, T., Lan, J., Lukacs, G. L., Haché, R. J. G. & Kaplan, F. Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 668–80 (2006).
  155. Hayashi, R., Wada, H., Ito, K. & Adcock, I. M. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur. J. Pharmacol.* **500**, 51–62 (2004).
  156. Schäcke, H., Döcke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* **96**, 23–43 (2002).
  157. Barnes, P. J. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 29–43 (2011).
  158. Necela, B. M. & Cidlowski, J. A. Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells. *Proc Am Thorac Soc* **1**, 239–246 (2004).
  159. Almawi, W. Y. & Melemedjian, O. K. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J. Mol. Endocrinol.* **28**, 69–78 (2002).
  160. Adcock, I. M. & Caramori, G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol. Cell Biol.* **79**, 376–384 (2001).
  161. Galofré, J. C. Manejo de los corticoides en la práctica clínica. *Rev. Medica Univ. Navarra* **53**, 9–18 (2009).
  162. McKenna, T. in *Endocrinology and Metabolism* 329–336 (2001).
  163. Buttgereit, F., Straub, R. H., Wehling, M. & Burmester, G. R. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.* **50**, 3408–3417 (2004).
  164. Van Cauwenberge, P., Van Zele, T. & Bachert, C. Chronic rhinosinusitis and nasal polyposis: the etiopathogenesis revealed? *Verh. - K. Acad. voor Geneesk. van België* **70**, 305–22 (2008).
  165. Rudack, C., Bachert, C. & Stoll, W. Effect of Prednisolone on Cytokine Synthesis in Nasal Polyps. *J. Interf. Cytokine Res.* **19**, 1031–1035 (1999).
  166. Rudack, C. & Bachert, C. Glucocorticosteroids rapidly inhibit allergen-induced expression of E-selectin in vitro in a mucosal model of allergic rhinitis. *Allergy* **55**, 363–8 (2000).
-

- 
167. Bachert, C. & Geveart, P. Effect of intranasal corticosteroids on release of cytokines and inflammatory mediators. *Allergy* **54 Suppl 5**, 116–23 (1999).
  168. Henriksson, G. *et al.* Effects of Topical Budesonide Treatment on Glucocorticoid Receptor mRNA Down-Regulation and Cytokine Patterns in Nasal Polyps. (2016).
  169. Naclerio, R. M. *et al.* Intranasal steroids inhibit seasonal increases in ragweed-specific immunoglobulin IE antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 717–721 (1993).
  170. Godthelp, T. *et al.* Antigen presenting cells in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis during allergen provocation. *Clin. Exp. Allergy* **26**, (1996).
  171. Barnes, P. J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **120**, 76–85 (2010).
  172. Barnes, P. J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 636–645 (2013).
  173. ten Brinke, A., Zwinderman, A. H., Sterk, P. J., Rabe, K. F. & Bel, E. H. ‘Refractory’ eosinophilic airway inflammation in severe asthma: effect of parenteral corticosteroids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**, 601–5 (2004).
  174. Reddel, H. K. *et al.* A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur. Respir. J.* 1–18 (2015). doi:10.1183/13993003.00853-2015
  175. Tos, M. *et al.* Efficacy of an aqueous and a powder formulation of nasal budesonide compared in patients with nasal polyps. *Am. J. Rhinol.* **12**, 183–9 (1998).
  176. Vendelo Johansen, L. *et al.* The effect of budesonide (Rhinocort) in the treatment of small and medium-sized nasal polyps. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **18**, 524–7 (1993).
  177. Jankowski, R., Klossek, J.-M., Attali, V., Coste, A. & Serrano, E. Long-term study of fluticasone propionate aqueous nasal spray in acute and maintenance therapy of nasal polyposis. *Allergy* **64**, 944–50 (2009).
  178. Small, C. B., Stryszak, P., Danzig, M. & Damiano, A. Onset of symptomatic effect of mometasone furoate nasal spray in the treatment of nasal polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 928–32 (2008).
  179. Tuncer, U., Soylu, L., Aydogan, B., Karakus, F. & Akcali, C. The effectiveness of steroid treatment in nasal polyposis. *Auris. Nasus. Larynx* **30**, 263–8 (2003).
  180. Hissaria, P. *et al.* Short course of systemic corticosteroids in sinonasal polyposis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with evaluation of outcome measures. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 128–33 (2006).
-

- 
181. Valera, F. C. P., Queiroz, R., Scrideli, C., Tone, L. G. & Anselmo-Lima, W. T. Evaluating budesonide efficacy in nasal polyposis and predicting the resistance to treatment. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 81–8 (2009).
  182. Peiró, T., Milara, J., Armengot, M. & Cortijo, J. Steroids & Hormonal Science Mucin Expression and Corticosteroid Efficacy in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. (2014). doi:10.4172/2157-7536.S12-007
  183. Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1711–22 (2013).
  184. Carmichael, J. *et al.* Corticosteroid resistance in chronic asthma. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*. **282**, 1419–22 (1981).
  185. Hakonarson, H. *et al.* Profiling of genes expressed in peripheral blood mononuclear cells predicts glucocorticoid sensitivity in asthma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14789–94 (2005).
  186. Lane, S. J., Arm, J. P., Staynov, D. Z. & Lee, T. H. Chemical mutational analysis of the human glucocorticoid receptor cDNA in glucocorticoid-resistant bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**, 42–8 (1994).
  187. Lane, S. J. & Lee, T. H. Glucocorticoid receptor characteristics in monocytes of patients with corticosteroid-resistant bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 1020–4 (1991).
  188. Corrigan, C. J. *et al.* Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Glucocorticoid pharmacokinetics, glucocorticoid receptor characteristics, and inhibition of peripheral blood T cell proliferation by glucocorticoids in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, 1016–25 (1991).
  189. Sher, E. R. *et al.* Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J. Clin. Invest.* **93**, 33–9 (1994).
  190. Ito, K., Getting, S. J. & Charron, C. E. Mode of glucocorticoid actions in airway disease. *ScientificWorldJournal*. **6**, 1750–69 (2006).
  191. Pujols, L., Mullol, J. & Picado, C. Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **7**, 93–9 (2007).
  192. Webster, J. C., Oakley, R. H., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6865–70 (2001).
  193. Fakhri, S. *et al.* Microbial superantigens induce glucocorticoid receptor beta and steroid resistance in a nasal explant model. *Laryngoscope* **114**, 887–92 (2004).
-

- 
194. Vazquez-Tello, A. *et al.* Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 1312–22 (2010).
  195. Hamilos, D. L. *et al.* GRbeta expression in nasal polyp inflammatory cells and its relationship to the anti-inflammatory effects of intranasal fluticasone. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 59–68 (2001).
  196. Weigel, N. L. & Moore, N. L. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2311–9 (2007).
  197. Irusen, E. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: Role in steroid-insensitive asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 649–657 (2002).
  198. Barnes, P. J. Corticosteroid Resistance in Airway Disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**, 264–268 (2004).
  199. Li, L. B., Goleva, E., Hall, C. F., Ou, L. S. & Leung, D. Y. M. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 1059–1069 (2004).
  200. Papi, A. *et al.* Rhinovirus infection causes steroid resistance in airway epithelium through nuclear factor  $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, (2013).
  201. Valera, F. C. P., Scrideli, C., Queinoz, R., Gonzaiga Tone, L. & Anselmo-Lima, W. T. NF-kappaB expression predicts clinical outcome for nasal polyposis. *Rhinology* **48**, 408–41 (2010).
  202. Takeno, S. *et al.* Nuclear factor-kappa B activation in the nasal polyp epithelium: relationship to local cytokine gene expression. *Laryngoscope* **112**, 53–58 (2002).
  203. Manetsch, M. *et al.* Corticosteroids and  $\beta_2$ -agonists upregulate mitogen-activated protein kinase phosphatase 1: in vitro mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 2049–59 (2012).
  204. Cosío, B. G. *et al.* Histone Acetylase and Deacetylase Activity in Alveolar Macrophages and Blood Mononocytes in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**, 141–147 (2004).
  205. Rahman, I., Marwick, J. & Kirkham, P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1255–1267 (2004).
  206. Kai, H. *et al.* Dexamethasone suppresses mucus production and MUC-2 and MUC-5AC gene expression by NCI-H292 cells. *Am. J. Physiol.* **271**, L484--488 (1996).

- 
207. Lu, W. Effects of dexamethasone on Muc5ac mucin production by primary airway goblet cells. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**, L52–L60 (2004).
  208. Chen, Y., Nickola, T. J., DiFronzo, N. L., Colberg-Poley, A. M. & Rose, M. C. Dexamethasone-mediated repression of MUC5AC gene expression in human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 338–347 (2006).
  209. Kim, Y. D. *et al.* Interleukin-1beta induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol Pharmacol* **62**, 1112–1118 (2002).
  210. Kim, Y. D. *et al.* Regulation of IL-1beta-mediated MUC2 gene in NCI-H292 human airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 112–6 (2000).
  211. Treon, S. P. *et al.* Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood* **93**, 1287–98 (1999).
  212. Imai, M., Hwang, H. Y., Norris, J. S. & Tomlinson, S. The effect of dexamethasone on human mucin 1 expression and antibody-dependent complement sensitivity in a prostate cancer cell line in vitro and in vivo. *Immunology* **111**, 291–297 (2004).
  213. KY, S., SH, C., JH, L., MY, P. & Kim, E. Regulation of membrane-associated mucins in the human corneal epithelial cells by dexamethasone. *Cornea* **26**, 709–14 (2007).
  214. Bai, C. H., Song, S.-Y. & Kim, Y.-D. Effect of glucocorticoid on the MUC4 gene in nasal polyps. *Laryngoscope* **117**, 2169–73 (2007).
  215. Martínez-Antón, A. *et al.* Corticosteroid therapy increases membrane-tethered while decreases secreted mucin expression in nasal polyps. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **63**, 1368–1376 (2008).
  216. Milara, J. *et al.* Mucin 1 downregulation associates with corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1–7 (2014). doi:10.1016/j.jaci.2014.07.011
  217. Slater, A., Smallman, L. A., Logan, A. C. & Drake-Lee, A. B. Mucociliary function in patients with nasal polyps. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **21**, 343–347 (1996).
  218. Barnes, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br. J. Pharmacol.* **148**, 245–254 (2009).
  219. McDougall, C. M. *et al.* Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 560–568 (2008).
  220. Jonckheere, N. & Van Seuningen, I. The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit. Rev. Oncog.* **14**, 177–196 (2008).
-

- 
221. Casadevall, J., Ventura, P. J., Mullol, J. & Picado, C. Intranasal challenge with aspirin in the diagnosis of aspirin intolerant asthma: evaluation of nasal response by acoustic rhinometry. *Thorax* **55**, 921–4 (2000).
  222. Spicer, A. P., Rowse, G. J., Lidner, T. K. & Gendler, S. J. Delayed Mammary Tumor Progression in Muc-1 Null Mice \*. **270**, 30093–30101 (1995).
  223. Milara, J., Armengot, M., Mata, M., Morcillo, E. J. & Cortijo, J. Role of adenylate kinase type 7 expression on cilia motility: Possible link in primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Rhinol. Allergy* **24**, 181–185 (2010).
  224. Komatsu, M., Carothers Carraway, C. A., Fregien, N. L. & Carraway, K. L. Reversible disruption of cell-matrix and cell-cell interactions by overexpression of sialomucin complex. *J. Biol. Chem.* **272**, 33245–33254 (1997).
  225. Mócsai, A. *et al.* G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood* **101**, 4155–4163 (2003).
  226. Sancho, J. <http://www.bifi.es/es/>. Available at: <http://www.bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/21sintesisproteinasyDNA/pcr.jpg>. (Accessed: 24th May 2017)
  227. <http://www.atdbio.com>. (2017). Available at: <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>. (Accessed: 24th May 2017)
  228. Bhavsar, P. *et al.* Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax* **63**, 784–790 (2008).
  229. Lea, S. *et al.* Corticosteroid insensitive alveolar macrophages from asthma patients; Synergistic interaction with a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **79**, 756–766 (2015).
  230. Green, R. H. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax* **57**, 875–879 (2002).
  231. Milara, J. *et al.* Roflumilast improves corticosteroid resistance COPD bronchial epithelial cells stimulated with toll like receptor 3 agonist. *Respir. Res.* **16**, 12 (2015).
  232. Moore, W. C. *et al.* Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, (2014).
  233. Wang, M. *et al.* Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma. *Respir. Res.* **17**, 153 (2016).
  234. Culpitt, S. V *et al.* Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary

- disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 24–31 (2003).
235. Mortaz, E. *et al.* Salmeterol with fluticasone enhances the suppression of IL-8 release and increases the translocation of glucocorticoid receptor by human neutrophils stimulated with cigarette smoke. *J. Mol. Med.* **86**, 1045–1056 (2008).
236. Sarir, H. *et al.* Combination of fluticasone propionate and salmeterol potentiates the suppression of cigarette smoke-induced IL-8 production by macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **571**, 55–61 (2007).
237. Leonardi, S., Coco, A., Del Giudice, M. M., Marseglia, G. L. & La Rosa, M. The airway epithelium dysfunction in the pathogenesis of asthma: The evidence. *Health (Irvine, Calif.)* **5**, 331–338 (2013).
238. Anwar, M. A., Basith, S. & Choi, S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp. Mol. Med.* **45**, e11 (2013).
239. Mercado, N. *et al.* Restoration of corticosteroid sensitivity by p38 mitogen activated protein kinase inhibition in peripheral blood mononuclear cells from severe asthma. *PLoS One* **7**, (2012).
240. Kobayashi, Y., Mercado, N., Barnes, P. J. & Ito, K. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One* **6**, (2011).
241. Ramsauer, V. P. *et al.* Muc4-ErbB2 complex formation and signaling in polarized CACO-2 epithelial cells indicate that Muc4 acts as an unorthodox ligand for ErbB2. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2931–2941 (2006).
242. Kim, S. T., Ye, M. K. & Shin, S. H. Effects of asian sand dust on mucin gene expression and activation of nasal polyp epithelial cells. *Am. J. Rhinol. Allergy* **25**, 303–306 (2011).
243. Shin, S. H., Ye, M. K. & Kim, J. K. Effects of fungi and eosinophils on mucin gene expression in rhinovirus-infected nasal epithelial cells. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* **6**, 149–155 (2014).
244. Choi, B.-R. *et al.* Expression of glucocorticoid receptor mRNAs in glucocorticoid-resistant nasal polyps. *Exp. Mol. Med.* **38**, 466–73 (2006).
245. Grad, I. & Picard, D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* **275**, 2–12 (2007).
246. Burns, K. *et al.* Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* **367**, 476–80 (1994).
247. Roderick, H. L., Campbell, A. K. & Llewellyn, D. H. Nuclear localisation of calreticulin in vivo is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors. *FEBS Lett.* **405**, 181–185 (1997).
248. Lomako, J., Lomako, W. M., Carothers Carraway, C. A. & Carraway, K. L. Regulation of the membrane mucin Muc4 in corneal epithelial cells by

- proteosomal degradation and TGF- $\beta$ 1. *J. Cell. Physiol.* **223**, 209–214 (2010).
249. Milara, J. *et al.* MUC4 impairs the anti-inflammatory effects of corticosteroids in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 855–862 (2017).



## **ABREVIATURAS**



---

## ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario.
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
AP-1	Activador de la proteina-1.
BEAS2B	Línea inmortalizada de células epiteliales bronquiales humanas.
BAL	Lavado broncoalveolar.
BEBM	Medio Basal de Epitelio Bronquial.
BSA	Albumina sérica bovina.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
Ct	Ciclo umbral.
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EFG	Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
ERK1/2	Quinasa regulada por señal extracelular.
FEV <sub>1</sub>	Volumen Espiratorio forzado en el primer segundo.
FDG	Fluorodesoxiglucosa.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
HEK293	Línea inmortalizada de células embrionarias de riñón 293.
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
GR $\alpha$	Receptor de glucocorticoides $\alpha$ .
GR $\beta$	Receptor de glucocorticoides $\beta$ .

---

GRE	Elemento de Respuesta a Glucocorticoides.
GR-Ser226	Receptor de glucocorticoides fosforilado en el residuo Serina 226.
HDAC	Histona deacetilasa.
HMVEC-L	Línea inmortalizada de células endoteliales de microvaso pulmonar.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazino etanosulfónico.
HRP	Peroxidasa de rábano.
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular.
IL-5	Interleuquina-5.
IL-6	Interleuquina-6.
IL-8	Interleuquina-8.
IL-13	Interleuquina-13.
JNK	Quinasa c - Jun N -terminal.
KO	Knock Out.
LBD	Dominio de Unión del Ligando.
LPS	Lipopolisacárido.
M	Molar (mol/litro).
MAPK	Protein quinasas activadas por mitógenos.
MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos.
MKP1	MAP Kinasa fosfatasa 1.
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9.
MUC	Mucina.
MUC1-CT	Región C-terminal de la mucina 1.
MUC4 $\alpha$	Subunidad $\alpha$ de la mucina 4.
MUC4 $\beta$	Subunidad $\beta$ de la mucina 4.
NaOH	Hidróxido sódico.
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NPC	Complejo de Poro Nuclear.

---

---

OMS	Organización Mundial de la Salud.
PBS	Tampón salino fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PET	Tomografía por Emisión de Positrones.
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa.
PN	Polipósis Nasal.
PN-sA	Polipósis nasal sin Asma.
PN-AIA	Polipósis nasal con Asma e intolerancia a los AINES.
PN-ATA	Polipósis nasal con Asma y tolerancia a los AINES.
PN-CR	Polipósis nasal corticorresistente.
p-ERK	Proteína ERK fosforilada.
p-P38	Proteína P38 fosforilada.
ROI	Region de interés.
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute.
RSC-PN	Rinosinusitis Crónica asociada a Pólipos Nasaes.
RT	Retrotranscripción inversa.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
TC	Tomografía Computarizada.
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1.
TNF- $\alpha$	Factor $\alpha$ de necrosis tumoral.
TLR	Receptor tipo Toll.
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina.
UFR	Unidades de fluorescencia relativa.
U937	Línea inmortalizada de células tipo monocito 937.
VCAM	Molécula de adhesión vascular.
VOI	Volumen de interés.
WT	Wild Type.

---



## **ANEXOS**





## **ANEXO 1**

Aprobación del comité ético y modelo de  
consentimiento informado de estudio con pacientes



## APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

### - ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 28 de Mayo de 2015 el Proyecto de Investigación:

Título:	Papel de las mucinas ancladas a membrana sobre la corticorresistencia en pacientes asmáticos y con rinosinusitis crónica asociada a poliposis nasal		
I.P.:	Miguel Armengot Carceller	Servicio/Unidad	Otorrinolaringología

Acuerda respecto a esta documentación:

Que la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.  
Al ser el Doctor Miguel Armengot Carceller miembro del CEIC no estuvo presente en la evaluación de este Proyecto de investigación

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente	Ausente	Disculpa
<b>Presidente</b>	Dr. Severiano Marín Bertolín			X
	D. Ernesto Bataller Alonso		X	
	D. Alejandro Moner González	X		
<b>Miembros Lego</b>	Dña. M <sup>a</sup> Teresa Jareño Roglan		X	
	Dña. Encarna Domingo Cebrián			X
	D. Jaime Alapont Pérez	X		
	Dña. Carmen Sarmiento Cabañes	X		
	D. Antonio Baltasar Olivas Nevado		X	
	Dr. D. José Manuel Iranzo Miguélez		X	
	Dr. D. Miguel Armengot Carceller	X		
<b>Vocales</b>	Dr. D. Julio Cortijo Gimeno	X		
	Dra. Dña. Elena Rubio Gomis	X		
	Dr. D. Gustavo Juan Samper	X		
	Dra. Pilar Blasco Segura	X		
	Dra. M <sup>a</sup> José Safont Aguilera	X		
	Dra. Ana Blasco Cordellat			X

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

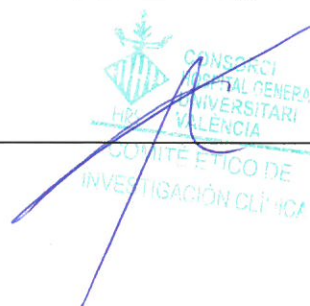
	Presente	Ausente	Disculpa
Dr. Antonio Martorell Aragonés			x
Dr. Aurelio Quesada Dorador		x	
Dr. Pedro Polo Martin	x		
Dra. Inmaculada Sáez Ferrer	x		
Dr. Alberto Berenguer Jofresa	x		
Dra. Goitzane Marcaida Benito	x		
Dr. Javier Milara Payá	X		
Secretario Dra. Ana Mínguez Martí	X		

En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente- Real Decreto 223/2004- para que la decisión del citado CEIC sea válida. El CEIC en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 01 de junio de 2015

Fdo. Dr Severiano Marin Bertolin  
(Presidente CEIC CHGUV)



CONSORCIO  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA  
COMITÉ ÈTIC DE  
INVESTIGACIÓ CLÍNICA

## APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

### - ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 2 de octubre de 2014 el Proyecto de Investigación:

<b>Título:</b>	Papel de las mucinas ancladas a membrana sobre la corticorresistencia en pacientes asmáticos y con rinosinusitis crónica asociada a poliposis nasal.		
<b>I.P.:</b>	Dr. Miguel Armengot Carceller	<b>Servicio/Unidad</b>	Otorrinolaringología

Acuerda respecto a esta documentación:

Que la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente	Ausente	Disculpa
<b>Presidente</b>	Dr. Severiano Marín Bertolín	x		
	D. Ernesto Bataller Alonso			x
	D. Alejandro Moner González	X		
	Dña. Mª Teresa Jareño Roglan			x
<b>Miembros Lego</b>	Dña. Encarna Domingo Cebrián	X		
	D. Jaime Alapont Pérez	X		
	Dña. Carmen Sarmiento Cabañes	X		
	D. Antonio Baltasar Olivas Nevado			X
	Dr. D. José Manuel Iranzo Miguélez		X	
	Dr. D. Miguel Armengot Carceller		x	
	Dr. D. Julio Cortijo Gimeno	X		
<b>Vocales</b>	Dra. Dña. Elena Rubio Gomis			x
	Dr. D. Gustavo Juan Samper	X		
	Dra. Pilar Blasco Segura			x
	Dra. Mª José Safont Aguilera	x		
	Dra. Ana Blasco Cordellat	X		

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

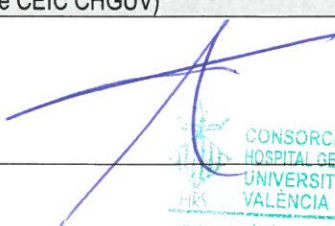
	Presente	Ausente	Disculpa
Dr. Antonio Martorell Aragonés			x
Dr. Aurelio Quesada Dorador			x
Dr. Pedro Polo Martin	x		
Dra. Inmaculada Sáez Ferrer	x		
Dr. Alberto Berenguer Jofresa	X		
Dra. Goitzane Marcaida Benito	X		
Dr. Javier Milara Payá			x
Secretario Dra. Ana Mínguez Martí			x

En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente- Real Decreto 223/2004- para que la decisión del citado CEIC sea válida. El CEIC en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 03 de octubre de 2014

Fdo. Dr Severiano Marin Bertolin  
(Presidente CEIC CHGUV)



CONSORCI  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA  
COMITÉ ÈTIC DE  
INVESTIGACIÓ CLÍNICA

## **ANEXO 2**

Autorización para el procedimiento de  
experimentación animal





**AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00064**

Vista la solicitud realizada en fecha **03/04/17** con nº reg. entrada **15929** por D/D<sup>a</sup>. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

***“Determinación de la implicación de MUC1 en la respuesta a Dexametasona en un model de Asma agudo en ratón”***

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

**AUTORIZO:**

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00064** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Julio Cortijo Gimeno**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina – Campus Blasco Ibañez**

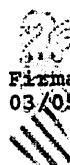
Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca



Firmado por Rogelio Ulanes Ribas el  
03/05/2017 11:57:40  
**GENERALITAT  
VALENCIANA**



## ANEXO 3

Publicación científica

“Mucin 1 downregulation associates with  
corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis  
with nasal polyps”



# Mucin 1 downregulation associates with corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps

Javier Milara, PhD, PharmD,<sup>a,b,c,\*</sup> Teresa Peiró, PhD,<sup>c,d,\*</sup> Miquel Armengot, PhD, MD,<sup>e,f</sup> Soledad Frias, MD,<sup>e</sup> Anselm Morell,<sup>c,d</sup> Adela Serrano, PhD,<sup>c,g</sup> and Julio Cortijo, PhD<sup>a,c,d,g</sup> Valencia, Spain

**Background:** A number of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) are resistant to oral corticosteroids. Mucin 1 (MUC1) shows anti-inflammatory properties, and its cytoplasmic tail (CT) interacts with transcription factors, facilitating their nuclear translocation. Because glucocorticoid receptor (GR) nuclear translocation is key to the anti-inflammatory effect of corticosteroids, we hypothesized that MUC1 is involved in the effectiveness of corticosteroids.

**Objective:** To analyze the role of MUC1 in corticosteroid effectiveness in different cohorts of patients with CRSwNP and elucidate the possible mechanisms involved.

**Methods:** Seventy-three patients with CRSwNP took oral corticosteroids for 15 days. Corticosteroid resistance was evaluated by nasal endoscopy. The expression of MUC1 and MUC1 CT was evaluated by real-time PCR, Western blotting, and immunohistochemistry. Beas-2B knockdown with RNA interference for MUC1 (siRNA-MUC1) was used to analyze the role of MUC1 in the anti-inflammatory effects of dexamethasone.

**Results:** Nineteen patients had nasal polyps that were resistant to oral corticosteroids (NP-CR). MUC1 expression was downregulated in these patients. Primary epithelial cells from patients with NP-CR were insensitive to the anti-inflammatory effects of dexamethasone. In siRNA-MUC1 Beas-2B, dexamethasone showed weaker anti-inflammatory effects, a reduced inhibition of phospho-extracellular-signal-regulated kinases 1/2, a less severe mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 increase, and a reduced GR nuclear translocation. Immunoprecipitation experiments revealed that MUC1-CT and GR $\alpha$  form protein complexes and translocate to the nucleus in response to dexamethasone. MUC1-CT-GR $\alpha$  complex was downregulated in NP-CR tissue.

**Conclusion:** MUC1-CT participates in the corticosteroid response that mediates GR $\alpha$  nuclear translocation. The low expression of MUC1 in patients with CRSwNP may participate in corticosteroid resistance. (J Allergy Clin Immunol 2015;135:470-6.)

**Key words:** MUC1, corticosteroid resistance, nasal polyp, chronic rhinosinusitis, glucocorticoid receptor

Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a disease of the sinuses characterized by mucosal thickening and polyp formation. CRSwNP is present in approximately 10% to 15% of patients with asthma and more than 90% of patients with aspirin-intolerant asthma.<sup>1</sup> The etiology of nasal polyposis is currently unknown. However, 80% of white patients have major eosinophilic inflammation with a T<sub>H</sub>2 cytokine profile, and bacterial colonization and superantigens might modulate the disease severity.<sup>1</sup>

Corticosteroids show strong anti-inflammatory activity and are the first-line therapy for patients with CRSwNP. Placebo-controlled studies have shown that topical corticosteroid therapy reduces polyp size,<sup>2,3</sup> nasal symptom severity,<sup>4</sup> and the incidence of recurrence after polypectomy.<sup>5,6</sup> However, topical corticosteroid therapy is not effective in all patients, leading to the use of systemic corticosteroids. Significant reductions in symptom severity and polyp size were demonstrated in a study involving a 2-week course of oral corticosteroids.<sup>7</sup> Thus, oral corticosteroids are now accepted as an effective therapy for the treatment of severe CRSwNP. However, a number of patients show resistance to the effects of systemic corticosteroids and must undergo sinus surgery to control the disease.

The epithelial mucus layer represents a protective barrier against pathogens and irritants. Mucins are involved in this protective function by participating in mucociliary clearance. Different roles have been described for mucins depending on whether they are secreted or membrane-bound. Mucin 1 (MUC1), which is a membrane-bound mucin, acts as a sensor receptor and participates in cellular signaling.<sup>8</sup> MUC1 has recently emerged as an anti-inflammatory molecule that inhibits bacteria- and virus-induced inflammation in airways.<sup>9-11</sup> The anti-inflammatory role of MUC1 emanates from its ability to inhibit the activation of several toll-like receptors (TLR2-9) by bacteria and viruses.<sup>9-12</sup>

The MUC1 protein comprises 2 polypeptide subunits: an N-terminal extracellular subunit and a C-terminal subunit. A highly conserved cytoplasmic tail (CT) in the C-terminal subunit modulates multiple intracellular signals.<sup>13</sup> The 72-amino-acid MUC1-CT contains 7 tyrosine residues, the phosphorylation status of which has been associated with intracellular signal transduction in cancer cells as well as with the inhibition of TLR5-MyD88 assembly and consequent inflammation in airway

From <sup>a</sup>the Clinical Research Unit, University General Hospital Consortium; <sup>b</sup>the Department of Biotechnology, Universidad Politécnica de Valencia; <sup>c</sup>the Research Foundation of General Hospital of Valencia; <sup>d</sup>the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Valencia; <sup>e</sup>the Rhinology Unit, University General Hospital Consortium; <sup>f</sup>the Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Valencia; and <sup>g</sup>CIBERES, Health Institute Carlos III.

\*These authors contributed equally to this work.

This work was supported by grants SAF2011-26443 (Spanish government; to J.C.), FIS CP11/00293 (Spanish government; to J.M.), CIBERES (Spanish government; CB06/06/0027), ADE10/00020 (Spanish government), FIS P111/02618 (M.A.), and ACIF/2010/114 (Generalitat Valenciana; to T.P.) as well as research grants from Regional Government Prometeo II/2013/014 (J.C., J.M.) "Generalitat Valenciana." Support from the CENIT program (Spanish government) was obtained.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication July 25, 2013; revised July 1, 2014; accepted for publication July 14, 2014.

Available online August 23, 2014.

Corresponding author: Javier Milara, PhD, PharmD, Unidad de Investigación, Consorcio Hospital General Universitario, Avenida tres cruces s/n, E-46014 Valencia, Spain. E-mail: [xmilara@hotmail.com](mailto:xmilara@hotmail.com).

0091-6749/\$36.00

© 2014 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.011>

#### Abbreviations used

CRSwNP:	Chronic rhinosinusitis with nasal polyps
CT:	Cytoplasmic tail
ERK1/2:	Extracellular-signal-regulated kinases 1/2
GR:	Glucocorticoid receptor
hsp:	Heat-shock protein
MKP1:	Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
MIF:	Macrophage migration inhibitory factor
NP:	Nasal polyps
NP-AIA:	Nasal polyps with aspirin-intolerant asthma
NP-ATA:	Nasal polyps with aspirin-tolerant asthma
NP-CR:	Nasal polyps resistant to oral corticosteroids
NPwA:	Nasal polyps without asthma or aspirin intolerance
PGN:	Peptidoglycan
TLR:	Toll-like receptor

epithelial cells.<sup>14,15</sup> The interaction of MUC1-CT with signal transducers and its nuclear translocation and subsequent biological responses are believed to be regulated by specific protein-protein interactions, but the precise mechanisms by which this occurs remain poorly understood. It has been demonstrated that MUC1-CT may interact with estrogen receptor (ER) $\alpha$  by being translocated to the nucleus as a MUC1-CT-ER $\alpha$  transcription complex in response to 17 $\beta$ -estradiol.<sup>16</sup> Similar findings were observed for the  $\beta$ -catenin-MUC1-CT transcription complex as a modulator of morphogenesis.<sup>17,18</sup>

Corticosteroids exert their anti-inflammatory functions by binding to their intracellular receptor, the glucocorticoid receptor (GR), which is a ligand-inducible transcription factor. In the absence of its ligand, GR resides predominantly in the cytoplasm, where it is sequestered in a multimeric chaperone complex comprising heat-shock protein (hsp) 90, hsp70, hsp90-binding protein p23, immunophilins, and other factors to prevent its degradation and assist in its maturation.<sup>19</sup> Upon ligand binding, the GR complex translocates to the nucleus with the help of a number of proteins, such as nuclear localization signals and importins, where it exerts its anti-inflammatory effects.<sup>19</sup>

Recent evidence showed that corticosteroids increased MUC1 expression *in vitro*<sup>20,21</sup> as well as in human NP epithelium following a 2-week course of oral corticosteroids.<sup>22</sup> However, the association of oral corticosteroid efficacy with MUC1 expression as well as the possible interactions among corticosteroids, GR, and MUC1 are currently unknown. Interestingly, recent evidence has indicated that MUC1-CT binds to hsp90 to form protein complexes.<sup>23</sup> Because hsp90 participates in GR stability and nuclear translocation, MUC1-CT could also mediate GR activity.

Based on the findings in previous reports, we hypothesized that MUC1 may control corticosteroid efficacy and GR signaling. We thus investigated the expression of MUC1 in patients with CRSwNP that did and did not respond to oral corticosteroid therapy. Using NP tissue, NP epithelial cell cultures, and *in vitro* mechanistic analysis, we evaluated the link between MUC1-CT and the anti-inflammatory efficacy of corticosteroids.

## METHODS

Study design, experimental protocols, and statistical analysis are provided in the [Methods](#) section in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org).

## RESULTS

### Expression and distribution of TLRs and MUC1 are altered in patients with NP-CR

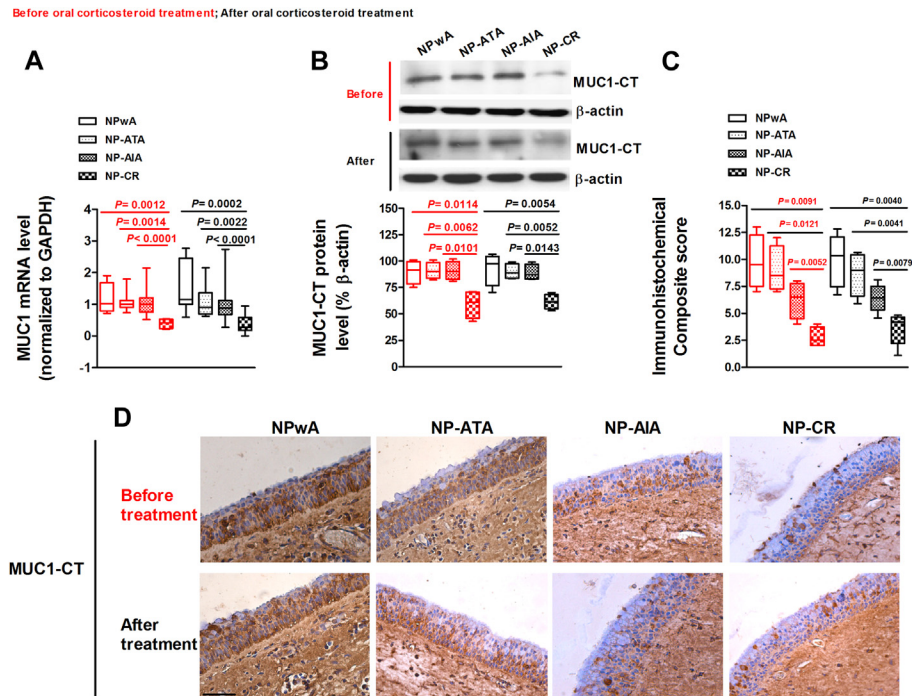
In this study, 73 patients with CRSwNP and no response to intranasal corticosteroids after 3 months were recruited to initiate a 15-day course of oral corticosteroids. At the end of oral therapy, 19 patients were classified as having NP-CR because their NP endoscopic score was not reduced by more than 1. In total, 7, 2, and 10 of the 19 patients with NP-CR had the NP without asthma or aspirin intolerance (NPwA), NP with aspirin-tolerant asthma (NP-ATA), and NP with aspirin-intolerant asthma (NP-AIA) phenotypes, respectively. The clinical characteristics of all patients before and after oral corticosteroid therapy are defined in [Table E2](#) (in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), and the characteristics of the patients with NP-CR are shown in [Table E3](#) (in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

The TLR family plays a key role in pathogen recognition and induction/regulation of the innate and adaptive immune responses in the NP epithelium.<sup>24</sup> In this study, we observed deregulation of TLR expression in the NP epithelium in the different patient groups (see [Fig E1](#) in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). In fact, TLR2 showed weak expression in the NPwA, NP-ATA, and NP-AIA groups before and after oral corticosteroid treatment, while it was significantly increased and distributed widely on the NP epithelium in the NP-CR group. In contrast, TLR4 did not show significant differences among the groups and was distributed homogeneously throughout the NP epithelium in all groups before and after treatment. TLR5 was expressed mainly in basal epithelial cells of the NPwA group and was strongly expressed throughout the whole NP epithelium in the NP-CR group and, to a lesser extent, in the NP-AIA group, showing no difference of expression before and after oral corticosteroid treatment.

Because the anti-inflammatory effect of MUC1-CT may involve inhibition of TLR activation, we next explored the expression and distribution of MUC1 in NP. MUC1 mRNA expression was downregulated before and after oral corticosteroid therapy in the NP tissue of patients with NP-CR ([Table E2](#); [Fig 1, A](#)) compared with the other groups, while no differences were observed among responders in the NPwA, NP-ATA, and NP-AIA groups ([Table E2](#); [Fig 1, A](#)). The same pattern of MUC1 expression was observed between patients with NP-CR showing NPwA, NP-ATA, and NP-AIA (see [Table E3](#)). In a similar manner, MUC1-CT protein expression was significantly decreased in patients with NP-CR, mainly in the NP epithelium before and after treatment ([Fig 1, B-D](#)).

### Expression and distribution of corticosteroid-dependent targets in NP

Several of the anti-inflammatory properties of corticosteroids are by post-transcriptional mechanisms, including the upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP1), which inhibits the activation of several mitogen-activated protein kinases. In this study, mRNA and protein expression of MKP1 showed similar low expression in all groups of patients before treatment, and increased significantly in responders, but not in non-responders after oral corticosteroid treatment (see [Fig E2, A](#), and [Fig E3, A and B](#), in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). IL-8 was equally over-expressed in the NP of all patients



**FIG 1.** MUC1 expression is downregulated in patients with NP-CR. mRNA expression of MUC1 in NP tissue of patients with NPwA (n = 12), NP-ATA (n = 8), NP-AIA (n = 34), and NP-CR (n = 19) before (red color) and after (black color) oral corticosteroid treatment (A). Data are expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  mRNA MUC1 levels normalized to GAPDH mRNA levels. Western blotting analysis of MUC1-CT protein expression of patients with NPwA, NP-ATA, NP-AIA, and NP-CR (B). Representative Western blot results are shown. Data are expressed as MUC1-CT protein levels as determined by densitometry relative to  $\beta$ -actin levels. Box plot representing the composite score of the MUC1-CT marker across NP (C). NPs were immunostained for MUC1-CT (brown) and counterstained with hematoxylin (D). Representative immunohistochemistry images are shown. Scale bar = 50  $\mu$ m. Data are presented as a box and whisker plot of medians, interquartile range (IQR), and minimum and maximum values. *P* values were obtained by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn *post-hoc* test.

before treatment and significantly decreased after corticosteroid therapy in responders, but not in NP-CR patients (see Fig E2, B). However, macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression was similar among all groups of patients before and after treatment. As with MKP1, the mRNA and protein expression of GR was significantly lower in NP-CR tissue and epithelial cells than in all other groups and progressively decreased in the NP-ATA and NP-AIA phenotypes before and after treatment. Furthermore, the phosphorylation of ERK1/2 before treatment was elevated in NPwA and even more in NP-ATA, NP-AIA, and NP-CR and significantly downregulated in responders, but not in NP-CR patients after treatment (see Fig E3, A and B).

### Effects of dexamethasone on NP epithelial cells

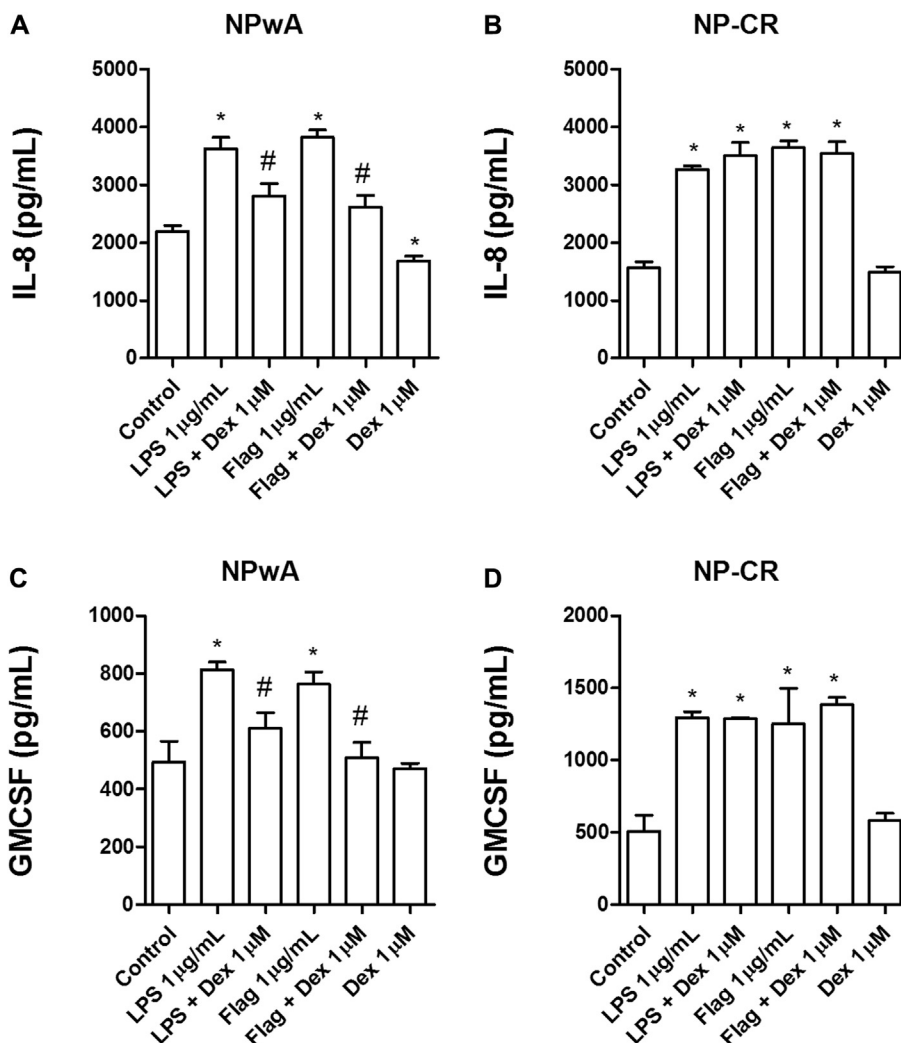
NP epithelial cells were isolated from responders with NPwA and nonresponders with NP-CR from the same NPwA phenotype. Dexamethasone (1  $\mu$ M) inhibited IL-8 secretion induced by LPS and flagellin by 56% and 70% and GM-CSF secretion by 63% and 94%, respectively (Fig 2, A and C). In contrast, NP epithelial cells from patients with NP-CR did not respond to dexamethasone (Fig 2, B and D). Similar results were found with nasal epithelial cells isolated from responders with NP-AIA and nonresponders with NP-CR with the same NP-AIA phenotype (data not shown).

To analyze the contribution of MUC1 to the anti-inflammatory effects of dexamethasone, MUC1 knockdown by RNA interference (siRNA-MUC1) was assayed in Beas-2B cells following stimulation with flagellin, LPS, or peptidoglycan (PGN) in the presence or absence of dexamethasone. siRNA-MUC1 cells showed significantly higher IL-8 and GM-CSF release following flagellin, LPS, or PGN stimulation than did siRNA(-) stimulated cells ( $P < .05$ ) (Fig E4, A-F, in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Dexamethasone inhibited IL-8 secretion by 45%, 70%, and 52% following flagellin, LPS, and PGN stimulation in siRNA(-) cells, respectively. In contrast, the percent inhibition of dexamethasone in siRNA-MUC1 cells was significantly lower, reaching only 10%, 40%, and 25% following flagellin, LPS, and PGN stimulation, respectively ( $P < .05$ ) (Fig E4, A-C). Similar results were found for GM-CSF release. Dexamethasone inhibited GM-CSF secretion by 30%, 92%, and 62% in siRNA(-) cells and by 0%, 55%, and 21% in siRNA-MUC1 cells following flagellin, LPS, and PGN stimulation, respectively ( $P < .05$ ) (Fig E4, D-F).

### Effects of MUC1 suppression on cell signaling activation

Cells treated with dexamethasone for 24 hours showed increased protein expression of MUC1-CT in Beas-2B cells (Fig E5, A, in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).



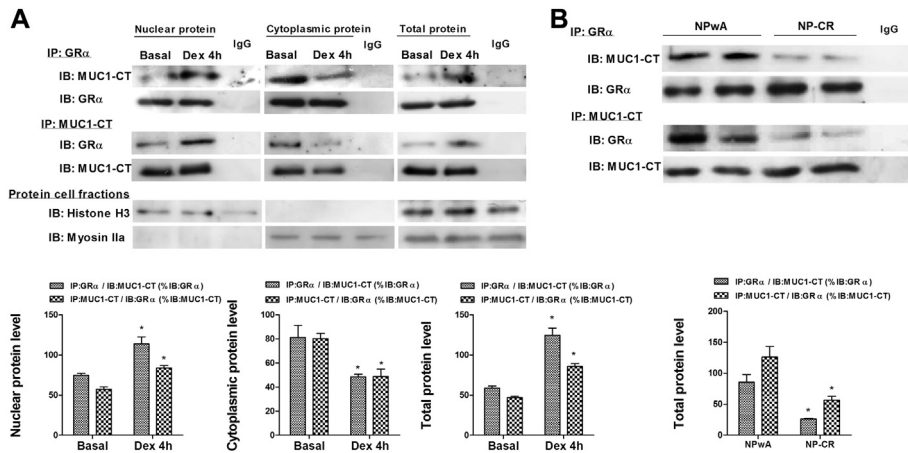


**FIG 2.** NP epithelial cells from patients with NP-CR are insensitive to dexamethasone. Primary NP epithelial cells obtained from patients with NPwA (A and C) (n = 4) and NP-CR (B and D) (n = 4) were incubated with or without 1 μM dexamethasone for 2 hours before LPS (1 μg/mL) or flagellin (Flag; 1 μg/mL) stimulation for 24 hours. The IL-8 (A and B) and GM-CSF (C and D) concentrations were measured by ELISA. Results are expressed as means (SEM) of 3 independent experiments in each population. Two-way ANOVA was followed by the post-hoc Bonferroni test. \**P* < .05 related to control release in the same subject group; #*P* < .05 related to the stimulus LPS or Flag.

Protein analysis by Western blotting showed suppression of MUC1-CT after 48 hours of siRNA-MUC1 exposure. MUC1 suppression was sustained following an additional 24 hours of 1 μM dexamethasone exposure (Fig E5, A). In cells treated with siRNA(-) control, dexamethasone significantly inhibited the phosphorylation of ERK1/2 following stimulation with flagellin, LPS, or PGN, while in siRNA-MUC1 cells, dexamethasone did not show an inhibitory effect (Fig E5, B). Contrary effects were observed for MKP1 expression. Unlike siRNA-MUC1 cells, dexamethasone increased MKP1 expression in control siRNA(-) cells (Fig E5, C). Next, we explored whether a TLR agonist could phosphorylate GR at the Ser226 residue. In Beas-2B, flagellin and PGN increased GR-Ser226 phosphorylation, which was inhibited by PD98059, an antagonist of ERK1/2. This suggested a role of ERK1/2 in this phosphorylation (Fig E6, A, in the Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). In other experiments, siRNA-MUC1 cells showed hyper-phosphorylation at GR-Ser226 following flagellin, LPS, or PGN stimulation without affecting GRα

expression. In contrast, the siRNA(-) group showed modest GR-Ser226 phosphorylation (Fig E6, B). In patients with CRSwNP, the phosphorylation of GR-Ser226 was significantly higher in NP-CR tissue than in NPwA, NP-ATA, and NP-AIA tissue and was accompanied by downregulation of GRα (Fig E6, C). Because GR-Ser226 phosphorylation may determine GRα nuclear translocation and corticosteroid activity,<sup>25</sup> we next explored the effect of MUC1 suppression on GRα nuclear translocation. In siRNA(-) cells, the GRα relative fluorescence unit intensity in the cell nucleus of Beas-2B was expressed significantly more strongly following 4 hours of dexamethasone exposure than in non-exposed cells (see Fig E7 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). However, the effect of dexamethasone on GRα nuclear translocation was significantly lower in siRNA-MUC1 cells (*P* < .05). In this regard, PGN, LPS, or flagellin reduced the efficacy of dexamethasone in translocating GRα to the nucleus, and this effect was stronger in siRNA-MUC1 cells (see Fig E7).





**FIG 3.** MUC1-CT is coexpressed with GR $\alpha$  to form a complex that translocates to the nucleus following dexamethasone stimulation. The nuclear, cytoplasmic, or total protein immunoprecipitates (IP) of GR $\alpha$  or MUC1-CT were collected from Beas-2B cells incubated in the presence or absence (basal) of dexamethasone (Dex; 1  $\mu$ M) for 4 hours (A). IP were immunoblotted (IB) with opposite antibodies MUC1-CT or GR $\alpha$  or with the same antibodies used for immunoprecipitation as controls. The IgG isotype was used as a negative control for immunoprecipitation. Histone H3 and myosin IIa antibodies were used in Western blots of various subcellular and total protein extracts to determine the specificity of subcellular protein extraction. NP tissues from NPwA (n = 6) and NP-CR (n = 7) were lysed and immunoprecipitated with GR $\alpha$  or MUC1-CT antibodies (B). Opposite antibodies were probed with IB to analyze MUC1-CT-GR $\alpha$  complex expression variations and the same antibodies as controls. The IgG isotype was used as a negative control for immunoprecipitation. Representative Western blots are shown. Graphs represent the densitometry of ratios to GR $\alpha$  or MUC1-CT protein levels as appropriate. Results are expressed as means (SEM) of 3 independent experiments. One-way ANOVA was followed by the post-hoc Bonferroni test. \* $P$  < .05 related to basal (A) or NPwA (B) group.

### Co-expression of MUC1-CT and GR $\alpha$

Beas-2B cells were treated with 1  $\mu$ M dexamethasone for 4 hours to promote GR $\alpha$  nuclear translocation. Co-immunofluorescence for GR $\alpha$  and MUC1-CT showed a cytoplasmic distribution characterized by superposition on basal cells and nuclear co-expression in cells stimulated with dexamethasone (see Fig E8 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). In immunoprecipitation experiments, we observed co-expression of MUC1-CT and GR $\alpha$  in both the cytoplasm and nucleus of Beas-2B cells (Fig 3, A). Total, nuclear, or cytoplasmic protein was then extracted from cells stimulated with or without 1  $\mu$ M dexamethasone for 4 hours and immunoprecipitated with MUC1-CT or GR $\alpha$ . In cells stimulated with dexamethasone, the co-expression of MUC1-CT-GR $\alpha$  was increased in the total and nuclear protein immunoprecipitates (measured by Western blotting), indicating nuclear complex translocation of MUC1-CT-GR $\alpha$  after dexamethasone exposure (Fig 3, A). In contrast, MUC1-CT-GR $\alpha$  complex expression was decreased in the cytoplasm after dexamethasone exposure (Fig 3, A). To validate these observations in NP tissue, total protein was extracted from polyps of patients with NPwA and NP-CR (NPwA nonresponders) and immunoprecipitated with MUC1-CT or GR $\alpha$  followed by immunoblotting with opposite antibodies. We observed that MUC1-CT-GR $\alpha$  complex expression was significantly higher in NP from NPwA than from NP-CR (Fig 3, B).

### DISCUSSION

In the present study, we provided new evidence of the role of MUC1 in mediation of the response to corticosteroids in patients with CRSwNP. Patients resistant to the effect of oral corticosteroids showed significantly lower expression of MUC1 in NP

epithelium; this was accompanied by similarly low expression of MKP1 and GR $\alpha$  and an increase in ERK1/2 phosphorylation. Mechanistic experiments revealed the formation of a protein complex between MUC1-CT and GR $\alpha$ , which protected against GR-Ser226 hyper-phosphorylation induced by TLR agonists and helped GR $\alpha$  to translocate into the nucleus to exert its anti-inflammatory effects. These results are of potential value to understanding the loss of efficacy of corticosteroids in patients with CRSwNP.

Recent evidence indicates that chronic rhinosinusitis results from an abnormal immune response to microorganisms or their products, including fungi, staphylococci, pseudomonal biofilms, or viruses.<sup>1,26-28</sup> In CRSwNP, the abnormal mucosal immune function impairs the prevention or elimination of microbial colonization of the sinonasal cavities. The TLR family plays a key role in pathogen recognition and induction/regulation of the innate and adaptive immune responses. In fact, recent data suggest that the inflammatory process involved in CRSwNP is characterized by an excessively activated TLR-mediated signaling pathway, which may contribute to the formation of NP.<sup>24</sup> In this study, we detected expression of TLR2, TLR4, and TLR5 in the NP epithelium of all patients. Furthermore, TLR2 and TLR5 were significantly upregulated in the epithelium of patients with NP-CR compared with that of responders with NPwA, NP-ATA, and NP-AIA. TLR2 signals the presence of gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, and TLR5 signals the presence of the flagellin component of flagellated bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, which are both common in NP. Interestingly, the anti-inflammatory effects of MUC1 are based on the inhibition of several TLRs,<sup>12</sup> mainly through the cytoplasmic MUC1-CT interaction with TLR signal components.<sup>14</sup> In this study, patients with CRSwNP who did not

respond to oral corticosteroids showed lower expression of MUC1-CT than that in the NP tissue of responders with NPwA, NP-ATA, and NP-AIA. Higher expression of TLR2 and TLR5 accompanied by MUC1-CT downregulation may confer an over-activation of TLR signaling and subsequent inflammation. In this regard, IL-8, a product of TLR activation<sup>14,29</sup> that is particularly insensitive to the anti-inflammatory effects of corticosteroids,<sup>30</sup> was significantly upregulated in NP tissue of patients with NP-CR compared with the NP tissue of the other groups.

One of the downstream signals activated by TLRs is ERK1/2 phosphorylation.<sup>31</sup> In this regard, recent evidence suggests that superantigen-induced corticosteroid resistance involves ERK1/2 hyper-phosphorylation, which leads to GR $\alpha$  phosphorylation and inhibition of dexamethasone-induced GR $\alpha$  nuclear translocation.<sup>32</sup> In this study, NP tissue of patients with NP-CR showed significantly higher ERK1/2 phosphorylation than did NP tissue of responders with NPwA, NP-ATA, and NP-AIA. Similarly, NP of patients with NP-CR also showed significantly higher GR-Ser226 phosphorylation than did NP of responders. Recent evidence indicated that GR-Ser226 phosphorylation by p38 or JNK1 might mediate corticosteroid insensitivity in asthmatic patients through inhibition of GR $\alpha$  nuclear translocation.<sup>25,33</sup> In support of this evidence, GR-Ser226 hyper-phosphorylation in patients with NP-CR could inhibit GR $\alpha$  transcriptional and post-transcriptional anti-inflammatory effects following corticosteroid therapy. In this regard, MKP1, an endogenous inhibitor of ERK1/2 phosphorylation induced by corticosteroids as part of its anti-inflammatory activity, was found to be significantly downregulated in patients with NP-CR compared with responders, which may explain in part the increase of ERK1/2 and GR-Ser226 phosphorylation and consequently the resistance to oral corticosteroids. Interestingly, MKP1 was progressively downregulated in the same way that p-ERK1/2 was progressively upregulated in responders, reaching the higher deregulated level in the NP-AIA phenotype. Corticosteroid resistance is an acquired clinical condition that is usually reached after exposure to chronic inflammatory/oxidative stress situations in patients with various pathologies.<sup>34</sup> Thus, because NP-AIA is the most severely inflammatory form of CRSwNP and a particularly persistent phenotype,<sup>1</sup> altered expression of MKP1 and p-ERK1/2 may reflect the aggressive nature of NP-AIA. However, a large proportion of patients with NP-AIA were responders, suggesting the participation of other intracellular mechanisms in corticosteroid resistance. In fact, other molecular pathways have been related to poor responses to corticosteroids in patients with CRSwNP, such as higher levels of IL-1 $\beta$ , ICAM-1, nuclear factor- $\kappa$ B, and GR $\beta$  after treatment.<sup>35-37</sup> In our cohort of patients, we detected significant GR $\alpha$  downregulation in NP tissue of patients with NP-CR, which might have contributed to the loss of corticosteroid efficacy.<sup>38</sup> Interestingly, MUC1 expression was also downregulated in patients with NP-CR, suggesting a possible relation between MUC1 and GR. To elucidate this enigmatic relationship, we conducted mechanistic experiments using MUC1 knockdown by RNA interference. In siRNA-MUC1 cells, dexamethasone showed an impaired anti-inflammatory effect by inhibiting IL-8 and GM-CSF secretion following exposure to TLR2, TLR4, or TLR5 agonists. These results were corroborated in primary nasal epithelial cells from the NP of patients with NP-CR who showed no MUC1 expression and no inhibitory effect of dexamethasone on IL-8 and GM-CSF release. More interestingly, unlike in control cells, siRNA-MUC1

cells showed increased ERK1/2 phosphorylation in response to TLR2, TLR4, and TLR5 that was not inhibited by dexamethasone. Similar findings were observed for MKP1 expression, in which MUC1-knockdown cells did not show increased MKP1 expression after dexamethasone exposure. Furthermore, siRNA-MUC1 cells were hyper-phosphorylated at GR-Ser226, reducing GR $\alpha$  nuclear translocation; this indicates a protective role of MUC1 on GR $\alpha$  phosphorylation and supports the findings in the NP tissue of patients with NP-CR.

We herein provide the first evidence of the constitutive formation of the MUC-CT-GR $\alpha$  complexes that assist in GR $\alpha$  nuclear translocation. Furthermore, dexamethasone exposure promoted the nuclear translocation of MUC1-CT-GR $\alpha$  transcription complexes, which helped to exert its anti-inflammatory effects. This was observed both *in vitro* and in patients with NP, suggesting that patients resistant to oral corticosteroids have lower MUC1-CT-GR $\alpha$  complex expression and, therefore, less GR $\alpha$  nuclear translocation and anti-inflammatory effects.

The lack of MUC1 expression could contribute to the loss of corticosteroid efficacy by 2 mechanisms. First (upstream), the lack of MUC1 results in over-activation of the TLR pathway, such as ERK1/2 phosphorylation, which hyper-phosphorylates GR-Ser226 and inhibits its nuclear translocation. Second (downstream), MUC1 downregulation reduces the nuclear translocation of GR $\alpha$  in response to dexamethasone and in the absence of a TLR stimulus, suggesting a role for the MUC1-CT-GR $\alpha$  complex in corticosteroid activity (see Fig E9 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org), for more detailed description on mechanistic pathways). Similarly, previous findings showed that the MUC1-CT-ER $\alpha$  transcription complex protected and stabilized ER $\alpha$  by attenuating its ubiquitination and degradation,<sup>16</sup> and a protective role of  $\beta$ -catenin degradation by the  $\beta$ -catenin-MUC1-CT transcription complex was similarly proposed.<sup>17</sup> These findings are in line with a possible protective role of MUC1-CT on GR $\alpha$ .

However, although the findings of this study provide a rational explanation for the lack of efficacy of corticosteroids in patients with CRSwNP, other mechanisms may also be implicated,<sup>34</sup> and there are still some knowledge gaps that need to be explored. For example, we did not explore whether there is a direct interaction between MUC1-CT and GR $\alpha$  because MUC1-CT can indirectly bind to the GR $\alpha$ -chaperone complex.<sup>19,23</sup> Furthermore, whether corticosteroid resistance is limited to the NP tissue or is disseminated to other airway tissue/cell types being modulated by MUC1-CT is currently unknown; further investigations are thus warranted. Another limitation of this study was the use of the Beas-2B cell line. Beas-2B is a bronchial epithelial cell line that could display behaviors different from those of nasal epithelial cells, depending on the cellular context.

In summary, we have demonstrated a new role for MUC1-CT in modulation of the anti-inflammatory effects of corticosteroids in patients with CRSwNP. Our findings suggest a possible explanation for why corticosteroids cannot repress inflammation and consequently the NP endoscopic score; namely, that the MUC1-CT-GR $\alpha$  complex is deficient.

We thank Sonia Priego for assistance in analyzing the confocal microscopy images at the Microscopy Service of the Unidad Central de Investigación Médica (UCIM) Faculty of Medicine, Valencia, Spain, and Professor G. Juan of the Respiratory Unit of the Hospital General, Valencia, Spain, for facilitating the clinical data.

**Clinical implications: MUC1 expression is associated with corticosteroid efficacy in patients with CRSwNP. MUC1-CT associates with the GR $\alpha$  protein complex and participates in GR $\alpha$  nuclear translocation. The lack of MUC1-GR $\alpha$  complex expression in patients with NP-CR may explain the resistance to oral corticosteroids in these patients.**

## REFERENCES

- Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2012;50:1-12.
- Tos M, Svendstrup F, Arndal H, Orntoft S, Jakobsen J, Borum P, et al. Efficacy of an aqueous and a powder formulation of nasal budesonide compared in patients with nasal polyps. *Am J Rhinol* 1998;12:183-9.
- Vendelo Johansen L, Illum P, Kristensen S, Winther L, Vang Petersen S, Synnerstad B. The effect of budesonide (Rhinocort) in the treatment of small and medium-sized nasal polyps. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1993;18:524-7.
- Mygind N, Pedersen CB, Prytz S, Sorensen H. Treatment of nasal polyps with intranasal beclomethasone dipropionate aerosol. *Clin Allergy* 1975;5:159-64.
- Dingsor G, Kramer J, Olsholt R, Soderstrom T. Flunisolide nasal spray 0.025% in the prophylactic treatment of nasal polyposis after polypectomy. A randomized, double blind, parallel, placebo controlled study. *Rhinology* 1985;23:49-58.
- Virolainen E, Puhakka H. The effect of intranasal beclomethasone dipropionate on the recurrence of nasal polyps after ethmoidectomy. *Rhinology* 1980;18:9-18.
- Hissaria P, Smith W, Wormald PJ, Taylor J, Vadas M, Gillis D, et al. Short course of systemic corticosteroids in sinonasal polyposis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with evaluation of outcome measures. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:128-33.
- Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carothers Carraway CA. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays* 2003;25:66-71.
- Kim KC, Lillehoj EP. MUC1 mucin: a peacemaker in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:644-7.
- Kyo Y, Kato K, Park YS, Gajghate S, Umehara T, Lillehoj EP, et al. Anti-inflammatory role of MUC1 mucin during infection with nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:149-56.
- Li Y, Dinwiddie DL, Harrod KS, Jiang Y, Kim KC. Anti-inflammatory effect of MUC1 during respiratory syncytial virus infection of lung epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298:L558-63.
- Ueno K, Koga T, Kato K, Golenbock DT, Gendler SJ, Kai H, et al. MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:263-8.
- Hatrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* 2008;70:431-57.
- Kato K, Lillehoj EP, Park YS, Umehara T, Hoffman NE, Madesh M, et al. Membrane-tethered MUC1 mucin is phosphorylated by epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells and associates with TLR5 to inhibit recruitment of MyD88. *J Immunol* 2012;188:2014-22.
- Zrihan-Licht S, Baruch A, Elroy-Stein O, Keydar I, Wreschner DH. Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins. Cytokine receptor-like molecules. *FEBS Lett* 1994;356:130-6.
- Wei X, Xu H, Kufe D. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol Cell* 2006;21:295-305.
- Chen YT, Gallup M, Nikulina K, Lazarev S, Zlock L, Finkbeiner W, et al. Cigarette smoke induces epidermal growth factor receptor-dependent redistribution of apical MUC1 and junctional beta-catenin in polarized human airway epithelial cells. *Am J Pathol* 2010;177:1255-64.
- Wen Y, Caffrey TC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hollingsworth MA. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *J Biol Chem* 2003;278:38029-39.
- Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:2-12.
- Imai M, Hwang HY, Norris JS, Tomlinson S. The effect of dexamethasone on human mucin 1 expression and antibody-dependent complement sensitivity in a prostate cancer cell line in vitro and in vivo. *Immunology* 2004;111:291-7.
- Seo KY, Chung SH, Lee JH, Park MY, Kim EK. Regulation of membrane-associated mucins in the human corneal epithelial cells by dexamethasone. *Cornea* 2007;26:709-14.
- Martinez-Anton A, de Bolos C, Alobid I, Benitez P, Roca-Ferrer J, Picado C, et al. Corticosteroid therapy increases membrane-tethered while decreases secreted mucin expression in nasal polyps. *Allergy* 2008;63:1368-76.
- Ren J, Raina D, Chen W, Li G, Huang L, Kufe D. MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling. *Mol Cancer Res* 2006;4:873-83.
- Zhang Q, Wang CS, Han DM, Sy C, Huang Q, Sun Y, et al. Differential expression of Toll-like receptor pathway genes in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 2013;133:165-73.
- Mercado N, Hakim A, Kobayashi Y, Meah S, Usmani OS, Chung KF, et al. Restoration of corticosteroid sensitivity by p38 mitogen activated protein kinase inhibition in peripheral blood mononuclear cells from severe asthma. *PLoS One* 2012;7:e41582.
- Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:34-8.
- Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:991-6.
- Shin SH, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, et al. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1369-75.
- Liu X, Wetzler LM, Nascimento LO, Massari P. Human airway epithelial cell responses to *Neisseria lactamica* and purified porin via Toll-like receptor 2-dependent signaling. *Infect Immun* 2010;78:5314-23.
- Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;120:76-85.
- Anwar MA, Basith S, Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp Mol Med* 2013;45:e11.
- Li LB, Goleva E, Hall CF, Ou LS, Leung DY. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1059-69.
- Kobayashi Y, Mercado N, Barnes PJ, Ito K. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One* 2011;6:e27627.
- Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:636-45.
- Choi BR, Kwon JH, Gong SJ, Kwon MS, Cho JH, Kim JH, et al. Expression of glucocorticoid receptor mRNAs in glucocorticoid-resistant nasal polyps. *Exp Mol Med* 2006;38:466-73.
- Hamilos DL, Leung DY, Muro S, Kahn AM, Hamilos SS, Thawley SE, et al. GRbeta expression in nasal polyp inflammatory cells and its relationship to the anti-inflammatory effects of intranasal fluticasone. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:59-68.
- Valera FC, Queiroz R, Scrideli C, Tone LG, Anselmo-Lima WT. Evaluating budesonide efficacy in nasal polyposis and predicting the resistance to treatment. *Clin Exp Allergy* 2009;39:81-8.
- Li P, Li Y, Li YQ, Yang QT, Zhang GH. Glucocorticoid receptor expression and glucocorticoid therapeutic effect in nasal polyps. *Clin Invest Med* 2010;33:E181-8.



## ANEXO 4

Publicación científica

“MUC4 impairs the anti-inflammatory effects of corticosteroids in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps”





# MUC4 impairs the anti-inflammatory effects of corticosteroids in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps



Javier Milara, PhD, PharmD,<sup>a,b,c,d,\*</sup> Anselm Morell, PhD,<sup>c,d,\*</sup> Beatriz Ballester, PhD,<sup>d</sup> Miguel Armengot, MD, PhD,<sup>e,f</sup> Esteban Morcillo, MD, PhD,<sup>c,d,g</sup> and Julio Cortijo, PhD<sup>c,d,h</sup>  
Valencia and Castellon, Spain

**Background:** Current evidence suggests that membrane-tethered mucins could mediate corticosteroid efficacy, interacting with glucocorticoid receptor (GR) in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). Mucin 4 (MUC4)-tethered mucin is expressed in nasal polyp (NP) epithelial cells and upregulated under inflammatory conditions. Moreover, MUC4 $\beta$  has the capacity to interact with other intracellular proteins. We hypothesized that MUC4 modulates corticosteroid efficacy of patients with CRSwNP.

**Objective:** We sought to analyze the role of MUC4 in corticosteroid effectiveness in different cohorts of patients with CRSwNP and elucidate the possible mechanisms involved.

**Methods:** Eighty-one patients with CRSwNP took oral corticosteroids for 15 days. Corticosteroid resistance was evaluated by using nasal endoscopy. Expression of MUC4 and MUC4 $\beta$  was evaluated by means of real-time PCR, Western blotting, and immunohistochemistry. BEAS-2B knockdown with RNA interference for MUC4 (small interfering RNA [siRNA]-MUC4) was used to analyze the role of MUC4 in the anti-inflammatory effects of dexamethasone.

**Results:** Twenty-two patients had NPs resistant to oral corticosteroids. MUC4 expression was upregulated in these patients. In siRNA-MUC4 BEAS-2B airway epithelial cells dexamethasone produced higher anti-inflammatory effects, increased inhibition of phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2, increased mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 expression, and increased glucocorticoid response element activation.

**Immunoprecipitation and immunofluorescence experiments revealed that MUC4 $\beta$  forms a complex with GR $\alpha$  in the nuclei of NP epithelial cells from corticosteroid-resistant patients.**

**Conclusion:** MUC4 $\beta$  participates in the corticosteroid resistance process, inhibiting normal GR $\alpha$  nuclear function. The high expression of MUC4 in patients with CRSwNP might participate in corticosteroid resistance. (*J Allergy Clin Immunol* 2017;139:855-62.)

**Key words:** MUC4, corticosteroid resistance, nasal polyp, chronic rhinosinusitis, glucocorticoid receptor

Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a chronic inflammatory disease characterized by the presence of edematous masses of inflamed mucosa, leading to nasal obstruction, secretion, loss of smell, headache/ facial pain, and reduced quality of life.<sup>1</sup> CRSwNP is frequently associated with asthma and aspirin intolerance, and T<sub>H</sub>2 cytokine expression and eosinophilic infiltration are characteristics. Overall, the cause and pathogenesis of CRSwNP remain a matter of debate, suggesting that a role for either fungi or bacteria in patients with CRSwNP might play a key role.<sup>1</sup>

Nasal topical corticosteroids are the first-line treatment for CRSwNP, reducing polyp size, nasal symptoms, and the number of recurrences after polypectomy.<sup>1</sup> In case of a lack of clinical response, a 2-week course of systemic corticosteroids generally improves polyp size and nasal symptoms.<sup>2</sup> However, there are subsets of patients who have resistance to oral corticosteroids and need sinus surgery to control the disease, which does not eliminate future recurrences. This scenario has increased the research on new therapies directed to those patients resistant to oral corticosteroids, particularly new biologic agents, such as omalizumab (anti-IgE), mepolizumab (anti-IL-5), or dupilumab (anti-IL-4/IL-13) among others.<sup>3</sup> Therefore the greatest challenge for the future would be to identify biomarkers to appropriately select those corticosteroid-resistant patients who could benefit from new therapies.

Mucins are widely known key components of the airway epithelial mucus layer that contribute to the protection of the sinonasal mucosa from pathogens and irritants through their participation in the mucociliary clearance mechanism.<sup>4</sup> However, recent evidence suggests that mucins are also involved in other less conventional roles, including host defense against airway infection and inflammation, morphogenesis and repair, and treatment response.<sup>5-7</sup> In contrast to secreted mucins, membrane-tethered mucins are transmembrane proteins anchored to the apical surface of mucosal epithelial cells, with a highly glycosylated N-terminal domain in contact with the outside environment acting as a sensor receptor and a short cytoplasmic tail (CT) that enables its participation in intracellular signaling.<sup>4</sup> Although mucin 1 (MUC1) and mucin 4 (MUC4) membrane-tethered mucins are overexpressed in nasal polyp (NP) epithelium in comparison with normal nasal mucosa,<sup>8</sup> there is a lack of

From <sup>a</sup>the Department of Pharmacy, <sup>c</sup>the Rhinology Unit, and <sup>h</sup>the Research and Teaching Unit, University Hospital Consortium, Valencia; <sup>b</sup>the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Jaume I University, Castellon; the Departments of <sup>e</sup>Pharmacology and <sup>f</sup>Medicine, Faculty of Medicine, University of Valencia; <sup>d</sup>CIBERES, Health Institute Carlos III, Valencia; and <sup>g</sup>Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia.

\*These authors contributed equally to this work.

Supported by grants SAF2014-55322-P (to J.C.), FIS PI14/01733 (to J.M.), FIS PI11/02618 (to M.A.), SAF2015-65368-R (to E.M.), CIBERES (CB06/06/0027), TRACE (TRA2009-0311; Spanish Government), and research grants from Regional Government Prometeo II/2013/014 (to J.C., E.M., and J.M.) Generalitat Valenciana.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication April 14, 2015; revised May 18, 2016; accepted for publication June 2, 2016.

Available online September 14, 2016.

Corresponding author: Javier Milara, PhD, PharmD, Unidad de Investigación, Consorcio Hospital General Universitario, Avenida tres cruces s/n, E-46014 Valencia, Spain. E-mail: [xmilara@hotmail.com](mailto:xmilara@hotmail.com).

The CrossMark symbol notifies online readers when updates have been made to the article such as errata or minor corrections

0091-6749/\$36.00

© 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.064>

*Abbreviations used*

CRSwNP:	Chronic rhinosinusitis with nasal polyps
CT:	Cytoplasmic tail
Ct:	Cycle threshold
DMEM:	Dulbecco modified Eagle medium
EGF:	Epidermal growth factor
ERK:	Extracellular-signal-regulated kinase
GAPDH:	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GR:	Glucocorticoid receptor
GRE:	Glucocorticoid response element
hsp:	Heat shock protein
LAR II:	Luciferase Assay Reagent II
MKP1:	Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
MUC4:	Mucin 4
NP:	Nasal polyp
NP-AIA:	Nasal polyps with aspirin-intolerant asthma
NP-ATA:	Nasal polyps with aspirin-tolerant asthma
NP-CR:	Nasal polyps resistant to oral corticosteroids
NPwA:	Nasal polyps without asthma or aspirin intolerance
PGN:	Peptidoglycan
siRNA:	Small interfering RNA
TLR:	Toll-like receptor

information about their role. In this regard we recently showed that MUC1 is significantly downregulated in patients with CRSwNP who are resistant to oral corticosteroids.<sup>6</sup> Further analysis revealed that the CT fraction of MUC1 provides anti-inflammatory effects on NP epithelial cells through inhibition of Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, and TLR5. Moreover, MUC1-CT associates with the glucocorticoid receptor (GR)  $\alpha$  protein complex, mediating GR $\alpha$  nuclear translocation in response to corticosteroids and allowing its anti-inflammatory effects.<sup>6</sup> In contrast to MUC1, the role of MUC4 on corticosteroid efficacy in patients with CRSwNP is unknown.

The *MUC4* gene encodes a membrane-tethered mucin composed of 2 subunits: MUC4 $\alpha$  and MUC4 $\beta$ .<sup>9</sup> MUC4 $\alpha$  is the extracellular subunit featuring a typical hyperglycosylated region. MUC4 $\beta$  is the transmembrane subunit containing 3 epidermal growth factor (EGF)-like domains (EGF3, EGF1, and EGF2 located from the C-terminus to the N-terminus) and a short CT fragment with potential protein-protein interactions, such as the well-described ErbB2-MUC4 $\beta$  interaction in patients with different types of cancer.<sup>10</sup>

Recent evidence showed that MUC4 expression is upregulated in airways under inflammatory conditions<sup>11</sup> and that corticosteroids decrease MUC4 expression *in vitro*.<sup>11-13</sup> However, the association of oral corticosteroid efficacy with MUC4 expression, as well as the possible interactions among corticosteroids, GR, and MUC4, are currently unknown.

On the basis of this background, we hypothesized that MUC4 could modulate the systemic corticosteroid response in patients with CRSwNP. Thus we investigated the possible association of NP MUC4 expression with the response to oral corticosteroids in a cohort of patients with CRSwNP. In addition, we evaluated the possible mechanistic link between MUC4 $\beta$ , GR $\alpha$ , and the anti-inflammatory efficacy of corticosteroids. Results observed in this work might help provide new biomarkers to explain corticosteroid response in patients with CRSwNP.

**METHODS****Patients**

This study analyzed data from patients with CRSwNP (n = 81) enrolled from the Rhinology Unit of Valencia University General Hospital during a 4-year period (2010-2014). This work was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from each subject. Patients with CRSwNP with no clinical and endoscopic response to intranasal corticosteroids for 3 months were cross-sectionally recruited. At the moment of recruitment, all patients had extensive polyps (score = 2-4 on both sides, see [Table E1](#) in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Patient phenotypes were classified as nasal polyps without asthma or aspirin intolerance (NPwA), nasal polyps with aspirin-tolerant asthma (NP-ATA), and nasal polyps with aspirin-intolerant asthma (NP-AIA). Patients started oral corticosteroids (deflazacort) at 1 mg/kg/d for 8 days, followed by 0.5 mg/kg/d for another 7 days, according to routine clinical practice. Corticosteroid resistance was evaluated at day 15 after corticosteroid therapy. Patients unable to reduce more than 1 NP endoscopic score after the oral corticosteroid course were considered resistant to corticosteroids and classified as the nasal polyps resistant to oral corticosteroids (NP-CR) group. The clinical characteristics of all patients before starting oral corticosteroids and at the end of treatment are presented in [Table E2](#) in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org). NP tissues were sampled before and after oral corticosteroid therapy to isolate nasal epithelial cells and analyze tissue mRNA and protein expression, as well as protein epithelial location, by means of immunohistochemistry. Further information on the NP epithelial cell culture, immunohistochemistry/immunofluorescence, real-time RT-PCR and small interfering RNA (siRNA) experiments, Western blot analysis, immunoprecipitation, ELISAs for IL-8 and GM-CSF, experimental protocols, inducible MUC4-plasmid construct, and statistical analysis is provided in the [Methods](#) section in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org).

**RESULTS****Expression and distribution of MUC4 is altered in patients with CRSwNP resistant to oral corticosteroids**

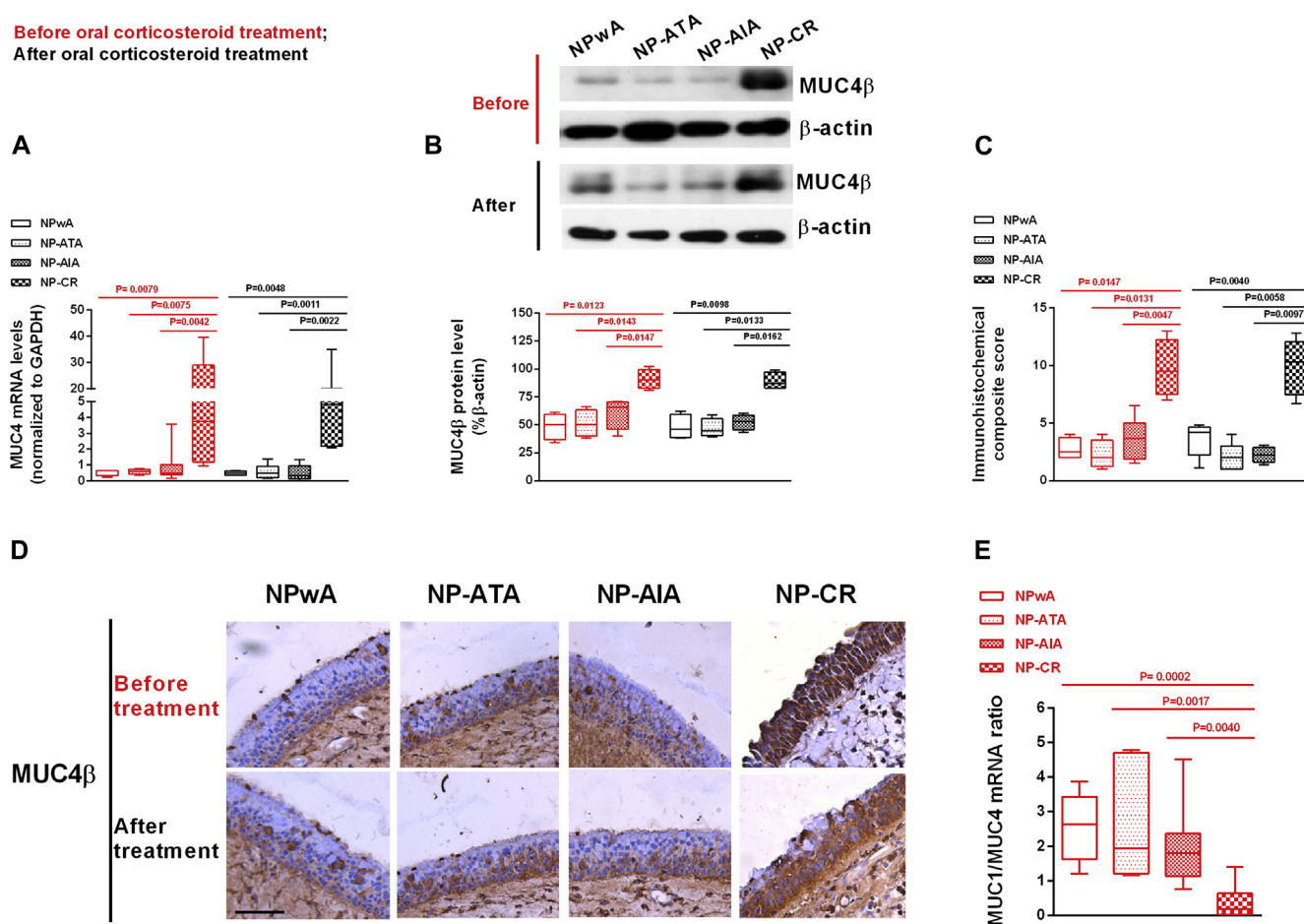
Eighty-one patients with CRSwNP and no response to intranasal corticosteroids were recruited to initiate a 15-day course of oral corticosteroids. Patients started oral corticosteroids (deflazacort) at 1 mg/kg/d for 8 days, followed by 0.5 mg/kg/d for another 7 days, according to routine clinical practice. Therapy compliance was evaluated by a clinical research pharmacy by means of direct recount of drug containers and personal interview with the patients after therapy ended. At the end of oral therapy, 22 patients were classified as having NP-CR because their NP endoscopic scores were not reduced by more than 1 unit (see the polyp scoring system in [Table E1](#)). Responder patients were classified as patients with NPwA (n = 14), NP-ATA (n = 12), and NP-AIA (n = 33). Among the 22 patients with NP-CR, 6 of them had NPwA (30% of total NPwA), 2 had NP-ATA (14.3% of total NP-ATA), and 14 had NP-AIA (29.8% of total NP-AIA). The clinical characteristics of all patients before and after oral corticosteroid therapy are defined in [Table E2](#), and the characteristics of the patients with NP-CR are shown in [Table E3](#) in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org).

NP biopsy specimens were taken before and after a 2-week course of oral corticosteroids to analyze the possible association of *MUC4* expression with corticosteroid response. *MUC4* mRNA expression was significantly upregulated before and after oral corticosteroid therapy in the NP tissue of patients with NP-CR ([Fig 1, A](#), and [Table E2](#)) compared with the other groups, whereas no differences were observed among responders in the NPwA, NP-ATA, and NP-AIA groups ([Fig 1, A](#), and [Table E2](#)). The



## Nasal polyp tissue

Before oral corticosteroid treatment;  
After oral corticosteroid treatment



**FIG 1.** MUC4 expression is upregulated in patients with NP-CR. **A**, mRNA expression of MUC4 in NP tissue of patients with NPwA (n = 14), NP-ATA (n = 12), NP-AIA (n = 33), and NP-CR (n = 22) before (red) and after (black) oral corticosteroid treatment. Data are expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  MUC4 mRNA levels normalized to GAPDH mRNA levels. **B**, Western blot analysis of MUC4β protein expression in patients with NPwA, NP-ATA, NP-AIA, and NP-CR. A representative Western blot is shown. Data are expressed as MUC4β protein levels, as determined by means of densitometry relative to β-actin levels. **C**, Box plot representing the composite score of the MUC4β marker across NPs. **D**, NPs were immunostained for MUC4β (brown) and counterstained with hematoxylin. Representative immunohistochemistry images are shown. Scale bar = 50 μm. **E**, MUC1/MUC4 gene expression ratio of NP tissue. Data are presented as a box and whisker plot of medians, interquartile ranges, and minimum and maximum values. P values were obtained by using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn *post hoc* test.

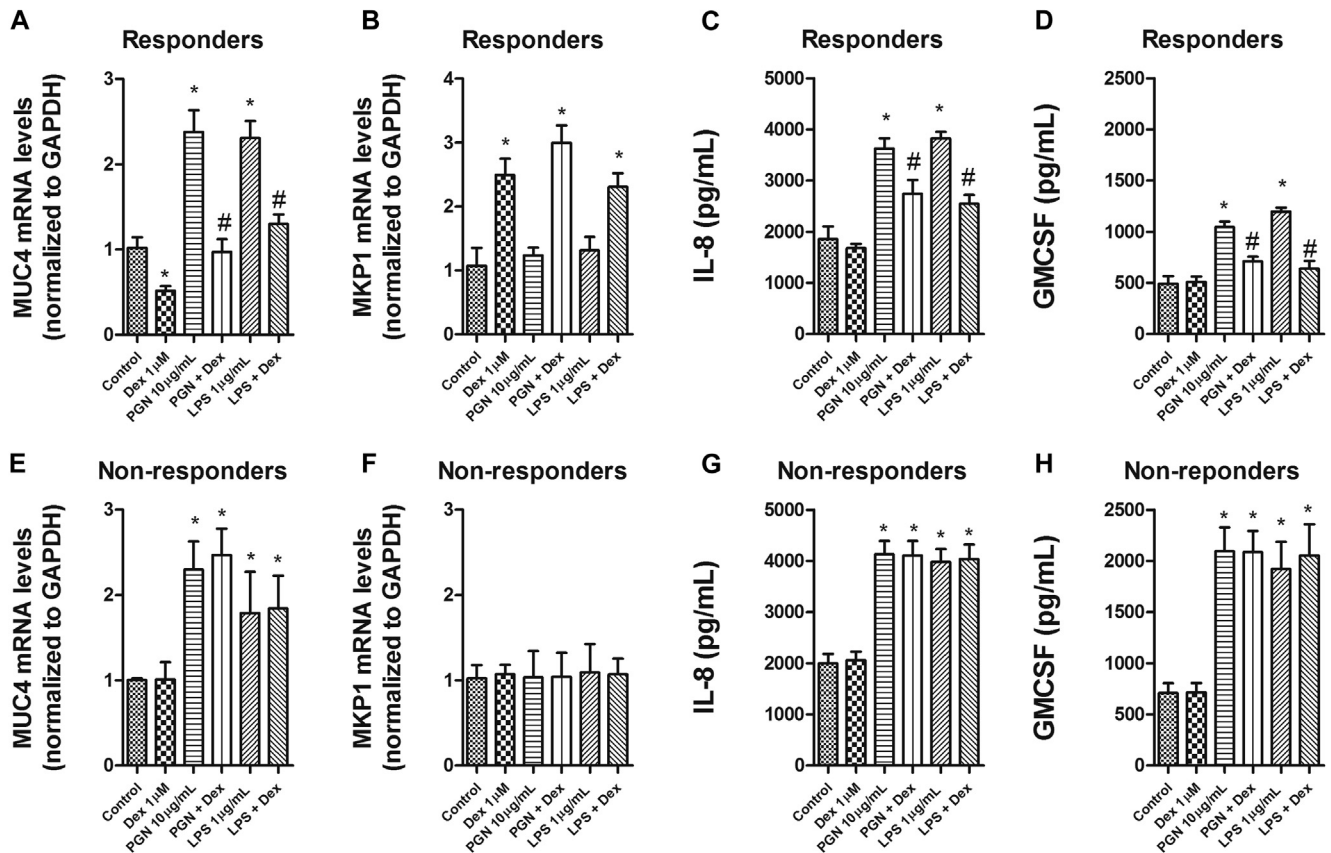
same pattern of MUC4 expression was observed between patients with NP-CR showing NPwA, NP-ATA, and NP-AIA (see Table E3). In a similar manner MUC4β protein expression was significantly overexpressed in patients with NP-CR, mainly in the NP epithelium, regardless of the stage of oral therapy (Fig 1, B-D). Furthermore, patients with NP-CR had a decreased MUC1/MUC4 gene expression ratio compared with responder patients, indicating a differential role of MUC1 and MUC4 in corticosteroid responsiveness (Fig 1, E).

### Anti-inflammatory effects of dexamethasone on NP epithelial cells from corticosteroid responders and nonresponders

NP epithelial cells were isolated from NP biopsy specimens of responders and nonresponders to oral corticosteroids to explore

the anti-inflammatory effects of dexamethasone. Nasal sinus microorganism colonization is present in patients with CRSwNP and contributes to the progression and severity of the disease. Both gram-positive and gram-negative bacteria are common in NP tissue, promoting inflammation through TLR activation. In particular, TLR2 and TLR4 are activated by gram-positive peptidoglycan (PGN) and gram-negative LPS, respectively. In NP epithelial cells isolated from responder patients, both 10 μg/mL PGN or 1 μg/mL LPS significantly induced overexpression of MUC4, which was inhibited by dexamethasone, even to less than control levels in the absence of stimulus, after 24 hours of exposure (Fig 2, A). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) was upregulated by dexamethasone in the presence or absence of the bacterial stimulus (Fig 2, B). Furthermore, dexamethasone inhibited the release of IL-8 induced by PGN and LPS by 49.9% ± 16.6% and

## Nasal polyp primary epithelial cells



**FIG 2.** NP epithelial cells from corticosteroid-resistant patients are insensitive to dexamethasone. Primary NP epithelial cells obtained from responder patients ( $n = 7$ ; **A-D**) and nonresponder patients with NP-CR ( $n = 8$ ; **E-H**) were incubated with or without  $1 \mu\text{mol/L}$  dexamethasone for 2 hours before LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) or PGN ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) stimulation for 24 hours. Fig 2, **A** and **E**, *MUC4* gene expression in NP epithelial cells. Fig 2, **B** and **F**, *MKP1* gene expression in NP epithelial cells. Fig 2, **C**, **D**, **G**, and **H**, IL-8 and GM-CSF concentrations were measured by means of ELISA. Results are expressed as means (SEM) of 3 independent experiments in each population. Two-way ANOVA was followed by the *post hoc* Bonferroni test. \* $P < .05$  related to control release in the same subject group. # $P < .05$  related to the stimulus LPS or PGN.

$64.7\% \pm 15.2\%$ , respectively, and the release of GM-CSF induced by PGN and LPS by  $60.5\% \pm 14.3\%$  and  $79.4\% \pm 19.3\%$ , respectively (Fig 2, **C** and **D**). Unlike responder patients, NP epithelial cells isolated from patients resistant to oral corticosteroids were insensitive to dexamethasone. In NP epithelial cells from patients with NP-CR, dexamethasone did not show any effect on MUC4 overexpression induced by PGN or LPS (Fig 2, **E**). Furthermore, dexamethasone was unable to induce MKP1 expression and did not inhibit IL-8 and GM-CSF secretion (Fig 2, **F-H**). In addition, NP epithelial cells from nonresponder patients released higher IL-8 and GM-CSF amounts than those cells from responder patients in response or absence to PGN or LPS (Fig 2, **C**, **D**, **G**, and **H**).

### Effects of MUC4 on dexamethasone anti-inflammatory pathways

Next, experiments were conducted to evaluate the contribution of MUC4 to the anti-inflammatory effects of dexamethasone. Neither MUC4 knockdown nor MUC1 knockdown modified MUC1 or MUC4 expression, respectively, which ruled out that

Muc1 and Muc4 regulate each other's expression (see Fig E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). MUC4 knockdown by RNA interference (siRNA-MUC4) was assayed in BEAS-2B cells after stimulation with LPS or PGN in the presence or absence of dexamethasone. siRNA-MUC4 cells showed significantly lower IL-8 and GM-CSF release after LPS or PGN stimulation than did siRNA(-) stimulated cells ( $P < .05$ ; see Fig E2, **A**, and E3, **B**, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Dexamethasone inhibited IL-8 secretion by  $57.7\% \pm 6.6\%$  and  $37.3\% \pm 16.1\%$  after LPS and PGN stimulation in siRNA(-) cells, respectively. The percentage inhibition of dexamethasone in siRNA-MUC4 cells was significantly higher, reaching  $92.3\% \pm 14.4\%$  and  $99.5\% \pm 20.9\%$  after LPS and PGN stimulation, respectively ( $P < .05$ ; see Fig E2, **A**, and E3, **B**). Similar results were found for GM-CSF release. Dexamethasone inhibited GM-CSF secretion by  $62.3\% \pm 9.3\%$  and  $65.3\% \pm 18\%$  in siRNA(-) cells and by  $88.2\% \pm 1\%$  and  $80.3\% \pm 5\%$  in siRNA-MUC4 cells after LPS and PGN stimulation, respectively ( $P < .05$ ; see Fig E2, **C**, and E3, **D**). Further experiments showed that the increase in MKP1 expression induced by dexamethasone was higher in

siRNA-MUC4 cells when compared with siRNA(-) control cells, suggesting that *MUC4* gene expression impairs anti-inflammatory effects of dexamethasone (see Fig E2, E and F).

Corticosteroids mediate part of through anti-inflammatory effects through transactivation of genes that encode proteins with anti-inflammatory properties through direct interaction of the agonist-bound GR to glucocorticoid response elements (GREs). In this work cells were transfected with GRE reporter construct in siRNA-MUC4 cells and siRNA(-) cells and incubated with 1  $\mu\text{mol/L}$  dexamethasone for 6 hours. Treatment of 2xGRE BEAS-2B reporter cells with dexamethasone (0.1 nmol/L to 1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 6 hours induced GRE-dependent transcription in a concentration-dependent manner that was significantly higher in siRNA-MUC4 than in siRNA(-) control cells (see Fig E2, G).

In siRNA(-) cells both PGN and LPS increase the levels of phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 over that seen in siRNA-MUC4 cells (see Fig E3, A). Dexamethasone partially inhibited PGN- and LPS-induced phosphorylation of ERK1/2 in siRNA(-) cells, whereas in siRNA-MUC4 cells the ERK1/2 phosphorylation was completely suppressed (see Fig E3, A). Contrary effects were observed for MKP1 expression. In siRNA(-) control cells the upregulation of MKP1 protein induced by dexamethasone was higher than that observed in siRNA-MUC4 cells (see Fig E3, B).

### **MUC4 $\beta$ interacts differently with the GR $\alpha$ complex in NP epithelial cells from patients with CRSwNP, both responders and nonresponders to oral corticosteroids**

NP primary epithelial cells were treated with or without 1  $\mu\text{mol/L}$  dexamethasone for 4 hours to promote GR $\alpha$  nuclear translocation. Nuclear, cytoplasmic, or total protein was extracted and immunoprecipitated with MUC4 $\beta$  or GR $\alpha$ , followed by an immunoblot with the GR $\alpha$  antibody or MUC4 $\beta$  immunoblot. In NP epithelial cells from responders with CRSwNP, coimmunoprecipitation of MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  was absent in the nucleus independent of dexamethasone treatment. In contrast, cytoplasm expressed the MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  complex, expression of which decreased after dexamethasone exposure (Fig 3, A). Confocal immunofluorescence for GR $\alpha$  and MUC4 $\beta$  revealed that both proteins are coexpressed in the cytoplasm of NP epithelial cells around the nucleus. After addition of dexamethasone, the GR $\alpha$ -MUC4 $\beta$  complex was dissociated, and GR $\alpha$  translated to the nucleus, whereas MUC4 $\beta$  remained in the cytoplasm (Fig 3, A). Different results were observed in NP epithelial cells from corticosteroid-resistant patients. NP epithelial cells showed a broad MUC4 $\beta$  distribution in cytoplasm and nucleus. MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  complex was present in nucleus and cytoplasm. Confocal images corroborated immunoprecipitation experiments, suggesting that in NP epithelial cells from corticosteroid-resistant patients, dexamethasone is unable to induce GR $\alpha$ -MUC4 $\beta$  complex dissociation.

### **Effect of MUC4 overexpression on anti-inflammatory effects of dexamethasone in the HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line**

The HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line was created with the doxycycline-inducible MUC4 expression system

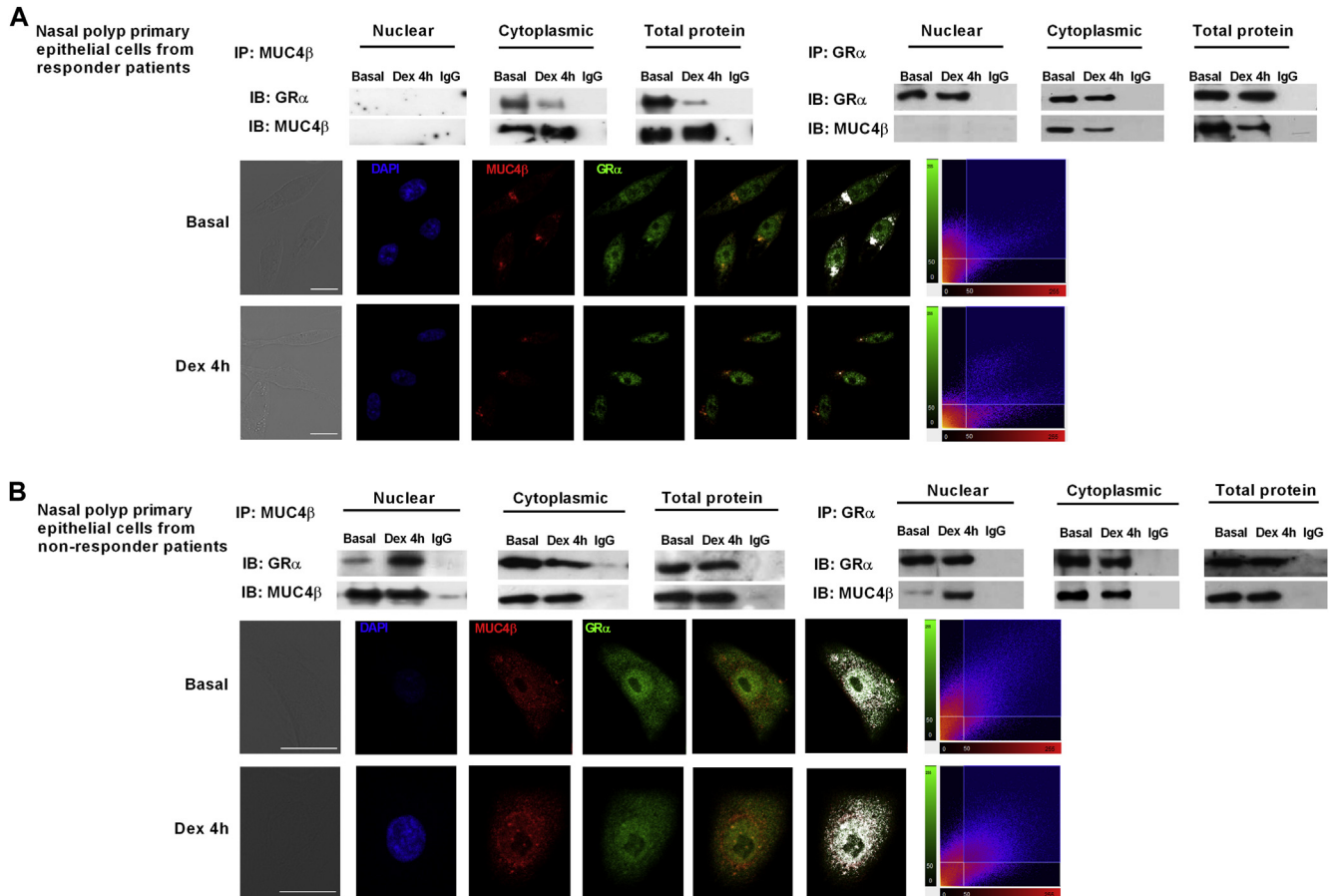
and the full-length MUC4-inducible plasmid CS-H2247-pTREG (see Fig E4 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Doxycycline at 1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, and 1  $\mu\text{mol/L}$  induced 2-, 19-, 42-, and 100-fold MUC4 increased expression, respectively, after 24 hours of incubation (see Fig E5, A, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). The HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line was incubated with or without doxycycline (100 nmol/L and 1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours, followed by the addition of dexamethasone (0.1 nmol/L-1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 hours before LPS stimulation for 24 hours.

The IL-8 percentage inhibition of dexamethasone in control cells was 100%, which is significantly higher than in cells pretreated with 100 nmol/L and 1  $\mu\text{mol/L}$  doxycycline, reaching 73.6%  $\pm$  4% and 48.7%  $\pm$  0.8% inhibition, respectively (see Fig E5, B). In other experiments HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 cells were transfected with GRE reporter construct and incubated with doxycycline (100 nmol/L or 1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours, followed by the addition of dexamethasone (0.1 nmol/L to 1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 6 hours. Treatment of 2xGRE HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 cells with dexamethasone (0.1 nmol/L to 1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 6 hours induced GRE-dependent transcription in a concentration-dependent manner that was significantly higher in the absence of doxycycline (see Fig E5, C). Finally, expression of the corticosteroid-inducible gene MKP1 was concentration-dependently induced by dexamethasone (0.1 nmol/L to 1  $\mu\text{mol/L}$ ) in HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 cells and inhibited in the presence of doxycycline (see Fig E5, D). Coimmunofluorescence analysis showed that under basal control conditions, MUC4 $\beta$  colocalized with GR $\alpha$  in the cytoplasm in the absence of dexamethasone. After stimulation with 1  $\mu\text{mol/L}$  dexamethasone, GR $\alpha$  dissociated from MUC4 $\beta$  and translocates to the nucleus. In HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 preincubated with 1  $\mu\text{mol/L}$  doxycycline, MUC4 $\beta$  colocalized with GR $\alpha$  throughout the cell and remained colocalized with MUC4 $\beta$  in the cytoplasm and nucleus after dexamethasone stimulation, suggesting a similar pattern of distribution as seen in NP epithelial cells from nonresponder patients (see Fig E5, E).

## **DISCUSSION**

Findings showed in this work provide first evidence on the participation of MUC4 in the corticosteroid resistance seen in patients with CRSwNP. MUC4 was significantly overexpressed in NP epithelial cells of corticosteroid-resistant patients when compared with those of CRSwNP responder patients. Mechanistic experiments revealed that TLR2 and TLR4 bacterial agonists induce MUC4 overexpression that is reversed by dexamethasone in responder patients but not in corticosteroid-resistant patients. MUC4 knockdown attenuated the inflammatory response elicited by TLR2 and TLR4 agonists and improved the anti-inflammatory effects of dexamethasone. In NP epithelial cells from responder patients, MUC4 $\beta$  formed a complex with GR $\alpha$  in the cytoplasm that was dissociated in response to dexamethasone to promote translocation of GR $\alpha$  to the nucleus. However, in NP epithelial cells from corticosteroid-resistant patients, MUC4 $\beta$  was overexpressed, and MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  complex was present in cytoplasm and nucleus remaining as a complex, regardless of the addition of dexamethasone, thus impairing the correct binding of GR $\alpha$  to GRE in promoter regions of glucocorticoid-inducible genes, such as MKP1, which might





**FIG 3.** MUC4 $\beta$  is coexpressed with GR $\alpha$  in NP epithelial cells. The nuclear, cytoplasmic, or total protein immunoprecipitates (IP) of MUC4 $\beta$  or GR $\alpha$  were collected from NP primary epithelial cells from responder (n = 6; **A**) and nonresponder (n = 8; **B**) patients and incubated in the presence or absence (basal) of dexamethasone (Dex; 1  $\mu$ mol/L) for 4 hours. Immunoprecipitates were immunoblotted (IB) with the opposite antibody GR $\alpha$  or with the same antibodies used for immunoprecipitation as controls. The IgG isotype was used as a negative control for immunoprecipitation. NP epithelial cells were fixed, permeabilized, and used for MUC4 $\beta$  (red) and GR $\alpha$  (green) immunostaining. Under basal conditions, MUC4 $\beta$  colocalized with GR $\alpha$  in the cytoplasm of responder patients and throughout the cell in nonresponder patients. After dexamethasone stimulation, GR $\alpha$  dissociated from MUC4 $\beta$  and translocated to the nucleus in cells from responder patients but remained colocalized with MUC4 $\beta$  in cytoplasm and nucleus in nonresponder patients. Colocalization was analyzed with a confocal spectral microscope (Leica TCS SP2; Leica, Wetzlar, Germany) that generated a bidimensional cytofluorogram that selected common localized points of both antibodies (white color). 4'-6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), blue nuclei. Scale bars = 10  $\mu$ m.

explain, in part, the effect of MUC4 on corticosteroid resistance of patients with CRSwNP.

This work is an extension study of previously reported clinical translational research<sup>6</sup> in which the membrane-tethered MUC1-CT was identified as a molecular tool that forms a complex with GR $\alpha$ , enabling GR $\alpha$  nuclear translocation in response to dexamethasone and the subsequent corticosteroid anti-inflammatory effects.<sup>6</sup> In this regard patients with NP-CR had lower MUC1-CT-GR $\alpha$  complexes in NP tissue along with lower expression of MKP1 and GR $\alpha$  than that observed in responder patients. Furthermore, dexamethasone increased MUC1-CT expression as part of its anti-inflammatory effects because MUC1-CT also inhibited activation of TLR proinflammatory signals.<sup>14</sup> The hypothesis derived from this previous study was that the membrane-tethered MUC4 mucin could play some role in corticosteroid efficacy in patients with CRSwNP.

In contrast to MUC1, the role of MUC4 has been described only in the context of different types of cancers.<sup>15</sup> Experimental evidence indicates that MUC4 $\beta$  binds the receptor ErbB2 in plasma membrane and modulates its localization,<sup>16</sup> phosphorylation, and downstream signaling,<sup>17</sup> thus promoting growth, motility, or differentiation of cancer cells.<sup>18</sup> However, MUC4 $\beta$  can play different roles independently of ErbB2, promoting, for example, the activation of c-Jun N-terminal kinase pathway and cell cancer migration independently of the ErbB2 receptor interaction.<sup>19</sup> As occurs with MUC1 mucin, MUC4 is expressed in nasal and bronchial epithelial cells of healthy subjects.<sup>20</sup> Previous reports have shown that MUC4 is overexpressed in NPs when compared with nasal mucosa,<sup>8,11</sup> and its expression is upregulated under inflammatory conditions<sup>13,21</sup> and after fungal, bacterial, or rhinovirus injury.<sup>11,21,22</sup>

Recent data also indicate that MUC4 is overexpressed in bronchial epithelium of patients with severe uncontrolled asthma when compared with that of healthy subjects or patients with mild-to-moderate asthma.<sup>23</sup> In this work we analyzed the role of MUC4 on corticosteroid efficacy. The overexpression of MUC4 $\beta$  was significantly associated with the lack of response to oral corticosteroids in patients with CRSwNP. Opposite results were observed for MUC1 expression. In fact, the lower ratio between MUC1/MUC4 expression in NPs clearly differentiated responder and nonresponder patients. Although the effect of MUC4 on corticosteroid efficacy is not known, previous observations could indicate some contribution. Thus, for example, airway bacterial (mainly *Staphylococcus aureus*) and rhinovirus airway colonization increase corticosteroid insensitivity<sup>24,25</sup> and MUC4 expression.<sup>11,22</sup> In addition, MUC4 is overexpressed in patients with severe uncontrolled asthma<sup>23</sup> that is particularly resistant to corticosteroids.<sup>26</sup> In this work the incidence of corticosteroid resistance was similar among patients with NPs without asthma and patients with asthma, perhaps because asthmatic patients participating in this study had mild-to-moderate well-controlled asthma.<sup>23</sup>

However, the association of MUC4 overexpression with corticosteroid resistance could be only an observation secondary to NP inflammation without any direct relation to corticosteroid mechanistic pathways. In this regard several mechanisms have been proposed to contribute to the loss of corticosteroid efficacy in patients with CRSwNP, such as the loss of MUC1, GR $\alpha$ , and MKP1 expression in NP tissue<sup>6</sup> or the increase of nuclear factor  $\kappa$ B, GR $\beta$ , phospho-ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase, and GR-Ser226 hyperphosphorylation.<sup>6,27-29</sup> This fact indicates that corticosteroid resistance is an acquired and progressive condition that can depend on several multiple molecular pathways. In this work we focused on the effect of MUC4 on dexamethasone's anti-inflammatory effects. In NP epithelial cells from responder patients, we observed that TLR2 and TLR4 agonists increased the expression of MUC4 and the release of IL-8 and GM-CSF, which were significantly inhibited by dexamethasone. Similar results have been observed previously in human NP epithelial cells, showing an inhibitory effect of dexamethasone on IL-1 $\beta$  or LPS-induced MUC4 overexpression.<sup>11,13</sup> Unlike in responder patients dexamethasone did not reduce the expression of MUC4 and release of IL-8 and GM-CSF in NP epithelial cells from corticosteroid-resistant patients. To identify the contribution of MUC4 to the anti-inflammatory effects of corticosteroids, we conducted mechanistic experiments by using MUC4 knockdown by RNA interference. Thus in siRNA-MUC4 cells TLR2 and TLR4 agonists significantly increased the release of IL-8 and GM-CSF when compared with siRNA(-) control cells, suggesting a role for MUC4 in the inflammatory process. Furthermore, dexamethasone showed an improved anti-inflammatory effect in siRNA-MUC4 cells. These results were mechanistically corroborated in siRNA-MUC4 cells, in which the activation of TLR2/TLR4 induced lower ERK1/2 phosphorylation that was nearly suppressed by dexamethasone. These results suggested that MUC4 $\beta$  could play some role collaborating in TLR activation or inhibiting corticosteroid efficacy. The last hypothesis was tested measuring levels of the glucocorticoid-enhanced MKP1 protein, which is induced as a consequence of the interaction of GR $\alpha$  with GRE in promoter regions of corticosteroid-inducible genes to inhibit ERK1/2 phosphorylation and the consequent inflammation.<sup>30</sup> In this

regard dexamethasone significantly increased MKP1 expression in NP epithelial cells from responder patients and in siRNA-MUC4 cells when compared with cells from nonresponders or siRNA(-) cells, respectively. Furthermore, dexamethasone significantly increased GRE reporter signal in siRNA-MUC4 cells when compared with that in siRNA(-) cells, confirming the hypothesis by which MUC4 can inhibit transactivation of GR $\alpha$ . Next, we analyzed the possible interaction of MUC4 $\beta$  with the GR $\alpha$  complex, as well as its possible effect on nuclear translocation. As occurs with MUC1-CT, the mucin MUC4 $\beta$  also contains a cytoplasm tail that can interact with other intracellular proteins to modulate different signal pathways.<sup>15</sup> However, in contrast to MUC1-CT, there is no current evidence of MUC4 $\beta$  intracellular interactions. In this work we immunoprecipitated MUC4 $\beta$  in NP epithelial cells from responders and from corticosteroid-resistant patients after 4 hours of dexamethasone exposure. In NP epithelial cells from responder patients, the MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  complex was absent in the nucleus and restricted to cytoplasm, mainly around the nucleus. After dexamethasone exposure, the MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  complex was dissociated, and GR $\alpha$  was released to the nucleus. However, in cells from nonresponder patients, the MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  complex was present in the cytoplasm and nucleus and was not dissociated by dexamethasone. These results indicate that MUC4 $\beta$  could work by blocking the correct interaction of GR $\alpha$  with GRE DNA regions. GR $\alpha$  forms different dynamic complexes with multiple proteins that modulate its correct function. In the absence of corticosteroids, GR $\alpha$  resides in the cytoplasm in a multimeric chaperone complex consisting of heat shock protein (hsp) 90, hsp70, hsp90-binding protein p23, immunophilins, MUC1-CT, and other factors to prevent its degradation and assist in its maturation.<sup>6,31</sup> The GR $\alpha$  complex translocates to the nucleus in response to corticosteroids and with the participation of nuclear pore complex, including importins and nucleoporins. GR $\alpha$  also builds a complex with the chaperone calreticulin, forming an inactive complex in the nucleus to export GR $\alpha$  to the cytoplasm.<sup>32,33</sup> Interestingly, MUC4 $\beta$  can also form a complex with calreticulin, which might explain, in part, the inactivation of GR $\alpha$  by a multimeric MUC4 $\beta$ -calreticulin-GR $\alpha$  complex.<sup>34</sup> However, the last proposed mechanism is only a speculation and reveals the necessity of further investigations to appropriately dissect the exact mechanism mediating the MUC4 $\beta$ -GR $\alpha$  relation.

To better understand the direct effect of MUC4 overexpression on corticosteroid resistance, we created a HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line based in tetracycline transactivator-inducible gene expression system. Cells incubated with doxycycline increased the expression of MUC4 to up of 100-fold. In doxycycline-treated HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 cells dexamethasone showed less inhibitory effect on LPS-induced IL-8 release and less GRE induction and MKP1 expression. Furthermore, the MUC4-GR $\alpha$  complex was not dissociated in doxycycline-treated HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 cells overexpressing MUC4, which mimicked the observations in NP epithelial cells from nonresponder patients and corroborated the effect of MUC4 overexpression on corticosteroid insensitivity. However, there is a lack of evidence whether MUC4 might play a role in the corticosteroid resistance seen in other tissues or inflammatory cells, as well as in patient with other airway diseases in which it is possible to observe a loss of corticosteroid efficacy, such as severe asthma or chronic obstructive pulmonary disease.<sup>26</sup> It should be emphasized that

mechanistic experiments were done in the BEAS-2B bronchial epithelial cell line and the MUC4-overexpressing HEK293 cell line. Both are biologically different from NP primary epithelial cells, and this represents a potential limitation of our study.

In summary, we demonstrated a new role for MUC4 in modulating the loss of the anti-inflammatory effects of corticosteroids in patients with CRSwNP, which might help explain the interindividual differences in response to corticosteroids.

We thank Sonia Priego for assistance in analyzing the confocal microscopy images at the Microscopy Service of the UCIM Faculty of Medicine, Valencia, Spain, and Professor G. Juan of the Respiratory Unit of the Hospital General, Valencia, Spain, for facilitating the clinical data.

### Key messages

- MUC4 overexpression on NP epithelium of patients with CRSwNP is a biomarker of oral corticosteroid resistance.
- MUC4 overexpression impairs the correct anti-inflammatory effects of corticosteroids by forming a MUC4-GR $\alpha$  inhibitory complex.

### REFERENCES

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinol Suppl* 2012;3 p preceding table of contents:1-298.
2. Hissaria P, Smith W, Wormald PJ, Taylor J, Vadas M, Gillis D, et al. Short course of systemic corticosteroids in sinonasal polyposis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with evaluation of outcome measures. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:128-33.
3. Pauwels B, Jonstam K, Bachert C. Emerging biologics for the treatment of chronic rhinosinusitis. *Expert Rev Clin Immunol* 2015;11:349-61.
4. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006;86:245-78.
5. Kim KC. Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm Pharmacol Ther* 2012;25:415-9.
6. Milara J, Peiro T, Armengot M, Frias S, Morell A, Serrano A, et al. Mucin 1 down-regulation associates with corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:470-6.
7. Senapati S, Das S, Batra SK. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Trends Biochem Sci* 2010;35:236-45.
8. Martinez-Anton A, Debolos C, Garrido M, Roca-Ferrer J, Barranco C, Alobid I, et al. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy* 2006;36:448-57.
9. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit Rev Oncog* 2008;14:177-96.
10. Carraway KL 3rd, Funes M, Workman HC, Sweeney C. Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Curr Top Dev Biol* 2007;78:1-22.
11. Bai CH, Song SY, Kim YD. Effect of glucocorticoid on the MUC4 gene in nasal polyps. *Laryngoscope* 2007;117:2169-73.
12. Seo KY, Chung SH, Lee JH, Park MY, Kim EK. Regulation of membrane-associated mucins in the human corneal epithelial cells by dexamethasone. *Cornea* 2007;26:709-14.
13. Woo HJ, Bae CH, Song SY, Lee HM, Kim YD. Expression of membrane-bound mucins in human nasal mucosa: different patterns for MUC4 and MUC16. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010;136:603-9.
14. Ueno K, Koga T, Kato K, Golenbock DT, Gendler SJ, Kai H, et al. MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:263-8.
15. Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 2010;29:2893-904.
16. Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:30142-7.
17. Ramsauer VP, Pino V, Farooq A, Carothers Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4-ErbB2 complex formation and signaling in polarized CACO-2 epithelial cells indicate that Muc4 acts as an unorthodox ligand for ErbB2. *Mol Biol Cell* 2006;17:2931-41.
18. Carraway KL, Theodoropoulos G, Kozloski GA, Carothers Carraway CA. Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncol* 2009;5:1631-40.
19. Jonckheere N, Skrypek N, Merlin J, Dessen AF, Dumont P, Leteurtre E, et al. The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS One* 2012;7:e32232.
20. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: from cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie* 2010;92:1-11.
21. Kim ST, Ye MK, Shin SH. Effects of Asian sand dust on mucin gene expression and activation of nasal polyp epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy* 2011;25:303-6.
22. Shin SH, Ye MK, Kim JK. Effects of fungi and eosinophils on mucin gene expression in rhinovirus-infected nasal epithelial cells. *Allergy Asthma Immunol Res* 2014;6:149-55.
23. Hattori T, Zhou X, Trudeau JB, Wenzel SE. MUC4 protein is increased in severe asthmatic bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:A2404.
24. Li LB, Goleva E, Hall CF, Ou LS, Leung DY. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1059-69.
25. Papi A, Contoli M, Adcock IM, Bellettato C, Padovani A, Casolari P, et al. Rhinovirus infection causes steroid resistance in airway epithelium through nuclear factor kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1075-85.e6.
26. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:636-45.
27. Choi BR, Kwon JH, Gong SJ, Kwon MS, Cho JH, Kim JH, et al. Expression of glucocorticoid receptor mRNAs in glucocorticoid-resistant nasal polyps. *Exp Mol Med* 2006;38:466-73.
28. Hamilos DL, Leung DY, Muro S, Kahn AM, Hamilos SS, Thawley SE, et al. GRbeta expression in nasal polyp inflammatory cells and its relationship to the anti-inflammatory effects of intranasal fluticasone. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:59-68.
29. Valera FC, Queiroz R, Scrideli C, Tone LG, Anselmo-Lima WT. Evaluating budesonide efficacy in nasal polyposis and predicting the resistance to treatment. *Clin Exp Allergy* 2009;39:81-8.
30. Vandevyver S, Dejager L, Libert C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* 2012;13:364-74.
31. Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:2-12.
32. Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, et al. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 1994;367:476-80.
33. Roderick HL, Campbell AK, Llewellyn DH. Nuclear localisation of calreticulin in vivo is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors. *FEBS Lett* 1997;405:181-5.
34. Lomako J, Lomako WM, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Regulation of the membrane mucin Muc4 in corneal epithelial cells by proteosomal degradation and TGF-beta. *J Cell Physiol* 2010;223:209-14.

## METHODS

### Patients

This study analyzed data from patients with CRSwNP (n = 81) enrolled from the Rhinology Unit of Valencia University General Hospital during a 4-year period (2010-2014). This work was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from each subject. This study incorporated 22 patients from a previously published work on MUC1's role in corticosteroid efficacy, which shares the same clinical design as the present study.<sup>E1</sup> Patients with CRSwNP with no clinical and endoscopic response to intranasal corticosteroids for 3 months were cross-sectionally recruited. In this study NPs were defined based on endoscopic findings of bilateral polyps originating from the middle meatus and/or confirmation of NPs by using computed tomography, according to the European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012 guidelines.<sup>E2</sup> All patients had extensive polyps (score, 2-4 on both sides; Table E1). Atopic status was evaluated by using a skin prick test or assays for specific IgEs against common inhaled allergens. The diagnosis of aspirin intolerance was confirmed by means of lysine-aspirin nasal challenge, as previously described.<sup>E3</sup> The diagnosis of asthma was determined by a pneumologist. All subjects were free of upper respiratory tract clinical infections for the 4 weeks preceding the oral corticosteroid therapy. None of the subjects used other medications (eg, antibiotics or antileukotrienes) for 4 weeks before starting oral corticosteroids.

At the moment of recruitment, patient phenotypes were classified as NPwA, NP-ATA, and NP-AIA. Patients started oral corticosteroids (deflazacort) at 1 mg/kg/d for 8 days, followed by 0.5 mg/kg/d for another 7 days, according to routine clinical practice. Therapy compliance was evaluated by a clinical research pharmacy using direct recount of drug containers and personal interviews with the patients after therapy ended. Corticosteroid resistance was evaluated at day 15 after corticosteroid therapy. Patients who were unable to reduce more than 1 NP endoscopic score after oral corticosteroid course were considered resistant to corticosteroids and classified as the NP-CR group. The clinical characteristics of all patients before starting oral corticosteroids and at the end of treatment are presented in Table E2. Patients of the NP-CR group had the NPwA (n = 6), NP-ATA (n = 2), and NP-AIA (n = 14) phenotypes, and their characteristics are defined in Table E3.

NP tissues were sampled before and after oral corticosteroid therapy to isolate nasal epithelial cells and to analyze tissue mRNA and protein expression, as well as protein epithelial location, by means of immunohistochemistry.

### NP epithelial cell isolation and cell culture

NP samples (approximately 5 × 5 mm) were washed with sterile physiologic serum and plated on collagen-coated culture dishes (10 μg/cm<sup>2</sup> rat type I collagen; Sigma, St Louis, Mo) in bronchial epithelial growth medium (comprising bronchial epithelial basal medium supplemented with bovine pituitary extract at 52 μg/mL, hydrocortisone at 0.5 μg/mL, human recombinant EGF at 25 ng/mL, epinephrine at 0.5 μg/mL, transferrin at 10 μg/mL, insulin at 5 μg/mL, retinoic acid at 50 nmol/L, triiodo-L-thyronine at 6.5 ng/mL, gentamicin at 40 μg/mL, amphotericin B at 50 ng/mL, BSA at 1.5 μg/mL, and retinoic acid at 0.05 μmol/L).

NPs were oriented with the epithelial layer to be in contact with the culture plate. Cultures were kept in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator at 37°C. After a period of approximately 1 to 2 weeks, NP epithelial cells were observed around the polyps and used for *in vitro* mechanistic experiments. The identity of the monolayer as NP epithelial cells was affirmed by using morphologic criteria and immunofluorescence for cytokeratin 18 (KRT18), as well as subsequent *in vitro* differentiation in an air-liquid interface as pseudostratified NP epithelium with basal cells, ciliated cells, columnar cells, and goblet cells, as previously outlined.<sup>E4</sup> Cell viability was assessed by means of vital trypan blue exclusion analysis with the Countess automated cell counter (Life Technologies, Madrid, Spain). Cell viability was greater than 98% in all cell cultures tested in this work. Experiments with primary nasal epithelial cells were performed at passage 1.

The bronchial epithelial BEAS-2B cell line was obtained from the American Type Culture Collection and cultured with the same culture medium and conditions as the primary NP epithelial cells described above at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in humidified air. The culture medium was replaced every 48 hours.

### Immunohistochemistry and immunofluorescence analysis

For immunohistochemical analysis of human NPs, the tissue was fixed, embedded in paraffin, cut into sections (4-6 μm), and stained with hematoxylin, as reported previously.<sup>E5</sup> The sections were incubated with rabbit anti-human polyclonal MUC4β antibody (NBP1-52193; Novus Biologicals, Littleton, Colo) for 24 hours at 4°C. A secondary anti-rabbit antibody (1:100; Vector Laboratories, Burlingame, Calif) with avidin-biotin complex/horseradish peroxidase was used for immunohistochemistry. The nonimmune IgG isotype was used as a negative control and yielded no signal in all cases (data not shown). Stained slices were scored by a blinded pathologist under a Nikon Eclipse TE200 light microscope (Nikon, Tokyo, Japan), and representative photographs were taken (10 slices per patient). Staining intensity was analyzed in NP epithelium. Staining intensity for MUC4β antibody was scored on a scale of 0 to 3 (0, negative; 1, weak; 2, moderate; and 3, strong immunoreactivity). The percentage of cells positive for MUC4β within NP epithelium was scored on a scale of 1 to 4 as follows: 1, 0% to 25% positive; 2, 26% to 50% positive; 3, 51% to 75% positive; and 4, 76% to 100% positive. The score of the staining intensity and percentage of immunoreactive cells were then multiplied to obtain a composite score ranging from 0 to 12.

The *in vitro* cell culture of NP epithelial cells was fixed (4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature) after appropriate treatments. Cells were permeabilized (20 mmol/L HEPES at pH 7.6, 300 mmol/L sucrose, 50 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, and 0.5% Triton X-100), blocked (10% goat serum in PBS), and incubated with the primary antibodies rabbit anti-human polyclonal MUC4-β antibody (NBP1-52193, Novus Biologicals) and mouse anti-human monoclonal GRα antibody (catalog no. 611227; BD Biosciences, San Jose, Calif) overnight at 4°C, followed by secondary antibody anti-rabbit/mouse rhodamine/fluorescein isothiocyanate (1:100; Molecular Probes, Eugene, Ore).

In Fig 3, colocalization of MUC4-β and GRα was performed with a confocal spectral Leica TCS SP2 microscope at ×1000 magnification and ×3 zoom. Red (HeNe 543 nm), green (HeNe 488 nm), and blue (Ar 351 nm and 364 nm) lasers were used. Colocalization studies were performed with Leica confocal software v2.61. A bidimensional cytofluorogram was created between different green and red intensity points of the cell image. The cell images with colocalized points of the 2 laser canals were changed to a white color in the cell image.

### Real-time RT-PCR and siRNA experiments

Total RNA was isolated from NP tissue by using TriPure Isolation Reagent (Roche, Indianapolis, Ind). The integrity of the extracted RNA was confirmed with the Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, Calif). Reverse transcription was performed in 300 ng of total RNA with a TaqMan reverse transcription reagent kit (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, Calif). cDNA was amplified with specific primers and probes predesigned by Applied Biosystems for MUC1 (Hs00159357\_m1), MUC4 (Hs00366414\_m1), and MKP1 (Hs00610256\_g1) in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) by using Universal Master Mix (Applied Biosystems).

Expression of the target gene was expressed as the fold increase or decrease relative to the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) as an endogenous control (4310884E, Applied Biosystems). The mean value of the replicates for each sample was calculated and expressed as the cycle threshold (Ct). The level of gene expression was then calculated as the difference (ΔCt) between the Ct value of the target gene and the Ct value of *GAPDH*. The fold changes in the target gene mRNA levels were designated  $2^{-\Delta Ct}$ .



siRNA, including the scrambled siRNA control, was purchased from Ambion (Cambridge, United Kingdom). *MUC4* gene-targeted siRNA (identification no. s9073) was designed by Ambion. BEAS-2B cells were transfected with siRNA (50 nmol/L) in serum and antibiotic-free medium. After 6 hours, the medium was aspirated and replaced with medium containing serum for a further 42 hours before cell stimulation. The transfection reagent used was lipofectamine-2000 (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) at a final concentration of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . *MUC4* knockdown was evaluated in BEAS-2B cells by means of Western blotting and RT-PCR by using *MUC4* $\beta$  antibody and *MUC4* primers and probe, as described above. *MUC4* expression in *MUC4* knockdown experiments was always less than 10% of *MUC4* expression in siRNA(–) control cells (data not shown).

### Western blot analysis

Western blot analysis was used to detect changes in NP tissue and BEAS-2B protein expression of *MUC4* $\beta$ , mouse anti-human phospho-ERK1/2 (catalog no. M9692, Sigma-Aldrich), rabbit anti-human polyclonal MKP1 (B1099; Assay Biotech, Sunnyvale, Calif), and GR $\alpha$  antibody (GR $\alpha$ ; catalog no. 611227, BD Biosciences). NP tissue or BEAS-2B cells were homogenized or scraped from a confluent 25-cm<sup>2</sup> flask and lysed on ice with a lysis buffer comprising complete inhibitor cocktail plus 1 mmol/L EDTA (Roche Diagnostics, West Sussex, United Kingdom) with 20 mmol/L TRIS base, 0.9% NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L dithiothreitol, and 1 mg/mL pepstatin A. Nuclear and cytoplasm protein extraction was performed with a nuclear active motif extraction kit (Active Motif Europe, Rixensart, Belgium), according to the manufacturer's protocol. The Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Herts, United Kingdom) was used according to the manufacturer's instructions to quantify the level of protein in each sample to ensure equal protein loading. SDS-PAGE was used to separate the proteins according to their molecular weight. Briefly, 15  $\mu\text{g}$  of proteins (denatured) along with a molecular weight protein marker (Bio-Rad Kaleidoscope marker, Bio-Rad Laboratories) was loaded onto an acrylamide gel consisting of a 5% acrylamide stacking gel stacked on top of a 10% acrylamide resolving gel and run through the gel by means of application of 100 V for 1 hour. Proteins were transferred from the gel to a polyvinylidene difluoride membrane by using a wet-blotting method. The membrane was blocked with 5% Marvel in PBS containing 0.1% Tween 20, probed with the antibodies described above, and normalized to total mouse anti-human  $\beta$ -actin (1:1000) antibody (mAb, catalog no. A1978; Sigma) or total rabbit anti-human ERK1/2 (1:1000) antibody (mAb; catalog no. 4695; Cell Signaling, Boston, Mass) as appropriate. The enhanced chemiluminescence method of protein detection with enhanced chemiluminescence reagents (ECL Plus; Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) was used to detect labeled proteins. Densitometry of films was performed with Image J 1.42q software (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, Bethesda, Md). Results of target protein expression are expressed as the percentage of the densitometry of the endogenous controls  $\beta$ -actin or total ERK1/2, as appropriate.

### Immunoprecipitation

Equal amounts of protein (200  $\mu\text{g}$ ) from total, cytoplasmic, or nuclear extracts were incubated with 2  $\mu\text{g}$  of anti-GR $\alpha$  or anti-*MUC4* $\beta$  antibodies and the IgG isotype control. Immune complexes were precipitated with protein G on Sepharose 4B fast flow beads (P-3296; Sigma) overnight at 4°C. After washing 3 times with NET buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl at pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, and 0.1% Nonidet P-40, the bound materials were eluted from the immunoprecipitates in reducing SDS-PAGE loading buffer containing 10% SDS, 1 mol/L Tris-HCl at pH 6.8, 50% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 2% bromophenol blue at 100°C for 10 minutes. Immunoprecipitated protein complexes were assayed by means of Western blotting, as described above, and probed with anti-GR $\alpha$  or anti-*MUC4* $\beta$  antibodies, as appropriate.

### GRE transfection assay

BEAS-2B epithelial cells were seeded (40,000 cells/well) and cultured for 24 hours in a 5% CO<sub>2</sub>/air atmosphere at 37°C in 96-well plates containing Dulbecco modified Eagle medium (DMEM). The Cignal GRE Reporter Assay Kit (catalog no. 336841; Qiagen, Hilden, Germany) was used to monitor the activity of GR-induced signal transductions pathways in cultured cells, according to the manufacturer's indications. First, cells were transfected with *MUC4* gene-targeted siRNA or scrambled siRNA control, as described above. Twenty-four hours later, cells were transfected with Cignal Reporter (100 ng), Cignal negative control (100 ng) and Cignal positive control (100 ng) in Opti-MEM serum-free culture medium using Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) as a transfection reagent. Subsequently, cells were incubated with the transfection reagents at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 16 hours. After this incubation period, cells were preincubated for 6 hours with different dexamethasone concentrations (0.1 nmol/L–1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) in DMEM.

After this 6-hour period, the luciferase assay was developed by using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (catalog no. 1910; Promega, Madison, Wis), according to the manufacturer's protocol for developing the assay. In brief, growth medium was removed from the cultured cells, and surfaces of the cultured cells were washed gently with PBS. After removing completely the rinse solution, Passive Lysis Buffer 1 $\times$  was added. The culture plate was then placed on an orbital shaker, with gentle shaking at room temperature for 15 minutes. In the meantime, Luciferase Assay Reagent II (LAR II) was prepared by resuspending the provided lyophilized Luciferase Assay Substrate in 10 mL of the supplied Luciferase Assay Buffer II. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of LAR II was dispensed in the appropriate number of wells of a white 96-well plate. Then a volume of 20  $\mu\text{L}$  of cell lysate was added to the wells containing LAR II and mixed by means of pipetting 2 or 3 times. The white plate was placed in the luminometer (Victor, PerkinElmer Inc, Zaventem, Belgium), reading was initiated, and firefly luciferase activity was measured. In the meantime, the Stop & Glo Reagent (Promega) was prepared, just before use, by diluting 1 volume of the Stop & Glo Substrate to 50 volumes of Stop & Glo Buffer. After the first measure, 100  $\mu\text{L}$  of Stop & Glo Reagent was dispensed in the corresponding wells. The plate was replaced in the luminometer, a second reading was initiated, and the Renilla Luciferase activity was recorded. Data are expressed as 2 $\times$  GRE fold induction of luciferase relative to unstimulated cells.

### In vitro stimulations

For the *in vitro* studies, primary NP epithelial cells or BEAS-2B cells were stimulated with the TLR2 agonist PGN (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; InvivoGen, San Diego, Calif) or the TLR4 agonist LPS (Ultrapure LPS, *E coli* 0111:B4; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; InvivoGen) for the indicated times. Dexamethasone (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , Sigma) was added 2 hours before stimulus. In other experiments cells underwent knockout for the *MUC4* gene for 48 hours and stimulation, as described above, in the presence or absence of dexamethasone.

### ELISA for IL-8 and GM-CSF

IL-8 and GM-CSF levels were determined in cell supernatants by using a commercially available ELISA kit for IL-8 and GM-CSF (catalog nos. DY208 and DGM00; R&D Systems, Nottingham, United Kingdom), according to the manufacturer's protocol.

### Doxycycline-induced *MUC4* expression of the HEK293/Tet3G/TRE3G-*MUC4* stable cell line

The HEK293 cell line was acquired from the American Type Culture Collection and cultured in DMEM (Lonza, Madrid, Spain), with 10% FBS, 0.4 mg/mL G418 (Geneticin; Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), and 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromycin (Thermo Fisher Scientific) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in humidified air.

Transfection of HEK293 cells with pEf-1a-Tet3G plasmid was performed, according to the manufacturer's protocol (Tet-On 3G Inducible Expression



System; catalog no. PT5148-1 [010814]; Clontech Laboratories, Mountain View, Calif).

HEK293 cells were seeded into 6-well plates with 2 mL of medium per well to make the cells 90% confluent. Two mix reactions were created: for mix A, 2.4 µg of pEF-1a-Tet3G plasmid was diluted in 125 µL of Opti-MEM medium, and for mix B, 5 µL of Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) was diluted with 125 µL of Opti-MEM medium and incubated at room temperature for 5 minutes. Mixes A and B were mixed and incubated at room temperature for 20 minutes. Mix solution was added to HEK293 cells with 2 mL of culture medium (DMEM + 10% FBS) and incubated in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 40 hours. After the culture time period, cells were trypsinized, serially diluted in 10-cm dishes with culture medium (DMEM, 10% FBS, and 0.4 mg/mL G418), and cultured for 2 weeks until the colonies were visible. When clones were visible, a total of 80 clones were selected by using a clone cylinder. Clones were cultured in 96-well plates and split into 3 sets for each clone. One set of clones was kept in culture. The other 2 sets were transfected with pTRE3G-Luc reporter plasmid. Twenty-four hours after transfection, we induced the cells with 1 µg/mL doxycycline (for each clone, one for uninduced and one for doxycycline induced) for another 24 hours. We then tested luciferase activity using the GeneCopoeia firefly luciferase kit (Luc-Pair Firefly Luciferase HS Assay Kit; catalog no. LF007; GeneCopeia, Rockville, Md). The clone showing the best doxycycline-induced luciferase activity was selected as the best clone for the HEK293/Tet3G stable cell line. We then went back to the set culture without transfection of pTRE3G-Luc and cultured it as the HEK293/Tet3G Cell Bank. From the HEK293/Tet3G cell line, we used the same transfection method to cotransfect CS-H2247-pTRE3G (2.4 µg, Fig E5) and the puromycin linear marker (0.12 µg) into 6-well plate. Forty hours after selection, we serially diluted the transfected cells with 0.4 µg/mL G418 and 0.8 µg/mL puromycin in 10-cm dishes. Using the same protocol, we then picked 20 single clones for clone screening.

Each stable clone was duplicated, one set kept in culture as a cell bank and the other set used to test MUC4 expression by using RT-PCR. For each clone to be tested, cells were split into 2 wells equally. One well was induced by 1 µmol/L doxycycline for 24 hours. The other was not induced with doxycycline. Gene sequence and CS-H2247-pTRE3G MUC4 full-length plasmid is shown in Fig E4 and online repository data 2 (full sequence). Doxycycline did not induce changes in cell viability at the concentrations used in this work, as assessed by using the trypan blue assay (data not shown).

## Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by using parametric or nonparametric analysis, as appropriate. A *P* level of less than .05 was considered to indicate statistical significance. In the NP tissue experiments, when the comparisons involved only 2 groups, between-group differences were analyzed by using the Mann-Whitney test. When comparisons involved several groups (NPwA, NP-ATA, NP-AIA, and NP-CR), a nonparametric 1-way ANOVA (Kruskal-Wallis test) was first performed in the case of a global significant difference; between-group comparisons were assessed by using the Dunn *post hoc* test, which generalizes the Bonferroni adjustment procedure.

*In vitro* mechanistic cell experiments were performed in primary NP epithelial cells or BEAS-2B cells. In these cases results were expressed as means (SEMs) of *n* experiments because a normal distribution for each data set was confirmed by means of histogram analyses and the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analysis was carried out by using parametric analysis. Two-group comparisons were analyzed with the 2-tailed Student paired *t* test for dependent samples and the unpaired *t* test for independent samples. Multiple comparisons were performed by using 1- or 2-way ANOVA, followed by the Bonferroni *post hoc* test. The percentage of inhibition of IL-8 and GM-CSF secretion was calculated, considering the increment between control (basal release) and stimulus (PGN or LPS) to be 100% of response, and the percentage inhibition of dexamethasone was calculated respect the 100% of response.

The CS-H2247-pTRE3G (with G63074) plasmid sequence is as follows:  
CTCGAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGAAGAGTTT  
ACTCCCTATCAGTGA  
TAGAGAACGTATGCAGACTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACG  
TATAAGGAGTTTACT  
CCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGACCAGTTTACTCCCTATCAG  
TGATAGAGAACGTAT  
CTACAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATATCCAGTTT  
ACTCCCTATCAGTGA  
TAGAGAACGTATAAGCTTTAGGCGTGTACGGTGGGCGCTATAA  
AAGCAGAGCTCGTTA  
GTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGCAATTCCACAACACTTTTGTG  
TTATACCAACTTTCCG  
TACCCTTCTACCCCTCGTAAAGTCGACACCGGGGCCAGATCT  
gccaccATGAAGGGGG  
CACGCTGGAGAGGGTCCCCTGGGTGTCCCTGAGCTGCCTGTG  
TCTCTGCCTCCTTCCG  
ATGTGGTCCCAGGAGTTTCCCTCTTCCCCTATGGGGCAGGCGCC  
GGGACCTGGAGTTCCG  
TCAGGAGGACCGTGGACTTCACCTCCCCACTTTCAGCCGGC  
GACTGGCTTCCCCCTTG  
GCTCCTCTCTCCGTGATTCCCTTACTTACAGACAATGGCCAG  
ATCATCTTCCCAGAGT  
CAGACTACCAGATTTTCTCTACCCCAACCCACTCCCAACAGG  
CTTCACAGCCGGGACC  
CTGTGGCCCTGGTGGCTCCGTTCTGGGACGATGCTGACTTCTCC  
ACTGGTCCGGGGACCA  
CATTTTATCAGGAATACGAGACGTTCTATGGTGAACACAGCCTGC  
TAGTCCAGCAGGCCG  
AGTCTTGGATTAGAAAGATGACAAAACCGGGGGCTACAAGG  
CCAGTGGGCCCTAAAGG  
TCACGTGGGTCAATGCCACGCCTATCCTGCCAGTGACCCTC  
GGGAGCAACACCTACC  
AAGCCATCTCTCCACGGACGGGAGCAGGTCTATGCCCTGTTT  
CTCTACCAGAGCGGTG  
GGATGCAGTGGGACGTGGCCAGCGCTCAGGCAACCCGGTGC  
TCATGGGCTTCTTAGTG  
GAGATGGCTATTTTCGAAAACAGCCACTGATGTCCCAGCCAGTG  
TGGGAGAGGTATCGCC  
CTGATAGATTCTGAATCCAACCTCAGGCCTCAAGGGCTGCAG  
TTCTACAGGCTACACC  
GGGAAGAAAGGCCCAACTACCGTCTCGAGTGCCTGCAGTGGCT  
GAAGCCAGCAGCTCGGT  
GGCCACGCTGGGGCTGGAACCAGGTCTCCTGCCCTTGTTCCTG  
GCAGCAGGGACGACGGG  
ACTTACGATTCCAACCCGTCAGCATAGGTCCGTTGGGCGCTCCGG  
AGTAGGCAGCTGTGCA  
GCTTACCTCTTGGCCAGGAGGCGTGTGCTGCAGCTACGGGCC  
CTGGGGAGAGTTTCTGTG  
AAGGCTGGCAGCTGCAGCTCCTTGGCAGTTGGCCAGGAACT  
GGAGCCACAGAGCTGGT  
GCTGCCGCTGGAATGACAAGCCCTACCTCTGTGCCCTGTACCAG  
CAGAGGCGGCCCCACG  
TGGGCTGTGCTACATACAGGCCCCACAGCCCGCTGGATGTT  
CGGGGACCCCCACATCA  
CCACCTTGGATGGTGTACGTTACACCTTCAATGGGCTGGGGGAC  
TTCTGTGGTTCGGGG  
CCCAAGACGGGAACTCCTCCTTCTGCTTCAGGGCCGACCGCC  
CAGACTGGCTCAGCCC  
AGGCCACCAACTTCATCGCCTTTGCGGCTCAGTACCCTCCAGC  
AGCCTGGGCCCCGTCA  
CGGTCCAATGGCTCCTTGGCCTCACGACGCAATCCGTGTCTGT  
CTGGATAACAGACTG  
TGACATTTACGCTGACCATGAAGACGGCGGAGGCCAGGAGAC  
GTTCAACGCCACCGGAG  
TCCTCTGAGCCGCAACGGCTCTGAGGTCTCGGCCAGCTTCGAC  
GGCTGGGCCACCGTCT

CGGTGATCGCGCTCTCCAACATCCTCCACGCCTCCGCCAGCCTC  
CCGCCGAGTACCAGA  
ACCGCACGGAGGGGCTCCTGGGGTCTGGAATAACAATCCAGA  
GGACGACTTACAGGATGC  
CCAATGGCTCCACCATTCCCCAGGGAGCCCTGAGGAGATGCTT  
TTCCACTTTGGAATGA  
CCTGGCAGATCAACGGGACAGGCCTCCTTGGCAAGAGGAATGA  
CCAGCTGCCTTCCAAC  
TCACCCTGTTTTCTACTCACAACCTGCAAAAAACAGCTCCTGG  
GCTGAACATTTGATCT  
CCAACGTGACGGAGATAGCTCATGCATCTATGACACCCTGGCC  
CTGGCAACGCAAGCA  
TCGGACTTACACGAGGGGAAAGTCAGTAAAACTACGAGCAGGC  
GAACGCCACCCTCAATC  
AGTACCCGCCCTCCATCAATGGTGGTCTGTGATTGAAGCCTAC  
AAGGGGCAGACCACGC  
TGATTCAGTACACCAGCAATGCTGAGGATGCCAACTTACAGCTC  
AGAGACAGCTGCACCG  
ACTTGGAGCTCTTTGAGAATGGGACGTTGCTGTGGACACCCAAG  
TCGCTGGAGCCATTCA  
CTCTGGAGATTCTAGCAAGAAGTGCCAAGATTGGCTTGGCATCT  
GCACTCCAGCCAGGA  
CTGTGGTCTGCCATTGCAATGCAGAGAGCCAGTGTGTGACAATC  
AGACCAGCAGGGTGG  
GCAACTCCTCCCTGGAGGTGGCTGGCTGCAAGTGTGACGGGGG  
CACCTTCGGCCGCTACT  
GCGAGGGCTCCGAGGATGCCTGTGAGGAGCCGTGCTTCCCGAG  
TGTCCACTGCGTTCCTG  
GGAAGGGCTGCGAGGCCTGCCCTCCAAACCTGACTGGGGATGG  
GCGGCACTGTGCGGCTC  
TGGGGAGCTCTTCTGTGTGTCAGAACCAGTCCCTGCCCTGTGAAT  
TACTGCTACAATCAAG  
GCCACTGCTACATCTCCAGACTCTGGGCTGTGAGCCATGTGC  
ACCTGCCCCAGCCT  
TCACTGACAGCCGCTGCTTCCCTGGCTGGGAACAACCTCAGTCCA  
ACTGTCAACCTAGAAC  
TTCCCTTAAGAGTCACTCCAGCTCTTGTCTAGTGAAGAGGAAAAAT  
GCCTCCATGGCAGAAG  
TCAACGCCTCGGTGGCATAACAGACTGGGGACCCTGGACATGCG  
GGCCTTTCTCCGAACA  
GCCAAGTGAACGAATCGATTCTGCAGCACCGGCCCTCGGGAAG  
CCCCATCCAACACTGGA  
TGGTCATCTCGGAGTTCAGTACCGCCCTCGGGGCCGGTCAAT  
GACTTCTGAACAACC  
AGCTGCTGGCCGCGGTGGTGGAGGCGTCTTATACCAGTTCCA  
CGGAGGAGTGAGGAGC  
CCAGGAACGACGTGGTCTTCCAGCCATCTCCGGGGAAGACGT  
GCGCGATGTGACAGCCC  
TGAACGTGAGCACGCTGAAGGCTTACTTTCAGATGCGATGGCTAC  
AAGGGCTACGACCTGG  
TCTACAGCCCCAGAGCGGCTTACCTGCGTGTCCCCGTGCAAT  
AGGGGCTACTGTGACC  
ATGGAGGCCAGTGCCAGCACCTGCCAGTGGGCCCGCTGCAG  
CTGTGTGCTTCTCCA  
TCTACAGGCCCTGGGGCGAGCACTGTGAGCACCTGAGCATGAA  
ACTCGACGCTTCTTCC  
GCATCTTCTTGGGGCCCTGGGGCGCCTTGTGCTGGGGGTC  
GGGACGTTCTGGTTC  
TGCGCTTCTGGGGTGTCTCCGGGGCCAGGTTCTCCTATTTCTG  
AACTCAGCTGAGGCCT  
TGCCCTTAGGCTAGCCTGCAGGGATCCAATGTAACCTGTATTCAGC  
GATGACGAAATCTTA  
GCTATTGTAATACTAGAGGATCTTGTGAAGGAACCTTACTTC  
TGTGGTGTGACATAA  
TTGGACAACCTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATA  
AAATTTTAAAGTGA

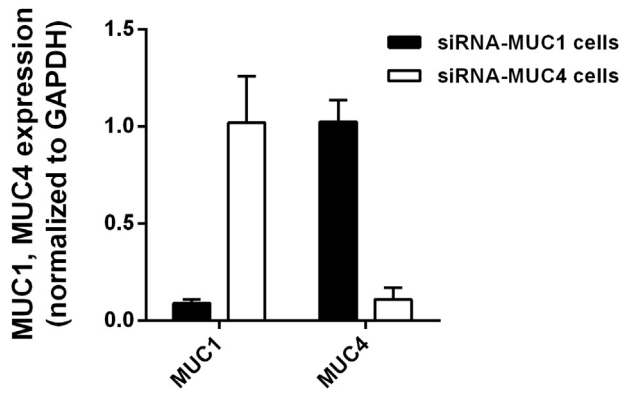
TAATGTGTAAACTACTGATTCTAATTGTTGTGATTTTAGATT  
CAACCTATGGAAC  
GATGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCTTTAATGAGGAAAACC  
TGTTTTGCTCAGAAGAA  
ATGCCATCTAGTATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCT  
ACTCTCCAAAAAAG  
AAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGC  
TAAGTTTTTTGAGTCAT  
GCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACAC  
CACAAAGGAAAAAGCT  
GCATGCTATACAAGAAAATATGGAAAAATATTCTGTAACTT  
TATAAGTAGGCATAAC  
AGTTATAATCATAACTACTGTTTTTCTTACTCCACACAGGCAT  
AGAGTGTCTGCTATT  
AATAACTATGCTCAAAAATGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGT  
AAAGGGGTTAATAAG  
GAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCATAATCAGCCATA  
CCACATTTGTAGA  
GGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACTCCCCTGAACC  
TGAAACATAAAATGAA  
TGCAATTTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTAC  
AAATAAGCAATAG  
CATCACAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAG  
TTGTGGTTTGTCCAA  
ACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCGGCTCTAGAGCTGCATT  
AATGAATCGGCCAAC  
GCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCC  
TCGCTCACTGACTCGC  
TGCGCTCGGTTCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA  
AAGGCGTAATACGGT  
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATCATGTGAGC  
AAAAGGCCAGCAAAAGG  
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGG  
CTCCGCCCCCTGACG  
AGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC  
GACAGGACTATAAAGAT  
ACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT  
CCGACCCTGCCGCTTA  
CCGATACCTGTCCGCTTCTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT  
TCTCATAGCTCACGT  
GTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTTTCGCTCCAAGCTGGGC  
TGTGTGCACGAACCC  
CCGTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTT  
GAGTCCAACCCGTAA  
GACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT  
TAGCAGAGCGAGGTATG  
TAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGC  
TACTAGAGAAGAAG  
TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA  
AGATTTGGTAGCTCTT  
GATCCGGCAACAAAGACCCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGT  
TGCAAGCAGCAGATTA  
CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCT  
ACGGGTCTGACGCTC  
AGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTA  
TCAAAAAGGATCTCA  
CCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTGTAAATCAATCTAAA  
GTATATATGAGTAAA  
CTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC  
TCAGCGATCTGTCTAT  
TTCTGTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA  
CGATACGGGAGGGCT  
TACCATCTGGCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGC  
TCACCGGCTCCAGATT  
TATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG  
TGGTCTGCAACTTTAT

CCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA  
GTAGTTCGCCAGTTA  
ATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTG  
TCACGCTCGTCTGTTG  
GTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTT  
ACATGATCCCCATGT  
TGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTC  
AGAAGTAAGTTGGCCG  
CAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA  
CTGTCATGCCATCCG  
TAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTC  
TGAGAATAGTGATGC  
GGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACC  
GCGCCACATAGCAGAA  
CTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAA  
CTCTCAAGGATCTTAC  
CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAA  
CTGATCTTCAGCATCTT  
TACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCA  
AAATGCCGCAAAAAAGG  
GAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTCT  
TTTCAATATTATTGAA  
GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAAT  
GTATTTAGAAAAATA

AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT  
GACGTCTAAGAAACCA  
TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCAGGAGG  
CCTTTCGTCTTCAAG  
AATTC.

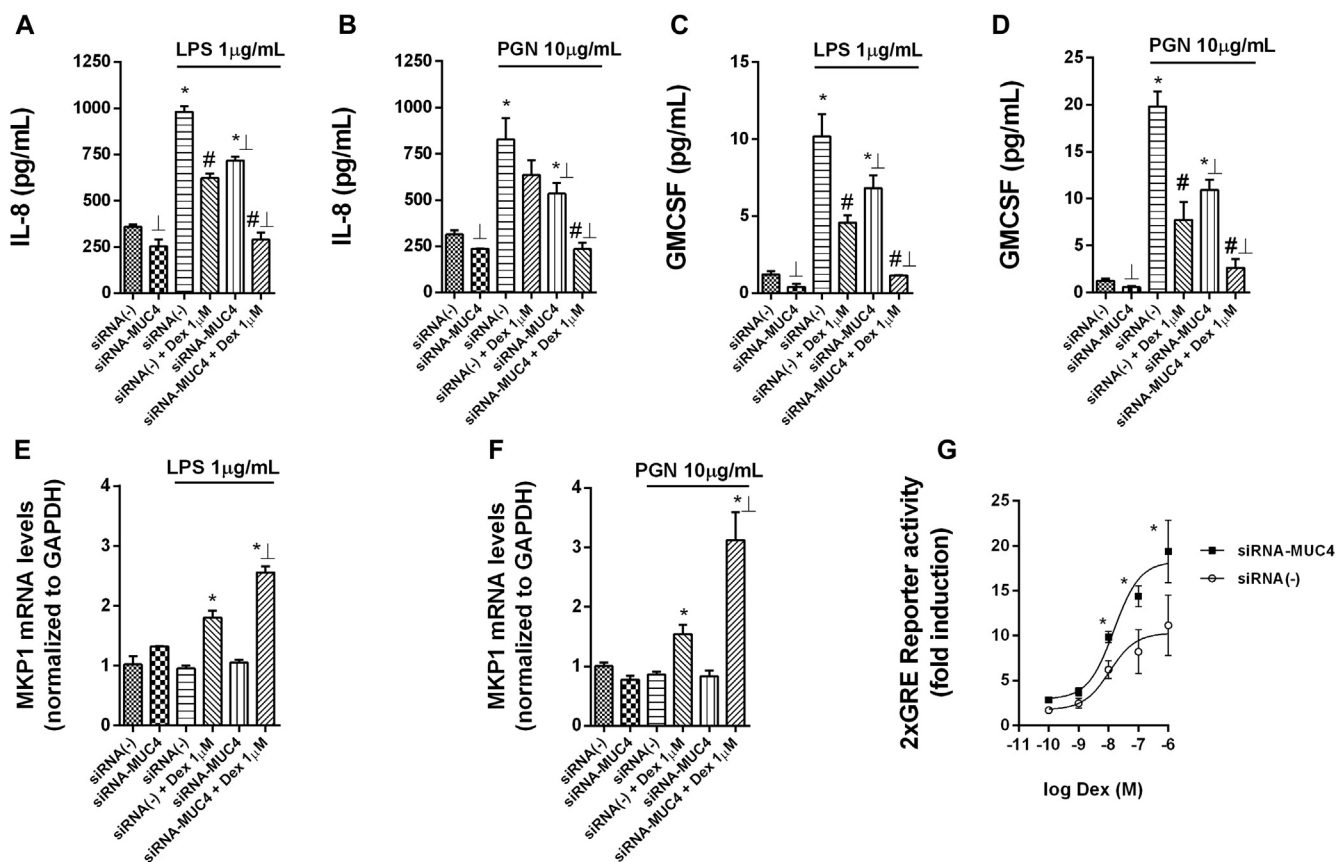
#### REFERENCES

- E1. Milara J, Peiro T, Armengot M, Frias S, Morell A, Serrano A, et al. Mucin 1 downregulation associates with corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:470-6.
- E2. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2012;50:1-12.
- E3. Casadevall J, Ventura PJ, Mullol J, Picado C. Intranasal challenge with aspirin in the diagnosis of aspirin intolerant asthma: evaluation of nasal response by acoustic rhinometry. *Thorax* 2000;55:921-4.
- E4. Milara J, Armengot M, Mata M, Morcillo EJ, Cortijo J. Role of adenylate kinase type 7 expression on cilia motility: possible link in primary ciliary dyskinesia. *Am J Rhinol Allergy* 2010;24:181-5.
- E5. Ortiz JL, Milara J, Juan G, Montesinos JL, Mata M, Ramon M, et al. Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulm Pharmacol Ther* 2010;23:222-8.



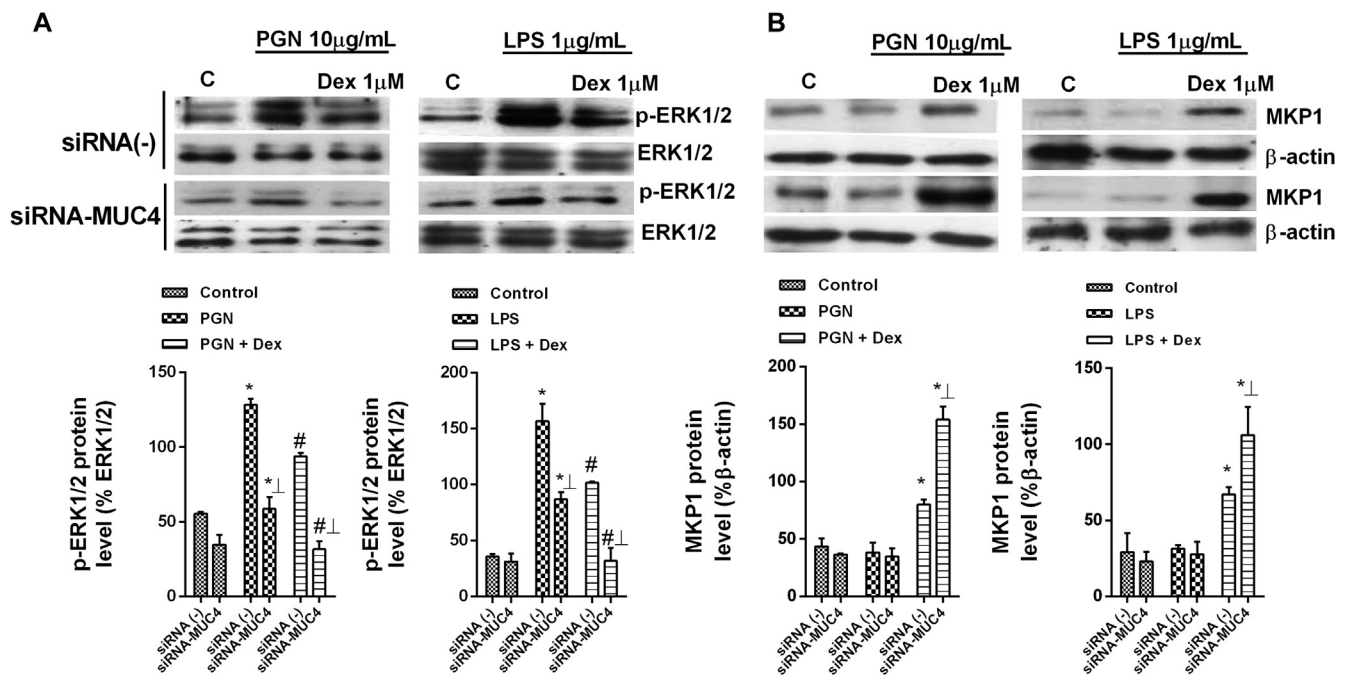
**FIG E1.** Silencing of MUC1 and MUC4 does not modify the other's expression. mRNA expression of *MUC1* or *MUC4* was measured in siRNA-MUC1 and siRNA-MUC4 BEAS-2B cells. Results are expressed as means (SEMs) of 3 independent experiments run in triplicate.

Beas2B epithelial cells



**FIG E2.** MUC4 knockdown improves the anti-inflammatory effects of dexamethasone. MUC4 knockdown by RNA interference (siRNA-MUC4) or negative control (siRNA(-)) was assayed in BEAS-2B cells. Cells were then incubated with or without 1 µmol/L dexamethasone for 2 hours before LPS (1 µg/mL) or PGN (10 µg/mL) stimulation for 24 hours. **A-D**, IL-8 and GM-CSF concentrations were measured by using ELISA. **E** and **F**, MKP1 gene expression was quantified by using real-time PCR. **G**, GRE nuclear activation by dexamethasone (0.1 nmol/L-1 µmol/L) in siRNA-MUC4 or siRNA(-) BEAS-2B cells. Results are expressed as means (SEMs) of 3 independent experiments run in triplicate. One-way ANOVA was followed by the *post hoc* Bonferroni test. Fig E2, **A-F**: \* $P < .05$  related to control release in the same siRNA group; # $P < .05$  related to the stimulus LPS or PGN;  $\perp P < .05$  related to the siRNA(-) group. Fig E2, **G**: \* $P < .05$  related to the siRNA(-) group.

## Beas2B epithelial cells



**FIG E3.** MUC4 knockdown improves the inhibitory effect of dexamethasone on ERK1/2 phosphorylation and MKP1 induction. MUC4 knockdown by means of RNA interference (siRNA-MUC4) or negative control (siRNA[-]) was assayed in BEAS-2B cells after stimulation with LPS or PGN in the presence or absence of 1  $\mu$ mol/L dexamethasone (added 2 hours before stimulus). After 20 minutes (**A**) or 4 hours (**B**) of stimulation, phospho-ERK1/2 or MKP1 protein levels, respectively, were measured by means of Western blotting. Representative Western blots are shown. Data are expressed as the densitometry of percentage ratios to  $\beta$ -actin protein levels. Results are expressed as means (SEMs) of 3 independent experiments. One-way ANOVA was followed by the *post hoc* Bonferroni test. \* $P < .05$  related to the control group. # $P < .05$  related to the stimulus.  $\perp P < .05$  related to the siRNA(-) group.

Created with SnapGene™

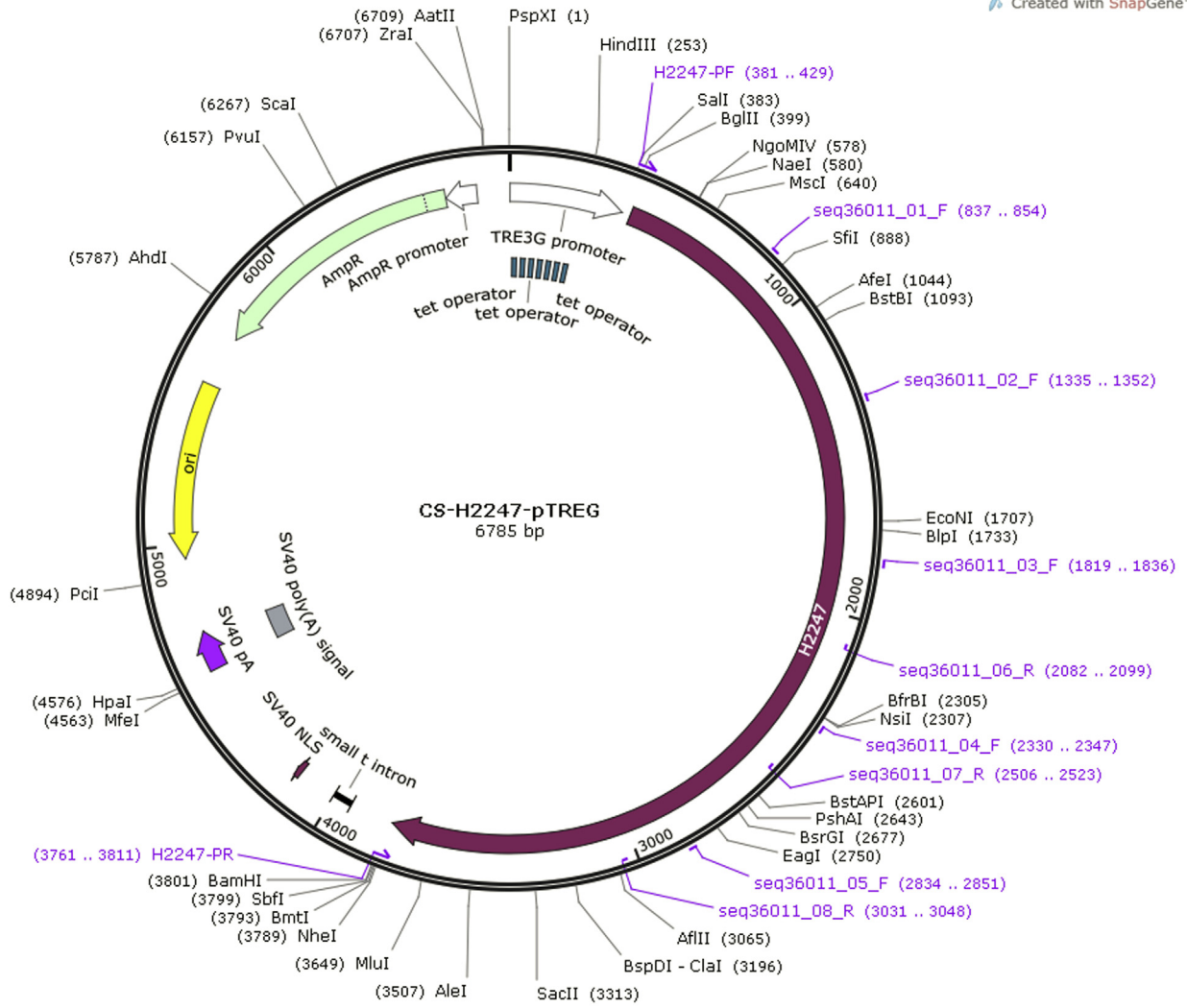
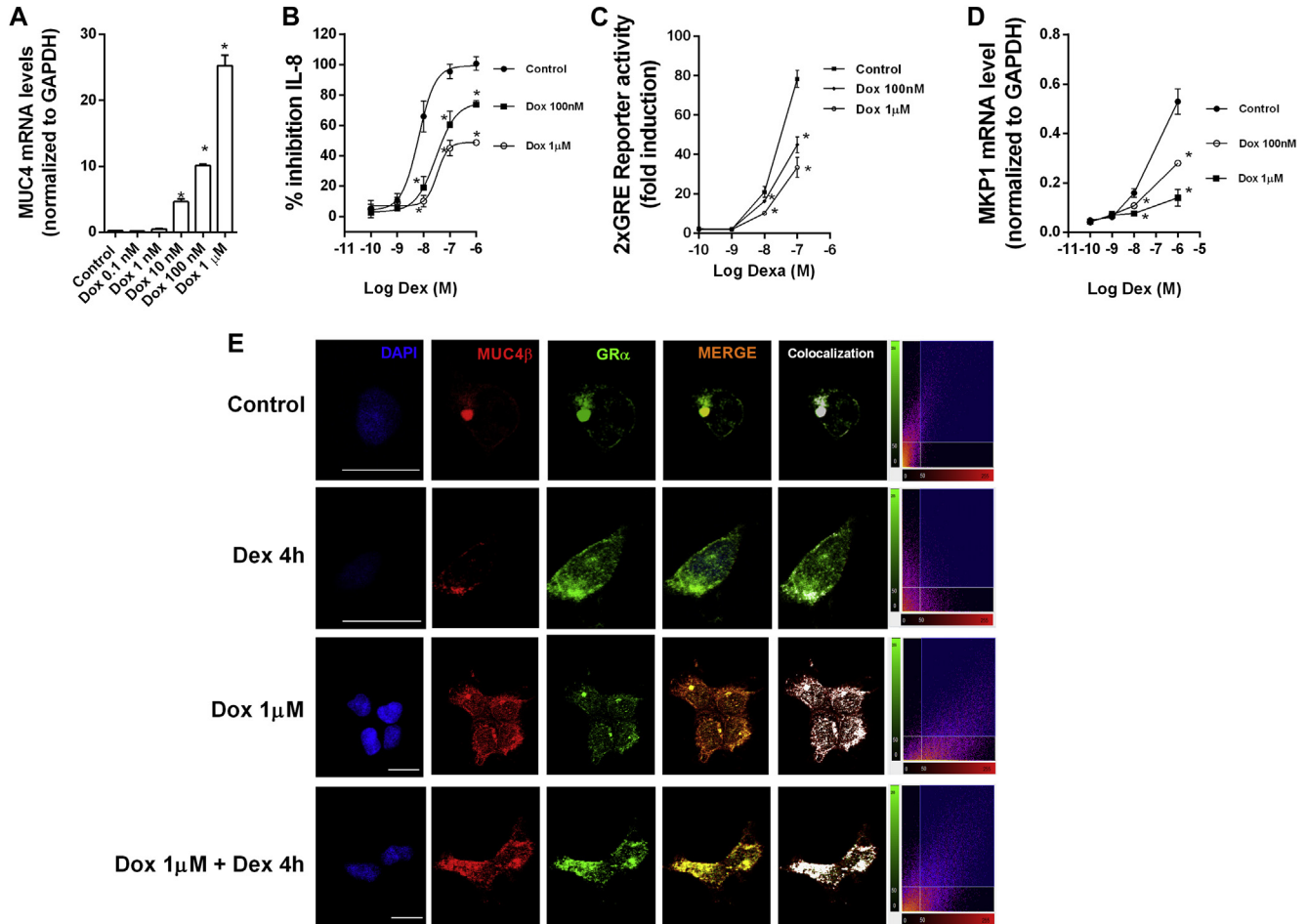


FIG E4. CS-H2247-pTREG full-length MUC4 map.



**FIG E5.** Effect of MUC4 overexpression on anti-inflammatory effects of dexamethasone in the HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line. **A**, The HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line was stimulated with 1 μmol/L doxycycline (*Dox*) for 24 hours, and *MUC4* mRNA expression was measured by using RT-PCR. **B**, The HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line was incubated with or without doxycycline (100 nmol/L, 1 μmol/L) for 24 hours, followed by addition of dexamethasone (*Dex*; 0.1 nmol/L-1 μmol/L) for 2 hours and later stimulation with LPS (1 μg/mL) for 24 hours. Supernatants were collected to measure IL-8 levels by means of ELISA, and percentage IL-8 inhibition was calculated with respect to LPS (1 μg/mL stimulus). **C**, GRE nuclear activation by dexamethasone (0.1 nmol/L-1 μmol/L) in the HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line pretreated with or without doxycycline (100 nmol/L, 1 μmol/L) for 24 hours. **D**, The HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line was incubated with or without doxycycline (100 nmol/L, 1 μmol/L) for 24 hours, followed by addition of dexamethasone (0.1 nmol/L-1 μmol/L) for 24 hours. At the end of the incubation period, MKP1 mRNA expression was measured by using RT-PCR. Results are expressed as means (SEMs) of 3 independent experiments run in triplicate. One-way ANOVA was followed by the *post hoc* Bonferroni test. Fig E5, A-D: \**P* < .05 related to control group. **E**, The HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 stable cell line was incubated with or without doxycycline (1 μmol/L) for 24 hours, followed by 1 μmol/L dexamethasone for 4 hours. Cells were fixed, permeabilized, and used for MUC4β (red) and GRα (green) immunostaining. Under basal control conditions, MUC4β colocalized with GRα in the cytoplasm in absence of dexamethasone. After dexamethasone stimulation, GRα dissociated from MUC4β and translocates to the nucleus. In HEK293/Tet3G/TRE3G-MUC4 cells preincubated with doxycycline, MUC4β colocalized with GRα throughout the cell and remained colocalized with MUC4β in cytoplasm and nucleus after dexamethasone stimulation. Colocalization was analyzed with a confocal spectral microscope (Leica TCS SP2) that generated a bidimensional cytofluorogram that selected common localized points of both antibodies (white color). 4'-6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, blue nuclei. Scale bars = 10 μm.



**TABLE E1.** Polyp scoring system

Polyp score	Polyp size
0	No polyps
1	Small polyps in the middle meatus not reaching below the inferior border of the middle concha
2	Polyps reaching below the lower border of the middle turbinate
3	Large polyps reaching the lower border of the inferior turbinate or polyps medial to the middle concha
4	Large polyps causing almost complete congestion/obstruction of the inferior meatus

**TABLE E2.** Characteristics of patients with NPs at baseline and after 15 days of oral corticosteroids

	NPwA group	NP-ATA group	NP-AIA group	NP-CR group
No.	14	12	33	22
Age (y), mean (range)	57.1 (39-71)	55 (41-68)	49.1 (23-73)	54.2 (26-71)
Sex (male/female)	9/5	5/7	9/24	10/12
Asthma, no. (%)	0 (0)	12 (100)	33 (100)	16 (72.7)
Aspirin-intolerant asthma, no. (%)	0 (0)	0 (0)	33 (100)	14 (63.6)
Atopic, no. (%)	5 (35.7)	4 (33.3)	15 (45.5)	8 (36.4)
Intranasal corticosteroid, no. (%)	12 (100)	12 (100)	33 (100)	22 (100)
Current smokers, no. (%)	3 (25)	2 (16.6)	6 (18.2)	3 (13.6)
Bilateral NP endoscopic score before treatment, mean (SEM)	5.52 (0.41)	5.72 (0.51)	5.82 (0.27)	5.58 (0.52)
Bilateral NP endoscopic score after treatment, mean (SEM)	4.01 (0.10)*	4.11 (0.22)*	4.31 (0.12)*	5.49 (0.24)†
Change in bilateral NP endoscopic score, $\Delta$ mean (SEM)	-1.51 (0.12)	-1.61 (0.30)	-1.51 (0.28)	-0.09 (0.02)†
<i>MUC4</i> mRNA tissue expression before treatment ( $2^{-\Delta Ct}$ ), mean (SEM)	0.483 (0.25)	0.570 (0.25)	0.964 (0.49)	12.83 (4.6)†
<i>MUC4</i> mRNA tissue expression after treatment ( $2^{-\Delta Ct}$ ), mean (SEM)	0.501 (0.220)	0.578 (0.47)	0.495 (0.31)	10.76 (3.12)†

\**P* < .05 versus before treatment.†*P* < .05 versus the NPwA, NP-ATA, and NP-AIA groups.

**TABLE E3.** Characteristics of patients resistant to oral corticosteroid therapy

Total no.	NPwA group (n = 20)	NP-ATA group (n = 14)	NP-AIA group (n = 47)
NP-CR group, no. (%)	6 (30)	2 (14.3)	14 (29.8)
Change in bilateral NP endoscopic score, $\Delta$ mean (SEM)	-0.11 (0.1)	-0.09 (0.04)	-0.07 (0.05)
Age (y), mean (range)	50.13 (26-58)	66.5 (60-71)	55.2 (34-68)
Sex (male/female)	4/2	1/1	4/10
Asthma, no. (%)	0 (0)	2 (100)	10 (100)
Aspirin-intolerant asthma, no. (%)	0 (0)	0 (0)	10 (100)
Atopic, no. (%)	2 (9.1)	1 (50)	5 (35.7)
Current smokers, no.	2	0	1
<i>MUC4</i> mRNA tissue expression before oral treatment ( $2^{-\Delta Ct}$ ), mean (SEM)	9.95 (2.24)	12.91 (4.31)	12.42 (5.13)
<i>MUC4</i> mRNA tissue expression after oral treatment ( $2^{-\Delta Ct}$ ), mean (SEM)	10.80 (3.61)	10.29 (5.71)	11.57 (4.19)



## ANEXO 5

Secuencia completa del plásmido

CS-H2247-pTRE3G



CTCGAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGAAGAGTTTACTCCCTATCAGTGA  
 TAGAGAACGTATGCAGACTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATAAGGAGTTTACT  
 CCCTATCAGTGATAGAGAACGTATGACCAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTAT  
 CTACAGTTTACTCCCTATCAGTGATAGAGAACGTATATCCAGTTTACTCCCTATCAGTGA  
 TAGAGAACGTATAAGCTTTAGGCGGTACGGTGGGCGCCTATAAAAGCAGAGCTCGTTTA  
 GTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGCAATCCACAACACTTTTGTCTTATAACCAACTTTCCG  
 TACCACTTCTTACCCTCGTAAAGTCGACACCCGGGGCCAGATCTgccaaccATGAAGGGGG  
 CACGCTGGAGGAGGGTCCCCTGGGTGTCCCTGAGCTGCCTGTGTCTCTGCCTCCTTCCGC  
 ATGTGGTCCCAGGAGTTTCCCTCTTCCCCTATGGGGCAGGCGCCGGGGACCTGGAGTTCCG  
 TCAGGAGGACCGTGGACTTACCTCCCCACTCTTCAAGCCGGCGACTGGCTTCCCCCTTG  
 GCTCCTCTCTCCGTGATTCCCTCTACTTACAGACAATGGCCAGATCATCTTCCCAGAGT  
 CAGACTACCAGATTTTCTCCTACCCCAACCCACTCCCAACAGGCTTACAGGCCGGGACC  
 CTGTGGCCCTGGTGGCTCCGTTCTGGGACGATGCTGACTTCTCCACTGGTCCGGGGACCA  
 CATTTTATCAGGAATACGAGACGTTCTATGGTGAACACAGCCTGCTAGTCCAGCAGGCCG  
 AGTCTTGGATTAGAAAGATGACAAACAACGGGGGCTACAAGGCCAGGTGGGCCCTAAAGG  
 TCACGTGGGTCAATGCCACGCCTATCCTGCCAGTGGACCCTCGGGAGCAACACCTACC  
 AAGCCATCCTCTCCACGGACGGGAGCAGGTCTATGCCCTGTTTCTCTACCAGAGCGGTG  
 GGATGCAGTGGGACGTGGCCAGCGCTCAGGCAACCCGGTGTCTATGGGCTTCTCTAGTG  
 GAGATGGCTATTTGAAAACAGCCACTGATGTCCCAGCCAGTGTGGGAGAGGTATCGCC  
 CTGATAGATTCCTGAATTCCAACCTCAGGCCTCCAAGGGCTGCAGTTCTACAGGCTACACC  
 GGAAGAAAGGCCAACTACCGTCTCGAGTGCCTGCAGTGGCTGAAGAGCCAGCCTCGGT  
 GGCCAGCTGGGGCTGGAACCAGGTCTCCTGCCCTTGTTCCTGGCAGCAGGGACGACGGG  
 ACTTACGATTCCAACCCGTCAGCATAGGTGCTGGGGCCTCGGCAGTAGGCAGCTGTGCA  
 GCTTACCTCTTGGCGAGGAGGCGTGTGCTGCAGCTACGGGCCCTGGGGAGAGTTTCGTG  
 AAGGCTGGCAGTGCAGCGTCTTGGCAGTTGGCCAGGAACTGGAGCCACAGAGCTGGT  
 GCTGCCCTGGAATGACAAGCCCTACCTCTGTGCCCTGTACCAGCAGAGGCCCCACG  
 TGGGCTGTGCTACATACAGGCCCCACAGCCCGCCTGGATGTTTCGGGGACCCCCACATCA  
 CCACCTTGGATGGTGTGAGTTACACCTTCAATGGGCTGGGGGACTTCTGCTGGTCCGGG  
 CCAAGACGGAACTCCTCCTTCTGCTTACAGGGCCGACCCGCCAGACTGGCTCAGCCC  
 AGGCCACCAACTTCATCGCCTTTGCGGCTCAGTACCGCTCCAGCAGCCTGGGCCCGTCA  
 CGGTCCAATGGCTCCTTGAGCCTCACGACGCAATCCGTGTCTGCTGGATAACCAGACTG  
 TGACATTTAGCCTGACCATGAAGACGGCGGAGGCCAGGAGACGTTCAACGCCACCGGAG  
 TCCTCCTGAGCCGCAACGGCTCTGAGGTCTCGGCCAGCTTCGACGGCTGGGCCACCGTCT  
 CGGTGATCGCGCTCTCCAACATCCTCCACGCCTCCGCCAGCCTCCCGCCCGAGTACCAGA  
 ACCGCACGGAGGGGCTCCTGGGGGTCTGGAATAACAATCCAGAGGACGACTTCAGGATGC  
 CCAATGGCTCCACCATTCCCCCAGGGAGCCCTGAGGAGATGCTTTTCCACTTTGGAATGA  
 CCTGGCAGATCAACGGGACAGGCCTCCTTGGCAAGAGGAATGACCAGCTGCCTTCCAAC  
 TCACCCCTGTTTTTACTCACAACCTGCAAAAAACAGCTCCTGGGCTGAACATTTGATCT  
 CCAACTGTGACGGAGATAGCTCATGCATCTATGACACCCTGGCCCTGCGCAACGCAAGCA  
 TCGGACTTACACGAGGGAAGTCAGTAAAAACTACGAGCAGGCGAACGCCACCCTCAATC  
 AGTACCCGCCCTCCATCAATGGTGGTCTGTGATTGAAGCCTACAAGGGGACAGCCACGC  
 TGATTGAGTACACCAGCAATGCTGAGGATGCCAACTTACGCTCAGAGACAGCTGCACCC  
 ACTTGGAGCTTTTGAATGGGACGTTGCTGTGGACACCCAAAGTCGCTGGAGCCATTCA  
 CTCTGGGATTTAGCAAGAAGTGCCAAGATTGGCTTGGCATCTGCACTCCAGCCCAAGCA  
 CTGTGGTCTGCCATTGCAATGCAGAGAGCCAGTGTGTTGTACAATCAGACCAGCAGGGTGG  
 GCAACTCCTCCCTGGAGGTGGCTGGCTGCAAGTGTGACGGGGGACCTTCCGGCCGCTACT  
 GCGAGGGCTCCGAGGATGCCTGTGAGGAGCCGTGCTTCCCGAGTGTCCACTGCGTTCTG  
 GGAAGGGCTGCGAGGCCTGCCCTCCAAACCTGACTGGGGATGGGCGGCACTGTGCGGCTC  
 TGGGGAGCTCTTCTGTGTGAGAACCAGTCTGCCCTGTGAATTAAGTACTGCTACAATCAAG  
 GCCACTGCTACATCTCCAGACTCTGGGCTGTGAGCCCATGTGCACCTGCCCCCAGCCT  
 TCACTGACAGCCGCTGCTTCTGGCTGGGAACAACCTTCACTCCAACCTGTCAACCTAGAAC  
 TTCCCTTAAGAGTCATCCAGCTCTTGGCTCAGTGAAGAGGAAAATGCCTCCATGGCAGAAG  
 TCAACGCCTCGGTGGCATAACAGACTGGGGACCCTGGACATGCGGGCCTTTCTCCGCAACA  
 GCCAAGTGAACGAATCGATTCTGCAGCACCGGCCTCGGGAAGCCCCATCCAACACTGGA  
 TGGTCATCTCGGAGTTCCAGTACCGCCCTCGGGGCCCCGGTCAATTGACTTCTGAACAACC  
 AGCTGCTGGCCGCGGTGGTGGAGGCGTTCTTATACCACGTTCCACGGAGGAGTGAGGAGC  
 CCAGGAACGACGTGGTCTTCCAGCCCATCTCCGGGGAAGACGTGCGCGATGTGACAGCCC  
 TGAACGTGAGCACGCTGAAGGCTTACTTCAAGTGCAGTGGCTACAAGGGCTACGACCTGG  
 TCTACAGCCCCCAGAGCGGCTTACCTGCGTGTCCCCGTGCAGTAGGGGCTACTGTGACC  
 ATGGAGGCCAGTGCCAGCACCTGCCAGTGGGCCCGCTGCAGCTGTGTGTCTTCTCCA  
 TCTACACGGCCTGGGGCAGCACTGTGAGCACCTGAGCATGAAACTCGACGCGTTCTTCG

GCATCTTCTTTGGGGCCCTGGGCGGCCTCTTGCTGCTGGGGGTCGGGACGTTTCGTGGTCC  
 TCGCCTTCTGGGGTTGCTCCGGGGCCAGGTTCTCCTATTTCTGAACTCAGCTGAGGCCT  
 TGCCTTAGGCTAGCCTGCAGGGATCCAATGTAAGTGTATTCAGCGATGACGAAATTTCTTA  
 GCTATTGTAATACTCTAGAGGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAA  
 TTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAATATAAAATTTTTAAGTGTA  
 TAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAC  
 GATGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCTTAAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAA  
 ATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAAG  
 AAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCAT  
 GCTGTGTTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCT  
 GCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATATTCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAAC  
 AGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATT  
 AATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAG  
 GAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGA  
 GGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAA  
 TGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG  
 CATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAA  
 ACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCGGCTCTAGAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC  
 GCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGC  
 TCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT  
 TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGG  
 CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG  
 AGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT  
 ACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA  
 CCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT  
 GTAGGATCTCAGTTCCGTTGAGTGGTTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCC  
 CCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAA  
 GACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG  
 TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAG  
 TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT  
 GATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTA  
 CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTC  
 AGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA  
 CCTAGATCCTTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAA  
 CTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAT  
 TTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT  
 TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATT  
 TATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTAT  
 CCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTA  
 ATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTT  
 GTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGT  
 TGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCG  
 CAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATTTCTTTACTGTCCATGCCATCCG  
 TAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCAATTTGAGAATAGTGTATGC  
 GCGGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAA  
 CTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTAC  
 CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTT  
 TACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGG  
 GAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAA  
 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATA  
 AACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCA  
 TTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAG

AATTC