

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
DOCTORADO EN MEDICINA**



**EXPRESIÓN DE MUCINAS EN POLIPOSIS NASAL:
CORRELACIONES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS.**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

M^a SOLEDAD FRÍAS MOYA-ANGELER

DIRIGIDA POR:

PROF. D. MIGUEL ARMENGOT CARCELLER

PROF. D. JULIO CORTIJO GIMENO

PROF. D. JAVIER MILARA PAYÁ

VALENCIA, JULIO 2018.

EXPRESIÓN DE MUCINAS EN POLIPOSIS NASAL: CORRELACIONES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS.

Trabajo presentado por Doña M Soledad Frías Moya-Angeler para optar al grado de doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia.



PROF. MIGUEL ARMENGOT CARCELLER
Profesor Titular de Otorrinolaringología
Departamento de Cirugía
Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. M^a Soledad Frías Moya-Angeler, con el título:

**“EXPRESIÓN DE MUCINAS EN POLIPOSIS NASAL: CORRELACIONES CLÍNICAS E
HISTOPATOLÓGICAS”**

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 Valencia, Junio 2018.

Prof. Miguel Armengot Carceller



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

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. M^a Soledad Frías Moya-Angeler, con el título:

**“EXPRESIÓN DE MUCINAS EN POLIPOSIS NASAL: CORRELACIONES CLÍNICAS E
HISTOPATOLÓGICAS”**

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 Valencia, Junio 2018.

Prof. Julio Cortijo Gimeno

PROF. D. JAVIER MILARA PAYÁ
Doctor por la Universidad de Valencia
Especialista en farmacia hospitalaria
Consortio Hospital General Universitario de Valencia

Certifica:

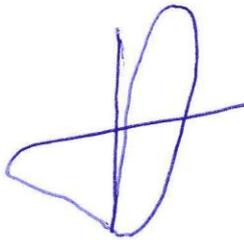
Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. M^a Soledad Frías Moya-Angeler, con el título:

**“EXPRESIÓN DE MUCINAS EN POLIPOSIS NASAL: CORRELACIONES CLÍNICAS E
HISTOPATOLÓGICAS”**

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 Valencia, Junio 2018.



Dr. Javier Milara Payá.

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- “BECA FIS” (Expediente: PI11/02618). Ministerio de Ciencia e Innovación. Gobierno de España.
- “Ayuda del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias CIBERES” (Grupo CB06/06/0027). Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e innovación. Gobierno de España.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero manifestar mi reconocimiento y gratitud a los Profesores Miguel Armengot Carceller, Julio Cortijo Gimeno y Javier Milara Payá, por la experta dirección de este trabajo. Esta tesis no podría haberla realizado sin su ayuda y consejo en tantos momentos de dudas y falta de ánimo. Muy especialmente, estoy agradecida a la atención prestada por el Profesor Milara.

Un punto y aparte supone el Profesor Armengot, artífice de casi todo lo que soy y sé como Otorrinolaringóloga, además de haber sido un apoyo en cualquier ámbito de mi vida desde que llegué a Valencia allá por 2003.

Quiero manifestar expresamente mi agradecimiento a la Fundación Investigación Hospital General Universitario de Valencia, a todo el personal, pero en especial a la Doctora Teresa Peiró, por su ayuda para entender y poder realizar todos los procesos técnicos llevados a cabo en este estudio.

También quiero dar las gracias al personal de la biblioteca y hemeroteca del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, por dejarme “bucear” en las historias clínicas de los pacientes y siempre estar dispuestas a prestarme ayuda.

A mis padres, Soledad y Pepe, mi ejemplo a seguir en la vida, que me han dado todo lo que soy. Las palabras se quedan cortas para daros las gracias.

A mis hermanos, Jose y Lourdes, y sus familias, que me ayudan a superar los momentos más bajos de ánimo y hacen los momentos felices aún más alegres.

Y por último, a mi familia. Aurora, mi mujer, mi soporte diario, el ánimo que nunca falla y mi informática particular. Gracias por hacer todo tan fácil. Sin ti habría tirado la toalla hace mucho tiempo; esta tesis es parte tuya. Lope, la luz que ilumina mis días, la razón por la que intentar siempre ser mejor.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE.

1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	17
1.1. Poliposis nasosinusal	19
1.1.1. Definición	19
1.1.2. Historia	21
1.1.3. Fisiopatología	22
1.1.3.1. Concepto de poliposis nasosinusal	23
1.1.3.2. Mecanismos fisiopatológicos	24
1.1.4. Epidemiología	31
1.1.4.1. Estudios de Prevalencia de la poliposis nasal	31
1.1.4.2. Factores asociados a la poliposis nasal	33
1.1.5. Clínica	37
1.1.6. Diagnóstico	38
1.1.6.1. Exploraciones complementarias	38
1.1.7. Tratamiento	41
1.1.7.1. Corticoides intranasales	41
1.1.7.2. Corticoides sistémicos	42
1.1.7.3. Antibioticoterapia	42
1.1.7.4. Antihistamínicos	42
1.1.7.5. Antileucotrienos	42
1.1.7.6. Tratamiento quirúrgico	43
1.2. Mucinas	45
1.3. Corticorresistencia	47
2. <u>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</u>	49
2.1. Hipótesis	51
2.2. Objetivos	52
3. <u>METODOLOGÍA</u>	53
3.1. Material	55
3.1.1. Pacientes	55
3.2. Método	58
3.2.1. Cultivos celulares	58
3.2.1.1. Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales de PN	58

3.2.2. Histología	59
3.2.2.1. Inmunohistoquímica	59
3.2.2.2. Inmunofluorescencia	61
3.2.3. Estudio de la expresión génica: Técnicas de biología molecular	63
3.2.3.1. Extracción de ARN total y cuantificación	63
3.2.3.2. Retrotranscripción inversa	63
3.2.3.3. RT-PCR a tiempo real	64
3.2.3.4. Experimentos ARNip	68
3.2.4. Estudio de la expresión proteica. Western Blot	68
3.2.5. Inmunoprecipitación	69
3.2.6. Estimulación <i>In Vitro</i>	70
3.2.7. Ensayos ELISA para IL-8 y GM-CSF	71
3.2.8. Análisis estadístico	71
4. <u>RESULTADOS</u>	72
4.1. La expresión y distribución de TLRs y MUC1 están alteradas en las muestras de pólipos nasales de pacientes corticorresistentes	74
4.2. Análisis de la expresión y distribución de marcadores de corticorresistencia en tejido de pólipo nasal	79
4.3. Análisis de los efectos de la dexametasona en las células epiteliales de pólipo nasal	84
4.4. Análisis de los efectos de la supresión MUC1 en las señales de activación celular mediadas por corticoides	88
4.5. Co-Expresión de MUC1-CT y GR α	93
5. <u>DISCUSIÓN</u>	97
6. <u>CONCLUSIONES</u>	105
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	108
8. <u>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</u>	117
9. <u>ANEXO</u>	123

1- INTRODUCCIÓN GENERAL.

1.1-POLIPOSIS NASOSINUSAL

1.1.1. DEFINICIÓN.

La poliposis nasosinusal (PN) es una enfermedad inflamatoria en la que tiene lugar una degeneración edematosa multifocal y bilateral de la mucosa de las masas laterales del etmoides. Esta degeneración provoca la formación de lesiones polipoides lisas, gelatinosas, translúcidas y piriformes, que progresivamente van ocupando los meatos etmoidales hacia las fosas nasales. Desde este punto de vista, sería más preciso emplear la denominación de poliposis etmoidonasal. 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. (1)

Desde un punto de vista clínico, el documento EPOS 2012 (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps) define la rinosinusitis (y en ese concepto incluye a la poliposis nasal) 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 nasales o bien secreción nasal (rinorrea anterior/posterior):

- dolor/sensación de presión facial;
- pérdida total o parcial del sentido del olfato;

Y, además,

- Signos endoscópicos de:
 - pólipos nasales, y/o
 - secreción mucopurulenta principalmente en el meato medio, y/o edema/obstrucción mucosa principalmente en el meato medio;
- y/o
- Cambios en la Tomografía Computerizada (TC):
 - cambios en la mucosa del complejo osteomeatal y/o de los senos paranasales.

Según la duración del cuadro se puede diferenciar:

- **Rinosinusitis aguda**

Clínica de menos de 12 semanas de evolución.

Resolución completa de los síntomas.

- **Rinosinusitis crónica**

Clínica de más de 12 semanas de evolución.

Sin resolución completa de los síntomas.

La rinosinusitis crónica (RSC) también puede cursar con exacerbaciones (2).



Figura 1. Pólipo nasal. Visión endoscópica de pólipo nasal en el meato medio de la fosa nasal derecha. EL pólipo se aprecia como una masa blanquecina. Imagen tomada de consulta, con la autorización explícita del paciente.

1.1.2. HISTORIA.

Hipócrates, alrededor del año 400 a. C. hizo la primera descripción precisa de la enfermedad. Los llamó polypous (poly- por muchos y -pous por pediculados) y los clasificó en duros y blandos.

La técnica quirúrgica propuesta por el propio Hipócrates consistía en rodear el pedículo del pólipo con un lazo y traccionar de él, eliminándolo desde su origen, y permaneció inalterada hasta el siglo XIX.

En el siglo II d. C, Galeno refiere la exéresis de pólipos con una lanceta pequeña y estrecha, completando el procedimiento con una cureta, con el fin de eliminar la base de implantación.

En el siglo VI d. C, Aetius de Amida considera que los pólipos están causados por un humor denso y pegajoso que desciende de la cabeza. Más adelante, Ioannes Actuarius (siglo XIV d. C.) añade a las descripciones previas el concepto de obstrucción en el drenaje de las secreciones nasosinusales.

En 1882, E. Zuckerlandl, en un estudio sobre 39 autopsias, describió de manera precisa la localización y los cambios histológicos similares a los de una inflamación catarral. En 1885, Woakes describe como causa de los pólipos una etmoiditis necrosante infecciosa; por lo tanto el tratamiento pasó a ser la etmoidectomía (extracción rutinaria del etmoides) por vía externa. En 1925; Bourgeois sugirió una etiología alérgica que fue ampliamente aceptada y difundida durante el resto del siglo XX.

La aparición de los corticoides reafirmó la teoría de la inflamación, y cambiaron las expectativas de tratamiento. Inicialmente se usaban por vía oral o de forma depot intramuscular. También se usaron en forma depot localizada en el pólipo, lo que llegó a causar ceguera en varios casos. Finalmente comenzaron a utilizarse de forma tópica nasal en 1967, obteniéndose buenos resultados y demostrándose el descenso en la incidencia de recurrencias utilizándose tras la cirugía.

Durante la última década se ha introducido con fuerza el tratamiento corticoideo tópico nasal y sistémico en tandas cortas, dejando la cirugía como último recurso. (1)

1.1.3. FISIOPATOLOGÍA.

Las fosas nasales y los senos paranasales constituyen un conjunto de espacios aéreos situado en la parte anterior del cráneo o cráneo respiratorio. Los senos paranasales se comunican con la cavidad nasal a través de pequeñas aberturas. La cavidad nasal y los senos adyacentes están recubiertos por un epitelio columnar ciliado pseudoestratificado que contiene células caliciformes y glándulas; estas estructuras producen secreciones que mantienen la humedad en las fosas nasales y forman una capa de moco que fluye constantemente. Esta capa de moco puede retener a las partículas y a las bacterias, inactivarlas por la acción de las enzimas que contiene (p. ej. la lisozima y la lactoferrina), y transportarlas hacia el esófago. Los cilios desempeñan un papel importante en el transporte del moco. Normalmente, el vaciado de todos los senos paranasales depende de este transporte mucociliar; sin embargo, las secreciones procedentes de grandes áreas sinusales tienen que pasar hacia la cavidad nasal a través de pequeñas aberturas u ostiums.(2)

El complejo osteomeatal desempeña un papel fundamental en la patogenia de las rinosinusitis. Esta estructura es una unidad funcional que comprende los orificios de drenaje de los senos maxilares, las celdas etmoidales anteriores, el seno frontal y sus orificios de drenaje, el infundíbulo etmoidal, el hiato etmoideo, y el meato medio. La cuestión clave es el mantenimiento de la permeabilidad de los orificios de drenaje, ya que, en concreto, ésta afecta significativamente a la composición y a la secreción del moco. De hecho, si los orificios de drenaje están abiertos, el transporte mucociliar puede eliminar fácilmente las sustancias particuladas y las bacterias. Los problemas surgen cuando el orificio es demasiado pequeño para la cantidad de moco presente, cuando aumenta la producción de moco (p. ej., en el curso de una infección del tracto respiratorio superior) y cuando existen alteraciones de la función ciliar, ya que entonces se produce una estasis de las secreciones y cesa la eliminación de bacterias. En estas circunstancias, se inflama la mucosa y empeoran los procesos inflamatorios ya existentes y disminuye la ventilación, con lo que la disfunción ciliar se hace aun más pronunciada. Este círculo vicioso es difícil de romper, y si la situación persiste puede desembocar en una RSC. En la rinosinusitis crónica la oclusión de los orificios de drenaje no desempeña un papel etiopatogénico tan importante como en la aguda, siendo más bien una enfermedad de la propia mucosa nasosinusal.(2)

1.1.3.1. CONCEPTO DE POLIPOSIS NASOSINUSAL.

La rinosinusitis crónica con o sin poliposis nasal se suele englobar dentro de una única entidad patológica, ya que parece imposible diferenciar claramente ambos cuadros. En consecuencia, en la actualidad, se considera a la PN una forma clínica bilateral e idiopática de rinosinusitis crónica, grupo heterogéneo de enfermedades con diferentes etiologías y distintos mecanismos etiopatogénicos. En algunos casos la rinosinusitis crónica y la poliposis nasosinusal pueden representar estadios diferentes de la misma enfermedad.(2)

La rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal (RSCcPN) se define como un proceso inflamatorio crónico de la mucosa de las fosas nasales y los senos paranasales, de etiología aún desconocida, en el que parecen desempeñar un papel importante los eosinófilos, y que conduce a la formación de pólipos edematosos bilaterales benignos desde los senos paranasales, fundamentalmente etmoidales, hacia la cavidad nasal. (3)

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 pseudoestratificado respiratorio 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, pero también se observan neutrófilos, mastocitos, células plasmáticas, linfocitos, monocitos, y fibroblastos. El que la Interleuquina 5 (IL-5) sea la citocina que predomina en la poliposis nasal indica que los eosinófilos están activados y sobreviven durante más tiempo.

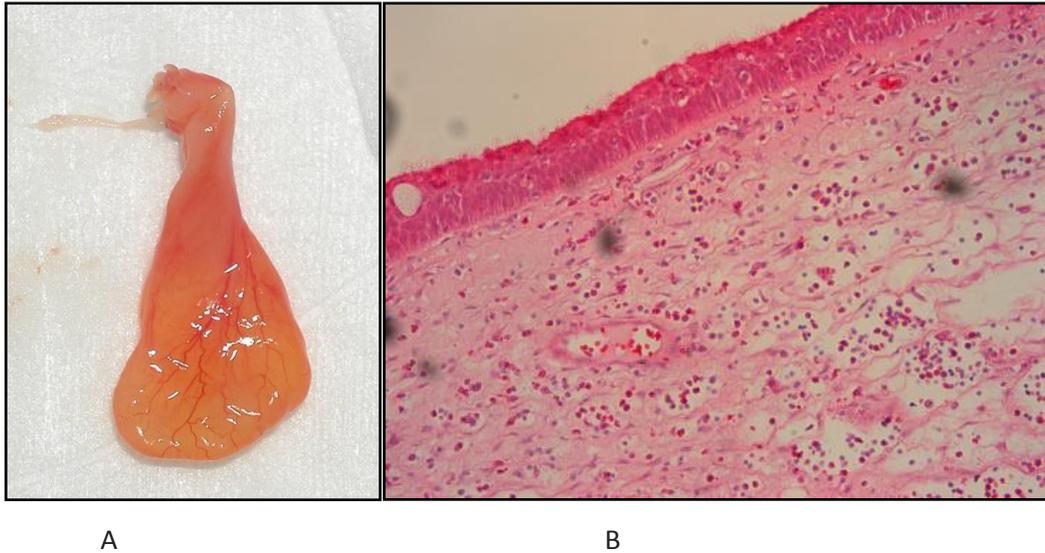


Figura 2: Imagen macroscópica (A) e histopatología del pólipo nasal (B): Corte histológico de un pólipo nasal, con tinción de Hematoxilina-eosina. En él se aprecia el infiltrado eosinófilo presente en el estroma del pólipo, epitelio respiratorio en superficie y membrana basal engrosada.

Se desconoce el motivo por el que algunos pacientes presentan pólipos y otros no. Se ha demostrado la existencia de una relación en los pacientes con la "triada de Samter o de Widal", que cursa con asma, intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), y pólipos nasales, también conocida como ASA Triada. No obstante, no todos los pacientes afectados por intolerancia a los AINEs presentan pólipos nasales, ni viceversa. La prevalencia de los pólipos nasales es del 4% en la población general (5), del 7-15% en los pacientes asmáticos, y del 36-60% en los que presentan intolerancia a los AINEs (6). Durante mucho tiempo, se ha asumido que la alergia predisponía a la poliposis nasal, ya que en ambas situaciones se observa rinorrea acuosa y edema de mucosa, y los eosinófilos son abundantes. No obstante, los datos epidemiológicos no respaldan esta correlación: solo en un 0,5-1,5% de los pacientes con pruebas cutáneas positivas frente a los alérgenos habituales se detecta la presencia de pólipos (7).

1.1.3.2. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS.

La poliposis nasosinusal es una enfermedad inflamatoria de etiología desconocida con una fisiopatología multifactorial en la que probablemente varios factores pueden actuar en un mismo paciente. En los últimos años se han producido un gran avance en el estudio de los diferentes mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo y persistencia del crecimiento polipoideo de la mucosa nasosinusal; mecanismos que serán analizados a continuación, destacando los más importantes para esta tesis.

A. Patrón de expresión de mucinas.

El aclaramiento mucociliar y la permeabilidad del complejo osteomeatal son los dos principales factores que permiten un funcionamiento fisiológico de los senos paranasales. En la rinosinusitis crónica y la poliposis nasosinusal existe una hipersecreción e hiperviscosidad mucosa que dificultan el aclaramiento mucociliar junto a una inflamación de la mucosa y cambios histológicos que tienden a la cronicidad.

Las mucinas (MUC) son el componente principal del moco y el que le confiere sus propiedades viscoelásticas. La poliposis nasosinusal, la rinosinusitis crónica, fibrosis quística y el asma presentan patrones alterados de expresión de mucinas diferentes. El estudio de estos patrones alterados nos puede ayudar a realizar un diagnóstico diferencial. Así en la poliposis existe un aumento en la expresión de mucina-1 (MUC1), mucina-2 (MUC2), mucina-5A (MUC5A) y mucina-8 (MUC8); mientras que en la rinosinusitis sin PN existe un aumento en la expresión de mucina-5B (MUC5B) y MUC8.(8)

B. Inflamación y mediadores inflamatorios.

El estudio de los mediadores inflamatorios es fundamental para mejorar el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la poliposis y para poder diferenciar entre rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal, fibrosis quística con poliposis y rinosinusitis crónica sin poliposis.

El principal factor responsable de la formación del pólipo es la inflamación eosinofílica persistente de la mucosa nasosinusal. Otro de los hallazgos característicos de la PN es la presencia de abundantes linfocitos T de memoria activados (CD3+CD45RO+) con un fenotipo mixto Th1/Th2 con producción de IL-5 (Th2) e IFN- β (Th1)(9); y una reducción en la expresión de FOXP3 (factor de transmisión de señales relacionado con las células Treg) y TGF- β 1 (factor beta1 transformador del crecimiento), citocina producida por las células Treg e implicada en la remodelación bronquial, lo que se traduce en una disminución de la actividad de las células T reguladoras (Treg) que conduce a un aumento en la expresión de T-bet (factor de transmisión de señales relacionado con las respuestas Th1) y GATA-3 (factor de transmisión de señales relacionado con las respuestas Th2). Por el contrario, la RSC sin PN se caracteriza por presentar elevados niveles de TGF- β 1 e IFN- β (citocina producida por las células Th1).

La IL-5 es fundamental, además, en el reclutamiento, activación y maduración del eosinófilo, así como en la inhibición de su apoptosis. La eotaxina y el regulador de la activación de las células T expresadas y secretadas (RANTES) son claves también en el reclutamiento y activación de los eosinófilos. Los eosinófilos activados liberan mediadores proinflamatorios

vasoactivos y citotóxicos como la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la proteína básica principal (MBP), la peroxidasa del eosinófilo (EPO) y la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN). El grado de inflamación eosinofílica se correlaciona intensamente con los niveles de ECP y de IL-5. La forma clínica de poliposis nasosinusal con niveles más elevados de ECP es la poliposis con asma no alérgica e intolerancia cruzada a los AINEs.

La rinosinusitis crónica con poliposis presenta un patrón inflamatorio Th2 con concentraciones elevadas de IL-5, eotaxina, ECP e IgE, mientras que la rinosinusitis crónica sin poliposis presenta un patrón inflamatorio Th1 con niveles elevados de interferón gamma (IFN- γ) y de TGF- α .(2)

C. Remodelado tisular.

Uno de los mecanismos etiopatogénicos propuestos es la existencia de una alteración de las funciones de remodelación tisular, lo que provocaría una defectuosa reparación-fibrosis de la matriz extracelular (MEC). La citocina TGF- α es un importante factor inmunomodulador y de inicio del proceso de remodelación, que interviene en la formación de la MEC favoreciendo la producción y depósito de proteínas extracelulares, e inhibiendo la síntesis de proteinasas como las metaloproteinasas de la matriz (MMP), que actúan degradando la MEC. El TGF- α también desempeña funciones reguladoras, suprimiendo la activación de células T y la síntesis de anticuerpos por las células B.

Los pacientes con rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal presentan concentraciones bajas de TGF- α 1 en la mucosa, mientras que en los sujetos con rinosinusitis sin poliposis la concentración de TGF- α 1 es superior a la de los controles sanos. Esta disminución del TGF- α conduce a una disminución de las funciones T reguladoras y a una disminución de la producción de componentes de la MEC.(4)

D. Disfunción del epitelio nasal.

Estudios recientes sugieren la hipótesis de que la RSC con y sin PN puede ser secundaria, al menos en parte, de una disfunción del epitelio nasal en su papel como mediador y regulador de la respuesta inmune e inflamatoria. Estos estudios han demostrado que las células epiteliales intervienen en la regulación de las células dendríticas, células T y células B, además de realizar funciones barrera frente a agentes externos e intervenir en la inmunidad innata.(4)

E. Alergia.

La incidencia de atopia en pacientes con PN según los diferentes estudios puede abarcar desde un 10% a un 96,5%. Aunque los pacientes presentan con frecuencia pruebas

intraepidérmicas (prick-test) positivas frente a aeroalergenos, el papel potencial de la hipersensibilidad mediada por IgE en la formación de la PN es tema de discusión en la actualidad. Algunos autores han sugerido la existencia de una respuesta alérgica local con presencia de IgE específica solo en la mucosa y no en sangre periférica.

A pesar de no existir pruebas de la existencia de una relación causal clara entre la alergia y PN, la alergia respiratoria (rinitis y/o asma) en estos pacientes es un factor que en numerosas ocasiones se asocia a formas graves de la PN y contribuye al agravamiento de la calidad de vida de los pacientes; por lo que necesita ser correctamente diagnosticado y tratado para mejorar la probabilidad de éxito del tratamiento de la PN.(4)

F. Inmunidad innata.

Uno de los mecanismos fisiopatológicos propuestos más recientemente es la existencia de un déficit de la inmunidad innata que podrían favorecer la colonización microbiana y el desarrollo de una respuesta inmune anormal. Los principales componentes de la inmunidad innata incluyen: los péptidos antimicrobianos humanos (AMP), como las defensinas y las catelicidinas, los receptores del reconocimiento de patógenos, como los receptores de tipo TOLL (*toll-like receptors*; TLR), y la vía alternativa del complemento. Los pacientes con RSC con PN presentan una menor expresión de genes de la inmunidad innata (incluidos *TLR-9* y *beta defensina humana 2*) que los pacientes con RSC sin PN y los controles sanos.(4)

El conocimiento de las funciones defensivas de los AMP, que actúan atacando estructuras esenciales del microorganismo que le son muy difíciles de sustituir, abre el camino para la aplicación de nuevos tratamientos con un menor desarrollo de resistencia que el que presentan los antibióticos químicos.

G. IgE y *Staphylococcus aureus*.

El *Staphylococcus aureus* coloniza frecuentemente la mucosa nasal del meato medio de los pacientes con PN y puede liberar superantígenos que interfieren con las células T y B locales (10). Las tasas de colonización más altas se suelen detectar en pacientes con PN y asma o PN e intolerancia a los AINEs(11). Un hallazgo característico de la PN es la síntesis local de IgE multiclonal e IgE específica frente a enterotoxinas del *Staphylococcus aureus* (sIgE-SAE), que se relacionan con el grado de inflamación eosinofílica(12).

Las SAE clásicas pueden actuar como alérgenos convencionales y como superantígenos, especialmente la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST)-1 y la proteína estafilocócica A (SPA). Los superantígenos son capaces de activar directamente a la célula T uniéndose a la cadena variable beta del receptor de la célula T, provocando una fuerte respuesta primaria con

activación policlonal de linfocitos e hipergammaglobulinemia muy superior a la producida por los antígenos convencionales.

Los pacientes con PN con IgE-SAE presentan formas más graves de la enfermedad, tanto a nivel local como sistémico, con una mayor inflamación eosinofílica y una mayor asociación a asma y/o intolerancia a AINEs(12). Ello es debido a que las SAE amplifican la inflamación eosinofílica en la RSC con PN y pueden disminuir el efecto terapéutico de los corticoides, alterando la sensibilidad y expresión del receptor beta de los glucocorticoides. Todo ello abre el campo para nuevos enfoques terapéuticos, aún en fase de prueba, principalmente en las formas graves de PN asociada a asma bronquial y en la PN recurrente. Entre las nuevas opciones terapéuticas cabría destacar el tratamiento con anti-IL-5, anti-IgE y tratamientos antibióticos; estos últimos han demostrado su eficacia en la dermatitis atópica grave con colonización estafilocócica(4).

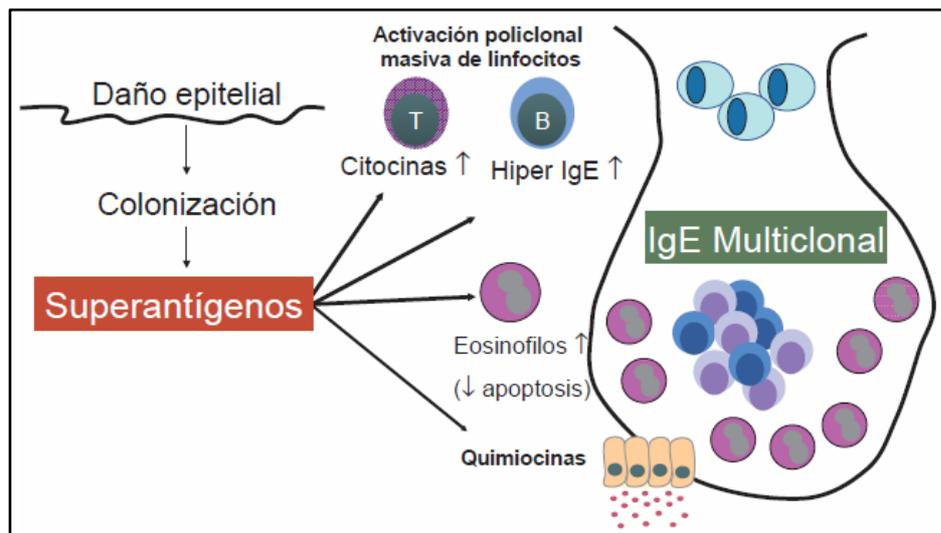


Figura 3. Papel de los superantígenos del *Staphylococcus aureus* en la PN. (Figura tomada de Proyecto Polina (4)). La liberación de superantígenos interfiere con las células T y B locales. En la PN ocurre un aumento en la síntesis local de IgE multiclonal e IgE específica frente a enterotoxinas del *Staphylococcus aureus* que se relaciona con el grado de inflamación eosinofílica.

H. Biofilms.

Los biofilms son complejas organizaciones de bacterias que se desarrollan agrupadas en una matriz de exopolisacáridos adherida a una superficie viva o inerte. El biofilm aísla a las bacterias del medio en el que viven, facilita la comunicación bacteria a bacteria, reduce la accesibilidad del sistema inmunitario e impide la fagocitosis. Además, las bacterias del biofilm son extraordinariamente resistentes a los antibióticos, dado que éstos sólo alcanzan las capas más externas del mismo. Están implicados en numerosas infecciones humanas y existen evidencias progresivas de su papel en la RSC(13).

Muchas bacterias patógenas habituales colonizan la superficie mucosa lesionada de la RSC y la PN formando biofilms. No son un agente etiológico primario en la PN, pero sí un factor que contribuye de manera significativa añadiendo más inflamación. Clínicamente los casos de PN con presencia de biofilms se correlacionan con formas más graves de la enfermedad y con peor evolución postoperatoria(14).

I. Hongos.

El papel de la infección fúngica en la PN es controvertido dado que su demostración es difícil debido principalmente a la ubicuidad de las esporas. Se basa en la similitud histológica entre la aspergilosis broncopulmonar alérgica y la rinosinusitis fúngica alérgica. La rinosinusitis de los senos maxilares por *Aspergillus* fue descrita por Millar en 1981 y Katzenstein, en 1983 describieron la presencia de grupos de eosinófilos necróticos, cristales de Charcot-Leyden e hifas fúngicas no invasivas, en la mucina sinusal de pacientes afectados de sinusitis crónica (15), denominándola rinosinusitis alérgica por *Aspergillus*. Más tarde, Robson propuso el nombre de sinusitis fúngica alérgica (16).

Para estos autores se trataba de una patología mediada por IgE, en respuesta a diversos hongos, presentes en la mucina eosinofílica sinusal. La teoría se apoyaba en la observación de IgE específica en los cultivos. Actualmente, la hipótesis más aceptada excluye el factor alérgico y propone la denominación de sinusitis fúngica eosinofílica (17) y se apoya en el hecho de la negatividad de las pruebas cutáneas en muchos pacientes afectados de RSC con hongos demostrados en moco nasal. De hecho, la cuantificación de la IgE específica fúngica no difiere entre pacientes con RSC y sujetos sanos. Esta contradicción se intenta explicar mediante la importancia de la IgE local en ausencia de IgE sistémica (18).

J. Eicosanoides y enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA) o ASA Triada.

Una de las formas de PN más graves, recidivantes y resistentes al tratamiento lo constituye la recientemente denominada EREA, que asocia RSC (con PN en el 80-90% de los casos), intolerancia cruzada a los AINEs y asma, conocida también como tríada de ASA (19). Los pacientes con PN e intolerancia a los AINEs presentan una intensa eosinofilia tisular con niveles muy elevados de ECP (20) y de citocinas relacionadas con la activación del eosinófilo y su supervivencia (IL-5, GM-CSF, RANTES, eotaxina) (21). El déficit de producción local de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y prostaglandina E2 (PGE2) parece ser el factor desencadenante del desarrollo de una inflamación eosinofílica grave principalmente en pacientes con intolerancia a los AINEs (22).

La producción de leucotrienos cisteinílicos (cisLT) se correlaciona con el grado de eosinofilia tisular y de producción de ECP; y no con la intolerancia a los AINEs; algunos estudios no encuentran diferencias en la liberación de leucotrienos C4 (LTC4) ni en la producción de COX y lipooxigenasas (LO) entre pacientes con y sin intolerancia cruzada a los AINEs(22), mientras que otros detectan incrementos de 5-LO y LTC4-sintasa, cisLT y receptores de cisLT1 en el tejido de PN de pacientes con intolerancia a los AINEs (23).

K. Óxido nítrico.

Los pacientes con PN presentan en el epitelio en aumento de la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), especialmente los pacientes con asma y EREA (24). En la actualidad se está evaluando el papel que tiene el óxido nítrico en la formación de los PN y su posible utilidad diagnóstica.

L. Factores genéticos.

Las alteraciones en el metabolismo de los eicosanoides presentes en los pacientes con tríada de ASA parecen indicar que puede haber una base genética en algunos casos de PN. No se tiene, actualmente, un conocimiento suficiente sobre el posible origen genético de la PN, pero sí se han constatado hechos que indican que en ciertos pacientes ello es posible (2). Así, los antecedentes familiares están presentes en algunos pacientes. Además, estudios genéticos han revelado correlaciones entre ciertos alelos HLA y la PN: En los pacientes con HLA-DR7-DQA1*0201 y HLA-DR7-DQB1*0202 la incidencia de PN es el triple de la población general. Es también significativa la existencia de un factor racial, ya que la elevada eosinofilia tisular de la PN es típica de la raza caucásica, sin embargo en China la PN no es eosinofílica (25).

Estudios realizados con *microarrays*, que monitorizan la expresión simultánea de miles de genes, han demostrado expresiones genéticas alteradas de numerosos procesos celulares en pacientes con PN. Los genes identificados como potencialmente patógenos se pueden clasificar en cuatro grupos sobre la base de sus roles biológicos: a) genes implicados en el crecimiento y desarrollo; b) genes que codifican citocinas; c) genes con funciones inmunes y; d) genes con otras funciones desconocidas (26). Probablemente en el futuro estas alteraciones serán fundamentales para las nuevas terapias.

1.1.4. EPIDEMIOLOGIA.

A la hora de abordar la epidemiología de la PN es importante tener en cuenta dos aspectos que ocasionan que la prevalencia exacta de esta entidad sea todavía desconocida. En primer lugar, que se dispone aún de un número insuficiente de estudios epidemiológicos. En segundo lugar, que los resultados de estos estudios difieren de forma importante en función de los mecanismos de selección de la población estudiada y de los métodos diagnósticos utilizados. A continuación, se señalan los estudios de prevalencia y se analizan los principales factores implicados en el desarrollo de la poliposis nasal.

1.1.4.1. Estudios de prevalencia de la poliposis nasal.

En líneas generales se pueden dividir los diferentes estudios en dos grandes grupos. Aquellos que emplean cuestionarios y los que utilizan la endoscopia nasal como método para evidenciar la presencia de PN. Según la guía EP³OS la endoscopia nasal es un requisito para precisar de forma más aproximada los valores de prevalencia de la PN, de tal manera que aquellos trabajos basados en cuestionarios podrían sobreestimar la prevalencia de la poliposis(2).

En este sentido, los trabajos clásicos realizados por Larsen y Tos en cadáveres permiten apreciar la diferente prevalencia de PN encontrada en función del método exploratorio empleado. De este modo, la prevalencia fue del 2% cuando el método empleado fue la rinoscopia anterior. Cuando se realizó la resección del bloque naso-etmoidal completo, se encontró una prevalencia del 26% (5 de 19 cadáveres). Finalmente en un tercer estudio donde se combinaba la endoscopia con la cirugía endoscópica sinusal, la prevalencia ascendió al 32%. Es necesario tener en cuenta que la edad media de los pacientes en estos tres estudios basados en autopsias osciló entre 70 y 79 años (4).

Las cifras de prevalencia que aparecen en la literatura médica oscilan, en función de los estudios consultados, entre un 0,2% y un 5,6%, dependiendo lógicamente del criterio diagnóstico empleado.

En la siguiente tabla aparece la prevalencia de poliposis nasosinusal encontrada en los principales estudios de la literatura.

Autor	Año	Prevalencia	Método
Settipane	1977	4,2%	Revisión de historias clínicas
Portenko	1989	1,3%-5,6%	Cuestionario
Ming YG	1996	0,5%	Endoscopia nasal
Hedman	1999	4,3%	Cuestionario
Johansson	2003	2,7%	Endoscopia nasal
Klossek	2005	2,1%	Cuestionario-algoritmo

Tabla 1. Principales estudios de prevalencia de poliposis nasosinusal en la literatura, con el método de realización del mismo.

En líneas generales se ha observado una mayor prevalencia de varones en los estudios de PN. En el estudio referido de incidencia de PN sintomática, Larsen y Tos, encuentran prácticamente el doble de incidencia de PN en los varones que en las mujeres. Por su parte, Rugina y cols, en un trabajo publicado en el año 2001 observan una relación varones/mujeres de 1,69/1. Esta tendencia también es apreciada por Johansson, quien encuentra una relación 2,2/1. En un estudio realizado mediante cuestionario enviado por correo a 900 pacientes a los que se les había realizado una polipsectomía, Collins y cols encuentran una proporción 2/1 entre varones y mujeres. En dos de los trabajos publicados no se aprecia esta tendencia; Settipane no encuentra diferencias entre sexos y Klossek encuentra una mayor frecuencia de PN en mujeres, si bien este dato no presentó significación estadística (4).

La PN se desarrolla fundamentalmente en la edad media de la vida, presentando un pico de máxima incidencia entre la cuarta y quinta décadas de la vida. Este cuadro es muy poco frecuente en la edad pediátrica. Settipane estima su prevalencia en niños en el 0,1%. Cabe recordar que el diagnóstico de una PN en un niño debe hacer pensar en la existencia de una patología más relevante, como la fibrosis quística.

En los diferentes estudios consultados se observa que tanto la prevalencia como la incidencia de la PN se incrementan con la edad. Johansson estima una prevalencia del 1% en menores de 40 años frente al 5% de los mayores de 60 años. Klossek asimismo encuentra una prevalencia del 1,22% en el rango de edad de 18 a 24 años y del 2,47% en los mayores de 65 años. También estos datos son observados por Settipane, que encuentra unas cuatro veces más frecuencia de PN en pacientes asmáticos mayores de 40 años (4).

Larsen y Tos, en su trabajo sobre la incidencia de la PN sintomática, también encuentran un incremento de ésta en función de la edad. Así, la incidencia pasa de 0,86 a 1,68 casos /1.000 habitantes y año para los varones de entre 50 y 59 años y de 0,39 a 0,82 casos /1.000 habitantes y año para las mujeres de entre 50 y 59 años (4).

1.1.4.2. Factores asociados a la poliposis nasal.

Existen una serie de factores que se han relacionado con la PN. Estos factores o condiciones asociadas son: el tabaquismo, la alergia, el asma, la intolerancia a los AINEs y los factores genéticos.

➤ Tabaquismo.

En general, los diferentes estudios estiman que el tabaquismo se encuentra con menor frecuencia en los pacientes con PN que en la población general(4). En un estudio realizado por Toledano y cols. en población española publicado en 2008, describen un 25,5% de fumadores entre los pacientes con PN, frente al 38,9% de un grupo control de sujetos sanos, aunque no hallaron diferencias estadísticamente significativas (27).

➤ Alergia.

En cuanto al segundo de los factores asociados mencionado, la alergia, actualmente se encuentra en discusión su papel como causa de PN. Si bien se puede observar que muchos pacientes presentan pruebas cutáneas o determinación de IgE positivas, la relación entre ambas entidades no está aclarada de forma adecuada en la literatura. Settipane refiere que la frecuencia de poliposis en pacientes con rinitis alérgica es baja: 1,5% . Frente a estos datos existen otros estudios que encuentran relación con la alergia. Klossek, por su parte, observa una mayor frecuencia de clínica alérgica en pacientes con PN que en la población general(4). También existen autores que revelan una mayor incidencia de alergia alimentaria en pacientes con poliposis, si bien estos datos no están confirmados (28).

En lo referente a la relación entre pruebas cutáneas positivas y PN se dispone de abundantes datos en la literatura médica. Crampette y cols en un estudio multicéntrico desarrollado en Francia encuentran un 32,5% de pacientes con PN y pruebas cutáneas o IgE específica positivas. Settipane observa un 55% de pruebas cutáneas positivas en 211 pacientes estudiados con PN. En su trabajo, Klossek encuentra pruebas positivas en el 26,1% de 212 pacientes. Por su parte, Bonfils y cols en un trabajo del año 2006 en el cual presentan resultados de dos estudios, el primero sobre 180 pacientes y el segundo sobre 74, notifican un 19,5% y un 16,2%, respectivamente, de pacientes con PN y Phadiatop positivo. Toledano y cols encontraron un 47,9% de pacientes con rinitis alérgica de un total de 142 pacientes con PN frente a un 45,5% en el grupo control, observando en este caso una diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos. En un estudio de 1983 realizado en 57 pacientes con PN, a los que se les realizaron diversas investigaciones alérgicas, Bunnang y cols encuentran que el 96,5% de los pacientes presentaban respuestas positivas al menos en uno de los métodos empleados (4).

En un estudio realizado en 25 pacientes consecutivos con PN y 50 pacientes consecutivos con rinitis alérgica, Van Lancker y cols encontraron que el 72% y el 96%, respectivamente, de los pacientes presentaba sensibilización a aeroalérgenos perennes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, mientras que el 84% y el 86%, respectivamente, estaban sensibilizados a aeroalérgenos estacionales, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas.

Muñoz del Castillo y cols en un estudio realizado en España con 190 pacientes con PN y 190 sujetos sanos, encuentran que las pruebas cutáneas con una batería de 18 aeroalérgenos eran positivas en el 63,2% de los pacientes con PN, de los cuales más de la mitad estaban sensibilizados a más de dos aeroalérgenos, frente a un 31,1% de los controles. Por su parte, Sin y cols evalúan la existencia de alergia mediante pruebas cutáneas y determinación de IgE específica en una población de 95 pacientes con PN, encontrando que, sobre la base de ambas pruebas, un 45,2% de la muestra se catalogó como alérgica, si bien las pruebas cutáneas fueron positivas en el 66,3% de los pacientes.

Pastorello y cols, en un estudio realizado en 90 pacientes a los que se les realizaba una polipeptomía y en los que determinan la IgE específica en suero y secreción nasal frente a un panel de aeroalérgenos, encuentran IgE específica en el 38% de los sueros y en el 32% de las secreciones nasales (exclusivamente en secreciones nasales en el 11%). Asimismo, encuentran unos niveles de IgE sérica total significativamente más elevados que en una población de 50 controles (4).

También se ha postulado la posibilidad de que exista una producción local de IgE sin que se detecte en suero o mediante pruebas cutáneas. Los autores de un metaanálisis que incluía 9 estudios con 287 pacientes en los que se evaluaba la IgE específica sérica y en mucosa nasal encuentran un 19% de pacientes que presentan IgE nasal positiva, pero negativa a nivel sérico, por lo que sugieren que un porcentaje de los pacientes con PN puede presentar alergia local (29).

Asero y Bottazzi realizan pruebas cutáneas con una batería amplia de aeroalérgenos y encuentran un 63% de pacientes con pruebas cutáneas positivas; los autores comparan las sensibilizaciones con una serie histórica propia de pacientes con alergia respiratorias y encuentran un mayor porcentaje de sensibilización a aeroalérgenos perennes, en particular *Dermatophagoides* y también a *Candida albicans* (4).

➤ **Asma.**

El tercer factor asociado que se menciona es el asma. La relación entre los PN y el asma se puede valorar desde dos prismas diferentes; el porcentaje de pacientes con asma bronquial que desarrollan PN y aquellos pacientes diagnosticados de PN que, en su evolución, presentan asma. A continuación se presentan algunos estudios que ilustran la relación entre ambas entidades clínicas.

En un estudio realizado por Bonfils y cols en el que se evalúa la relación del asma y la alergia en un grupo de 180 pacientes diagnosticados de PN mediante endoscopia y TC, se observa un 48,6% de asmáticos y un 22,8% de pacientes con hiperreactividad bronquial entre los que presentaban pruebas cutáneas positivas y un 28,3% y 20%, respectivamente, en aquellos con pruebas cutáneas negativas (4). En el mencionado estudio de Muñoz del Castillo y cols, los autores encuentran que un 48,9% de los pacientes con PN presenta asma frente a un 2,6% de los controles (4).

En un análisis de los 38 pacientes del estudio epidemiológico realizado en Skovde y diagnosticados de PN mediante fibroscopia, Johansson y cols, encuentran que un tercio de los pacientes respondía positivamente a la pregunta de si habían presentado ataques de asma o de dificultad respiratoria acompañada de sibilancias en el último año.

En un estudio realizado en 342 pacientes con asma, los investigadores observaron que el 9% padecía PN y que la presencia de esta entidad se asociaba con una mayor gravedad del asma (4).

En 1977 se realizó un estudio retrospectivo sobre 445 pacientes con poliposis nasal, resultando que el 21% de los mismos padecía asma. Aunque la PN se observó en el doble de varones que de mujeres, éstas presentaban el doble de posibilidades de padecer asma (30).

También se ha determinado la hiperreactividad bronquial (HRB) en los pacientes con PN. En un estudio realizado en 122 pacientes con PN a los que se les realizó una prueba de metacolina, los investigadores encuentran que el 35% de los pacientes presentaba HRB (31).

➤ **Intolerancia a los AINEs.**

La relación entre la PN y la intolerancia a los AINEs es bien conocida en la práctica clínica diaria. Asimismo en la literatura están publicados varios trabajos que nos ilustran de forma cuantitativa esta relación. Settipane encuentra un 14,2% de pacientes con PN que presentaban intolerancia a los AINEs. Cifras algo más elevadas aparecen en los trabajos de Crampette: 31%, Klossek: 20,3% y Toledano: 26,7% (4).

Por su parte Bonfils y cols en un estudio ya citado previamente, encuentra valores más bajos de relación entre la PN y la intolerancia a AINEs, 8,5% en pacientes con pruebas cutáneas positivas y 4,8% en aquellos con pruebas cutáneas negativas (4).

➤ **Factores genético-hereditarios.**

En lo referente a la asociación familiar aparecen dos estudios que encuentran antecedentes familiares en pacientes con PN. Rugina y cols refieren que un 52,7% de un total de 224 pacientes con PN referían antecedentes familiares en las últimas tres generaciones. Por su parte, Greisner y cols encuentra un 14% de antecedentes familiares en 50 pacientes con PN. En contraposición a lo referido anteriormente, estudios con gemelos homocigóticos realizados por Lockey en 1973 no se encuentra gran concordancia. En la actualidad, la importancia de los factores genético-hereditarios de la PN están por determinar, y los distintos estudios indican resultados discordantes (4).

1.1.5. CLINICA.

Existe una importante similitud entre los síntomas de la poliposis y los de la rinitis. En los comienzos de la enfermedad suele aparecer sensación de ocupación nasal sin llegar a obstruir completamente la fosa. Ya en fases más avanzadas, van apareciendo otros síntomas como la obstrucción nasal clara y un agravamiento de la hiposmia. La alteración del olfato puede ser el primer síntoma; éste es un síntoma progresivo que suele evolucionar a anosmia. A veces, la pérdida del olfato puede interpretarse como sensación de pérdida del sabor, que no es más que la manifestación de la ausencia de retroolfato. Este síntoma no siempre está presente o aparece de forma más tardía(1).

La insuficiencia respiratoria nasal suele ser el síntoma prínceps referido por la mayoría de los pacientes. Inicialmente es cambiante en el tiempo, dependiendo del tamaño de los pólipos. A veces los pacientes relatan una variabilidad exagerada de la insuficiencia respiratoria nasal. Este síntoma es el reflejo de la hiperreactividad nasal propia del proceso inflamatorio, base fisiopatológica de la poliposis nasal. En raras ocasiones la obstrucción nasal es completa. Es típicamente bilateral, permanente y aumenta en decúbito supino.

La rinorrea, bilateral, anterior o posterior, también es un síntoma frecuente. Normalmente es espesa y es frecuente que sufra sobreinfecciones que prolongan el tratamiento del cuadro.

Otras manifestaciones posibles son el prurito y los estornudos en salvas, reflejo de una hiperactividad de la mucosa nasal. La cefalea y la molestia ocular son menos frecuentes. Los dolores faciales se proyectan sobre la zona nasal o sinusal y se suelen describir como una sensación de pesadez. Se localizan principalmente a nivel de las regiones maxilar o mediofacial. La epistaxis es un signo de escasa incidencia. Para la mayoría de los autores no es un síntoma inicial relacionado con la enfermedad (1).

El dolor aparecerá en aquellos casos en los que haya infección aguda.

Es común en estos pacientes el uso prolongado de vasoconstrictores nasales, lo cual puede ser causa de patología de oído medio o bien de rinitis medicamentosa (1).

1.1.6. DIAGNÓSTICO.

Las bases del diagnóstico son la historia clínica y los hallazgos a la exploración. Las pruebas de imagen como el TC nos aportan información adicional, como es la extensión de la lesión así como otras patologías asociadas, complicaciones y como estudio prequirúrgico. En el TC tenemos que identificar estructuras de vital importancia como el septum nasal, el cornete medio y las paredes óseas de los senos. Podremos ver expansión ósea o erosión. También se pueden apreciar niveles hidroaéreos y la completa opacificación de los senos.

Previo al estudio radiológico deberemos hacer una completa exploración otorrinolaringológica básica que incluya una rinoscopia anterior, en la que normalmente encontraremos masas semitransparentes, blandas y móviles bilaterales. Posteriormente realizaremos una exploración endoscópica, evaluando el meato medio, la apófisis unciforme, la bulla etmoidal, la región cercana a la rima olfatoria, la zona anterior al seno esfenoidal y la rinofaringe.

Es importante la realización de biopsias en el caso de lesiones unilaterales ya que es numerosa la patología tanto benigna (angiofibroma nasofaríngeo, papiloma invertido, pólipo antrocoanal...) como maligna (carcinoma epidermoide...) que podemos hallar (1), pues la poliposis nasosinusal es siempre bilateral.

En el caso de niños, la presencia de pólipos nasales debe hacernos pensar en la posibilidad de fibrosis quística en los casos bilaterales y del meningoencefalocelo en los casos unilaterales.

1.1.6.1. Exploraciones complementarias.

1. Endoscopia nasal.

Imprescindible para poder hacer el diagnóstico de poliposis. Nos da una información mucho más rica que la rinoscopia anterior. La angulación ideal es la de 30º aunque algunos especialistas prefieren la de 0º.

2. Rinomanometría anterior.

Las resistencias nasales representan el 50% del total del árbol respiratorio. Esta prueba estudia la mecánica y las características cuantitativas y cualitativas del flujo aéreo. Su fiabilidad se basa en la correlación existente con las mediciones obtenidas por tomografía computarizada y por resonancia magnética. Este sistema nos permite estudiar los flujos en cm³/seg. a diferentes valores de presión (75, 100, 150 y 300 pascales) en las dos fases de la respiración (inspiración y espiración) y de forma unilateral (32).

3. Rinometría acústica.

Valora la geometría de las fosas nasales basándose en la reflexión de una onda acústica. Los resultados se expresan en una gráfica donde es posible calcular las aéreas transversales en función de la distancia de las narinas, siendo un dato importante el Área Transversal Mínima (ATM), que es la zona más estrecha de las fosas nasales y, por tanto, la más importante a la hora de evaluar las resistencias de la nariz al paso del aire; su mayor fiabilidad esta en los siete primeros centímetros de la narina (33).

4. Tomografía axial computerizada (TC).

Es una prueba de imagen con tal poder de resolución que nos permite estudiar hasta las lesiones óseas más pequeñas, y las posibles lesiones de las partes blandas asociadas. A veces se encuentran alteraciones de la mucosa sinusal de forma fortuita, en el estudio de otra patología, y a las que hay que conceder relativa importancia.

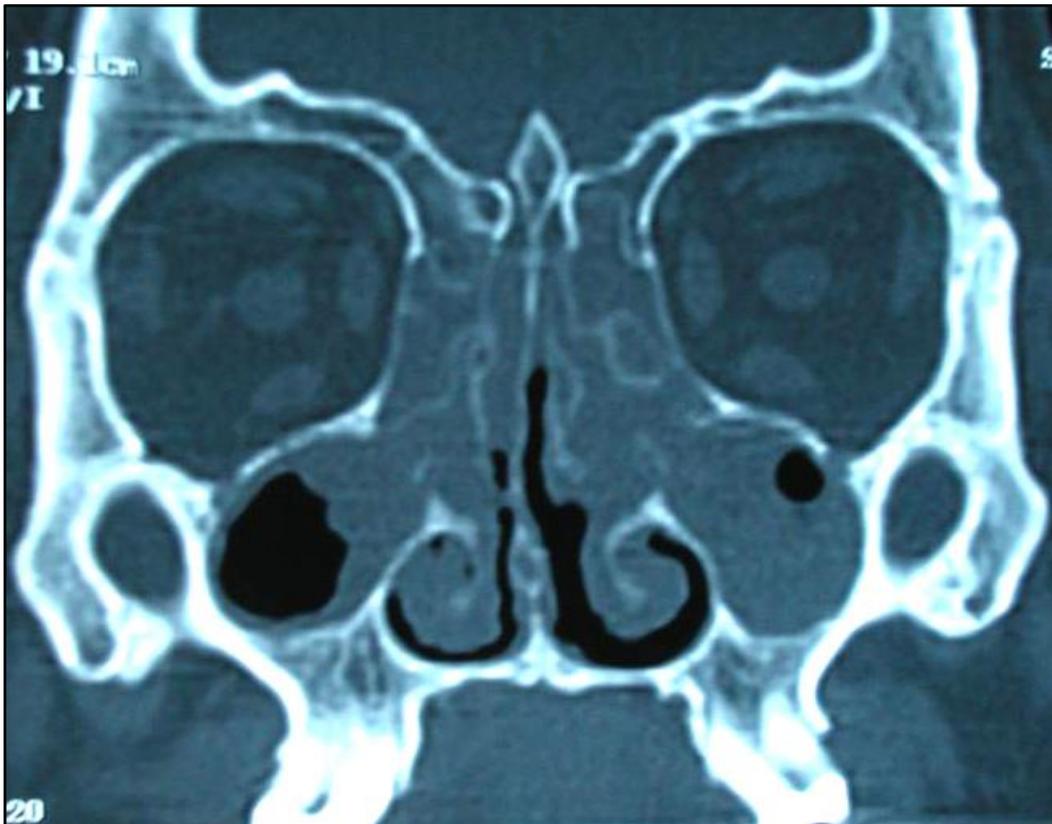


Figura 4.TC de poliposis nasosinusal. Corte coronal de TC de paciente afecto de poliposis nasosinusal. Se aprecia la ocupación por tejido de densidad partes blandas de etmoides, senos maxilares y meatos medios

En la poliposis nasal puede existir reabsorción ósea y expansión de los límites normales del hueso, consecuencia de la presión (34).

Se considera esencial por varios motivos:

- Nos permite conocer la anatomía rinosinusal.
- Determina la invasión sinusal de la poliposis y permite apreciar la respuesta al tratamiento médico.
- Indica la intervención que se debe realizar.
- Pone de manifiesto la existencia de anomalías anatómicas sinusales que pueden complicar la cirugía endoscópica.
- Se considera de valor médico-legal.

5. Olfatometría.

Pueden dividirse en estáticas y dinámicas. Las primeras aprovechan los movimientos respiratorios, entrando el olor pasivamente lo que resulta más fisiológico. Las dinámicas transmiten el estímulo oloroso a través de una corriente permanente de un gas inodoro. Existen, así mismo, diferentes formas de medir la olfacción según el medio-soporte que sea el transportador de la sustancia olorosa. El disolvente, pues, puede ser un gas inodoro (nitrógeno o aire limpio), o un medio líquido inodoro, o un medio sólido en forma de una resina sintética (32).

6. Examen neumoalergológico.

Es indispensable realizar un estudio neumoalergológico para evaluar un asma evidente, eliminar una hiperreactividad bronquial latente y buscar un terreno atópico (1). Dependiendo del criterio del especialista se pueden realizar pruebas sanguíneas, pruebas cutáneas en busca de una hipersensibilidad de tipo I y un examen funcional respiratorio con prueba de la metacolina. Se debe sospechar ante cualquier antecedente de intolerancia a la aspirina, a un AINE o a un conservante o colorante alimentario, y considerar al paciente como intolerante.

1.1.7. 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.

1.1.7.1. Corticoides intranasales.

Son los fármacos más potentes y efectivos en la prevención y supresión de la inflamación ocasionada por estímulos de tipo mecánico, químico, infeccioso e inmunológico. Su efecto se basa en reducir la obstrucción nasal, los estornudos y la hidrorrinorrea en un 50 por 100 de los casos, y en aumentar el flujo aéreo nasal (1). Los corticoides inhiben diferentes aspectos de la inflamación al estimular o inhibir la transcripción de genes y la expresión de enzimas, metabolitos del ácido araquidónico y las enzimas que los regulan, moléculas de adhesión y citocinas, así como sobre diferentes células inflamatorias (eosinófilos, mastocitos, linfocitos).

No hay consenso en lo que se refiere a la duración y a la dosis de tratamiento, pero por lo general se requieren tratamientos prolongados, de meses o años, con dosis diarias que oscilan entre los 100 y los 800 microgramos, repartidos en una o dos tomas, para obtener resultados satisfactorios, siendo muy importante la educación del paciente en la forma de aplicación. Una vez pulverizada cualquiera de las presentaciones de corticoide, la cabeza debe desplazarse hacia atrás durante uno o dos minutos, con el fin de facilitar la medicación a todas las fosas nasales y sobre todo a la zona del meato medio, de donde emergen los pólipos.

Mantener el tratamiento con corticoides tópicos tras la cirugía ayuda a prevenir recurrencias de la enfermedad (1).

También se ha demostrado la eficacia de los corticoides intranasales en la mejoría de la función pulmonar en pacientes con asma o ASA triada (1).

Dentro de los efectos adversos locales de los corticoides intranasales se han descrito efectos menores como sequedad nasal, costras y en ocasiones epistaxis leve o incluso algún caso de perforación septal. No se ha descrito efecto teratogénico que contraindique la administración de corticoides intranasales en pacientes embarazadas, aunque es conveniente evitarlos en lo posible.

Prácticamente no existe el riesgo de supresión del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, ya que las dosis administradas son mínimas y además tienen poca disponibilidad. Tampoco se han observado signos de atrofia de la mucosa nasal, ni efectos sobre la metaplasia epitelial, el grosor de la membrana basal o el número de células mucosas (1).

1.1.7.2. Corticoides sistémicos.

No existen estudios aleatorizados y controlados con placebo, pero está clara la eficacia clínica de los corticoides sistémicos en los casos de poliposis nasal. Mejoran todos los síntomas incluyendo la pérdida del olfato, además de reducir el tamaño de los pólipos.

No se recomienda el uso de corticoides sistémicos inyectables depot como tratamiento para la poliposis nasal por su riesgo de efectos secundarios y por la falta de control de su liberación.

Tras un tratamiento prolongado con corticoides sistémicos pueden aparecer efectos secundarios tales como hipertensión arterial, osteopenia y osteoporosis, cataratas, miopatía, ansiedad, depresión o incluso psicosis (1). El cese brusco de un tratamiento con corticoides puede asociarse a una insuficiencia adrenal que puede llegar a ser fatal para el individuo al suprimirse el funcionalismo del eje hipotálamo-hipofisario.

1.1.7.3. Antibióticoterapia.

En los últimos diez años se ha visto incrementado el interés en la interacción entre antibióticos (fundamentalmente macrólidos) y el sistema inmune (1). El objetivo es focalizar el efecto antiinflamatorio de la eritromicina y sus derivados en el tratamiento de la sinusitis crónica y la poliposis nasal. Los estudios demuestran la inhibición producida por los macrólidos sobre los genes de expresión de la IL-6 e IL-8, así como sobre la expresión de moléculas de adhesión intercelular (esenciales para el reclutamiento de células inflamatorias).

En el futuro se establecerá si dicha eficacia es aceptada como medicina basada en la evidencia. Se necesitan sin embargo más estudios para recomendar el uso tanto de estos fármacos como de los antibióticos antifúngicos.

1.1.7.4. Antihistamínicos.

Son eficaces para mejorar los síntomas de alergia cuando se asocia una rinitis alérgica. No hay estudios clínicos que validen su uso en la poliposis nasal salvo, junto a la evitación alérgica, para mejorar los síntomas de una rinitis alérgica asociada (1).

1.1.7.5. Antileucotrienos.

Los antagonistas de los receptores de leucotrienos (montelukast, zafirlukast y pranlukast) podrían presentar actividad sobre la génesis de los pólipos nasales. Serían útiles especialmente en el caso de pacientes con ASA triada, como tratamiento continuado del asma y de la

poliposis nasosinusal y en ocasiones la prevención de la recidiva después del tratamiento quirúrgico (1). Sin embargo los efectos son beneficiosos para el asma pero no para la poliposis.

1.1.7.6. Tratamiento quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico de la RSCcPN está dirigido tanto a la propia enfermedad como a actuar frente a los factores predisponentes que hacen que se perpetúe. La cirugía se indica, básicamente, cuando el tratamiento medicamentoso haya llegado a su límite. Está muy bien establecido en las guías clínicas EPOS y Polina. Existen otra serie de indicaciones que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 2. Indicaciones de cirugía en la RSCcPN.
<ul style="list-style-type: none">• RSCcPN refractaria al tratamiento farmacológico.• Mucocele o piocele sinusal.• Sinusitis fúngica.• Complicaciones (absceso subperióstico, absceso cerebral, meningitis, osteomielitis, trombosis del seno cavernoso).• RSCcPN unilateral.• Tratamiento farmacológico contraindicado (Diabetes Mellitus, glaucoma, HTA, tuberculosis).

Tabla 2. Indicaciones de tratamiento quirúrgico en la PN.

El tratamiento quirúrgico hoy día se realiza por vía endoscópica ya que el abordaje externo ha quedado en desuso. La cirugía se realiza bajo anestesia general, con intubación orotraqueal o colocación de mascarilla laríngea, y consiste en la exéresis, en primer lugar, de las masas polipoideas que ocupan la fosa nasal con un microdebridador, y, posteriormente, se procederá a la apertura de los ostium de drenaje de los senos para que mantengan su ventilación. La apertura de los senos ha de realizarse ampliando el ostium natural, dado que los cilios

intrasinuales siguen batiendo hacia ellos, y si se realiza un segundo ostium puede dar lugar a un transporte vicioso de la mucosidad: salida por el ostium natural y entrada por el accesorio (35). En algunos casos se pueden encontrar los senos rellenos de un moco “glue”, muy adherido a las paredes sinusales. Es muy importante evacuarlo por completo para evitar recidivas tempranas.

1.2-MUCINAS.

Las mucinas epiteliales (MUCs) son glicoproteínas de alto peso molecular cuya función básica consiste en dar protección y lubricar la superficie epitelial(36, 37). Es el componente principal del moco, y se ha propuesto también su participación en la renovación y diferenciación del epitelio, así como en la modulación de la adhesión celular. Desde el punto de vista molecular todas las mucinas comparten una característica común: están constituidas por un gran número de secuencias repetidas en grupo, que son diferentes en cada una de ellas. Como parte fundamental del moco representan una barrera protectora frente a patógenos e irritantes participando en el aclaramiento mucociliar (38).

Según su localización las MUCs se pueden clasificar en dos principales familias: mucinas ancladas a membrana o de membrana (mm), asociadas a endotelios y leucocitos, donde actúan como ligandos para familias de proteína de unión a carbohidratos; y mucinas secretoras (ms), que constituyen el componente principal de las mucosidades de epitelios donde cumplen principalmente una función protectora (39). Las mucinas secretoras (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8 Y MUC19) carecen de un dominio de transmembrana y son secretadas en el espacio extracelular. Por el contrario, las mucinas ancladas a membrana (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12-17 y MUC20) son proteínas de anclaje a membrana Tipo I, con un dominio que atraviesa la membrana, una región extracelular terminal NH₂ y una porción terminal COOH intracitoplasmática(40). Al igual que las mucinas secretoras, también se encuentran altamente glicosiladas, pero son más pequeñas y no forman geles o mucosidades extracelulares, pero sí funcionan como ligandos para receptores como selectinas y/o integrinas (41).

Hasta el momento se han identificado una veintena de genes que codifican las MUCs (38). Aunque cada mucina es codificada por un gen diferente comparten características similares en su estructura primaria, pero también albergan muchos dominios funcionales únicos haciendo que la expresión de cada gen MUC sea específica de los órganos, tejidos y tipos celulares(37).

Evidencias recientes indican que como consecuencia de su estructura tan específica, cada mucina interactúa con diferentes receptores proteicos (40). Las mucinas de membrana pueden interactuar con proteínas extra e intracelulares, mientras que las mucinas secretoras solo pueden unirse a proteínas en el espacio extracelular. Estas interacciones proporcionan especificidad a los fenómenos moleculares y celulares mediados por mucinas. Entre las mucinas, destaca la actividad de la MUC1. Esta mucina de membrana actúa como un receptor muy sensible, capaz de participar en múltiples señales intracelulares. Recientemente ha emergido como una molécula antiinflamatoria, actuando como inhibidora de la inflamación

inducida por virus y bacterias en la vía aérea, al demostrarse su habilidad para inhibir la activación que producen estos virus y bacterias en varios receptores *toll-like* (TLR2-9) (42-45).

Como todas las mucinas de membrana, la MUC1 presenta las dos porciones polipeptídicas anteriormente descritas, extracelular e intracitoplasmática, pero en su terminal intracitoplasmática, conserva una porción (*cytoplasmic tail, CT*), que modula múltiples señales intracelulares (46). La MUC1 CT 72-aa contiene 7 residuos de tirosina, cuyo estado de fosforilación se ha asociado con señales intracelulares del cáncer, así como con la inhibición del ensamblaje del receptor TLR5 con la molécula adaptadora MyD88 ,y la consecuente inflamación de las células epiteliales de la vía aérea derivada de dicha unión (47, 48).

Han aparecido evidencias que muestran que los glucocorticoides aumentan la expresión *in vitro* de la MUC1 (49, 50), como también lo hace en el epitelio de los pólipos nasosinuales tras dos semanas de tratamiento con glucocorticoides orales (51). Aunque la asociación entre la eficacia de los corticoides orales y la expresión de la MUC1, así como la posible interacción de los receptores de los glucocorticoides (GR) y la MUC1 es, todavía, desconocido.

Poder conocer la naturaleza de estas interacciones y los fenómenos celulares que desencadenan supone una vía de investigación de nuevas terapias.

1.3-CORTICORRESISTENCIA.

La inflamación que ocurre en la poliposis nasosinusal (PN) está producida principalmente por citocinas (factor de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), IL-1 β , TNF- α , GM-CSF y la IL-5), quimiocinas (eotaxina-2) y las moléculas de adhesión (ICAM-1); todas ellas aumentan el estatus inflamatorio a nivel local de los PN, reclutando células inflamatorias al interior de los pólipos que mantienen un proceso pro-inflamatorio crónico. Cuando dicho proceso comienza los factores de transcripción (TF) migran al núcleo celular y promueven la transcripción de los genes de los factores proinflamatorios anteriormente comentados, así como moduladores de la proliferación celular, de la diferenciación y de la apoptosis. Los dos TF mejor conocidos son la proteína activadora-1 (AP-1) y el factor nuclear- κ B (NF- κ B) (52). La AP-1 induce la expresión de múltiples genes proinflamatorios como la IL-4, IL-5, GM-CSF, y el NF- κ B, una vez estimulado, es capaz de unirse al ADN e inducir la transcripción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , eotaxina, GM-CSF, ICAM-1, molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1)) así como genes anti-apoptóticos. A su vez, La IL-1 β y el TNF- γ pueden también activar el NF- κ B B, de manera que se establece un circuito reverberante, perpetuándose el proceso inflamatorio en los PN (53).

De acuerdo con el consenso europeo (2) los glucocorticoides (GC) tópicos están considerados el tratamiento de elección para la poliposis nasosinusal, aunque la remisión completa de la enfermedad tan solo se aprecia en un 60-80% de los casos (54). Los mecanismos celulares que inducen la aparición (55) de resistencia a los GC tópicos están considerados una de las mayores causas de fallo en el tratamiento de la PN.

El mecanismo de acción de los glucocorticoides se explica por la unión de los GC a unos receptores intracitoplásmicos específicos (GR), este complejo GC-GR se transloca hasta el núcleo celular, donde se une a un sitio específico del ADN convirtiéndose capaces de promover o inhibir la transcripción de genes (52). Al mismo tiempo, los GC también interactúan con los TF, AP-1 y (NF)- κ B, inactivándolos, de manera que inactivan las citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión proinflamatorias, siendo éste el principal mecanismo antiinflamatorio de los GC.

Existen, al menos, dos tipos de GR: GR- α , que muestra una gran afinidad por los GC y tiene una gran capacidad transcritora; y el GR- β , que no es capaz de activar la transcripción de genes y se considera un inhibidor endógeno del GR- α (56). La sobreexpresión de este último

receptor está considerado el marcador más importante para predecir el desarrollo de corticorresistencia, si bien, todavía existe controversia acerca del papel del mismo (52).

Aparte de las isoformas de los GR existen otros factores que han demostrado corticorresistencia *in vitro* (57), como el efecto inhibitorio recíproco entre GR y TF, la disfunción de la histona deacetilasa, en la que los GC-GR llegan al núcleo, pero no pueden activar los genes con respuesta antiinflamatoria, y la protein kinasa p38, que fosforila el GR e inhibe su translocación al núcleo celular.

EL papel de los TF, citocinas y las isoformas de los GR en la expresión clínica de la PN es hoy día pobremente conocido. El conocimiento de los mecanismos genéticos envueltos en la respuesta de los pólipos nasales al tratamiento con GC contribuirá a optimizar el tratamiento de esta enfermedad.

2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1-HIPÓTESIS.

La hipótesis del presente trabajo de tesis doctoral se basa en los siguientes antecedentes:

1) El principal tratamiento de la PN asociada a RNC son los corticoesteroides tópicos, sin embargo existe un porcentaje, de aproximadamente, el 20% de pacientes no respondedores.

2) Tras el fallo del tratamiento tópico, los corticoesteroides sistémicos son la terapia de elección, aunque como en el primer caso existe un porcentaje de pacientes no respondedores que serían tributarios a cirugía nasosinusal.

3) Actualmente existen nuevas terapias dirigidas a dianas moleculares específicas que podrían ser de elección en aquellos casos en los que exista una resistencia a corticoesteroides sistémicos, como son omalizumab o dupilumab. Sin embargo, aunque se han propuesto diversos biomarcadores de respuesta a corticoesteroides, ninguno de ellos tiene una validez clínica para seleccionar a pacientes corticorresistentes.

4) Las mucinas ancladas a membrana, como es MUC1, presentan efectos antiinflamatorios sobre la inflamación inducida por agentes infecciosos tales como bacterias Gram+ o Gram – como es la Pseudomona aeruginosa.

5) Los corticoesteroides aumentan la expresión de MUC1 como parte de su respuesta anti-inflamatoria.

6) La mucina MUC1 posee un tallo citoplasmático que transduce señales intracelulares anti-inflamatorias y que es capaz de interactuar con múltiples señales y receptores intracelulares mediando en su función.

Ante los antecedentes expuestos sería razonable establecer la hipótesis por la cual la mucina MUC1 puede ser un biomarcador de respuesta a los corticoesteroides, de tal modo que su falta de expresión pueda correlacionarse con la falta de respuesta al tratamiento con corticoides en la RSCcPN.

2.2-OBJETIVOS.

Analizar la expresión de MUC1 como biomarcador de respuesta a corticoides sistémicos en pacientes con PN asociada RSC corticorresistente.

Para ello se establecen los siguiente sub-objetivos:

- Estudiar la expresión de mucinas en el tejido polipoideo de pacientes con RSC con PN, tanto respondedores como no respondedores a corticoides sistémicos, y así evaluar la posible correlación existente con la respuesta a corticoides sistémicos.

En casos de encontrar asociación se procederá al sub-objetivo nº 2,

- Establecer los mecanismos moleculares que justifican la asociación de la expresión de MUC1 sobre la respuesta a corticoides sistémicos.

3-METODOLOGÍA.

3.1. MATERIAL.

3.1.1. Pacientes.

Este estudio analiza los datos de 73 pacientes afectados de rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal atendidos en la sección de Rinología del Hospital General Universitario de Valencia, todos ellos fueron informados del estudio y firmaron el consentimiento informado previo a la toma de la muestra. Así mismo, el estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital.

En la presente tesis doctoral, el diagnóstico de poliposis nasosinusal fue definido basándonos en los hallazgos endoscópicos de poliposis nasosinusal bilateral y/o confirmación de PN en el estudio radiológico con tomografía axial computerizada, de acuerdo con el Consenso Europeo sobre Rinosinusitis y Pólipos Nasales de 2012 (EPOS 2012) (2). Todos los pacientes mostraban pólipos extensos (score 2 - 4 en ambas fosas). El estado alérgico o no de los pacientes fue evaluado usando el test cutáneo de provocación (prick-test) o por medio de una analítica de sangre, buscando IgEs específicas contra alérgenos inhalados comunes en nuestro medio. El diagnóstico de intolerancia a la aspirina fue realizado por medio de la prueba de exposición inhalatoria nasal a lisina-aspirina (58). El diagnóstico de asma fue llevado a cabo por un neumólogo. Ninguno de los sujetos presentó infección de la vía aérea superior en las 4 semanas previas a la terapia corticoidea oral. Se comprobó que ninguno de los sujetos tomaba otra mediación (por ejemplo antibióticos o Antileucotrienos) en las 4 semanas previas al inicio de la terapia corticoidea oral.

Sistema sinusal	Izquierda	Derecha
Maxilar (0, 1, 2) Puntuación total		
Etmoides anterior (0, 1, 2)		
Etmoides posterior (0, 1, 2)		
Esfenoideo (0, 1, 2)		
Frontal (0, 1, 2)		
Complejo osteomeatal (sólo 0 ó 2)*		
Puntuación total		

0 - sin anomalías; 1 - opacificación parcial; 2 - opacificación total.

*0 - sin obstrucción; 2 - obstruido

Tabla 3. Sistema de puntuación del TC de Lund-MacKay. (Tabla adaptada del Consenso Europeo sobre Rinosinusitis y Pólipos Nasales, EPOS, de 2012.) El sistema de Lund-MacKay asigna una puntuación de 0 a 2 según la opacificación ausente, parcial o completa de cada sistema sinusal y del complejo osteomeatal, con lo que se obtiene una puntuación máxima de 12 en cada lado.

En el momento del reclutamiento, los pacientes comenzaron con corticoesteroides orales (deflazacort), a dosis de 1 mg/kg/ día durante 8 días, seguidos por 0,5mg/kg/ día otros 7 días. La corticorresistencia fue evaluada el día 15 tras la toma del corticoesteroide oral. Los pacientes en los que no se apreció una disminución mayor de un grado de su poliposis en la exploración endoscópica tras la toma del corticoide oral pasaron a formar parte del grupo de corticorresistentes (PN-CR). A este respecto cabe explicar que los pacientes se agruparon según sus características fenotípicas de la siguiente manera:

- a) PN sin asma y sin intolerancia a la aspirina (PNsA; n=12),
- b) PN con asma y con tolerancia a la aspirina (PN-ATA; n=8);
- c) PN con asma e intolerancia a la aspirina (PN-AIA; n=34) y PN-CR (n=19).

Las características clínicas analizadas de cada paciente se definen en el apartado de resultados.

La muestra de tejido polipoideo fue obtenida y analizada antes y tras la toma del corticoide oral por parte de los pacientes. Los pacientes acudieron a las consultas externas de Otorrinolaringología, sección de Rinología, del Hospital General Universitario de Valencia el día acordado tras el tratamiento. Se les colocó unas lentinas intranasales embebidas en anestésico local (Lidocaína 2%), y se les tomó una muestra de pólipo nasal bajo visión endoscópica con

una óptica de 30º y pinza de Blakesley. Tras el procedimiento los pacientes volvieron a su domicilio sin complicaciones ni necesidad de taponamiento nasal.

3.2. Método.

3.2.1. Cultivos celulares.

3.2.1.1 Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales de PN.

De todas las muestras de PN que llegaron al laboratorio, se escindió un fragmento de epitelio de los pólipos nasales. Estos fragmentos fueron lavados con suero fisiológico estéril y con medio de crecimiento para células epiteliales bronquiales (BEGM). El medio BEGM está compuesto por medio basal para células epiteliales (BEBM) suplementado con: extracto de pituitaria bovina (52 µg/mL), hidrocortisona (0.5 µg/mL), factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano recombinante (25 ng/mL), epinefrina (0.5 µg/mL), transferrina (10 µg/mL), insulina (5 µg/mL), triyodo-L-trionina (6.5 ng/mL), gentamicina (40 µg/mL), anfotericina B (50 ng/mL), albúmina sérica bovina (1.5 µg/mL) y ácido retinoico (05 µM).

Tras la limpieza del fragmento, éste se cortó longitudinalmente y se obtuvieron explantes de aproximadamente 5 mm que se depositaron en placas de 6 pocillos tapizadas con colágeno (10µg/cm² colágeno tipo I de rata (Sigma). Los explantes se orientaron de forma que la capa epitelial estuviese en contacto con la superficie del pocillo. Se incubaron las placas durante 15 minutos en el incubador (37°C y 5% CO₂) para facilitar la adherencia del explante a la superficie colagenizada del pocillo y, pasado este tiempo, se añadió 1 mL de medio BEGM por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

Se observó cómo crecieron células epiteliales de pólipos alrededor de los explantes, alcanzando una confluencia adecuada tras un periodo de aproximadamente 7 a 14 días.

A partir de ese momento se retiraron los explantes y los cultivos celulares fueron utilizados para medir la expresión, tanto de ácido ribonucleico (ARN) como de proteína.

La viabilidad celular fue evaluada mediante el método de tinción por exclusión del azul de tripano utilizando el contador celular automático *Countess® automated cell counter* (Life Technologies, Madrid, España). La viabilidad celular de todos los cultivos utilizados en este estudio fue superior al 98%.

Las células epiteliales bronquiales BEAS2B se obtuvieron del American Type Culture Collection y se sembraron en medio BEGM con suplementos (Lonza, Madrid, España) a 37°C con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue remplazado cada 48h.

3.2.2. Histología.

3.2.2.1. Inmunohistoquímica.

El epitelio PN pseudoestratificado se fijó con paraformaldehído 4% durante al menos 48 horas. Posteriormente se deshidrató mediante el siguiente procedimiento:

Paso:	Solución:	Tiempo (minutos):
1.	Etanol 70%	30
2.	Etanol 96% I	30
3.	Etanol 96% II	30
4.	Etanol 100% I	30
5.	Etanol 100% II	30
6.	Xileno I	30
7.	Xileno II	30
8.	Parafina I	60

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 μm de espesor) con un micrótopo HM 340 E (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza) y se adhirieron a portaobjetos. Para realizar las inmunohistoquímias, se desparafinaron los cortes con xileno. Una vez desparafinados los cortes, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo, fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-ratón o anti-conejo, conjugado con un complejo formado por avidina-biotina junto a la enzima peroxidasa de rábano (Vector Laboratoires, Burlingame, CA). Se utilizó el isotipo control inmunoglobulina G (IgG) como control negativo. En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

TLR2 (monoclonal)	Novus Biologicals (NBP1-51792B)	Ratón
TLR4 (monoclonal)	Novus Biologicals (H00007099-M02)	Ratón
TLR5 (policlonal)	Novus Biologicals (NBP1-76661)	Conejo
MUC1-CT (policlonal)	Novus Biologicals (NBP1-60046)	Conejo
Phospho-ERK 1/2 (monoclonal)	Sigma-Aldrich (M9692)	Ratón

Anticuerpo Secundario:	Referencia:	Dilución:
Anticuerpo anti-ratón IgG (H+L) Biotinilado (origen: rata)	eBioscience (Ref. 13-4013)	1:100
Anticuerpo anti-conejo IgG (H+L) conjugado a biotina (origen: burro)	Jackson ImmunoResearch Laboratoires Inc. (Ref. 711-065-152)	1:100

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunohistoquímica. Definición de abreviaturas: TLR2: Receptor tipo Toll 2; TLR4: Receptor tipo Toll 4; TLR5: Receptor tipo Toll 5; MUC1-CT: Mucina tipo 1- cola citoplásmica ("Cytoplasmic Tail"); Phospho-ERK: Kinasa reguladora de la señal extracelular ("extracellular signal-regulated Kinase") fosforilada ; IgG: Inmunoglobulina G; H+L: Cadena polipeptídica pesada ("heavy") y ligera ("light") de las IgG.

Todas las secciones con inmunotinción fueron evaluadas con un microscopio Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías representativas (10 cortes por paciente). La intensidad de las inmunotinciones de los distintos anticuerpos en el epitelio PN fue evaluada mediante una escala de 0-3 (Inmunoreactividad: 0-negativa, 1-débil, 2-moderada, 3-fuerte). El porcentaje de células positivas del epitelio PN para los distintos anticuerpos fue evaluado mediante una escala de 1-4 (Células positivas: 1: 0-25%, 2: 26-50%, 3: 51-75% y 4: 76-

100%). Los valores resultantes para la intensidad de las inmunotinciones y los porcentajes de células inmunoreactivas fueron multiplicados para obtener una puntuación compuesta, con un rango de 0 a 12.

3.2.2.2. Inmunofluorescencia.

Los explantes de PN de los pacientes fueron colocados en pocillos de placas de cultivo y las células epiteliales de PN (CEPN) crecieron alrededor de los explantes. Cuando las células alcanzaron un 100% de confluencia, se tomaron fotografías de la superficie del cultivo celular con un microscopio de contraste de fases acoplado a cámara Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón). También se realizó análisis por inmunofluorescencia de los distintos marcadores, descrita en el siguiente apartado.

Las células epiteliales bronquiales BEAS2B se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras realizar otros tres lavados con PBS, se permeabilizaron con una solución compuesta por: HEPES 20mM pH=7,6, sacarosa 300mM, NaCl 50mM, MgCl₂ 3mM y Triton X-100 0,5%. Posteriormente, se bloquearon (10% suero de cabra en PBS) e incubaron durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C. Pasado este tiempo se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente. Se lavaron 3 veces con PBS y se procedió al montaje con el medio específico para fluorescencia DAKO. Las CEPN fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE200 acoplado a cámara (Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías representativas (x200). En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Anticuerpo Primario:	Referencia:	Origen:
MUC1-CT (policlonal)	Novus-Biologicals (NBP1-60046)	Conejo
GR α (monoclonal)	BD Biosciences (611227)	Ratón

Anticuerpo Secundario:	Referencia:	Dilución:
Anticuerpo anti-conejo conjugado a FITC	Molecular Probes.	1:100
Anticuerpo anti-ratón conjugado a FITC	Molecular Probes.	1:100

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunofluorescencia: Definición de abreviaturas: MUC1-CT: Mucina tipo 1- cola citoplásmica ("Citoplasmic Tail"); GR α : Receptor glucocorticoideo alfa; FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

Igualmente, se realizó otro experimento, en el que el tejido de PN fue fijado e introducido en el compuesto O.C.T. TM (Tissue-Tek[®], USA). Las secciones con inmunotinción fueron enfrentadas con los anticuerpos primarios correspondientes, durante 24h a 4°C. Después de ese tiempo se incubaron con un anticuerpo secundario fluorescente específico. Las muestras fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE200 acoplado a cámara (Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías representativas (x200). En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Anticuerpo Primario:	Referencia:	Origen:
MKP1 (policlonal)	Assay biotech (B1099)	Conejo
GR α (monoclonal)	BD Biosciences (611227)	Ratón

Anticuerpo Secundario:	Referencia:	Dilución:
DAPI	Molecular Probes	1:10.000

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunofluorescencia: Definición de abreviaturas: MKP1: Protein Kinasa Fosfatasa activadora de mitógeno 1 ("Mitogen Activated Protein Kinasa Phosphatase 1"); GR α : Receptor glucocorticoideo alfa; DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride.

3.2.3 Estudio de la expresión génica: Técnicas de Biología molecular.

3.2.3.1 Extracción de ARN total y cuantificación.

Para aislar el ARN total de CEPN de cultivo primario y de CEPN diferenciadas en ALI 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), siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación se determinó la concentración del ARN extraído mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total (ng/μL) 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} .

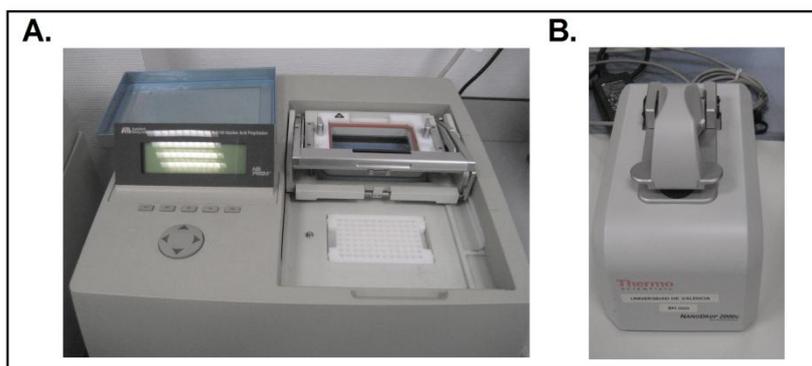


Figura 5. Extracción de ARN total y cuantificación. A. Sistema ABI Prism TM 6100 Nucleic Acid Prep Station para la extracción de ácidos nucleicos. B. Espectrofotómetro NanoDrop 2000C para la cuantificación de ácidos nucleicos.

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°C hasta su utilización.

3.2.3.2. Retrotranscripción inversa (RT).

En la reacción de retrotranscripción inversa (RT), la enzima retrotranscriptasa inversa sintetiza ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario (ADNc) partir de un ARN molde.

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit “Taq Man para la retrotranscripción inversa”. Se realizó este proceso en un termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C, ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C. El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

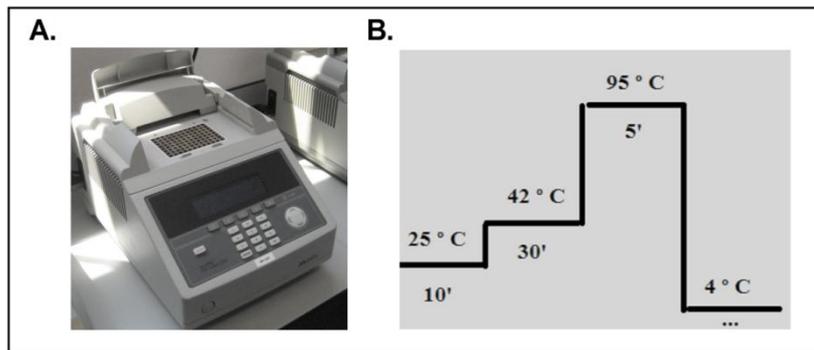


Figura 6. Retrotranscripción inversa. A. Termociclador 9800 Fast Thermal Cycler para realizar la reacción de retrotranscripción inversa. B. Etapas de la reacción. En la figura se muestran temperaturas (°C) y tiempos (minutos) de los distintos pasos de la reacción.

3.2.3.3. RT-PCR a tiempo real.

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:

- **Desnaturalización del ADN molde.**
- **Hibridación de cebadores.**
- **Elongación.**

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial en la cantidad de ADN de la región de interés.

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.

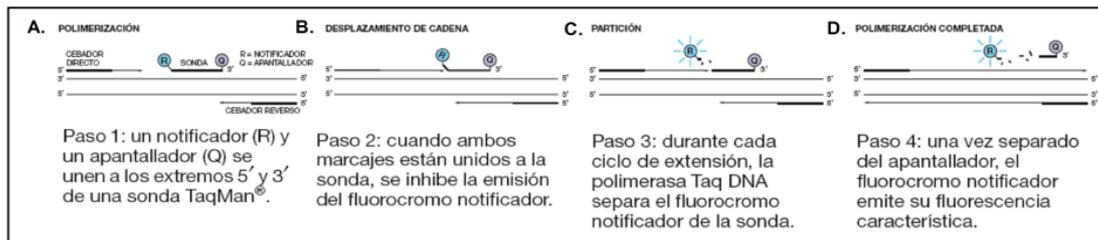


Figura 7. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto específico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a medida que se acumula durante la reacción (Figura extraída de "Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System: Guía de reactivos" 2006, 2010).

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 los *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®* utilizados para el estudio de la expresión de los genes de interés.

Gen	Referencia	Longitud del amplicón (pb)
TLR2	Hs00610101_m1	80
TLR4	Hs00152939_m1	
TLR5	Hs01019558_m1	
MUC1	Hs00159357_m1	
MKP1	Hs00610256_m1	
MIF	Hs00236988_m1	
IL8	Hs00174103_g1	
GR α	Hs00353740_m1	
GADPH	4352339E	118

Tabla 7. Ensayos de Expresión Génica TaqMan® utilizados en la RT-PCR a tiempo real (Applied Biosystems). Definición de abreviaturas: TLR2: Receptor tipo Toll2; TLR4: receptor tipo Toll 4; TLR5: receptor tipo Toll 5; MUC1: mucina tipo 1; MKP1: Protein Kinasa Fosfatasa activadora de mitógeno 1 ("Mitogen Activated Protein Kinasa Phosphatase 1"); IL8: interleucina 8; GR α : Receptor glucocorticoideo alfa; NADPH oxidasa 4; GADPH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (control endógeno)

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

- **1 μ L de ADNc sintetizado en la transcripción inversa**
- **5 μ L de TaqMan® Gene Expression Master Mix**
- **0,5 μ L de la sonda y cebadores correspondientes**
- **3,5 μ L de agua dietilpirocarbonato (DEPC).**

La PCR se desarrolló en un termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C, un ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.

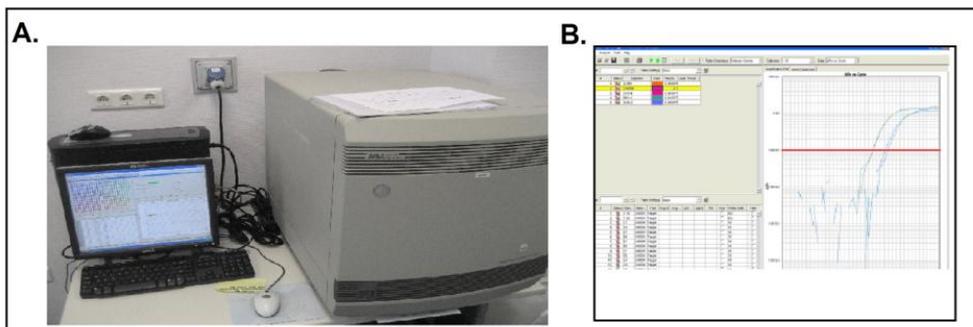


Figura 8. RT-PCR a tiempo real. A. Termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-PCR). B. Software RQ Manager utilizado para el análisis de las curvas de amplificación obtenidas y la cuantificación de la expresión génica.

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. Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que se alcanza el nivel prefijado de fluorescencia. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la retrotranscripción inversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

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

En este método se utiliza la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

Siendo:

$$\Delta Ct_1 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 1}$$

$$\Delta Ct_2 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 2}$$

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 de referencia sea aproximadamente igual. El proveedor de las sondas utilizadas en los experimentos garantiza que la eficiencia en las reacciones es de 1. Se estudió cada muestra por duplicado, se corrigieron los valores frente al gen referencia y se normalizaron frente al grupo control. Se calculó el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los distintos grupos y se representó junto al grupo control, cuyo valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es igual a 1. El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equivale a la expresión relativa de ARNm de un determinado gen.

3.2.3.4. Experimentos ARNip.

Los ARN pequeños de interferencia (ARNip), incluido el ARNip control codificado, fueron adquiridos a Ambion® (Huntingdon, Cambridge, UK). Se utilizó como gen diana ARNip de MUC1 (número de identificación 4392420), diseñado por Ambion®, y con dicho ARNip (50nM) se transfectaron células Beas-2b en un medio con suero y libre de antibióticos. Después de un periodo de 6 horas, el medio fue aspirado y remplazado por otro medio que contenía igualmente suero durante otras 42 horas antes de la estimulación celular. El reactivo usado para la transfección fue Lipofectamine-2000® (Invitrogen, Paisley, UK) a una concentración final de 2 µg/mL.

3.2.4. Estudio de la expresión proteica. Western Blot.

La técnica de Western Blot fue utilizada para detectar cambios en la expresión proteica de MUC1-CT (21kD), Fosfo-ERK 1/2 (42-44 kD), MKP1 (40kD), GR α (94 kD) y Fosfo-GR-Ser 226 (86kD; anticuerpo monoclonal, origen: conejo; Novus Biologicals (NB100-92540) en células Beas-2b y tejido de PN. Las células de los PN y las células Beas-2b fueron homogeneizadas y raspadas de un matraz confluyente de 25 cm². Las células se lisaron en hielo, con una solución amortiguadora de lisis, que consiste en un cóctel plus inhibidor 1nM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Roche Diagnostics Ltd. West Sussex, UK) con 20 nM de Tris base, 0,9% de ClNa, 0,1% Tritón X-100, 1 nM de Ditiotreitól y 1 µg/mL de pepstatina A. Se extrajo proteína nuclear y citoplasmática con el kit de extracción *Nuclear active motif kit* (Active Motif, Europa, Rixensart, Bélgica) de acuerdo al protocolo del fabricante. El ensayo *Bio-Rad Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, UK) 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.

Se empleó la electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas desnaturalizadas (15 µg) y el marcador de peso molecular *Bio-Rad Kaleidoscope marker* se cargaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida, 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 difluoruro de polivinilideno utilizando un método de transferencia semi-húmeda. La membrana fue bloqueada con BSA 5% en PBS con

0,1% de TWEEN®20 durante 3 horas e incubada con los anticuerpos primarios descritos en párrafos anteriores , y normalizados con los anticuerpos totales de β -actina (origen: ratón; dilución: 1:1000; monoclonal; Referencia: Sigma-Aldrich (A1978)), anticuerpos totales de ERK1/2 (origen: conejo; dilución: 1:1000; monoclonal, Referencia: Cell Signalling, Boston, Massachusetts, USA, catálogo nº 4695)) o anticuerpo total de GR α , según correspondiera.

El método utilizado para la detección de la proteína es un método basado en la detección por quimioluminiscencia y para ello se utilizaron los reactivos *ECL plus* (Amersham GE Healthcare).

La densitometría fue realizada con el software ImageJ 1.42q (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, USA). Los resultados se expresaron en ratios de controles endógeno de β -actina, ERK 1/2 total o GR α , según corresponda, y normalizados al grupo control.

3.2.5. Inmunoprecipitación.

Cantidades iguales de proteína (200 μ g) de extractos totales, citoplásmicos o nucleares, fueron incubados con anticuerpos anti-MUC1-CT y anti-GR α . Los complejos inmunológicos fueron precipitados con Proteína G en cuentas de flujo rápido de Sepharose 4B (Sigma (P-3296)), durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, Fueron lavadas 3 veces con solución amortiguadora NET, que contiene 50mM Tris-ClH, pH 8.0, 150mM ClNa, y 0.1% Nonidet P-40. El material unido se eluyó en inmunoprecipitados usando un de tampón de carga SDS-PAGE, que contiene: SDS 10%, Tris-Hcl 1M, pH 6.8, Glicerol 50%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 2%; a 100°C durante 10 minutos. Los complejos de proteínas inmunoprecipitados fueron analizados usando la técnica de Western Blot descrita en líneas superiores, y fueron enfrentados con los anticuerpos anti-anti-GR α o anti—MUC1-CT correspondientes.

Los experimentos que se muestran en la figura siguiente son co-inmunoprecipitaciones (o inmunoprecipitaciones de complejos inmunes). Esto significa que después del experimento llevado a cabo en células con dexametasona, los extractos de proteína (ya sean nucleares, citoplásmicos o totales) son inmunoprecipitados con un anticuerpo (por ejemplo anti-GR α). En este periodo de tiempo el anticuerpo captura el inmunocomplejo celular GR que puede estar interactuando con otras proteínas (en nuestro caso estamos analizando la interacción con MUC1-CT). El anticuerpo GR α es añadido en exceso (2 μ g) para lograr la precipitación de todos los complejos celulares GR α posibles. En este paso, tenemos un exceso de complejos GR α (que están elevados en los extractos nucleares después de la exposición a dexametasona, y bajos en los citoplásmicos, igualmente después de la exposición a dexametasona). Aunque, en el siguiente paso, los co-inmunoprecipitados son añadidos a una suspensión con Proteína G en

cuentas de flujo rápido de Sepharosa 4B (Sigma (P-3296)), donde los complejos IgG-GR anticuerpo-GR α saturan todos los sitios de unión de la Sepharosa. Si bien, en este paso no podemos diferenciar entre las cantidades nucleares GR α o citoplásmicas GR α , porque todo extracto celular GR α está unido al anticuerpo GR α y todas las cuentas de Sepharosa 4B están saturadas de complejos anticuerpo GR α - extracto celular GR α . Este método es usado para apreciar cambios solo en la cantidad de proteínas que están formando complejos con extracto celular proteico GR α , pero no para cambios en dichos extractos celulares, que son siempre constantes debido a la saturación de las cuentas de Sepharosa 4B (sirva como ejemplo Chen YT, Am J Pathol. 2010 Sep;177(3):1255).

Para entender mejor el proceso descrito en líneas anteriores se expone la siguiente figura:

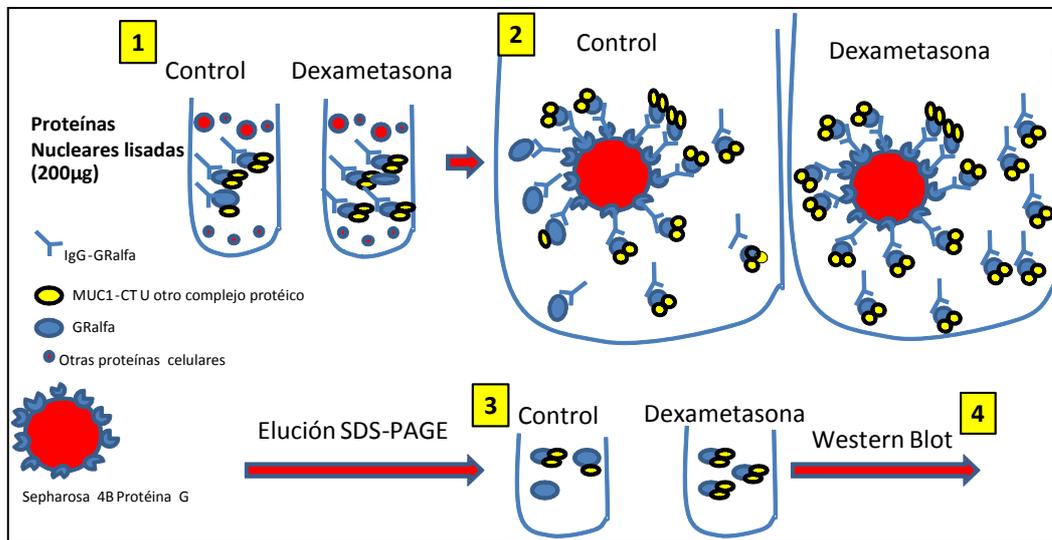


Figura 9. Proceso seguido en experimentos de inmunoprecipitación. SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

3.2.6. Estimulaciones *In Vitro*.

Para los estudios *In vitro* Las células epiteliales primarias de PN o las células Beas2b fueron estimuladas con agonista TLR2 peptidoglicano (PGN; *in vivo* Gen; 10 µg/ml), agonista TLR4 lipopolisacárido (LPS; *in vivo* Gen; 1 µg/ml) o agonista TLR5 flagelina (*in vivo* Gen; 1 µg/ml) durante el tiempo indicado. Dos horas antes del estímulo fue añadida Dexametasona (Sigma; 1 µM), y media hora antes del estímulo fue añadido el inhibidor de ERK1/2 PD98059 (Sigma; 1 µM). En otros experimentos las células fueron silenciadas para el gen MUC1 durante 48h y posteriormente estimuladas tal y como se describe en líneas superiores, en presencia o ausencia de Dexametasona.

3.2.7. Ensayos ELISA para IL-8 y GM-CSF.

El análisis de la liberación de IL-8 y GM-CSF activos se realizó utilizando el kit *Human CXCL8/IL-8 DuoSet* y el kit *Human GM-CSF Quantikine ELISA* (R&D Systems, Nottingham, UK; nº de catálogo DY208 y DGM00), que permiten determinar cuantitativamente los niveles de IL-8 y GM-CSF en el sobrenadante de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante análisis paramétrico o no paramétrico, según corresponda. El valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Se utilizó un análisis no paramétrico para comparar los resultados obtenidos a partir de las células epiteliales de PN. En este caso, los resultados se representan como medianas, rango intercuartil y valores mínimos y máximos. Cuando la comparación solamente concernía a dos grupos, las diferencias entre grupos fueron analizadas con el test de Mann-Whitney. Cuando la comparación fue entre varios grupos (PNsA, PN-ATA, PN-AIA y PN-CR), en primer lugar se realizó un análisis de varianza de una vía no paramétrico (Test de Kruskal-Wallis). En el caso de una diferencia significativa global, se evaluó las comparaciones entre grupos con el test posthoc de Dunn, que generaliza el procedimiento de ajuste por Bonferroni.

Los experimentos *in vitro* para el estudio de los mecanismos implicados fueron realizados en Células epiteliales primarias de PN y células Beas2b. En este caso, se expresaron los resultados como la media (error estándar) de n experimentos, ya que se confirmó la distribución normal de cada conjunto de datos mediante análisis de histograma y test de Kolmogorov-Smirnov. En este caso, el análisis estadístico fue realizado por análisis paramétrico. Las comparaciones entre dos grupos fueron realizadas utilizando el test de Student de dos colas para muestras apareadas (en el caso de muestras dependientes) o el test de Student de dos colas para muestras desapareadas (para muestras independientes). Las comparaciones múltiples fueron analizadas por análisis de varianza de una vía o de dos vías seguido de tests post hoc de Bonferroni.

4-RESULTADOS.

4. RESULTADOS.

4.1. La expresión y distribución de TLRs y MUC1 están alteradas en las muestras de pólipos nasales de pacientes corticorresistentes.

Los pacientes (n=73) con rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal (RSCcPN) y sin respuesta, ni clínica ni en el examen endoscópico, a la terapia corticoidea intranasal después de 3 meses de tratamiento, son reclutados para iniciar un tratamiento oral de 15 días de duración de corticosteroides orales. Al final de la terapia oral, 19 pacientes fueron clasificados como corticorresistentes al no aparecer en el examen endoscópico una disminución en el Score de, al menos, un grado. En la siguiente tabla se muestran las características clínicas de los pacientes en el momento de iniciar la terapia corticoidea oral.

	PNsA	PN-ATA	PN-AIA	PN-CR
N	12	8	34	19
Edad (años), media (rango)	58.8 (38-75)	57 (43-69)	57.2 (21-77)	54.8 (26-79)
Género (hombre/mujer)	8/4	3/5	9/25	8/11
Asma, no. (%)	0 (0)	8 (100)	34 (100)	12 (63.2)
Intolerancia a la Aspirina no. (%)	0 (0)	0 (0)	34 (100)	10 (52.6)
Atopia, no. (%)	3 (25)	3 (37.5)	16 (47)	6 (31.5)
Toma de corticosteroides intranasales no. (%)	12 (100)	8 (100)	34 (100)	19 (100)
PN bilateral score endoscópico, media (SEM)	5.50 (0.48)	5.75 (0.56)	5,79 (0.29)	5,68 (0.53)

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes al inicio de la terapia oral. Definición de abreviaturas: PNsA: poliposis Nasosinusal sin Asma; PN-ATA PN con asma y con tolerancia a la aspirina; PN-AIA: PN con asma e intolerancia a la aspirina; PN-CR: PN corticorresistente.

La familia de los receptores TLR, glicoproteínas de transmembrana tipo I que reconocen patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos y estimulan una variedad de respuestas inflamatorias, juega un papel fundamental en el reconocimiento de agentes patógenos así como en la inducción y regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa en el epitelio de los PN (59). En este trabajo de tesis doctoral se observó una alteración en la expresión de los receptores TLR en las muestras de epitelio de PN en los diferentes grupos de pacientes que componen el estudio, comparando su distribución en el epitelio antes y después del tratamiento con corticoesteroides orales.

El receptor de TLR2, que se encuentra situado en la superficie celular y su ligando, ácido lipoteicoico, en la pared de bacterias Gram+, fue estudiado en primer lugar. Se apreció como el receptor TLR2 demostraba una expresión débil en pacientes de los grupos PNsA, PN-ATA y PN-AIA, mientras que en el grupo de pacientes PN-CR la expresión de TLR2 se encontró significativamente aumentada y ampliamente distribuida por el epitelio del PN tras el tratamiento con corticoide oral. En cambio, el receptor TLR4, responsable del reconocimiento de lipopolisacáridos de la pared bacteriana de bacterias Gram-, no demostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos y se distribuyó de manera homogénea en el epitelio de PN en todos ellos. Por último, el receptor TLR5, encargado de reconocer la flagelina de la pared bacteriana tanto de bacterias Gram+ como de Gram-, se expresó de manera similar en todos los grupos de pacientes, aunque sí se encontraron diferencias en la distribución en la muestra. En los pacientes pertenecientes al grupo PNsA se distribuyó principalmente en la lámina basal del epitelio, mientras que en el resto de grupos se expresó por todo el epitelio del PN. En la figura 10 podemos observar en los cortes de inmunohistoquímica como se distribuyen los receptores TLR, marcados en color marrón, en cada uno de los casos. Así, se aprecia como los receptores TLR2 aumentaron su expresión únicamente en el grupo de pacientes PN-CR tras el tratamiento con corticoesteroides orales, con una distribución homogénea por todo el epitelio de PN. El receptor TLR4 no presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos antes y después del tratamiento corticoideo oral, al igual que sucedió con el receptor TLR5, si bien, este último sí vio alterada su distribución en el epitelio de PN tras el tratamiento con corticoesteroides orales, tal y como se ha explicado en párrafos anteriores.

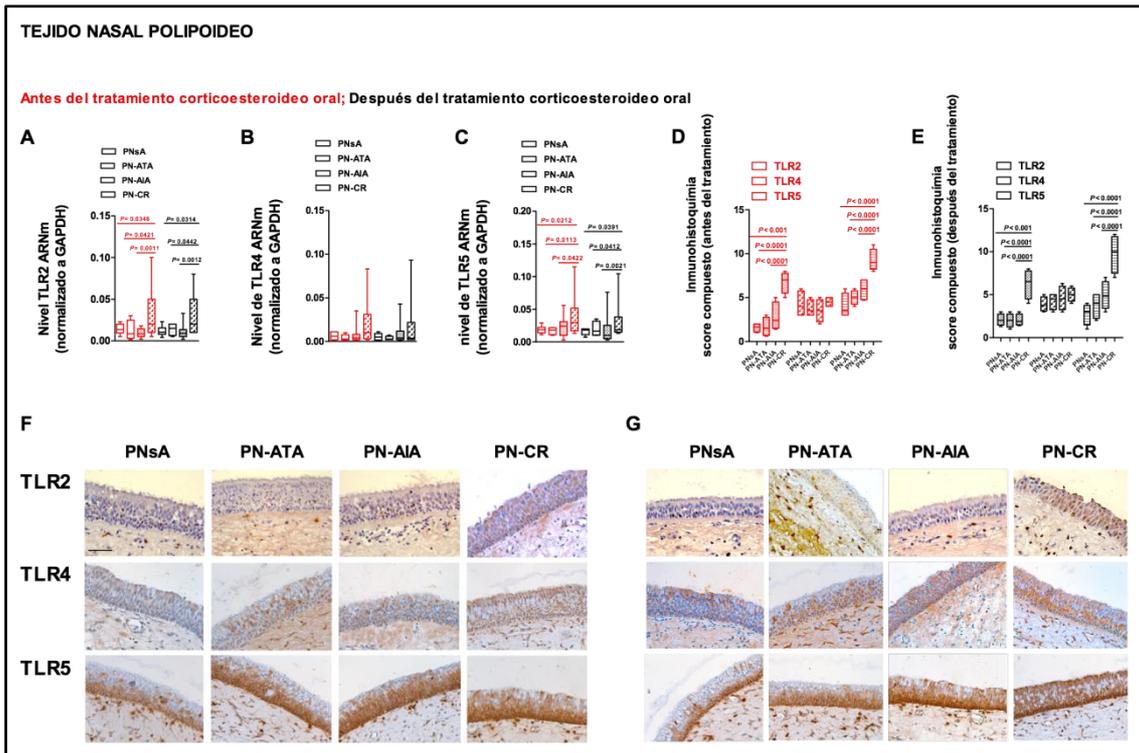


Figura 10. Expresión de receptores Toll-Like (TLR) en tejido polipoideo nasal de pacientes con rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal RSCcPN. Expresión del ARNm de **A**) TLR2, **B**) TLR4 y **C**) TLR5 en tejido de pólipo nasal de pacientes con poliposis nasosinusal sin asma (PNsA, n= 12), Poliposis nasosinusal con asma y con tolerancia a la aspirina (PN-ATA, n=8), poliposis nasosinusal con asma e intolerancia a la aspirina (PN-AIA, n=34), y poliposis nasosinusal y corticorresistencia (PN-CR, n=19); antes (gráficos en rojo) y después (gráficos en negro) del tratamiento con corticoesteroides orales. Los datos están expresados, con el método $2^{-\Delta C_t}$, como niveles de ARNm diana normalizados a niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El diagrama de caja representa el score compuesto de los marcadores de TLR2, TLR4 y TLR5 distribuidos en el tejido de pólipo nasal de los diferentes grupos de estudio, antes **(D)** y después **(E)** del tratamiento con corticoesteroides orales. **(F y G)** Inmunohistoquímica de tejido de pólipo nasal; las diferentes muestras de tejido polipoideo fueron inmunomarcadas para los marcadores TLR2, TLR4 y TLR5 (marrón) y sometidas a tinción de contraste con hematoxilina, antes **(F)** y después **(G)** de tratamiento oral con corticoesteroides. Se muestran imágenes representativas (escala 50 μ m). Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores P exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

La mucina de membrana MUC1 actúa como un receptor muy sensible, capaz de participar en múltiples señales intracelulares. Ejerce una función importante antiinflamatoria ya que actúa como inhibidora de la inflamación inducida por virus y bacterias en la vía aérea al inhibir la activación que producen estos virus y bacterias en varios receptores TLR. Como todas las mucinas de membrana, la MUC1 presenta las dos porciones polipeptídicas, extracelular e intracitoplasmática, y es en su terminal intracitoplasmática donde presenta una porción (*cytoplasmic tail, CT*) que modula múltiples señales intracelulares. MUC1 CT impide el ensamblaje de los receptores TLR con su ligando correspondiente inhibiendo así la puesta en marcha de los fenómenos inflamatorios en las células epiteliales de la vía aérea.

Una vez que se conoció que MUC1-CT podía ejercer su función anti-inflamatoria inhibiendo la activación de los receptores TLR, el siguiente paso fue explorar la expresión y distribución de MUC1 en la mucosa de PN. En este trabajo de tesis doctoral se apreció una baja expresión de ARNm de MUC1 en la muestra de tejido de PN de pacientes pertenecientes al grupo PN-CR comparado con los otros grupos del estudio, mientras que no se observó diferencias en la expresión entre las muestras de los grupos PNsA, PN-ATA y PN-AIA. (FIG 11, A-C). En la figura 11-D, en las imágenes correspondientes a inmunohistoquímica se aprecia de una manera más gráfica la afirmación anterior. En este caso MUC1, inmunomarcada en color marrón, se encontró presente por todo el epitelio de PN de los grupos PNsA, PA-AIA y PN-ATA. Por el contrario se pudo apreciar como su presencia estaba muy disminuida, en el caso de los pacientes pertenecientes al grupo PN-CR, en todo el espesor del epitelio de PN. En todos los grupos no hay diferencias en la distribución de MUC1 antes y después del tratamiento oral corticoesteroideo.

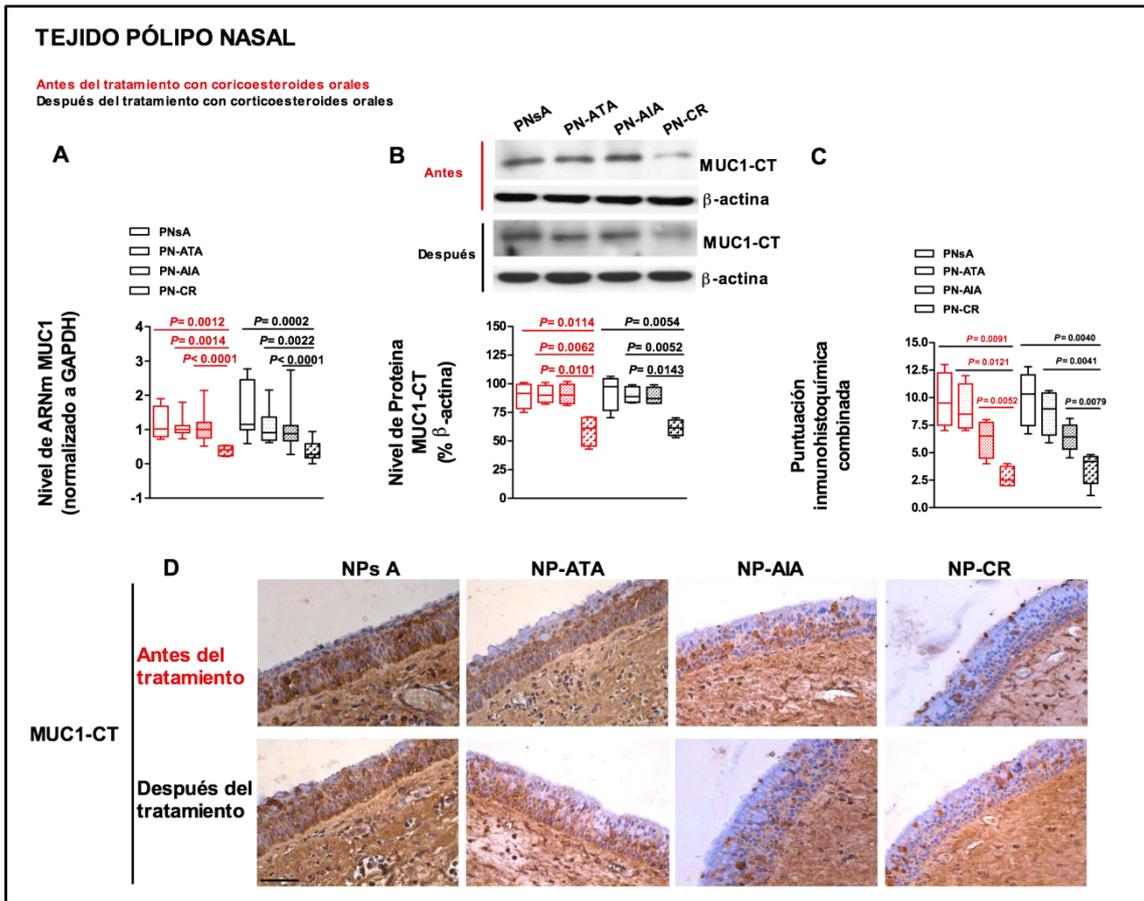


Figura 11. La expresión de MUC1 está disminuida en pacientes del grupo PN-CR. A) Expresión del ARNm de MUC1 en tejido de pólipos nasal de pacientes con poliposis nasosinusal sin asma (PNsA, n=12), Poliposis nasosinusal con asma y con tolerancia a la aspirina (PN-ATA, n=8), poliposis nasosinusal con asma e intolerancia a la aspirina (PN-AIA, n=34), y poliposis nasosinusal y corticorresistencia (PN-CR, n=19); antes (gráficos en rojo) y después (gráficos en negro) del tratamiento con corticosteroides orales. Los datos están expresados, usando el método $2^{-\Delta Ct}$, como niveles de ARNm de MUC1 normalizados a niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). **B)** Se realizó análisis por western-blot de la expresión de la proteína MUC1-CT en los pacientes de los grupos, PNsA, PN-ATA, PN-AIA y PN-CR. Se muestran imágenes representativas de western-blot para MUC1-CT, con el control interno β -actina, antes y después del tratamiento corticoesteroideo oral, en los diferentes grupos de estudio. **C)** El diagrama de caja representa el score compuesto de los marcadores de MUC1-CT distribuidos en el tejido de pólipos nasal en todos los grupos de estudio, antes (rojo) y después (negro) del tratamiento con corticosteroides orales. **D)** Inmunohistoquímica de tejido de pólipos nasal; las diferentes muestras de tejido polipoideo fueron inmunomarcadas para el marcador MUC1-CT (marrón) y sometidas a tinción de contraste con hematoxilina, antes y después de tratamiento oral con corticosteroides. Se muestran imágenes representativas (escala 50 μ m). Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores P exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

4.2. Análisis de la expresión y distribución de marcadores de corticorresistencia en tejido de pólipo nasal.

En este experimento de la tesis doctoral se analizó la expresión de diferentes marcadores de corticorresistencia, como son MKP1, IL-8, MIF y GR α , en cada uno de los grupos de pacientes que componen el estudio, antes y después del tratamiento corticoesteroideo oral.

Es sabido que los corticoesteroides realizan algunas de sus funciones antiinflamatorias por medio de mecanismos post-transcripcionales, incluyendo la regulación positiva de las MKP1. Éstas inhiben la activación de la mayoría de las MAPKs, que son proteínas de señalización de procesos inflamatorios y proliferativos, de manera que la activación de diferentes citocinas pro inflamatoria y la puesta en marcha de la respuesta inflamatoria en la mucosa de la vía aérea se encuentran mediadas por MAPKs. En el análisis de la expresión de ARNm y de proteína de MKP1 en las muestras de tejido de PN en los cuatro grupos del estudio, se apreció como antes del tratamiento con corticoesteroides orales la presencia de MKP1 era escasa en todos los grupos; por el contrario, tras el tratamiento oral corticoideo, la expresión de MKP1 aumentó en los grupos PNsA, PN-ATA y PN-AIA. No ocurrió lo mismo en el grupo PN-CR, donde, incluso tras la exposición a los corticoesteroides, la expresión de MKP1 se encontró disminuida (FIG 12-A).

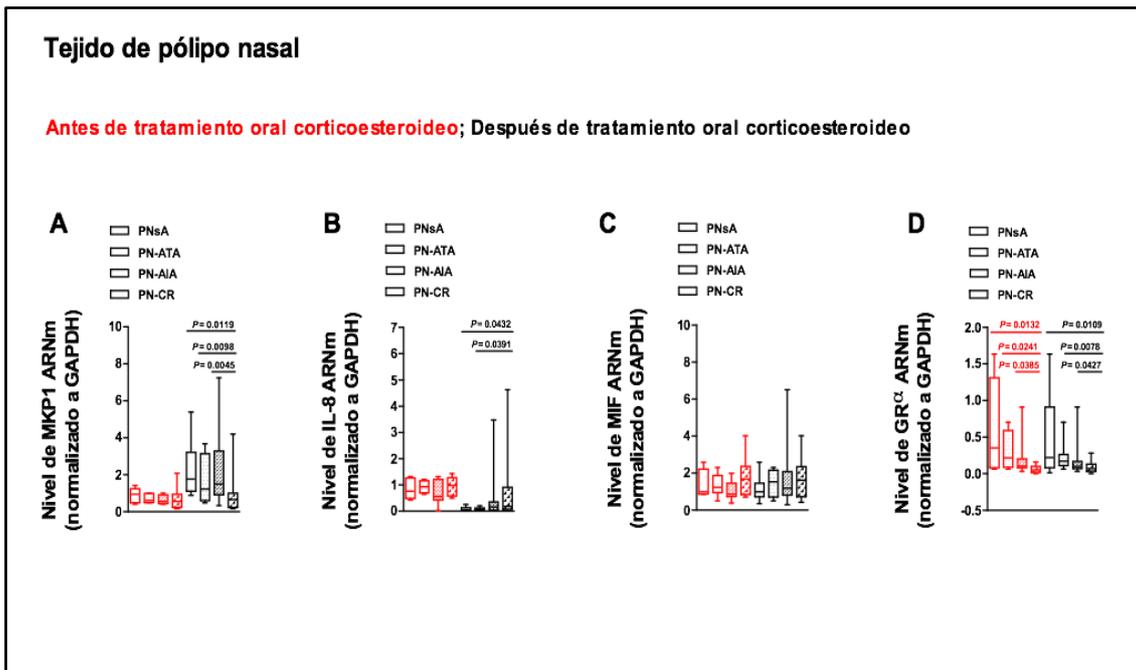


Figura 12. Expresión génica de marcadores de corticorresistencia en pólipo nasal de pacientes con RSC cPN. Expresión del ARNm de **A)** MKP1, Protein cinasa activada por mitógenos fosfatasa 1 (Mitogen-activated protein Kinase phosphatase 1), **B)** IL-8, Interleucina 8, **C)** MIF, Factor inhibidor de la migración de macrófagos, **D)** GR α , Receptor de glucocorticoide α ; en tejido de pólipo nasal de pacientes con poliposis nasosinusal sin asma (PNsA, n= 12), Poliposis nasosinusal con asma y con tolerancia a la aspirina (PN-ATA, n=8), poliposis nasosinusal con asma e intolerancia a la aspirina (PN-AIA, n=34), y poliposis nasosinusal y corticorresistencia (PN-CR, n=19); antes (gráficos en rojo) y después (gráficos en negro) de tratamiento con corticoesteroides orales. Los datos están expresados, usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, como niveles de ARNm normalizados a niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores P exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

En segundo lugar se estudió la expresión y distribución de la IL-8 en las muestras de PN. La IL-8 es una quimioquina de naturaleza pro-inflamatoria que actúa como potente factor quimiotáctico de neutrófilos y monocitos, regula la producción de proteínas de adhesión, amplificando la respuesta inflamatoria local. Uno de los mecanismos antiinflamatorios de los corticoides ocurre a este nivel, bloqueando la traducción del ARNm de la IL-8, entre otras citocinas. (60) En los resultados obtenidos se comprobó como la expresión de IL-8, tras la toma de corticoesteroides orales, estaba aumentada en el grupo PN-CR, mientras que en el resto de grupos la expresión de la misma se encontró disminuida de una manera muy significativa (FIG 12- B).

Siguiendo con el estudio de expresión de marcadores de corticorresistencia se analizó la expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en las muestras de PN (FIG 12-C). El MIF, una de las primeras citocinas pro-inflamatorias que se describió, es producido por diferentes tipos de células y tejidos como células T, macrófagos, monocitos, etc. Interviene en

el proceso inflamatorio estimulando la expresión y secreción de citocinas pro-inflamatorias como son el TNF- α , el interferón gamma (IFN- γ), la IL-1b, la IL-6, la IL-2 y la IL-8 y pudiendo, a su vez, contra regular el efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides (61, 62). En esta tesis doctoral se apreció como el MIF no aumentó su expresión en ninguno de los grupos de pacientes que componen el estudio en curso, incluso tras el tratamiento con corticoesteroides orales.

Por último se analizó la expresión del receptor de glucocorticoides α (GR α), que es el receptor específico al que se une el corticoesteroide. El receptor libre (no unido a ligando) se localiza en el citoplasma de la célula, pero cuando se une al ligando el complejo receptor/glucocorticoide formado puede seguir por dos rutas diferentes: si se transloca al núcleo, el complejo activará la expresión de proteínas anti-inflamatorias; si se mantiene en el citoplasma, el complejo reprimirá la expresión de proteínas pro-inflamatorias impidiendo la translocación de otros factores de transcripción del citoplasma al núcleo. En el presente estudio se apreció que la expresión de GR α apareció significativamente disminuida en las muestras de tejido y en las células epiteliales de pacientes pertenecientes al grupo PN-CR, tanto antes como después de la exposición a corticoesteroides orales, comparado con el resto de los grupos PNsA, PN-AIA y PN-ATA. Igualmente la expresión de GR α mostró una correlación con la expresión de MUC1 (Spearman $\rho = 0.59$, $P < 0.0001$) (FIG 12, D-E).

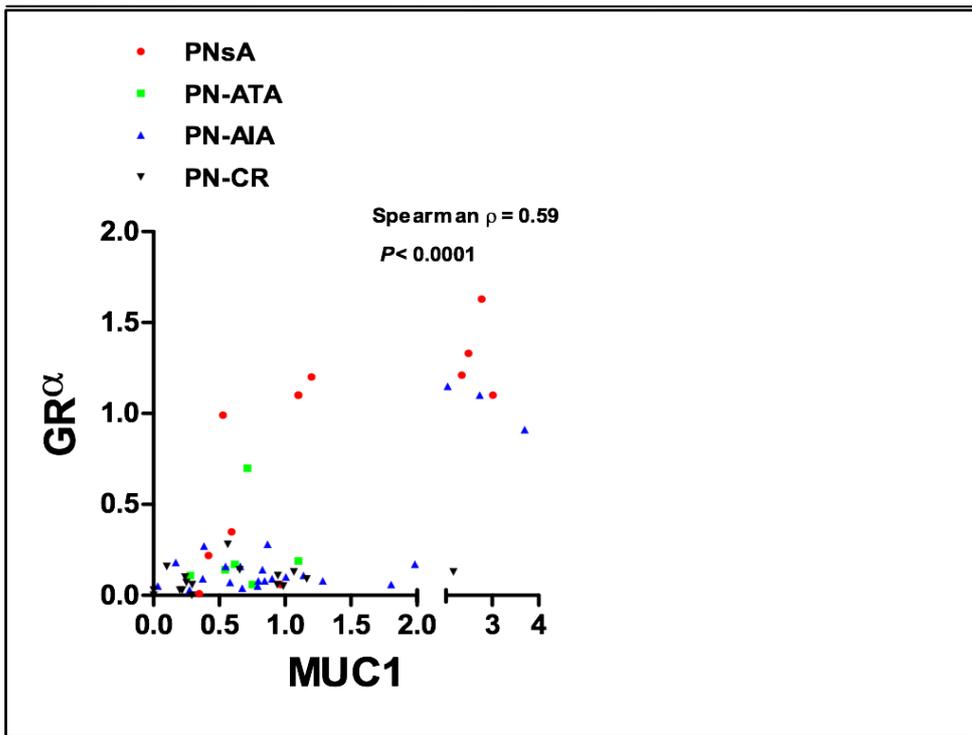


Figura 12-E. Correlación entre la expresión de MUC1 y GR α . Gráfica que muestra la correlación existente entre la expresión de MUC1 y la expresión de GR α en los diferentes grupos de pacientes con RSCcPN, apreciándose una mayor correlación en el grupo de pacientes corticorresistentes (PN-CR).

Del mismo modo, se realizó otro experimento para analizar proteínas de marcadores corticorresistentes en tejido de pólipo nasal de los pacientes de los diferentes grupos del presente estudio. En este caso fue analizada la expresión de GR α , MKP1 y fosfo-ERK1/2, antes y después del tratamiento con corticoesteroide oral, en cada uno de los grupos del estudio. La expresión de GR α , se encontró disminuida en el grupo PN-CR, en comparación con el resto de grupos, PNsA, PN-ATA y PN-AIA, tanto antes como después del tratamiento corticoideo. En cuanto a la expresión de MPK1, ésta era muy escasa en todos los grupos de pacientes antes del tratamiento corticoesteroideo, y tras él la expresión se aumentó en todos los grupos, si bien el aumento en el grupo PN-CR fue significativamente menor, comparado con el resto de grupos. Por último, la fosforilación de ERK1/2 se apreció sobre expresada en las muestras de pacientes del grupo PN-CR ($P < 0.05$) respecto al resto de grupos tras el tratamiento corticoesteroideo oral y, en menor grado, en las muestras del grupo PN-AIA ($P < 0.05$) respecto a los grupos PNsA y PN-ATA. En la figura 13 se pueden apreciar dichos resultados en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. La muestra fue inmunoteñida para anticuerpos GR α y MKP1 (seguido de anticuerpos secundarios con fluoresceína, en color verde), ó fosfo-ERK1/2 (en color marrón).

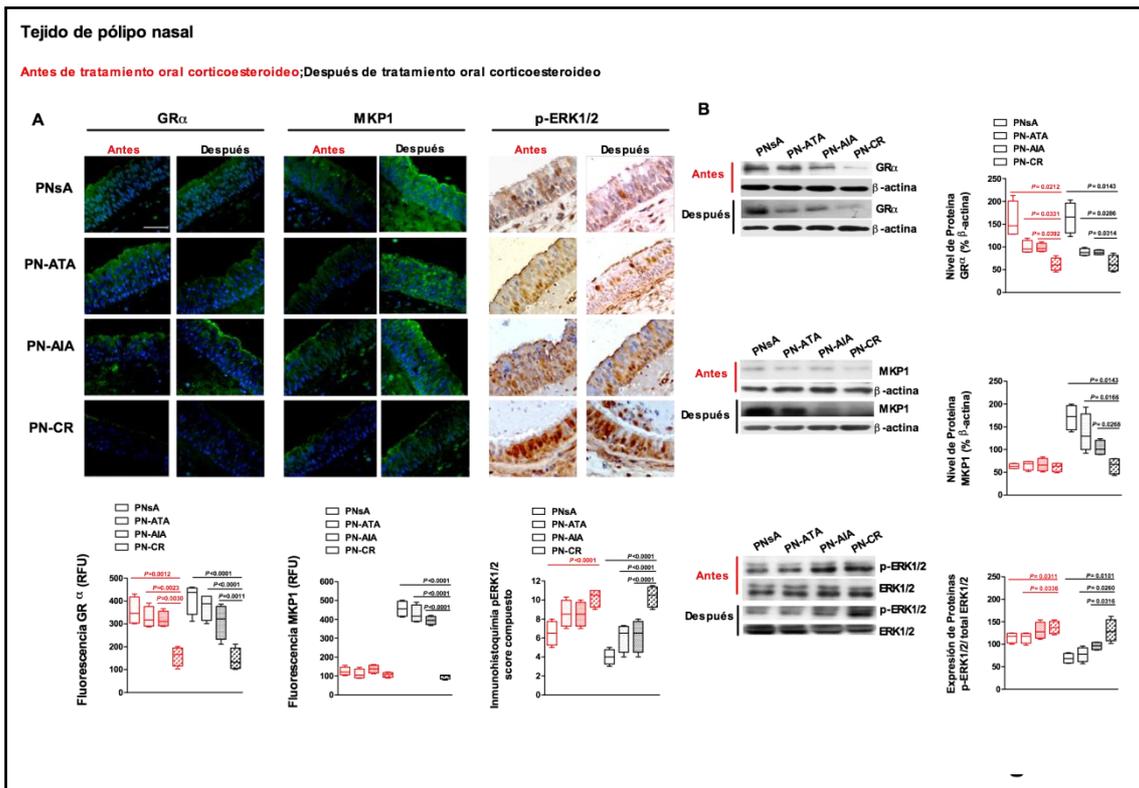


Figura 13. Expresión de proteínas de marcadores corticorresistentes en tejido de pólipo nasal de pacientes con RScPN. A) Muestra de tejido de PN. Se realizó inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. La muestra fue inmunotefñida para anticuerpos GR α y MKP1 (seguido de anticuerpos secundarios con fluoresceína, en color verde), ó fosfo-ERK1/2 (marrón) y sometido a contratinción con 4',6-diamidino-2-Fenilindol (DAPI) (marcador fluorescente), ó hematoxilina (visible). Se muestran imágenes representativas tanto de inmunohistoquímica como de inmunofluorescencia, antes (rojo) y después (negro) de la exposición a tratamiento oral con dexametasona. Escala 50 μ m. **B)** Análisis por Western-blot de la proteína de expresión de GR α , MKP1 y fosfo-ERK1/2 en pacientes pertenecientes a los grupos PNsA, PN-ATA, PN-AIA y PN-CR, antes (rojo) y después (negro) del tratamiento con dexametasona. Se muestran imágenes representativas de western-blot de los diferentes experimentos. Los datos están expresados como niveles de proteínas determinados por densitometría relativa a β -actina o niveles totales de proteína ERK1/2. Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores P exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

4.3. Análisis de los efectos de la dexametasona en las células epiteliales de pólipo nasal.

Para analizar de forma aislada el efecto anti-inflamatorio de los corticoides sobre el epitelio del PN se procedió al aislamiento y cultivo de células epiteliales de PN de pacientes respondedores y no respondedores a los corticoides orales. Una vez obtenido el cultivo celular se procedió a la estimulación con diferentes agonistas de los receptores TLR, como son LPS (agonista de TLR4), PGN (agonista de TLR2) y flagelina (agonista de TLR5) en presencia o ausencia de dexametasona 1 μ M. En células procedentes de pacientes respondedores a corticoides, dexametasona inhibió la secreción de IL-8 inducida por LPS y por flagelina en un 56% y un 70% respectivamente. Del mismo modo la dexametasona redujo la secreción de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) en un 63% y un 94% tras el estímulo con LPS y flagelina respectivamente. Por el contrario las células epiteliales de PN pertenecientes a pacientes del grupo PN-CR, no presentaron ninguna respuesta a la dexametasona lo cual confirma los efectos observados *in vitro* pero a nivel celular. En la figura 14, se aprecia como los niveles de IL-8 y de GM-CSF disminuyen tras la exposición a dexametasona en el grupo PNsA (FIG 14, A y C), mientras que por el contrario, los niveles de éstos no se vieron alterados por la dexametasona en el grupo PN-CR (FIG 14 B y D).

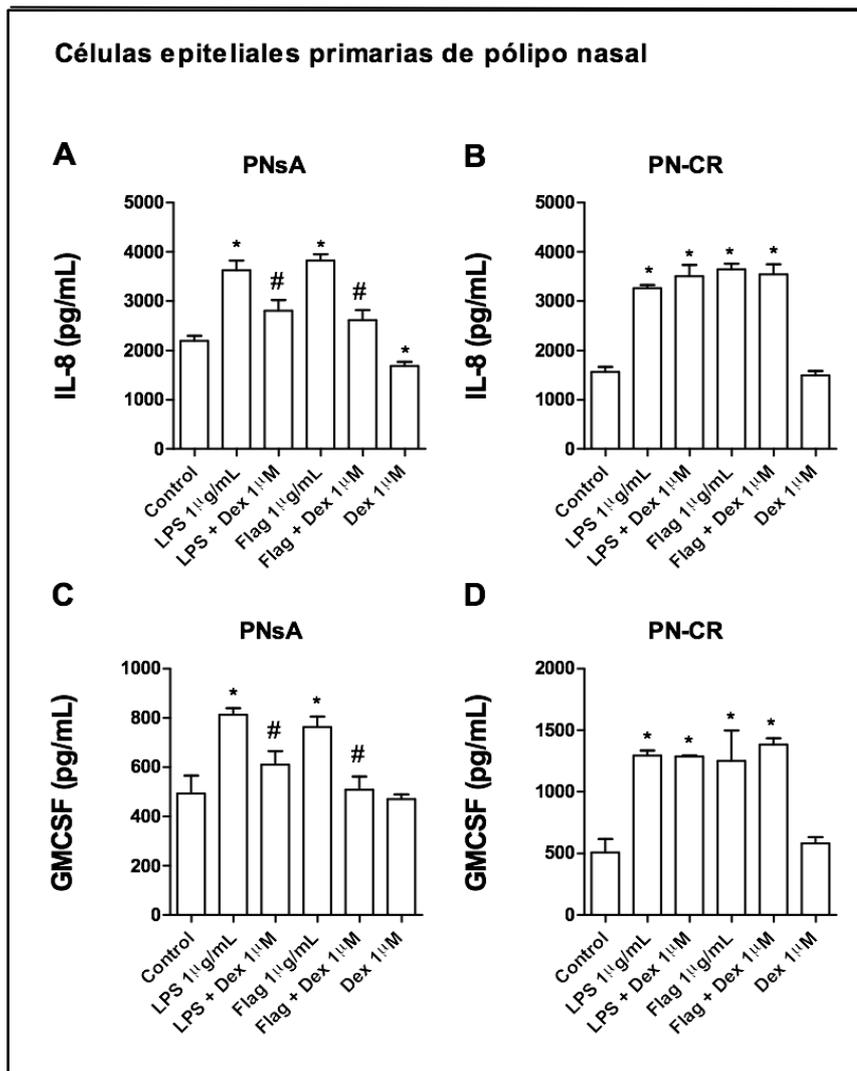


Figura 14. Efecto de la exposición a dexametasona en células epiteliales de pólipos nasales de pacientes de los grupos PNsA y PN-CR, siendo éste último grupo no sensible a la dexametasona. Células epiteliales primarias obtenidas de muestras de pólipos nasales de pacientes pertenecientes a los grupos PNsA (n=4) y PN-CR (n=4) fueron incubadas, con y sin exposición a dexametasona 1 μ M, durante dos horas, y posteriormente estimuladas durante 24 horas con lipopolisacárido (LPS) 1 μ M/mL o flagelina (Flag) 1 μ M/mL. La medición de la concentración de interleuquina 8 (IL-8) y de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) fue determinada por ELISA. En esta figura los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=3 (dos a tres poblaciones de células de pólipos nasales) experimentos por condición. Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido de test post hoc de Bonferroni. *P<0,05 comparado con control; #P<0,05 comparado con el estímulo de LPS o Flagelina.

Para continuar con la línea de estudio se analizó la contribución de MUC-1 en el efecto anti-inflamatorio de la dexametasona. Para ello se silenció la expresión de MUC1 por medio de ARN de interferencia para MUC1 (siARN-MUC1), el cual se vehiculizó al núcleo de células epiteliales bronquiales Beas2b. Una vez suprimida la expresión de MUC1 se procedió al estímulo celular con flagelina, LPS o PGN, en presencia o ausencia de dexametasona. En las células sin expresión de MUC1 (siARN-MUC1) se apreció un incremento significativo de la liberación de IL-8 y GM-CSF tras la estimulación con flagelina, LPS o PGN, en comparación con las células control (siARN (-)) ($P < 0.05$) (FIG 15).

En primer lugar se analizó y cuantificó en el grupo control como la dexametasona inhibe la secreción de IL-8, quimioquina pro-inflamatoria, tras la estimulación con diferentes agonistas de los receptores TLR, en este caso flagelina, LPS y PGN. Se pudo apreciar cómo tras estimulación con flagelina la disminución en la secreción de IL-8 fue del 45%, tras la estimulación con LPS fue del 70% y tras la estimulación con PGN del 52%. En cambio, el tanto por ciento de inhibición de la secreción de IL-8 inducido por dexametasona en las células con bloqueo de MUC1 fue menor que en el grupo control, llegando a un 10% tras estimulación con flagelina, un 40% tras la estimulación con LPS y una disminución del 25% tras la estimulación con PGN ($P < 0.05$) (FIG 15 A-C).

En segundo lugar se analizaron los resultados de liberación de GM-CSF en ambos grupos, grupo control y grupo con bloqueo de MUC1, siguiendo la misma metodología comentada en el párrafo anterior para el análisis de secreción de IL-8, y se encontraron resultados similares. En este caso, la dexametasona inhibió la secreción de GM-CSF en un 30%, 92% y 62% en células con expresión de MUC1, y de un 0%, 55% y 21% en células con bloqueo en la expresión de MUC1, tras la estimulación con flagelina, LPS y PGN respectivamente ($P < 0.05$) (FIG 15, D-F).

En ambos casos, la inhibición en la secreción de IL-8 y de GM-CSF tras la exposición a dexametasona fue menor en el grupo con bloqueo de MUC1 comparado con el grupo control, por lo que se puede afirmar que la expresión de MUC1 aumenta el efecto antiinflamatorio de la dexametasona en las células epiteliales de la vía aérea.

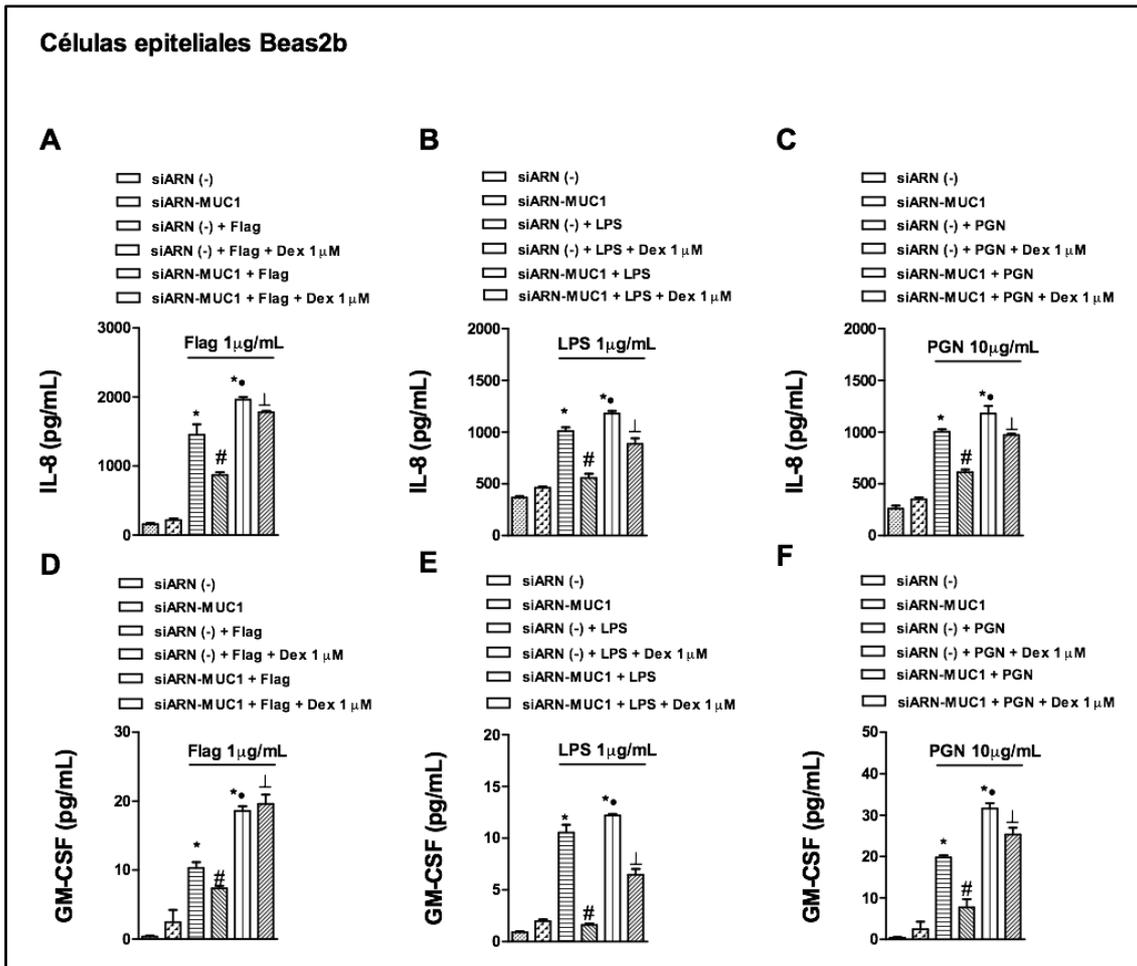


Figura 15. La expresión de MUC1 aumenta el efecto antiinflamatorio de la dexametasona en las células epiteliales de la vía aérea. Estudio del bloqueo de MUC1 por el ARN de interferencia (siARN-MUC1) o control negativo (siARN(-)) , se realizó un ensayo, añadiéndolos a células Beas2b. Posteriormente fueron estimuladas con flagelina (FLag; 1 μg/mL), Lipopolisacárido (LPS; 1 μg/mL) o Peptidoglicano (PGN; 10 μg/mL), en presencia o ausencia de dexametasona 1 μM, que fue añadida dos horas antes del estímulo comentado anteriormente. Después de 24 horas de estimulación, se realizó una cuantificación de IL-8 y GM-CSF por medio del método ELISA. En esta figura los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 experimentos independientes por condición. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido de test post hoc de Bonferroni. *P<0,05 comparado con el grupo no estimulado; #P<0,05 comparado con el estímulo en el grupo siARN(-). ●P<0,05 comparado con el estímulo en el grupo siARN(-). ⊥ P<0,05 comparado con las células tratadas con dexametasona en el grupo siARN(-).

4.4. Análisis de los efectos de la supresión MUC1 en las señales de activación celular mediadas por corticoides.

En el siguiente estudio de la presente tesis doctoral las células Beas2b fueron tratadas con dexametasona 1 μ M durante 24 horas y se realizó un análisis de la proteína de expresión de MUC1-CT, observando un aumento en la expresión de MUC1 a nivel celular. Posteriormente, las células epiteliales se transfectaron con siARN control negativo o siARN-MUC1 durante 48h, y, a posteriori, fueron estimuladas con dexametasona 1 μ M durante 24 horas. En el grupo de células control, tras la exposición a dexametasona se siguió apreciando expresión de MUC1. Por el contrario, el análisis por Western-Blot de proteínas, reveló una supresión de MUC1-CT en el grupo siARN-MUC1 (FIG 16 A).

En este experimento también se estudió el efecto de la dexametasona sobre la fosforilación de ERK1/2 (MAP kinasa), dicha fosforilación supone la activación de la transducción de señales pro-inflamatorias; así como el efecto del corticoesteroide en la expresión de MKP1, el cual inhibe la activación de MAPKs. De este modo, en las células control, la dexametasona inhibió significativamente la fosforilación de ERK1/2 después de estimulación con flagelina, LPS o PGN, mientras que en las células con bloqueo de MUC1 la dexametasona no demostró dicho efecto inhibitorio (FIG16 B). En cuanto a el análisis de la expresión de MKP1, en las células control, tras la estimulación con flagelina, LPS o PGN, el tratamiento con dexametasona supuso un incremento en la expresión de MKP1, al contrario de lo observado en las células siARN-MUC1, donde, tras la estimulación con flagelina, LPS y PGN y la exposición a dexametasona, no se apreció un aumento en la expresión de MKP1 (FIG 16 C).

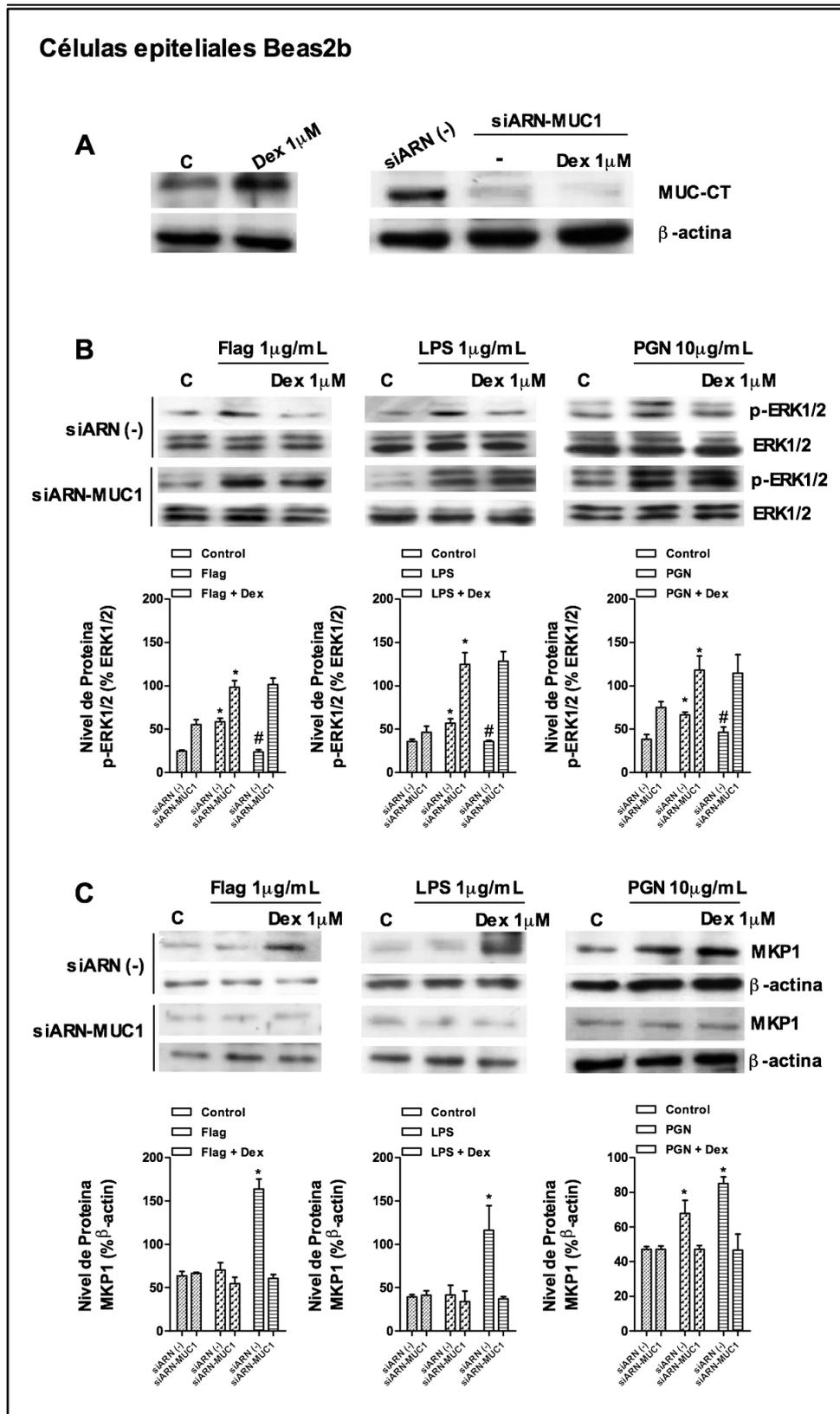


Figura 16. El bloqueo de MUC1 reduce el efecto inhibitorio de la dexametasona en la fosforilación de ERK1/2 y en la inducción de MKP1. A, Las células beas2b se transfectoron con siARN control negativo o siARN-MUC1 durante 48h, posteriormente fueron estimuladas con dexametasona 1µM durante 24 horas. Se muestran imágenes representativas de western-blot para MUC-CT. **B y C,** En las figuras se muestra como se realizó el bloqueo de MUC1 por el ARN de interferencia (siARN-MUC1) o el

control negativo (siARN(-)) en células Beas2b, seguido de la estimulación por Flagelina (Flag), Lipopolisacárido (LPS) o peptidoglicano (PGN), en presencia o ausencia de dexametasona 1 μ M, que fue añadida 2 horas antes de los estímulos comentados anteriormente. Después de 20 minutos (B) o 4 horas (C) de estímulo fueron medidos los niveles de fosfo-ERK1/2 y MKP1, respectivamente, utilizando western-blotting. Se muestran imágenes representativas de western-blot para ERK 1/2 y MPK1. Los datos son expresados como densitometría del ratio de niveles de proteína β -actina. En esta figura los resultados se expresan como la media (error estándar) de 3 experimentos independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Bonferroni. *P<0,05 comparado al control; #P<0,05 comparado al estímulo de LPS, Flagelina o PG.

El GR puede ser fosforilado en tres residuos diferentes de serina de su región terminal-N, Ser203, Ser211 y Ser226, los cuales intervienen en las funciones post-transcripcionales del receptor. Se ha demostrado que la fosforilación, individual o conjunta, de los residuos Ser203 y Ser211, es necesaria para el desarrollo de la actividad completa del GR (38, 63). Por el contrario, la fosforilación del residuo Ser226 origina una inhibición en la función del GR (64). Por ello y siguiendo con la línea de estudio, se examinó si agonistas de los TLR podían fosforilar el receptor glucocorticoides en el residuo Ser226 y analizar su efecto. Se comprobó que en células Beas2b, tras el estímulo con flagelina y PGN había un aumento de la fosforilación de GR-Ser226 (FIG 17 A); pero, tras añadir PD98059, un inhibidor de ERK1/2 en concreto de su activación por fosforilación, la fosforilación observada de GR-ser226 se encontró disminuida con respecto a la medición anterior. Este hallazgo sugirió que la ERK1/2 desempeña un papel importante en la fosforilación de GR-226.

Continuando con los experimentos se apreció que en las células con bloqueo de MUC1, tras el estímulo con flagelina, LPS o PGN, existía una hiperfosforilación de GR-Ser226 sin que se apreciase afectación en la expresión de GR α . Por el contrario, las células del grupo control mostraron una fosforilación modesta de GR-Ser226 incluso tras el estímulo con los agonistas TLR (FIG 17 B).

Para comprobar que los efectos observados *in vitro* también se reproducían *in vivo*, se procedió al análisis de GR-Ser226 en tejido de PN de los diferentes grupos de pacientes. De este modo se pudo comprobar que en los pacientes de grupo PN-CR, la fosforilación de GR-Ser226 fue significativamente mayor en la muestra de tejido polipoideo, comparado con los pacientes de los grupos PNsA, PN-ATA y PN-AIA; y , además, este aumento de la fosforilación estaba acompañado de una regulación a la baja de GR α (FIG 17 C).

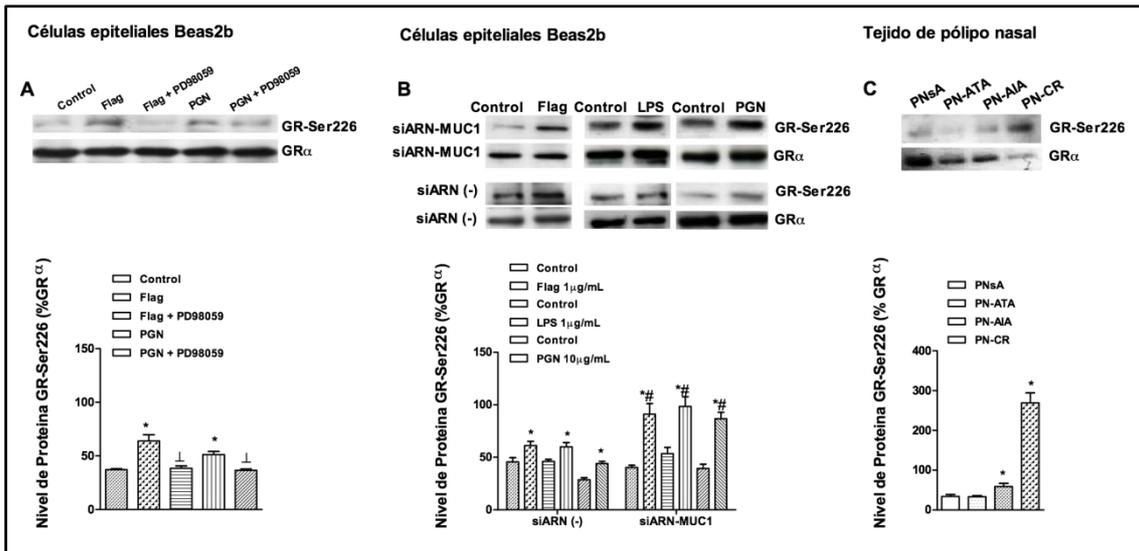


Figura 17. MUC1-CT reduce la fosforilación del receptor de glucocorticoide (GR-ser226). **A**, Se incubaron células Beas2b con el inhibidor PD98059 1 μ M, un antagonista de las cinasas extracelulares reguladas por señal (ERK1/2), durante 30 minutos, seguido de la estimulación durante 1 hora con flagelina (Flag 1 μ g/mL) o peptidoglicano (PGN 10 μ g/mL). **B**, Se realizó, en células Beas2b, un bloqueo de MUC1 por el ARN de transferencia (siARN-MUC1) o el control negativo (siARN(-)), seguido de estimulación con flagelina, lipopolisacárido (LPS 1 μ g/mL) o PGN, en presencia o ausencia de dexametasona 1 μ M, que fue añadida dos horas antes del estímulo. Tras una hora de estimulación, la fosforilación de GR-Ser226 y la expresión total de la proteína GR α fueron medidas usando western blotting. **C**, Muestras de tejido de pólipos nasal de pacientes del grupo PNsA (n=5), PN-ATA (n=4), PN-AIA (n=6) y PN-CR (n=7). En todas ellas se analizó la fosforilación de GR-Ser226 y el nivel total de proteína GR α . Imágenes representativas de western blot para cada uno de los experimentos. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de 3 experimentos independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Bonferroni. *P<0,05 versus control; \pm P<0,05 versus estímulo; #P<0,05 versus el grupo estimulado en células siARN(-).

Como ya hemos comentado en párrafos anteriores, la hiperfosforilación de GR-Ser226 ejerce una regulación negativa sobre la actividad de GR α , impidiendo su translocación al núcleo cuando se produce la interacción GR α y corticoide (65). Para analizar el papel de MUC1-CT sobre la translocación nuclear de GR α se utilizaron células beas2b con la proteína MUC1 silenciada así como células con expresión constitutiva de MUC1 (control). Todas las células se expusieron a dexametasona durante 4h, y tras ello se analizó la intensidad de las unidades relativas de fluorescencia (URF) de GR α en los núcleos celulares de células Beas2b. Se realizó una medición basal, sin la exposición a ningún tipo de estímulo, tanto en células control como en células siARN-MUC1, y la intensidad de URF de GR α fue similar en ambos tipos celulares ($P > 0,05$) (FIG 18). Posteriormente se realizaron mediciones tras la exposición a dexametasona y tras estímulo con flagelina, PGN y LPS. En las células control, tras la exposición a dexametasona, la intensidad de las URF de GR α se encontró significativamente expresada en comparación con las células con MUC1 silenciada ($P < 0,05$). Del mismo modo, tras el estímulo con flagelina, LPS y PDG, la intensidad de las URF de GR α fue mayor en las células control comparadas con las células con boqueo de MUC1 ($P < 0,05$). Si bien, a este respecto cabe señalar que la flagelina, PGN y LPS redujeron la eficacia de la dexametasona en la translocación del GR α hacia el núcleo celular, y este efecto fue mayor en las células si ARN-MUC1 (FIG 18).

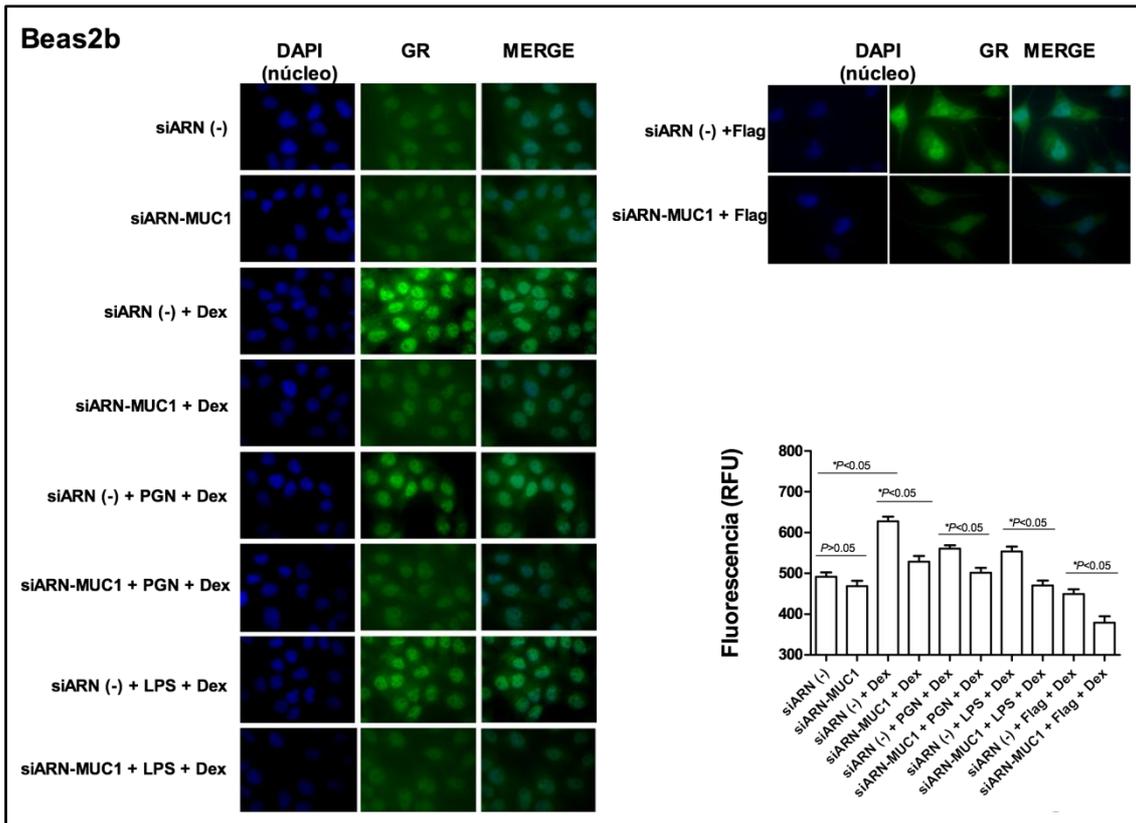


Figura 18. El bloqueo de MUC1 disminuye la translocación nuclear de GR α tras la exposición a dexametasona. Células Beas2b con MUC1 silenciada (siRNA-MUC1) o control (siRNA(-)) son expuestas a dexametasona (Dex; 1 μ M) durante 4 h. En otros experimentos, las células son estimuladas con PGN (10 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL), o flagelina (Flag; 1 μ g/mL) en presencia de Dexametasona durante 4 h. La muestra fue inmunoteñida para anticuerpos GR α seguido de anticuerpos secundarios apropiados con fluoresceína, en color verde. El núcleo fue teñido con 4', 6-diamidino-2-Fenilindol (DAPI) (marcador fluorescente). Se seleccionaron las regiones nucleares y se cuantificó la intensidad de la fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (URF). Los resultados se expresan como la media (error estándar) de 4 experimentos independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Bonferroni. Se muestran valores de $P < 0,05$, que indica la significación estadística entre los diferentes grupos.

4.5. Co-expresión de MUC1-CT y GR α .

Con el fin de estudiar cómo se produce la translocación nuclear de GR α en las células Beas2b tras la exposición a corticoides, dichas células fueron tratadas con dexametasona 1 μ M durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, en la visión con co-inmunofluorescencia se observó una superposición en la distribución citoplásmica de GR α y MUC1-CT en las células basales, así como una co-expresión nuclear de los mismos en las células estimuladas con dexametasona, lo cual sugiere una interacción física entre las dos proteínas.

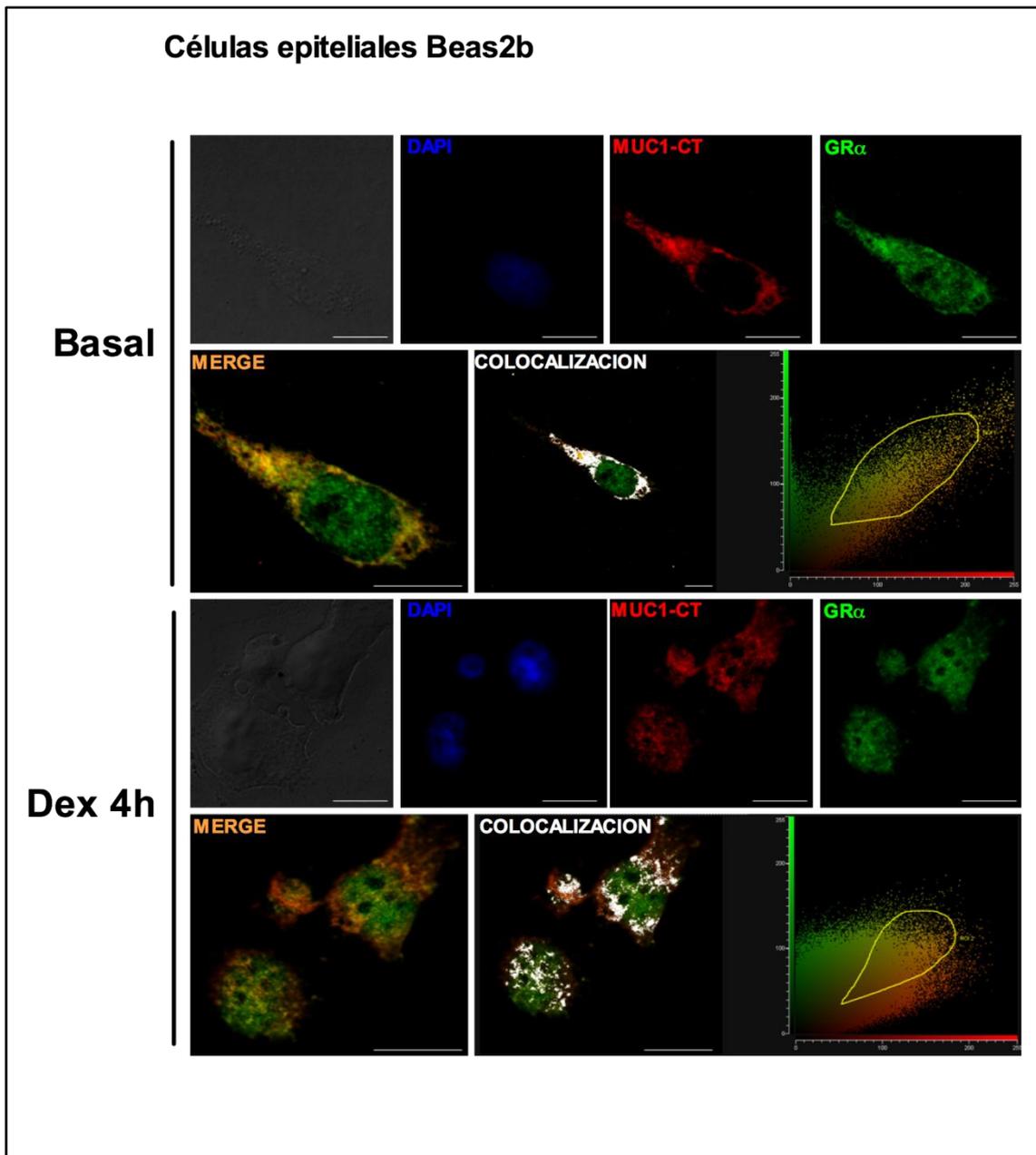


Figura 19. Co-expresión de MUC1-CT y GR α y su translocación al núcleo celular tras la estimulación con dexametasona. Se incubaron células Beas2b en ausencia (estado basal) o exposición a dexametasona (Dex; 1 μ M) durante 4 horas. Las células fueron fijadas, permeabilizadas, y se usaron para la inmunotinción de MUC1-CT (color rojo) y GR α (color verde). En condiciones basales MUC1-CT se observó co-expresada con GR α en el citoplasma celular. Después de la exposición a Dexametasona, la co-expresión de MUC1-CT y GR α se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. La co-expresión de MUC1-CT y GR α fue analizada con un microscopio confocal espectral Leica TCS SP2. El microscopio generó un citofluorograma bidimensional que seleccionó los puntos de localización común de ambos anticuerpos (color blanco). DAPI, núcleo azul. Escala de barras: 20 μ m.

En la misma línea de investigación se usaron experimentos de inmunoprecipitación. Para ello se estimularon las células con dexametasona durante 4h y posteriormente se realizó una extracción de proteína total, proteína citoplásmica y proteína nuclear para diferenciar el lugar celular donde podría producirse la interacción entre MUC1 y GR α . Las proteínas obtenidas se inmunoprecipitaron con MUC1-CT ó GR α realizándose posteriormente un western blot para la proteína opuesta. De este modo se pudo comprobar que en las células estimuladas con dexametasona la co-expresión de MUC1-CT-GR α estaba incrementada en los inmunoprecipitados de proteínas totales y nucleares; lo que indica una translocación nuclear del complejo MUC1-CT-GR α tras la exposición a los corticoesteroides (FIG 20 A). Por el contrario, la expresión del complejo MUC1-CT-GR α se apreció disminuida en los inmunoprecipitados de proteínas citoplásmicas tras la exposición a dexametasona (FIG 20 A). Estos resultados sugieren una unión directa de MUC1-CT con GR α tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células Beas2b tras la estimulación con dexametasona (FIG 20 A).

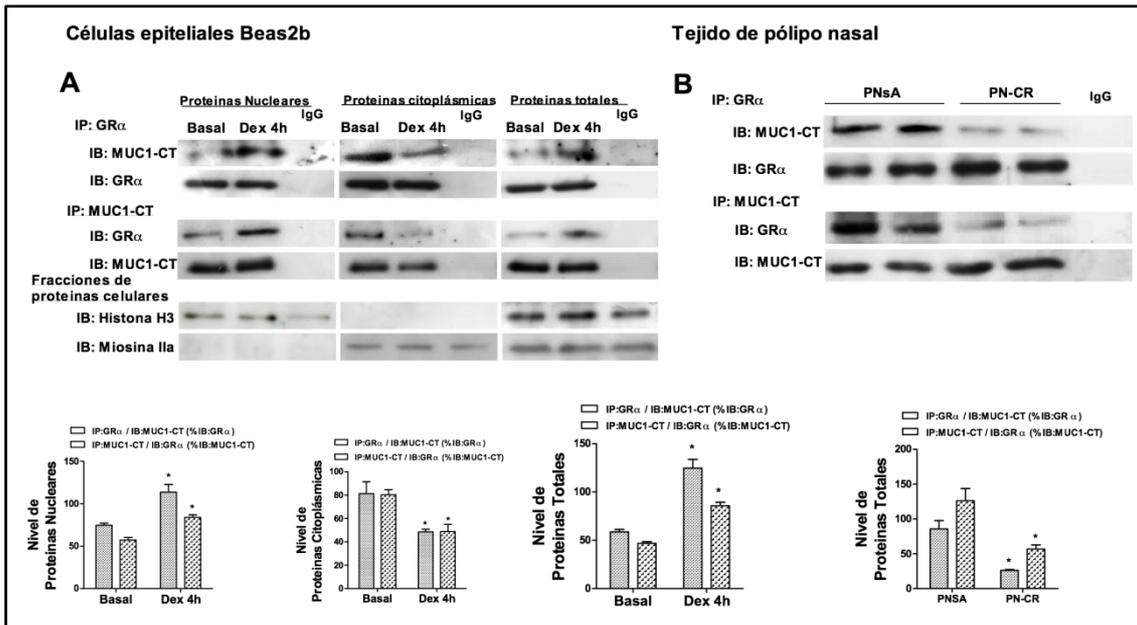


Figura 20. MUC1-CT se co-expresa con GR α para formar complejos de translocación nuclear tras la estimulación con dexametasona. **A.** Se obtuvieron inmunoprecipitados (IP) de proteínas nucleares, citoplásmicas o totales de GR α o MUC1-CT, de células Beas2b incubadas en presencia o ausencia (basal) de dexametasona (Dex; 1 μ M) durante 4 horas. Se realizó inmunoblot (IB) a los IP con el anticuerpo específico contrario de GR α o MUC1-CT, o con el mismo anticuerpo usado para la inmunoprecipitación como control. El isotipo IgG se usó como control negativo para la inmunoprecipitación. Anticuerpos de Histona H3 y Miosina IIa se usaron en los western-blot de extractos subcelulares y de proteína total, para determinar la especificidad de la proteína de extracción subcelular. **B.** Tejido de PN de los grupos PNsA (n=6) y PN-CR (n=7) se lisaron e inmunoprecipitaron con anticuerpos GR α o MUC1-CT. Posteriormente se enfrentaron a anticuerpos opuestos, por medio de IB, para analizar las variaciones en la expresión del complejo MUC1-CT-GR α y con los mismos anticuerpos como control. El isotipo IgG se usó como control negativo de la inmunoprecipitación. Se muestran imágenes representativas de western-blot. Los gráficos representan la densimetría de ratios para los niveles de proteína de GR α o MUC1-CT. Los resultados están expresados como medias en los 3 experimentos independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Bonferroni. *P<0,05 comparado a **(A)** basal o **(B)** grupo PNsA.

Con el propósito de validar estas observaciones en el tejido de PN se realizó una extracción de proteínas totales de las muestras de pólipos de pacientes pertenecientes a los grupos de estudio PNsA y PN-CR. Las proteínas obtenidas se inmunoprecipitaron con MUC1-CT ó GR α y, seguidamente, se realizó inmunoblot con el anticuerpo contrario. Con este experimento se observó que la expresión del complejo MUC1-CT-GR α estaba significativamente aumentada en las muestras que provenían del grupo PNsA en comparación con las muestras provenientes del grupo PN-CR (FIG 20 B).

5-DISCUSIÓN.

5. DISCUSIÓN.

En esta tesis doctoral se proporcionan nuevas evidencias del papel de la MUC1 en la mediación de la respuesta a los corticoesteroides orales en pacientes afectados de RSCcPN. A continuación se describen los principales resultados obtenidos, que hacen referencia a los objetivos planteados:

1-Los pacientes resistentes a los efectos antiinflamatorios de los corticoesteroides orales muestran una disminución significativa en la expresión de MUC1 en el epitelio de PN.

2-Dicha disminución en la expresión de MUC1 va acompañada de una disminución similar en la expresión de MKP1 y GR α .

3-Igualmente existe un aumento en la fosforilación de ERK1/2.

Los experimentos realizados revelan la existencia de la interacción de MUC1-CT con GR α . Dicha interacción protege de la hiperfosforilación de GR-Ser226 inducida por receptores TLR, y ayuda a que GR α realice la translocación al núcleo para ejercer sus efectos antiinflamatorios.

Estos resultados son de un valor potencial para entender la pérdida de la eficacia en el tratamiento con corticoesteroides orales en los pacientes afectados de RSCcPN.

Evidencias científicas recientes parecen indicar que la RSC es el resultado de una respuesta inmune alterada frente a los microorganismos o sus productos, como por ejemplo: hongos, biofilms de *Estafilococo* o de *Pseudomona*, e incluso virus (2, 66-68). En los pacientes que padecen RSCcPN la alteración en la mucosa inmune perjudica la prevención o eliminación de la colonización microbiana de las cavidades nasosinusales que ocurre habitualmente, lo que provoca la aparición de los PN y su perpetuación en el tiempo.

Es sabido que la familia de los receptores TLR desempeñan un papel importante en el reconocimiento de los patógenos y en la inducción y regulación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. De hecho, datos obtenidos recientemente sugieren que el proceso inflamatorio que encontramos en los pacientes afectados de RSCcPN se caracteriza por una activación excesiva de las vías de señalización mediadas por receptores TLR, lo cual contribuye a la formación de los pólipos nasales (59). En relación a esta afirmación, en el presente trabajo se ha determinado la expresión de los receptores TLR2, TLR4 y TLR5 en muestras de epitelio de PN de todos los pacientes incluidos en el estudio. De este modo se ha comprobado que los receptores TLR2 y TLR5 están significativamente aumentados en el epitelio de PN de pacientes pertenecientes al grupo de PN-CR cuando lo comparamos con las muestras de pacientes del resto de los grupos de estudio, como son PNsA, PN-ATA y PN-AIA. La activación de las señales del receptor TLR2 es debido a infecciones ocasionadas por bacterias Gram+ como *Staphylococcus aureus*; mientras que la activación del receptor TLR5 suele estar mediado por

componentes de flagelina de bacterias flageladas como *Pseudomona aeruginosa*, ambas bacterias están presentes habitualmente en el tejido de PN. Curiosamente, los efectos antiinflamatorios de MUC1 se basan en la inhibición de varios receptores TLR (45) , fundamentalmente por medio de la interacción citoplásmica de MUC1-CT con los componentes de la señal de los receptores TLR (47). En este estudio los pacientes afectos de RSCcPN que no han tenido una respuesta al tratamiento protocolizado con corticoesteroides orales han mostrado una disminución en la expresión de MUC1-CT, comparado con las muestras de tejido de PN de los pacientes pertenecientes a los grupos en los que sí ha habido una respuesta al tratamiento corticoesteroideo, es decir, los pacientes de los grupos PNsA, PN-ATA y PN-AIA.

El aumento de la expresión de TLR2 y TLR5, acompañado de una disminución en la regulación de MUC1-CT, origina una sobre activación de las señales que activan los receptores TLR con la consiguiente puesta en marcha del proceso inflamatorio. A este respecto, cabe señalar, que en el presente estudio la IL-8, un producto de activación de receptor TLR (47, 69) y particularmente insensible al efecto antiinflamatorio de los corticoesteroides (70), se ha encontrado significativamente aumentada en las muestras de tejido de PN de aquellos pacientes pertenecientes al grupo PN-CR, si lo comparamos con las muestras de pacientes del resto de grupos de estudio.

Una de las cascadas de señales activadas por los receptores TLR es la de la fosforilación de ERK1/2 (71). Así, evidencias recientes sugieren que en la resistencia al tratamiento antiinflamatorio de los corticoesteroides mediada por superantígenos, está implicada la hiperfosforilación de ERK1/2. Dicha hiperfosforilación ocasiona una fosforilación del receptor corticoideo GR α , y con ello, a la inhibición de la translocación nuclear de GR α que se encuentra mediada por los corticoesteroides (72).

En el trabajo desarrollado, en las muestras de PN de pacientes pertenecientes al grupo PN-CR se ha determinado un aumento significativo de la fosforilación de ERK1/2 si lo comparamos con las muestras de PN de pacientes pertenecientes a los grupos PNsA, PN-ATA y PN-AIA. Del mismo modo, las muestras de tejido de pacientes del grupo PN-CR han mostrado un aumento significativo de la fosforilación de GR-Ser226, comparado con el resto de pacientes incluidos en el estudio.

Evidencias recientes han señalado que la fosforilación de GR-Ser226 provocada por P38 o JNK1, debe ser la mediadora de la insensibilidad a los corticoesteroides que aparece en pacientes asmáticos, ocasionada por la inhibición de la translocación nuclear de GR α (65, 73). Apoyando dicha evidencia, la hiperfosforilación de GR-Ser226 hallada en los pacientes del

grupo PN-CR, podría inhibir los efectos antiinflamatorios de GR α transcripcional y post-transcripcional que aparece tras la terapia con corticoesteroides. A este respecto hay que señalar que MKP1, un inhibidor endógeno de la fosforilación de ERK1/2 inducida por los corticoesteroides como parte de su actividad antiinflamatoria, se ha encontrado significativamente disminuido en las muestras analizadas de pacientes del grupo PN-CR comparado con las muestras de PN del resto de grupos de estudio; lo cual debe explicar el aumento de la fosforilación de ERK1/2 y GR-Ser226 y la consecuente aparición de la resistencia al tratamiento con corticoesteroides como agente antiinflamatorio en la poliposis nasosinusal. Igualmente, existen también otros marcadores que han sido relacionados con una pobre respuesta al tratamiento antiinflamatorio de los corticoesteroides en pacientes afectados de RSCcPN, como la presencia de niveles elevados de IL-1 β , ICAM-1, factor nuclear (FN-kB) y GR β después del tratamiento corticoesteroideo (74-76). En la cohorte de pacientes de este trabajo se ha detectado una disminución significativa de GR α en las muestras de tejido de PN de pacientes pertenecientes al grupo PN-CR, esta disminución del receptor corticoideo debería explicar, al menos en parte, la pérdida de la eficacia de los corticoesteroides como agente antiinflamatorio en este grupo de pacientes, como previamente se ha esbozado(77). De una manera novedosa, en todos los grupos de pacientes estudiados en esta tesis, la expresión de MUC1 ha sido fuerte y directamente correlacionada con la expresión de GR α , lo cual sugiere una posible interacción entre ambos. En este contexto, se sabe que los corticoesteroides aumentan la expresión *in vitro* de MUC1 (50), y lo mismo ocurre en las muestras de tejido de PN de los pacientes pertenecientes a este estudio, a excepción de los pacientes del grupo PN-AIA (51), en los que no se apreció dicho aumento de expresión de MUC1; si bien, no se ha encontrado evidencia científica sobre el valor significativo de esta afirmación.

Para resolver la relación enigmática entre MUC1 y GR α , en el presente estudio se han llevado a cabo experimentos mecanísticos en los que se ha realizado un bloqueo de MUC1 por medio del ARN de interferencia. De este modo, en las células si ARN-MUC1, la exposición a dexametasona muestra un efecto antiinflamatorio disminuido sobre la inhibición de IL-8 así como la secreción de GM-CSF, seguido de los agonistas TLR2, TLR4 y TLR5. Estos resultados obtenidos *in vitro* han sido corroborados en las muestras de célula epitelial primaria de pólipos nasal ó en muestras de PN de pacientes pertenecientes al grupo PN-CR, los cuales han mostrado una ausencia de expresión de MUC1, así como la ausencia del efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la acción de IL-8 y GM-CSF.

Otro resultado interesante del presente estudio ha sido corroborar como las células siARN-MUC1, al contrario que las células control, muestran un aumento en la fosforilación de ERK1/2

en respuesta a agonistas de TLR2, TLR4 y TLR5, los cuales no han resultado inhibidos por la dexametasona. Resultados similares se han observado con la expresión de MKP1. Es decir, el bloqueo celular de MUC1 no aumentó la expresión de MKP1 tras la exposición a dexametasona. Además, se ha podido observar como las células siARN-MUC1 están hiperfosforiladas en el GR-Ser226, con lo que se consiguió una reducción en la translocación nuclear de GR α . Esta reducción en la translocación nuclear de GR α demuestra el papel protector de MUC1 en la fosforilación de GR α , dando así respaldo a los hallazgos del estudio llevado a cabo en las muestras de tejido polipoideo de los pacientes pertenecientes al grupo PN-CR.

En la actualidad se cree que la interacción de MUC1-CT con diferentes transductores de señal da lugar a su translocación nuclear y a la subsecuente respuesta biológica. Esta interrelación está regulada por un mecanismo de interacción proteína-proteína específico, pero el conocimiento preciso de los mecanismos por los que ocurre dicha interacción siguen siendo escasamente conocidos. A este respecto cabe decir que se ha demostrado que MUC1-CT ha de interactuar con los receptores de estrógenos α (ER α) provocando la translocación hacia el núcleo como complejo de transcripción MUC1-CT-ER α en respuesta al 17 β -estradiol en el cáncer de mama (78). Resultados similares han sido observados para el complejo de transcripción β -catenina-MUC1-CT como modulador de la; (79, 80). Todas las evidencias conocidas indican que MUC1-CT debe tener un papel protector cuando forma complejos de transcripción. En este contexto, el complejo de transcripción MUC1-CT-ER α protege y estabiliza al receptor ER α consiguiendo así que se atenúe su ubiquitinización y su degradación. Hallazgos similares permiten proponer, del mismo modo, un efecto protector del complejo de transcripción β -catenina-MUC1-CT en la degradación de la β -catenina. En la presente tesis doctoral se proporciona la primera evidencia de la unión de MUC1-CT y GR α como complejo, así como su papel protector en la fosforilación de GR-Ser226 y la translocación nuclear de GR α . Además, la exposición a dexametasona promueve la translocación nuclear del complejo de transcripción MUC1-CT-GR α para ejercer su efecto antiinflamatorio. Estos resultados se han observado *ex vivo* en muestras de pacientes con PN, lo cual sugiere que los pacientes resistentes al tratamiento oral con corticoesteroides presentan una disminución en la expresión del complejo MUC1-CT-GR α y, por lo tanto, existe un mayor grado de degradación de GR α , y una mayor fosforilación de GR-Ser226. En definitiva, en el presente trabajo se ha demostrado un nuevo papel de MUC1-CT como modulador de los efectos de los corticoesteroides orales en pacientes afectados de RSCcPN. Los hallazgos sugieren que la explicación de por qué los corticoesteroides no pueden contener la inflamación en la mucosa

nasal y controlar la poliposis nasosinusal, es en parte por la deficiencia del complejo MUC1-CT-GR α .

Con todo lo expuesto, se puede afirmar que la expresión de MUC1 contribuye en la eficacia de los corticoesteroides. Para realizar dicha afirmación existen dos posibles mecanismos que pueden explicar el efecto de MUC1-CT sobre los corticoesteroides. En primer lugar (lado izquierdo de la figura 21), MUC1-CT inhibe la activación de TLR2, 4, 5, consiguiendo así que no se una a la proteína adaptadora MYD88 y que no siga la señal de activación celular. Cuando existe falta de expresión de MUC1-CT, se observa una sobre activación en la vía de los receptores TLR, de manera que aumenta la fosforilación de IRAK-ERK1/2, que, a su vez, origina una hiperfosforilación de GR-Ser226. Al fosforilar GR-Ser226, el GR queda inactivo y no realiza su translocación nuclear (lado izquierdo de la figura). Con ello quedan inhibidos los efectos antiinflamatorios de la dexametasona y aumenta la inflamación celular. El segundo mecanismo que puede explicar la afirmación realizada en líneas previas (lado derecho de la figura 21) es el siguiente. MUC1-CT interacciona con el complejo GR α -Dexametasona, y ayuda a la translocación nuclear del mismo. Con esta acción induciría un aumento en la expresión de MKP1, consiguiendo de este modo una inhibición en la fosforilación de ERK1/2 y, por lo tanto, disminuyendo la inflamación celular.

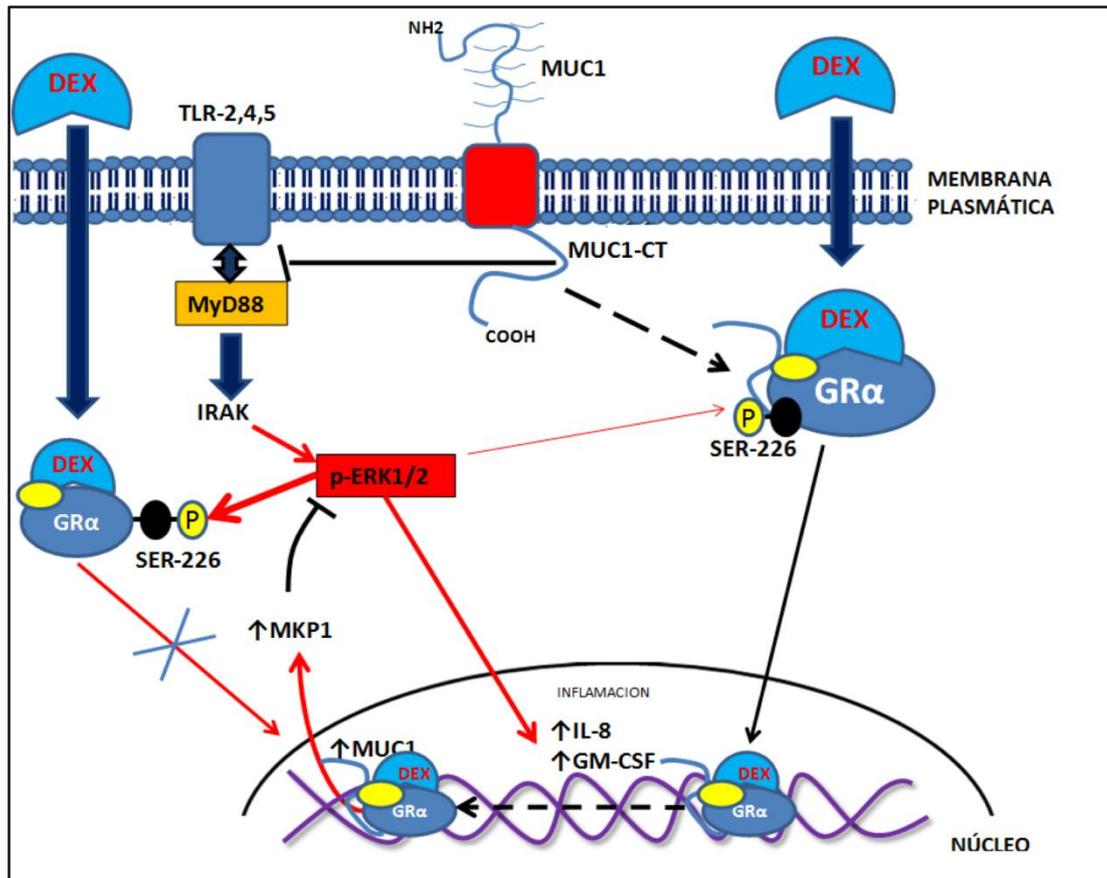


Figura 21. Diagrama de los posibles mecanismos de interacción de MUC1 y Dexametasona.

6-CONCLUSIONES.

6. CONCLUSIONES.

(1) La mucina MUC1 es un mediador de la respuesta a los corticoesteroides en pacientes afectados de RSCcPN.

(2) Los pacientes corticorresistentes presentan una expresión de MUC1 disminuida en el epitelio de los PN.

(3) La disminución en la expresión de MUC1 en el epitelio de PN va asociada a una disminución similar en la expresión de MKP1 y GR α .

(4) Del mismo modo, la disminución en la expresión de MUC1 se acompaña de un aumento en la fosforilación de ERK1/2.

Estos resultados son de un valor potencial para entender la pérdida de la eficacia en el tratamiento con corticoesteroides orales en los pacientes afectados de RSCcPN.

7-BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández EF-M, P; Ruiz, JM. Poliposis nasosinusal. In: SEORL-PCF, editor. Libro virtual de la SEORL-PCF2007. p. 1.
2. Fokkens, WL; Lund, VJ; Mullol, J; Bachert, C. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012;50(1):1-12.
3. Armengot, M; Carda, C. Eosinophil degranulation patterns in nasal polyposis: an ultrastructural study. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(5):466-70.
4. Valero AS, A; Colás, C; Armengot, M; Dávila, I; Cuvillo del, A; Soler, R. Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal SEAIC-SEORL. PROYECTO POLINA. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21(Suppl. 1: 2-3).
5. Hedman JK, J; Poussa, T; Nieminen, MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol*. 1999;28(4):717-22.
6. Larsen K. The clinical relationship of nasal polyps to asthma. *Allergy Asthma Proc*. 1996;17(5):243-9.
7. Settignano GC, FH. . Nasal polyps in asthma and rhinitis. A review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 1977;59(1):17-21.
8. Martínez-Antón AD, C; Garrido, M; Roca-Ferrer, J; Barranco, C; Alobid, I; Xaubet, A; Picado, C; Mullol, J. . Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(4):448-57.
9. Sánchez-Segura AB, JA; Rodríguez C. T Lymphocytes that infiltrate nasal polyps have a specialized phenotype and produce a mixed TH1/TH2 pattern of cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(6 Pt1):953-60.
10. Bachert CZN, van Zele, T; Gevaert, P; Patou, J; van Cauwenberge P. Staphylococcus aureus enterotoxins as immune stimulants in chronic rhinosinusitis. *Clin Allergy Immunol*. 2007;20:163-75.
11. Van Zele T, Gevaert, P; Watelet, JB; Claeys, G; Holtappels, G, Claeys, C; van Cauwenberge, P; Bachert, C. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(4):981-3.
12. Bachert CG, P; Holtappels, G; Johansson, SG; van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(4):607-14.

13. Hunsaker DL, JG. The relationship of biofilms to chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;16(3):237-41.
14. Psaltis AW, EK; Ha, KR; Wormald, PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol.* 2008;22(1):1-6.
15. Millar JW J, Laamb D. Allergic aspergillosis of the maxillary sinuses. *Proc Scottish Thorac Soc.* 1981;36:7-10.
16. Robson JH, PG; Benn, RA; Gatenby, PA. Allergic fungal sinusitis presenting as a paranasal sinus tumour. *Aust N Z J Med.* 1989;19:351-3.
17. Ponikau JS, DA; Kern, EB; Homburger, HA; Frigas, E; Gaffey, TA; Roberts, GD. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc.* 1999;74:877-84.
18. Collins MN, S; Smith, W; Kette, F; Gillis, D; Wormald, PJ. Role of local immunoglobulin E production in the pathophysiology of noninvasive fungal sinusitis. *Laryngoscope.* 2004;114:1242-6.
19. Settipane G. Nasal polyps: epidemiology, pathology, immunology, and treatment. *Am J Rhinol.* 1987;1:119-26.
20. Kowalski ML-P, A; Wozniak, J; Ptasinska, A; Jankowski, A; Wagrowska-Danilewicz, M; Danilewicz, M; Pawliczak, R. . Association of stem cell factor expression in nasal polyp epithelial cells with aspirin sensitivity and asthma. *Allergy.* 2005;60:631-7.
21. Hamilos DL, DY; Huston, DP; Kamil, A; Wood, R; Hamid, Q. . GM-CSF, IL-5 and RANTES immunoreactivity and mRNA expression in chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (NP). *Clin Exp Allergy.* 1998;28:1145-52.
22. Perez-Novo CW, JB; Claeys, C; Van Cauwenberge, P; Bachert, C. . Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:1189-96.
23. Picado CR, I; Rosello, J; Prat, J; Bulbena, O; Plaza, V; Montserrat, JM; Gelpi, E. . Release of peptide leukotriene into nasal secretions after local instillation of aspirin in aspirin-sensitive asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:65-9.
24. Parikh AS, GK; Gray, P; Belvisi, MG; Mitchell, JA. High levels of nitric oxide synthase activity are associated with nasal polyp tissue from aspirin-sensitive asthmatics. *Acta Otolaryngol.* 2002;122:302-5.
25. Zhang NH, G; Claeys, C; Huang, G; van Cauwenberge, P; Bachert, C. . Pattern of inflammation and impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyps from southern China. *Am J Rhinol.* 2006;20:445-50.

26. Platt MM, R; Stankovic, K. Gene-expression signatures of nasal polyps associated with chronic rhinosinusitis and aspirin sensitive asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9:23-8.
27. Toledano Muñoz ANM, C; García Simal M; Navarro Cunchillos, M; Galindo Campillo, AN. . Estudio epidemiológico en pacientes con poliposis nasal. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008;59:438-43.
28. Dogru HT, M; Uygur, K; Akkaya, A; Yasan, H. . Asymptomatic IgE mediated food hypersensitivity in patients with nasal polyps. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2003;21:79-82.
29. Shatkin JD, KG; Thisted, RA; Corey, JP. . Mucosal allergy in the absence of systemic allergy in nasal polyposis and rhinitis: a meta-analysis. . *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;111:553-6.
30. Moloney J. Nasal polyps, nasal polypectomy, asthma, and aspirin sensitivity. Their association in 445 cases of nasal polyps. *J Laryngol Otol.* 1977;91:837-46.
31. Han DK, SW; Cho, SH, Kim, DY; Lee, CH; Kim, SS; Rhee, CS. . Predictors of bronchial hyperresponsiveness in chronic rhinosinusitis with nasal polyp. . *Allergy.* 2009;64:118-22.
32. Benítez P M, J; Monserrat, JR. Poliposis nasal. In: S.L. EUROMEDICEEm, editor. *Rinitis Rinosinusitis y poliposis nasal Ponencia oficial de la SEORL y PCF2005.* p. 755-74.
33. Valero A. *Manual de Rinometría Acústica.* Barcelona: MRA editorial.; 2000.
34. Berenguer JP, T; Tomasello, A. Radiología nasosinusal: anatomía. *Rev rinol.* 2002;1:18-22.
35. Mullol J MJ, editor. *Rinitis, rinosinusitis, poliposis nasal.* 2005 ed: Almirall; 2005.
36. Hollingsworth MAS, B.J. Mucins in cancer: protection and control of de cell surface. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:45-60.
37. Senapati S. The MUC gene family: the role in the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Histol Histopathol.* 2008;23:1541-52.
38. Almlof T WA, Gustafsson JA. Role of acidic and phosphorylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:17535-40.
39. Curran DC, L. Advances in mucosal cell metaplasia. *Am J respir Cell Mol Biol.* 2010;42:268-75.
40. Senapati SD, S; Batra, SK. Mucin-Interacting proteins: from function to therapeutics. *Trends in biochemical sciences* 2009;35:236-45.
41. Kim K. Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics.* 2012;25(6):415-9.

42. Kim KL, EP. MUC1 mucin: a peacemaker in the lung. . *Am J respir Cell Mol Biol.* 2008;39:644-7.
43. Kyo YK, K; Park, YS; Gajghate, S; Umehara, T; Lillehoj, EP; et al. . Antiinflammatory role of MUC1 mucin during infection with nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46:149-56.
44. Li Y DD, 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.
45. Ueno K KT, 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.
46. Hattrup CL GS. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. . *Annu Rev Physiol* 2008;70:431-57.
47. Kato K LE, 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.
48. Zrihan-Licht S BA, 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.
49. Imai M HH, 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.
50. Seo KY CS, Lee JH, Park MY, Kim EK. . Regulation of membrane-associated mucins in the human corneal epithelial cells by dexamethasone. *Cornea* 2007;26:709-14.
51. Martinez-Anton A dBC, 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.
52. Valera FQ, R; Scrideli, C; Tone, LG; Anselmo-Lima, WT. Evaluating budesonide efficacy in nasal polyposis and predicting the resistance to treatment. *Clinical and Experimental Allergy.* 2008;39:81-8.
53. Adcock IM CG. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol.* 2001;79:376-84.
54. Tuncer U SL, Aydogan B, Karakus F, Akcali C. . The effectiveness of steroid treatment in nasal polyposis. *Auris Nasus Larynx.* 2003;30:263-8.

55. Pujols L MJ, Benítez P et al. Expression of the glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human nasal mucosa and polyp epithelial cells. *Respir Med.* 2003;97:90-6.
56. Schaaf MJM CJ. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;83:37-48.
57. PJ. B. Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1:264-8.
58. Casadevall J VP, Mullo 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.
59. Zhang Q WC, 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.
60. Huang S HJ. Translational initiation factor expression and ribosomal protein gene expression are repressed coordinately but by different mechanisms in murine lymphosarcoma cells treated with glucocorticoids. *Mol Cell Biol.* 1989;9(9):3679-84.
61. Calandra T BJ, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 1995;377:68-71.
62. Flaster H BJ, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol* 2007;21:1267-80.
63. Webster JC JC, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9287-93.
64. Itoh M AM, Yasui H, Takekawa M, Tanaka H, Imai K Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* 2002;16:2382–92.
65. Mercado N HA, Kobayashi Y, Meah S, Usmani OS, Chung KF, et al. 2. Restoration of corticosteroid sensitivity by p38 mitogen activated protein kinase inhibition in peripheral blood mononuclear cells from severe asthma. *PLoS One.* 2012;7:e41582.
66. Bachert C ZN, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:34-8.
67. Bendouah Z BJ, 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.

68. Shin SH PJ, 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.
69. Liu X WL, 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.
70. PJ. B. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120:76-85.
71. Anwar MA BS, Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp Mol Med*. 2013;45:e11.
72. Li LB GE, Hall CF, Ou LS, Leung DY. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1059-69.
73. Kobayashi Y MN, Barnes PJ, Ito K. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One* 2011;6:e27627.
- .
74. Choi BR KJ, 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.
75. Hamilos DL LD, 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.
76. Valera FC QR, 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.
77. Li P LY, Li YQ, Yang QT, Zhang GH. . Glucocorticoid receptor expression and glucocorticoid therapeutic effect in nasal polyps. *Clin Invest Med* 2010;33:E181-8.
78. Wei X XH, Kufe D. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol*. 2006;21:295-305.
79. Chen YT GM, 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.
80. Wen Y CT, Wheelock MJ, Johnson KR, Hollingsworth MA. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *J Biol Chem*. 2003;278:38029-39.

8-ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo.
ALI	Interfase aire-líquido (<i>Air-liquid interface</i>).
AMP	Péptidos antimicrobianos humanos.
AP-1	Proteína activadora 1.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNip	ARN pequeños de interferencia.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
BEAS2B	Línea celular inmortalizada de células epiteliales bronquiales humanas.
BEBM	Medio basal para células epiteliales.
BEGM	Medio de crecimiento para células epiteliales bronquiales.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CEBH	Células epiteliales bronquiales humanas.
CEIC	Comité Ético de Investigaciones Clínicas.
CEPN	Células epiteliales de PN.
CHGUV	Consortio Hospital General Universitario de Valencia.
CisLT	Leucotrienos cisteinílicos.
COX-2	Ciclooxigenasa-2.
Ct	Ciclo umbral.
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
ECP	Proteína catiónica del eosinófilo.
EDN	Neurotoxina derivada del eosinófilo.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EPO	Peroxidasa del eosinófilo.
ERα	Receptores de estrógenos α .
EREA	Enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina.
ERK1/2	Cinasa regulada por señal extracelular 1/2
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
Fosfo-ERK	Proteína ERK fosforilada.

FOXP3	Factor de transcripción con dominio “forkhead” P3.
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.
GATA-3	Factor de transcripción GATA-3.
GC	Glucocorticoides.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
GR	Receptores de los glucocorticoides.
GR-α	Receptor de los glucocorticoides- α .
GR-β	Receptor de los glucocorticoides- β .
GR-Ser226	Residuo de serina 226 de la región terminal-N del GR.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos.
ICAM-1	Molécula de adhesión celular-1.
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular.
IFN-β	Interferon- β .
IFN-γ	Interferon- γ .
IgE	Inmunoglobulina E.
IgG	Inmunoglobulina G.
IL-1β	Interleuquina-1 β .
IL-5	Interleuquina-5.
IL-6	Interleuquina-6.
IL-8	Interleuquina-8.
iNOS	Sintasa inducible del óxido nítrico.
LO	Lipooxigenasas.
LPS	Lipopolisacárido.
LTC₄	Leucotrieno C ₄ .
LT CD3+	Linfocito T de memoria activado CD3+
LT CD45RO+	Linfocito T de memoria activado CD45RO+
M	Molar (mol/litro).
MAPK	Protein cinasas activadas por mitógenos.
MBP	Proteína básica principal.
MEC	Matriz extracelular.
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos.
MKP1	Protein Kinasa Fosfatasa activadora de mitógeno 1 (“ <i>Mitogen Activated Protein Kinasa Phosphatase 1</i> ”).

MMP	Metaloproteinasa de matriz.
MUC	Mucina.
MUC1	Mucina-1.
MUC2	Mucina-2.
MUC5A	Mucina-5A.
MUC5B	Mucina-5B.
MUC8	Mucina-8.
MUC-CT	Terminal intracitoplásmico de la mucina (MUC-citoplasmic tail).
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
PBS	Tampón salino fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PGE2	Prostaglandina E2.
PGN	Peptidoglicano.
PN	Poliposis nasosinusal.
PN-CR	Poliposis nasosinusal corticorresistente.
PN-AIA	Poliposis nasosinusal con asma e intolerancia a la aspirina.
PN-ATA	Poliposis nasosinusal con asma y con tolerancia a la aspirina.
PNsA	Poliposis nasosinusal sin asma y sin intolerancia a la aspirina.
RANTES	Regulador de la activación de las células T expresadas y secretadas.
RSC	Rinosinusitis Crónica.
RSCcPN	Rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal.
RT	Retrotranscripción inversa.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
SAE	Enterotoxinas del Staphylococcus aureus.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
siARN-MUC1	ARN de interferencia para MUC1.
sIgE-SAE	IgE específica frente a enterotoxinas del Staphylococcus aureus .
SPA	Proteína estafilocócica A.
TC	Tomografía Computerizada.
TF	Factores de transcripción.
TGF-α	Factor de crecimiento transformante α .
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β 1.

TLR	Receptores de tipo TOLL (<i>toll-like receptors</i>).
TNF-α	Factor α de necrosis tumoral.
TSST	Toxina del síndrome del shock toxico.
URF	Unidades de fluorescencia relativa.

9-ANEXO

9. DICTAMENES: COMISION DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA CEIC.



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

lunes, 02 de enero de 2012

Este CEIC tras evaluar en su reunión

el Proyecto de Investigación:

Título:	"Expresión de mucinas en poliposis nasal: correlaciones clínicas e histopatológicas"	
	Servicio/Unidad	Otorrinolaringología

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que el Proyecto de Investigación es una tesis doctoral que forma parte del Proyecto "Mecanismos funcionales, celulares y moleculares de la poliposis nasal corticorresistente; hacia nuevas dianas terapéuticas" del Dr. Miguel Armengot y que fue **aprobado** el pasado 26 de Mayo de 2011 por el CEIC del CHGUV.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente
Presidente	Dr. Severiano Marin	
Vocales	D. Ernesto Bataller	X
	D. Alejandro Moner	X
	D. Germán García	
	Dr. D. José Manuel Iranzo	
	Dr. D. Miguel Armengot	X
	Dr. D. Julio Cortijo	
	Dra. Dña. Elena Rubio	X
	Dr. D. Gustavo Juan	X
	Dra. Pilar Blasco	X
	Dña. M ^a Teresa Jareño	
	Dra. M ^a José Safont	X
	Dr. José Luis Fayos	X
	Dr. Agustín Herrera	
	Dra. Ana Blasco	
	Dr. Antonio Martorell	
	Dr. Aurelio Quesada	
Dr. Guillermo Saez		
Dr. Fco. Javier Cervera		
Dr. José Vte. Roig Vila	X	

