



# VNiVERSIDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

## Estudio de *IL5RA* como biomarcador genético en Poliposis Nasal

Memoria presentada por D. David Hansoe Heredero Jung para optar al grado de Doctor

Fdo. David Hansoe Heredero Jung

2022



La Profa. Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética Molecular, el Prof. Dr. D. Ignacio J. Dávila González, Catedrático del Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, y la Profa. Dra. Dña. María Asunción García Sánchez, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico.

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado “Estudio de *IL5RA* como biomarcador genético en Poliposis Nasal”, que presenta el licenciado en Medicina D. David Hansoe Heredero Jung, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética Molecular, y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 22 de junio de 2022.

SANZ LOZANO Firmado digitalmente  
 CATALINA por SANZ LOZANO  
 SOFIA - CATALINA SOFIA -  
 12397038S 12397038S  
 Fecha: 2022.06.22  
 21:28:37 +02'00'

**Fdo: Profª Drª. Catalina S. Sanz Lozano**

DAVILA Firmado digitalmente  
 GONZALEZ por DAVILA  
 IGNACIO JESUS GONZALEZ IGNACIO  
 - 07844237H JESUS - 07844237H  
 Fecha: 2022.06.22  
 22:17:28 +02'00'

**Fdo: Prof. Dr. Ignacio J. Dávila González**

GARCIA Firmado digitalmente  
 SANCHEZ MARIA por GARCIA SANCHEZ  
 ASUNCION - MARIA ASUNCION -  
 07981192P 07981192P  
 Fecha: 2022.06.23  
 05:54:09 +02'00'

**Fdo: Profª. Drª. María Asunción García Sánchez**



## *Agradecimientos*

*Después de casi cinco años dedicados a este proyecto, me veo en la necesidad de transmitir, a todas aquellas personas que lo han hecho posible, mi más profundo agradecimiento.*

*En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis, Cati, Ignacio y Choni, el haber hecho posible todo este trabajo, el haber estado detrás todo el tiempo, encauzando el río por el camino correcto. A ellos tres y a la Dra. María Isidoro el haberme brindado la oportunidad de trabajar junto a ellos y desarrollarme en el mundo de la investigación biomédica y de la genética molecular, que tan enriquecedor ha sido y está siendo para mi vida profesional.*

*A Chus, Miguel, Jaqui, Alicia, y a los demás compañeros del laboratorio de Alergias, por haber compartido conmigo vuestra experiencia y conocimientos, y haberme dejado trabajar junto a vosotros.*

*A Sandra, por haber emprendido este viaje a la vez que yo y podernos haber apoyado el uno al otro en los momentos de trabajo más duro, resolviéndonos dudas, trabajando hasta tarde, o incluso experimentando paradojas espaciotemporales.*

*A Carlos, a Belén, y a mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Análisis Clínicos, que me han acogido durante todos estos años y han creado el entorno perfecto para aprender y para poder desarrollar la tesis.*

*A mis amigos, tanto de aquí de Salamanca como del resto del mundo, que siempre han estado detrás preguntándome cómo lo llevaba y dándome ánimos.*

*A mi familia, a mis padres y a mis hermanas, por todo el apoyo en la vida, no sólo aquí, y por todo su esfuerzo y dedicación durante tantos años, que me han conducido hasta donde estoy hoy, y les estoy muy agradecido.*

*Y sobretodo, a Cris, por haberme aguantado tanto tiempo, en mis peores momentos, día tras día, dándome fuerzas para no desfallecer en el proceso, y estando siempre ahí para todo lo que necesitase.*

*Muchas gracias a todos vosotros. Si no hubiese sido por vuestro apoyo, todo esto no existiría.*

*Os lo dedico.*

시작이 반이다...

*(Empezar es la mitad del camino)*

Proverbio coreano



## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN.....   | p.11 |
| 1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA POLIPOSIS NASAL.....                               | p.13 |
| 1.1. DEFINICIONES.....  | p.13 |
| 1.1.1. Rinosinusitis crónica.....   | p.13 |
| 1.1.2. Poliposis nasal.....   | p.15 |
| 1.1.3. Definiciones clínicas de la rinosinusitis.....                         | p.17 |
| a. Rinosinusitis en los adultos.....  | p.17 |
| b. Rinosinusitis en los niños.....  | p.18 |
| c. Rinosinusitis aguda en los adultos.....                                    | p.18 |
| d. Rinosinusitis aguda en los niños.....                                      | p.18 |
| e. Rinosinusitis aguda recurrente.....  | p.19 |
| f. Rinosinusitis crónica.....   | p.19 |
| g. Rinosinusitis difícil de tratar.....                                       | p.19 |
| 1.1.4. Clasificación de la rinosinusitis crónica.....                         | p.20 |
| 1.1.5. Impacto de la rinosinusitis.....                                       | p.21 |
| a. Calidad de vida.....   | p.21 |
| b. Costes asociados a la rinosinusitis.....                                   | p.21 |
| 1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA RINOSINUSITIS CRÓNICA.....                           | p.22 |
| 1.2.1. Prevalencia.....   | p.22 |
| 1.2.2. Subtipos de la rinosinusitis crónica.....                              | p.23 |
| 1.3. ASPECTOS ETIOLÓGICOS.....  | p.23 |
| 1.3.1. Factores predisponentes de rinosinusitis crónica con poliposis nasal.. | p.23 |
| 1.4. DIAGNÓSTICO.....   | p.29 |
| 1.4.1. Rinosinusitis crónica con poliposis nasal.....                         | p.32 |
| 1.4.2. Evaluación.....  | p.35 |
| 1.4.3. Diagnóstico diferencial.....   | p.36 |
| 1.4.4. Sistemas de gradación en la poliposis nasal.....                       | p.37 |
| 1.5. BIOMARCADORES EN LA POLIPOSIS NASAL.....                                 | p.38 |
| 1.5.1. Principales biomarcadores.....   | p.40 |
| 1.5.2. Papel de la interleucina 5 (IL-5) y del receptor de IL-5 (IL-5R).....  | p.45 |
| 1.6. TRATAMIENTO.....   | p.46 |
| 1.7. ASMA Y RSCcPN. DEFINICIÓN DE ASMA. FENOTIPOS.....                        | p.48 |
| 1.7.1. Fenotipos del asma.....  | p.49 |
| 1.7.2. Cuadro clínico del asma.....   | p.51 |
| 1.7.3. Diagnóstico del asma.....  | p.51 |
| 1.7.4. Estudio genético del asma.....   | p.52 |
| 1.7.5. Enfermedad de Fernand Widal (tríada del ASA o EREA).....               | p.53 |
| 2. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA POLIPOSIS NASAL.....                              | p.53 |
| 2.1. MARCADORES GÉNICOS EN RSCcPN.....  | p.53 |
| 2.2. GEN <i>IL5RA</i> .....   | p.56 |
| 2.3. IL-5R $\alpha$ COMO DIANA TERAPÉUTICA. USO DE BENRALIZUMAB.....          | p.60 |
| 2.4. EMPLEO DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS EN LA RSCcPN.....                          | p.62 |
| 2.5. GEN <i>IL4R</i> .....  | p.64 |
| 2.6. GEN <i>PTGDR2</i> .....  | p.65 |
| 3. MEDICINA DE PRECISIÓN EN RSCcPN.....                                       | p.68 |

|   |       |
|---|-------|
| HIPÓTESIS.....  | p.69  |
| OBJETIVOS.....  | p.73  |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....   | p.77  |
| 1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....   | p.79  |
| 1.1. Modelo experimental.....   | p.79  |
| 1.2. Muestreo.....  | p.79  |
| 1.3. Criterios de inclusión.....  | p.79  |
| 1.4. Descripción de la muestra.....   | p.80  |
| 1.5. Variables de estudio.....  | p.80  |
| 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>IL4R</i> E <i>IL5RA</i> .....             | p.80  |
| 2.1. Diseño de cebadores ( <i>primers</i> ).....                            | p.90  |
| 2.2. Extracción y purificación del RNA mensajero en sangre periférica.....  | p.93  |
| 2.3. Extracción y purificación del RNA mensajero en muestras de tejido..... | p.96  |
| 2.4. Cuantificación del RNA mensajero.....                                  | p.99  |
| 2.5. Análisis estadístico.....  | p.111 |
| 3. ANEXOS.....  | p.113 |
| RESULTADOS.....   | p.117 |
| 1. CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA DE LA MUESTRA.....                           | p.119 |
| 1.1. Distribución por grupos clínicos.....                                  | p.120 |
| 1.2. Nivel de eosinófilos por grupos.....                                   | p.120 |
| 1.3. IgE por grupos.....  | p.121 |
| 2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE <i>IL5RA</i> .....                               | p.121 |
| 2.1. Genes de referencia.....   | p.121 |
| 2.2. Expresión de <i>IL4R</i> e <i>IL5RA</i> en sangre periférica.....      | p.123 |
| 2.3. Expresión de <i>IL5RA</i> en muestras de tejido.....                   | p.131 |
| 2.4. Co-expresión de <i>IL5RA</i> y <i>PTGDR2</i> .....                     | p.136 |
| DISCUSIÓN.....  | p.141 |
| 1. ANÁLISIS DE LA MUESTRA.....  | p.144 |
| 2. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN.....   | p.145 |
| 2.1. Estudio de expresión de <i>IL4R</i> .....                              | p.145 |
| 2.2. Expresión de <i>IL5RA</i> en sangre periférica.....                    | p.146 |
| 2.3. Expresión de <i>IL5RA</i> vs eosinofilia.....                          | p.147 |
| 2.4. Expresión de <i>IL5RA</i> en muestras de tejido.....                   | p.150 |
| 2.5. Co-expresión de <i>IL5RA</i> y <i>PTGDR2</i> .....                     | p.151 |
| 3. PRESENTE Y FUTURO DE LA MEDICINA DE PRECISIÓN.....                       | p.152 |
| CONCLUSIONES.....   | p.157 |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | p.161 |
| ANEXOS. Publicaciones.....  | p.179 |



# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

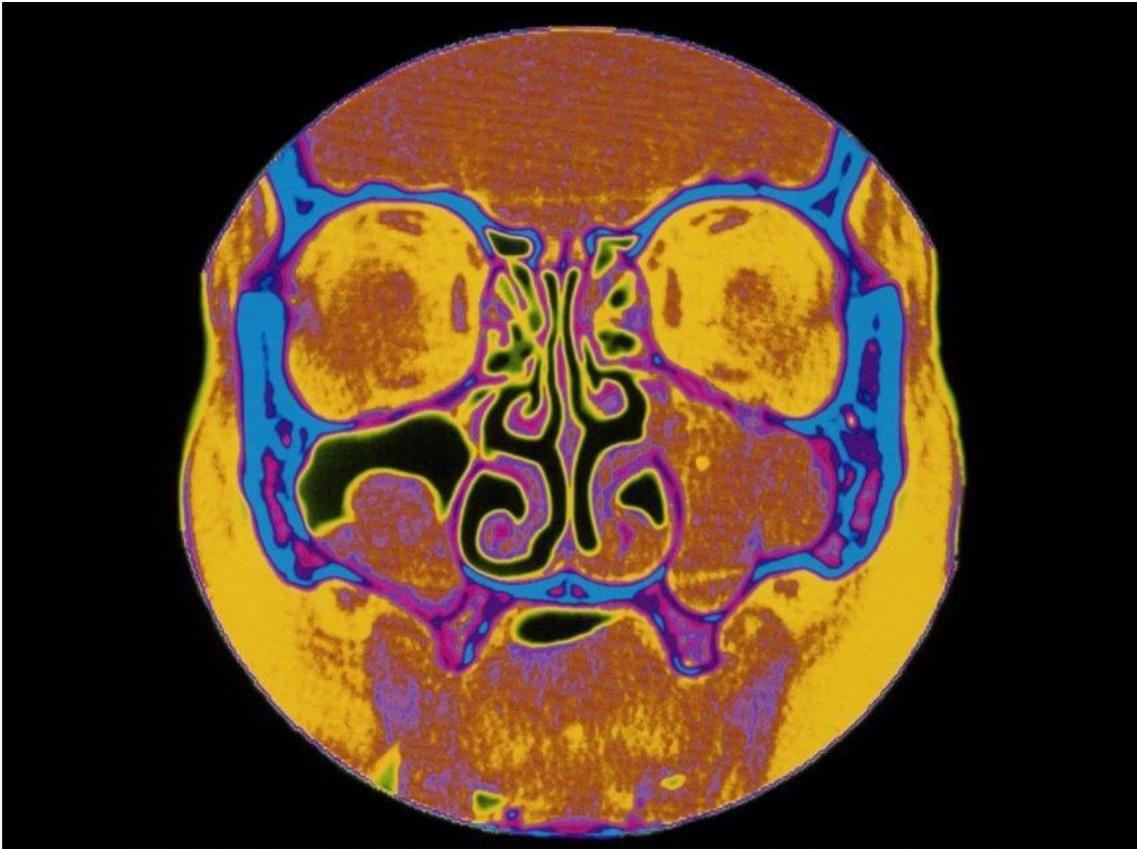


Imagen de tomografía computerizada (TC) de senos paranasales en rinosinusitis crónica con poliposis nasal. Figura extraída de *Mepolizumab reduces disease symptoms for Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Data from the SYNAPSE study*, Tabberer M. et al.<sup>1</sup>

### 1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA POLIPOSIS NASAL

#### 1.1. DEFINICIONES

##### 1.1.1. Rinosinusitis crónica

La rinosinusitis crónica (RSC) se considera un proceso inflamatorio que afecta a los senos paranasales y a la mucosa de las fosas nasales, y que tiene una duración igual o superior a 12 semanas.

El cuadro clínico comprende una serie de signos y síntomas, entre los que se encuentran la obstrucción nasal, la rinorrea mucopurulenta (anterior o posterior), la congestión, el dolor o la

sensación de presión facial y la alteración del sentido del olfato. El diagnóstico de RSC requiere la presencia de al menos 2 de estos síntomas, uno de los cuales debe de ser la obstrucción nasal, la rinorrea, la obstrucción o congestión; además, deben existir determinados hallazgos endoscópicos o radiológicos. La sintomatología afecta notablemente la calidad de vida (*quality of life, QoL*) del paciente, y se asocia a una importante carga social en términos de pérdida de productividad y consumo de recursos sanitarios<sup>2</sup>.

Por otra parte, la remodelación de la mucosa nasal, al igual que ocurre en el asma, puede dar lugar a una afectación nasosinusal crónica e irreversible. Por lo tanto, el tratamiento de la RSC, en los casos que no puedan ser curados, se basa en el alivio y la reducción de la sintomatología para mejorar la calidad de vida del paciente y prevenir la progresión de la enfermedad. La terapia incluye el control de la inflamación de la mucosa y del edema, así como el mantenimiento de una ventilación y un drenaje nasal adecuados. Es importante prevenir y tratar las infecciones concomitantes de microorganismos colonizadores y reducir, en la medida de lo posible, el número de episodios agudos de exacerbaciones. La RSC es una de las causas más comunes de prescripción antibiótica, por lo que el manejo adecuado de las infecciones asociadas está directamente relacionado con la prevención del aumento de resistencias a antibióticos<sup>3</sup>.

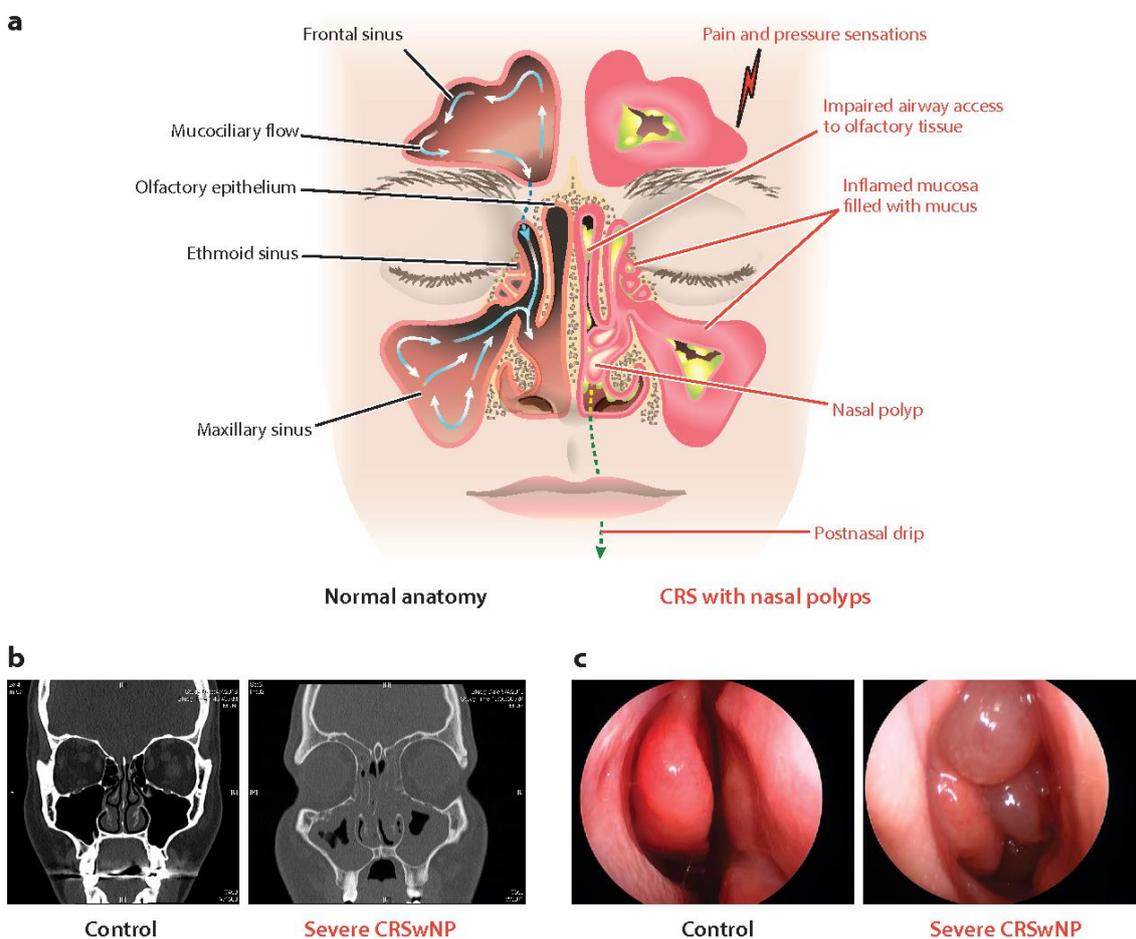
La RSC puede asociarse en gran medida al asma, pudiéndose afectar de esta manera tanto las vías respiratorias superiores como inferiores. En los pacientes que presentan ambas condiciones, el control de la sintomatología de la RSC puede beneficiar al propio control del asma, por lo que el tratamiento de ambas patologías se encuentra íntimamente ligado.

En líneas generales, la RSC es considerada una entidad compleja, y los fenotipos clínicos no tienen por qué corresponder o dar información exacta de lo que ocurre a nivel tisular, celular y molecular, aspectos que resultan cruciales en la dilucidación y tratamiento de comorbilidades asociadas, como el asma, y el diferente grado de respuesta frente a distintos tratamientos, incluyendo los corticoides, la cirugía o agentes biológicos. Un mayor entendimiento de los endotipos podría arrojar luz sobre terapias individualizadas contra procesos fisiopatológicos

propios del paciente, lo que conllevaría resultados potencialmente más efectivos y esperanzadores<sup>2</sup>.

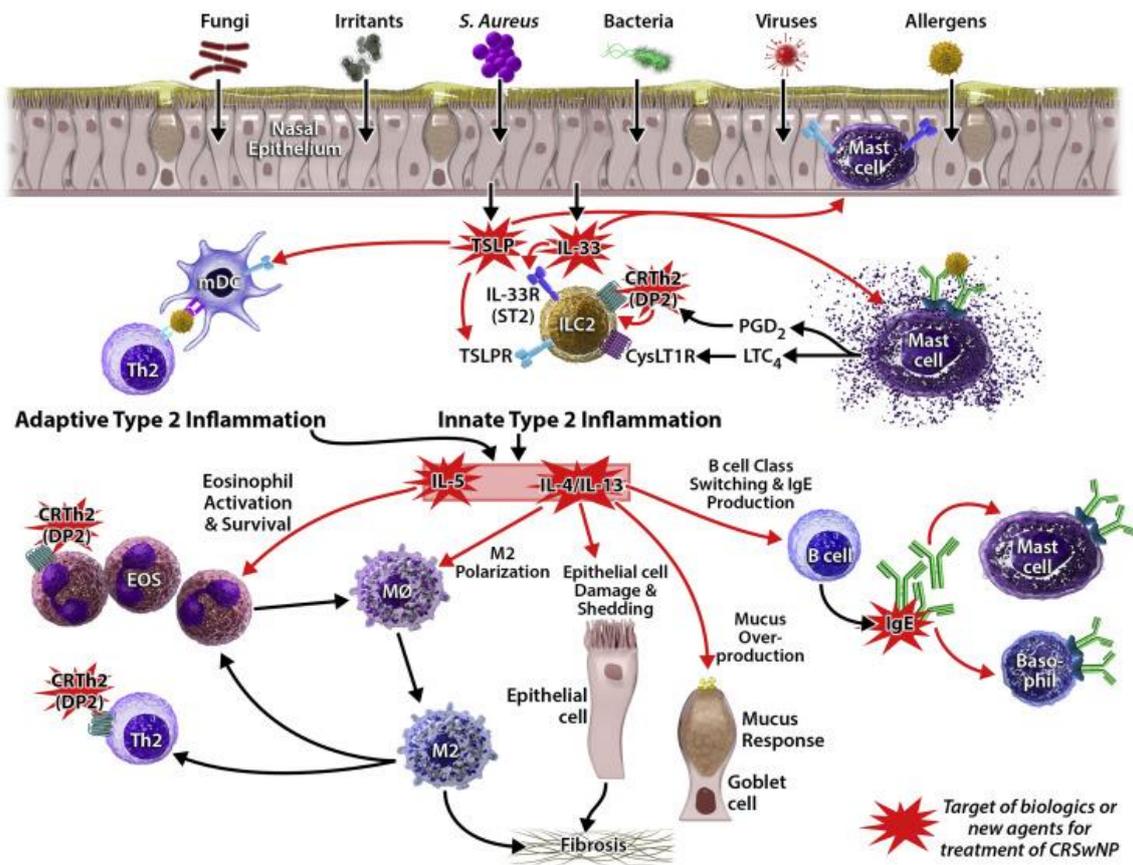
### 1.1.2. Poliposis nasal

La poliposis nasal (PN) es una enfermedad inflamatoria crónica englobada dentro de la rinosinusitis crónica (RSC). Las RSC pueden asociarse a PN (RSCcPN) o no presentar poliposis (RSCsPN). Mientras que en la RSCcPN los síntomas más frecuentes son la obstrucción nasal y la alteración del olfato, en la RSCsPN se añaden el dolor facial y la congestión nasal como síntomas igual de prevalentes<sup>4</sup>.



**Figura 1.** Comparación entre control sano y paciente con rinosinusitis crónica con poliposis nasal (RSCcPN). **a.** Comparación de características anatómicas y sintomatológicas. En la RSCcPN, la inflamación de la mucosa y la sobreproducción de material mucinoso produce dolor, sensación de presión, secreción nasal y, junto a los pólipos nasales, reducción del olfato. **b.** Comparación en cortes de TC. Se aprecia la opacificación de los senos paranasales y la cavidad nasal. **c.** Comparación rinoscópica, donde se pueden observar pólipos nasales en un paciente con RSCcPN. Figuras extraídas de *Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis*, Schleimer R.<sup>5</sup>.

La RSCcPN se asocia típicamente a congestión nasal, anosmia e hiposmia, drenaje postnasal y sensación de presión facial o sinusal (figura 1). Se desarrolla en el contexto de un proceso inflamatorio T2 con la participación de linfocitos  $T_H2$ , mastocitos y células linfoides innatas (ILC2), en muchas ocasiones con un aumento de la IgE y en el que participan las citocinas T2, principalmente las interleucinas (IL) 4, 5 y 13. La IL-5 actúa como factor de activación y supervivencia de los eosinófilos, mientras que la IL-4 y la IL-13 contribuyen a la remodelación y a la fibrosis, a la hiperplasia de células exocrinas caliciformes y la producción de mucina y al cambio de isotipo de las células B hacia la producción de IgE. Las alarminas, IL-25, IL-33 y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), producidas por el epitelio, actúan a varios niveles, entre ellos los receptores presentes en las ILC2, activando el proceso inflamatorio T2. En la figura 2 se presenta una figura explicativa de la patogenia de la RSCcPN y las dianas farmacológicas.



**Figura 2.** Inmunopatología de la RSCcPN. Se destacan en rojo las dianas terapéuticas de fármacos biológicos o nuevos agentes en investigación para el tratamiento de la RSCcPN. Figura extraída de *Biologics in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis*, Laidlaw M., Buchheit M.<sup>6</sup>

La prevalencia de la PN se estima entre el 1 y 4,5 % en adultos y 0,1 % en niños<sup>7,8</sup>. La etiología es desconocida. Se encuentra relacionada con la inflamación crónica, expresión de mucina, formación de biofilmes, infección por *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas y estrés oxidativo<sup>8-12</sup>. No está del todo claro si la sensibilización alérgica está relacionada con la patología<sup>13</sup>.

La calidad de vida (*Quality of Life, QoL*) puede verse significativamente afectada en los pacientes con poliposis nasal. En los estudios realizados por Radenne *et al.*<sup>14</sup> y Alobid *et al.*<sup>15</sup>, quienes emplearon el formulario *Short Form 36 (SF-36)*, se observaron diferencias entre los sujetos sanos y los pacientes con PN en todos los campos, exceptuando la funcionalidad física en el estudio de Alobid *et al.* Añadido a esto, los pacientes con PN presentaban mayor afectación en la esfera mental, en comparación con la física, derivado probablemente de la carga que provocaría la patología en sus vidas.

### **1.1.3. Definiciones clínicas de rinosinusitis**<sup>16</sup>

#### **a. Rinosinusitis en los adultos**

En la tabla 1 se indican los criterios de la rinosinusitis en los adultos.

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de rinosinusitis en los adultos<sup>16</sup>.

|   |   |
|---|---|
| <p><b>Rinosinusitis en adultos:</b></p> <p>Inflamación nasal o de los senos paranasales caracterizada por 2 o más síntomas, uno de los cuales debe ser obstrucción o congestión nasal o secreción nasal (anterior o posterior).</p> <p>Con o sin:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dolor o presión facial</li> <li>- Reducción o pérdida de olfato</li> </ul> |   |
| <p><b>más uno de los siguientes</b></p>   |   |
| <p><b>Signos endoscópicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pólipos nasales y/o</li> <li>- Secreción mucopurulenta, principalmente del meato medio y/o</li> <li>- Edema u obstrucción mucosa, principalmente del meato medio</li> </ul>   | <p><b>Cambios radiológicos en la tomografía computerizada (TC)</b></p> <p>Cambios de la mucosa dentro del complejo ostiomeatal y/o senos paranasales.</p> |

## b. Rinosinusitis en los niños

En la tabla 2 se indican los criterios de la rinosinusitis en los niños.

**Tabla 2.** Criterios diagnósticos de rinosinusitis en niños<sup>16</sup>.

| <b>Rinosinusitis en niños:</b>  |  |
|---|--|
| Presencia de 2 o más síntomas, uno de los cuales debe ser obstrucción o congestión nasal o secreción nasal (anterior o posterior).<br>Con o sin:<br>- Dolor o presión facial<br>- Reducción o pérdida de olfato |  |
| <b>más uno de los siguientes</b>  |  |
| <b>Signos endoscópicos:</b><br><br>- Pólipos nasales y/o<br>- Secreción mucopurulenta, principalmente del meato medio y/o<br>- Edema u obstrucción mucosa, principalmente del meato medio                       | <b>Cambios radiológicos en la tomografía computerizada (TC)</b><br><br>Cambios de la mucosa dentro del complejo ostiomeatal y/o senos paranasales. |

## c. Rinosinusitis aguda en los adultos

En los adultos, la rinosinusitis aguda se define como la instauración brusca de dos o más síntomas, uno de los cuales debe ser obstrucción o congestión nasal o secreción nasal (anterior o posterior), acompañados o no de dolor o presión facial y/o pérdida o reducción de olfato, por un periodo inferior a 12 semanas. Si el problema es recurrente, con periodos asintomáticos entre episodios, se requiere confirmación mediante consulta presencial o telefónica<sup>16</sup>.

## d. Rinosinusitis aguda en los niños

La rinosinusitis aguda en niños se define como la instauración brusca de dos o más síntomas: obstrucción o congestión nasal, secreción nasal clara o tos, por un periodo inferior a 12 semanas. Si el problema es recurrente, con periodos asintomáticos entre episodios, se requiere confirmación mediante consulta presencial o telefónica.

**e. Rinosinusitis aguda recurrente**

Se define como 4 o más episodios de rinosinusitis aguda al año, separados por periodos asintomáticos.

**f. Rinosinusitis crónica**

Presencia de síntomas de rinosinusitis que persisten 12 o más semanas.

**g. Rinosinusitis difícil de tratar**

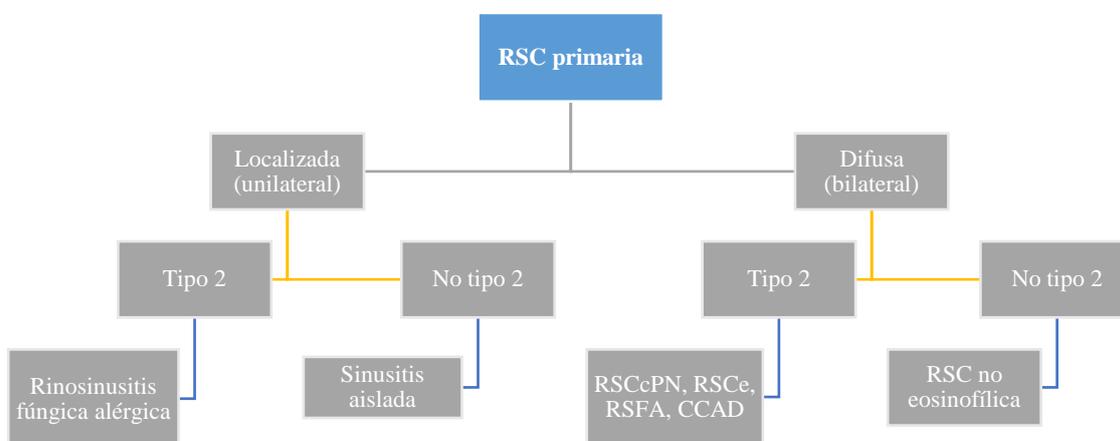
Se puede considerar que los pacientes que no alcanzan un nivel aceptable de control a pesar de un adecuado tratamiento quirúrgico y médico (corticosteroides intranasales y hasta dos ciclos cortos de antibióticos o corticosteroides sistémicos en el último año) presentan una rinosinusitis difícil de tratar<sup>16</sup>. En estos pacientes es de especial interés el entendimiento de las vías moleculares implicadas, con el objetivo de optimizar el tratamiento de forma individual y personal. En la tabla 3 muestra la clasificación de la RSC en función del control clínico.

**Tabla 3.** Clasificación de la RSC según el control clínico en el último mes, EPOS 2020<sup>16</sup>.

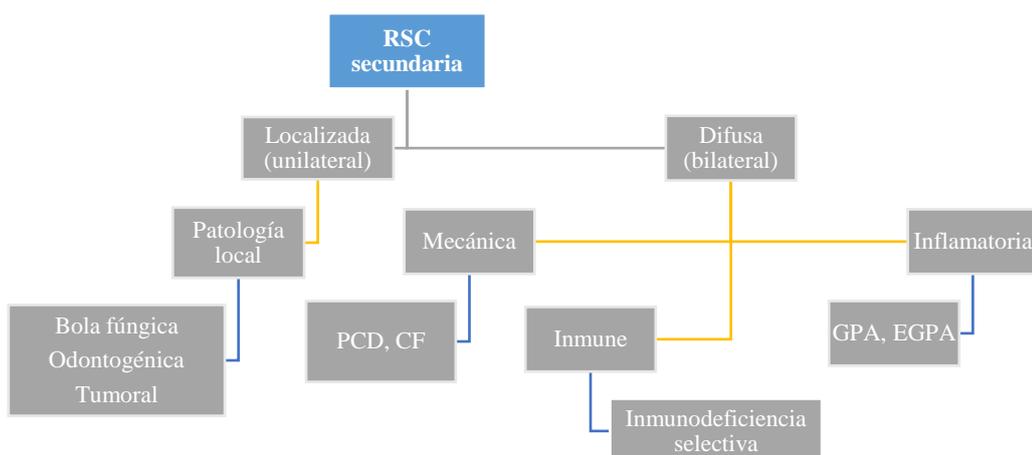
|  | <i>Controlada<br/>(todos los siguientes)</i> | <i>Parcialmente controlada<br/>(al menos 1 presente)</i> | <i>No controlada<br/>(3 o más presentes)</i>              |
|--|--|--|---|
| <b>Obstrucción nasal</b>                               | Ausente o no molesta                         | Presente la mayoría de los días de la semana             | Presente la mayoría de los días de la semana              |
| <b>Rinorrea / goteo postnasal</b>                      | Escasa y mucosa                              | Mucopurulenta la mayoría de los días de la semana        | Mucopurulenta la mayoría de los días de la semana         |
| <b>Dolor facial / presión facial</b>                   | Ausente o no molesta                         | Presente la mayoría de los días de la semana             | Presente la mayoría de los días de la semana              |
| <b>Olfato</b>  | Normal o poco afectado                       | Afectado   | Afectado  |
| <b>Alteración del sueño o fatiga</b>                   | Ausente                                      | Presente   | Presente  |
| <b>Endoscopia nasal (si se dispone de ella)</b>        | Mucosa normal o casi normal                  | Mucosa afectada  | Mucosa afectada   |
| <b>Tratamiento de rescate (en los últimos 6 meses)</b> | Sin necesidad                                | Necesidad de un ciclo de tratamiento de rescate          | Los síntomas persisten a pesar del tratamiento de rescate |

### 1.1.4. Clasificación de la rinosinusitis crónica

La guía EPOS 2020 del grupo *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps* (EP3OS), apoyada por la *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAAIC) y la *European Rhinologic Society* (ERS), establece la división entre RSC primaria y secundaria. La primera subdivisión distingue entre RSC localizada (unilateral) y difusa (bilateral) sobre la base de la distribución anatómica. A continuación, la enfermedad se clasifica por el endotipo dominante. En las figuras 3 y 4 se presenta la clasificación de la RSC primaria y secundaria, respectivamente.



**Figura 3.** Clasificación de la RSC primaria, EPOS2020. RSFA: Rinosinusitis fúngica alérgica. RSCcPN, rinosinusitis crónica con poliposis nasal; RSCe, rinosinusitis crónica eosinofílica; CCAD, enfermedad alérgica de compartimentos centrales.



**Figura 4.** Clasificación de la RSC secundaria, EPOS2020. PCD, discinesia ciliar primaria; CF, fibrosis quística; GPA, granulomatosis con poliangeítis (enfermedad de Wegener); EGPA, granulomatosis eosinofílica con poliangeítis (enfermedad de Churg-Strauss).

### **1.1.5. Impacto de la rinosinusitis**

#### **a. Calidad de vida (*Quality of Life, QoL*)**

El impacto que ejerce la rinosinusitis, tanto crónica como aguda, en la calidad de vida de los pacientes, es uno de los mayores problemas asociados a la patología, que ha sido ampliamente descrito. Los síntomas cardinales de la RSC (obstrucción nasal, insuficiencia ventilatoria nasal, congestión, rinorrea, alteración del olfato, presión y dolor facial) son responsables del empeoramiento del bienestar de las personas afectadas y, si bien no existe habitualmente riesgo vital, constituyen un espectro de síntomas que actúan como graves limitantes de la vida diaria. Así, en un estudio realizado por Gliklich y Metson<sup>17</sup> se observó que la RSC presentaba un impacto en la calidad de vida superior al de la angina de pecho o la insuficiencia cardíaca crónica.

El impacto en la calidad de vida de la RSC se ha evaluado mediante cuestionarios validados como el Eq-5D<sup>18</sup> o el SF36<sup>17,19</sup>, más orientados a medicina general, o el SNOT16<sup>20</sup> y SNOT22<sup>21</sup>, más específicos de patología rinológica<sup>16</sup>.

#### **b. Costes asociados a la rinosinusitis**

Los costes económicos asociados a la RSC no son en absoluto desestimables y superan a los de la úlcera péptica, las agudizaciones del asma o la rinitis alérgica estacional<sup>22</sup>. En los Estados Unidos, el coste por paciente y año es de alrededor de 2600 \$, oscilando la cifra global entre 10 000 y 13 000 millones de dólares al año.

En términos generales, la RSC supone un gasto sanitario de unos 2500 € por paciente por año, a los que es necesario añadir los gastos indirectos (mucho mayores) por pérdida de productividad y absentismo, puesto que el rango de edad de la patología incluye la edad laboral (18 a 65 años). Cabe destacar que en los Estados Unidos la rinosinusitis es una de las 10 enfermedades más costosas para el empleador<sup>23</sup>.

Los gastos asociados a la cirugía son elevados, oscilando entre unos 11000 \$ en EE. UU. y 1100 \$ en India<sup>24,25</sup>.

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA RSC

### 1.2.1. Prevalencia

La epidemiología de la rinosinusitis crónica no está tan estudiada como otros aspectos como su tratamiento o el diagnóstico. Las estimaciones de prevalencia pueden estar sesgadas por el solapamiento con otras patologías rinológicas, pudiendo estar sobreestimada<sup>16</sup>.

Un importante estudio epidemiológico sobre la RSC realizado en Europa fue el que realizó la *Global Allergy and Asthma European Network (GA<sup>2</sup>LEN)*<sup>156</sup>, mediante el empleo de cuestionarios postales enviados a una muestra aleatoria de individuos entre 15 y 75 años. Se obtuvo una prevalencia global del 10,9 %. Los estudios realizados en otras partes del mundo, con métodos similares al de GA<sup>2</sup>LEN, demostraron resultados de prevalencia con una considerable variabilidad entre países, oscilando entre un 5,5 % en Brasil (27) y un 28 % en Irán (32)<sup>27-32</sup>. El diagnóstico clínico de la RSC basado meramente en la sintomatología, sin estar apoyado por signos radiológicos o endoscópicos de inflamación en la mucosa nasal, puede llevar a confusión con otras patologías como la rinosinusitis aguda o la rinitis alérgica. La adición de la endoscopia nasal y la tomografía computarizada, hicieron del diagnóstico de la RSC un proceso más fiable. En el estudio realizado en Corea del Sur, la adición de la endoscopia nasal al diagnóstico redujo la prevalencia de un 12 % a un 1,2 %. En otras situaciones, la prevalencia disminuía al combinar el diagnóstico sintomatológico, extraído de guías EPOS, con la tomografía computarizada<sup>33</sup>. También se dieron casos en otros estudios de nuevos diagnósticos endoscópicos en pacientes con sintomatología negativa que previamente no habían sido etiquetados de RSC<sup>34</sup>.

Hoy en día, se estima que la rinosinusitis crónica afecta a una gran parte de la población (en torno al 5-12 %), constituyendo uno de los problemas de salud más frecuentes. La prevalencia puede variar por las diferencias entre criterios diagnósticos (clínica vs. hallazgos objetivos por rinoscopia o imagen). Se han descrito prevalencias más elevadas en la población de Oriente Medio<sup>35</sup>.

La edad media de diagnóstico es de 39 años<sup>27,36</sup>. El rango de edad es sin embargo amplio, con afectación tanto a adultos como niños.

### **1.2.2. Subtipos de la rinosinusitis crónica**

La rinosinusitis crónica con poliposis nasal (RSCcPN) comprende entre un 25 y un 30 % de los casos de RSC<sup>157</sup>.

La rinosinusitis crónica sin poliposis nasal (RSCsPN) es más frecuente que la RSCcPN (en torno a un 60-65 % de los casos), mientras que la rinosinusitis fúngica alérgica (RSFA) engloba menos del 5 % de los pacientes con RSC, aunque su prevalencia aumenta en algunas áreas geográficas (pacientes jóvenes en zonas del sur de los Estados Unidos).

## **1.3. ASPECTOS ETIOLÓGICOS**

La etiología de la rinosinusitis crónica, con o sin poliposis nasal, es compleja y variada, pudiendo ser la remodelación de la mucosa nasal y la inflamación subyacente responsables de la propia definición de la patología, causada por multitud de factores predisponentes.

### **1.3.1. Factores predisponentes de rinosinusitis crónica con poliposis nasal (RSCcPN)**

#### **a. Alergia**

La relación entre la sensibilización alérgica y la RSC es controvertida y ha sido objeto de diversos análisis. Una revisión sistemática realizada en 2014 que analizó 24 artículos<sup>37</sup> concluyó que el papel de la alergia en la RSCcPN y la RSCsPN no está claro y la evidencia es escasa. De todos modos, la recomendación es evaluar la alergia en los pacientes con RSC y tratarla de modo apropiado (proyecto POLINA<sup>209</sup>). Algunos estudios posteriores han apuntado que los distintos fenotipos de RSC pueden presentar una relación variable con la alergia, sobre todo la RSFA y la CCDAR.

**b. Asma y otras patologías de las vías respiratorias inferiores**

La prevalencia de asma en los pacientes con RSC es de un 25 %, muy superior a la prevalencia de asma en la población general (alrededor del 5 %) <sup>213</sup>, y es superior en los pacientes con RSC y rinitis alérgica concomitantes. En un estudio realizado en el Reino Unido, los autores encontraron una prevalencia de asma cercana al 10 % en los controles, superior al 20 % en los pacientes con RSCsPN, cercana al 45 % en los pacientes con RSCcPN y superior al 70 % en los pacientes con RSFA. En los pacientes que presentan simultáneamente ambas entidades, la asociación entre asma y RSC repercute negativamente en la QoL <sup>42</sup>.

Otras asociaciones relevantes de la RSC son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y las bronquiectasias <sup>45</sup>.

**c. Enfermedad respiratoria exacerbada por antiinflamatorios no esteroideos**

La enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina o, de modo más amplio, por fármacos antiinflamatorios no esteroideos o AINE (EREA), es una entidad caracterizada por la presencia de RSCcPN, asma y episodios de broncoespasmo en relación con la toma de AINE.

Respecto a la prevalencia de esta entidad, un metanálisis reciente concluyó que la EREA se puede presentar en un 7 % de los pacientes con asma típica y hasta en un 15 % de los pacientes con asma grave <sup>158</sup>. Por su parte, entre los pacientes con PN, se estima que la prevalencia puede oscilar entre el 8 y el 16 % <sup>159</sup>. En los pacientes con asma y PN la prevalencia puede ascender al 30 % <sup>160</sup>. Se estima que hasta un 15 % de los pacientes con EREA no son conscientes de presentar hipersensibilidad a los AINE y precisan ser diagnosticados mediante prueba de provocación <sup>161</sup>.

#### **d. Inmunodeficiencias**

Diversos estudios apuntan a una prevalencia aumentada de inmunodeficiencias en la población con rinosinusitis crónica, siendo las más frecuentes la inmunodeficiencia variable común y la deficiencia selectiva de IgA<sup>49</sup>. Un metanálisis<sup>50</sup>, que incluyó 1418 individuos de 13 estudios, encontró que el 23 % de los pacientes con RSC difícil de tratar y el 13 % de aquellos con RSC recurrente presentaba déficits de inmunoglobulinas. Este metanálisis puede estar sesgado por haberse realizado en centros de referencia terciarios, donde la prevalencia de inmunodeficiencias puede ser mayor. Dejando esto a un lado, es bastante probable que la RSC se asocie a un aumento significativo de hipogammaglobulinemia<sup>16</sup>. En los pacientes con RSC y mala respuesta al tratamiento habitual es importante valorar realizar un estudio de inmunidad.

#### **e. Reflujo gastroesofágico**

La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) afecta a un porcentaje elevado de la población (en torno a un 10% en occidente), y se contempla como un posible factor predisponente y de empeoramiento de la RSC, sin llegar a confirmarse su asociación y sin que exista un consenso sobre los posibles beneficios del tratamiento antirreflujo en pacientes con RSC recurrente<sup>16</sup>. No obstante, se podría valorar el tratamiento antirreflujo en determinados pacientes, incluso sin síntomas de ERGE.

#### **f. Variaciones anatómicas nasales**

Las variaciones anatómicas nasales tienen interés en la patogénesis de la RSC por la obstrucción del complejo ostiomeatal. En una revisión realizada en 2010 por Orlandi et al. se demostró una asociación significativa entre la desviación septal y la presencia de RSC, si bien los pacientes afectados de RSC

presentaban inflamación bilateral<sup>53</sup>. A pesar de que las variaciones anatómicas nasales no tienen por qué estar relacionadas con la aparición de RSC, se sospecha su implicación en la progresión de la enfermedad. Sedaghal et al.<sup>55</sup> encontraron una asociación entre una progresión más rápida de la RSC y la presencia de variaciones anatómicas como la presencia de celdillas infraorbitales o de Haller (celdillas de aire laterales a la lámina orbital del etmoides) o celdas frontales intersinusales, si bien dicha prevalencia no ha sido comparada con la de la población sin RSC.

#### **g. Factores microbiológicos**

Teniendo en consideración la naturaleza multifactorial de la RSC, la microbiota puede desempeñar también un papel en su patogénesis. En primer lugar, la progresión de la RSC no se ve claramente favorecida por el uso de antibioterapia<sup>16</sup>; no obstante, se ha evaluado la colonización por distintos patógenos de las vías respiratorias nasales en pacientes con RSC. En el ser humano, el *Staphylococcus aureus* coloniza frecuentemente las vías respiratorias y se ha asociado con el asma. Se han encontrado asociaciones similares en el caso de la RSC, si bien no parece haber diferencias entre RSCcPN y RSCsPN<sup>56</sup>. Otros patógenos que se han relacionado pertenecen a las especies *Corynebacterium*, *Propionibacterium* y a otras especies de *Staphylococcus*; también se ha relacionado al hongo *Malassezia restricta*<sup>57</sup>.

Los biofilmes están constituidos con un conglomerado de microorganismos que se adhieren entre sí y, frecuentemente, a una superficie; están recubiertos de una delgada matriz extracelular. Los microorganismos que los constituyen expresan una serie de genes diferencialmente regulados<sup>162</sup>. La población de estos *biofilmes* abarca especies como *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis* o *Haemophilus influenza*, siendo los de *S. aureus* los más frecuentemente asociados con RSC recalcitrantes o recurrentes.

Su prevalencia en la RSC se estima entre el 29 y el 72 %, y los pacientes con RSC y biofilmes presentan mayor gravedad preoperatoria y persistencia de los síntomas tras la cirugía, con inflamación persistente e infecciones concomitantes<sup>210,211</sup>.

En cuanto a los virus, los coronavirus son los más frecuentemente encontrados en los pacientes con RSC<sup>58</sup>, mientras que los virus *Parainfluenza* son los que más se asocia a disfunción olfatoria posinfecciosa, pudiendo desempeñar un papel en la génesis de la patología<sup>59</sup>. Actualmente, existe también evidencia de su implicación en las exacerbaciones agudas y se piensa que una infección vírica transitoria puede considerarse como un estímulo inflamatorio desencadenante<sup>16</sup>.

La afectación infecciosa fúngica en la rinosinusitis crónica abarca desde colonizaciones superficiales (infección fúngica saprofítica y bola fúngica) o manifestaciones alérgicas hasta entidades como la rinosinusitis fúngica invasiva granulomatosa crónica<sup>16</sup>.

#### **h. Disfunción ciliar**

Las deficiencias en el aclaramiento mucociliar de las vías respiratorias superiores debidas tanto a defectos ultraestructurales primarios como a defectos funcionales de los cilios, posiblemente secundarios a factores contaminantes o infecciosos, están también implicadas en la RSC. Si el aclaramiento mucociliar se ve afectado, las vías respiratorias resultan más vulnerables a infecciones y obstrucciones de repetición, lo que incrementa su susceptibilidad a factores ambientales extrínsecos (polución, microbiológicos...) y acaba resultando en una reacción inflamatoria secundaria, que exagera el defecto del aclaramiento<sup>212</sup>.

### **i. Tabaquismo**

El tabaquismo, tanto activo como pasivo, se asocia de forma clara con la RSC. Los productos presentes en el humo del tabaco inducen inflamación y estrés oxidativo en la mucosa, lo que conlleva la aparición de sintomatología nasal. La encuesta GA<sup>2</sup>LEN demostró una asociación significativa entre tabaco y RSC<sup>60</sup>. En estudios realizados en población pediátrica<sup>61,62</sup> se ha relacionado el tabaquismo pasivo con un peor pronóstico.

### **j. Contaminación**

Existen diversos estudios de correlación entre la exposición a la polución ambiental u ocupacional y el desarrollo de RSC, teniendo en cuenta la gran variedad de contaminantes y periodos de exposición a las que se pueden ver sometidos los pacientes. Los niveles de exposición pueden influir en la gravedad de la sintomatología de la RSC, siendo más relevante la afectación en la RSCsPN<sup>63</sup>; las condiciones de hacinamiento y pobreza se asocian también a un incremento en la prevalencia; y la exposición ocupacional a polvo de papel, productos de limpieza, animales, moho y humedad, u otros agentes ambientales, se encuentra, a su vez, relacionada con la RSC<sup>64,65</sup>. Un estudio reciente correlacionó la exposición ocupacional al polvo con la poliposis nasal en trabajadores de la industria textil<sup>65</sup>.

### **k. Síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS)**

El SAOS y la RSC presentan solapamiento de síntomas y a menudo pueden infradiagnosticarse casos de SAOS en los pacientes con RSC. En estos casos, el SNOT-22 puede ayudar a diferenciar ambas entidades: si la sintomatología predominante se relaciona más con ítems relacionados con el sueño (puntuaciones más elevadas en ítems psicológicos y de sueño)<sup>66</sup>. Sin embargo, en un estudio taiwanés no se encontró correlación entre la presencia de

SAOS y la gravedad de la rinosinusitis, ni se observó un empeoramiento de los problemas de sueño en los pacientes con PN<sup>67</sup>. La relación entre ambas entidades no está del todo clarificada y precisa de mayor estudio.

## 1. Otros

El consumo de alcohol puede verse asociado a un empeoramiento de los síntomas. La prevalencia más alta de hiperrespuesta nasal y bronquial inducida por el alcohol se observa en pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por AINE (N-ERD), seguida de la RSCcPN y, menos frecuentemente, en la RSCsPN<sup>69</sup>.

Otros posibles factores predisponentes de RSC abarcan desde el síndrome metabólico<sup>68</sup> o infecciones dentales hasta enfermedades sistémicas como la granulomatosis con poliangéitis, la granulomatosis con poliangéitis eosinofílica (antigua vasculitis de Churg-Strauss)<sup>70</sup> o, más raramente, la sarcoidosis<sup>71</sup>, la fibrosis quística o la discinesia ciliar primaria.

## 1.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la rinosinusitis crónica, como ya se ha descrito con anterioridad, se basa fundamentalmente en la combinación de historia clínica sintomatológica y signos endoscópicos y de imagen por tomografía computarizada (Tabla 1).

Como se ha especificado, los cuatro síntomas cardinales de la CRS son:

- Obstrucción y/o congestión/bloqueo nasal
- Secreción nasal mucopurulenta anterior y/o posterior
- Dolor/presión/plenitud facial
- Reducción o pérdida de olfato (Tos en niños)

- **Obstrucción y/o congestión/bloqueo nasal**

El concepto de congestión nasal puede diferir mucho entre los pacientes, desde una sensación de obstrucción o presión hasta la presencia excesiva de secreciones. La congestión típica de la RSC es bilateral, si bien los pacientes pueden referirla de predominio unilateral. En caso de verdadera unilateralidad, hay que valorar la posibilidad de que existan variaciones anatómicas locales, desviación septal o tumoraciones, tanto benignas como un pólipo antrocoanal (típicamente unilateral, largo, no relacionado directamente con la RSCcPN), como malignas.

- **Secreción nasal mucopurulenta anterior y/o posterior**

La secreción típica de la RSC es blanquecina o amarillenta, aunque existe variabilidad entre los pacientes. La secreción espesa amarillenta, verde o de marrónácea es más característica de la rinosinusitis aguda recurrente, la rinosinusitis fúngica o la eosinofílica.

- **Dolor/presión/plenitud facial**

La sensación de dolor o plenitud facial aparece en la mayoría de los pacientes con RSC, aunque es menos frecuente en la RSCcPN, debido a que en esta entidad el engrosamiento de la mucosa no se asocia habitualmente con infecciones crónicas<sup>72</sup>. Otros síntomas pueden ser migrañas, cefaleas tensionales, cefaleas en racimo, problemas de la articulación temporomandibular, problemas dentales u otros tipos de dolor facial inespecíficos. Su especificidad en la RSC es menor que la de la obstrucción o la secreción nasales<sup>73</sup>.

- **Reducción o pérdida de olfato (tos en los niños)**

La reducción (hiposmia) o pérdida completa (anosmia) del olfato se asocian con el engrosamiento de la mucosa o la opacificación de la fosa nasal entre el septum y el meato medio, siendo mucho más frecuente en la RSCcPN que en la RSCsPN<sup>75,76</sup>. La distorsión de la sensación olfativa (parosmia/fantosmia) es muy rara en la RSC y suele deberse a traumatismos o infecciones. Además, a diferencia de estas últimas, la hiposmia de la RSC presenta, de forma particular, fluctuación, pudiendo variar según la evolución de la obstrucción y la inflamación de la mucosa. Las causas más frecuentes de reducción de olfato se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Causas más frecuentes de disfunción olfativa.

| Causa                         | Frecuencia (en clínicas especializadas) | Frecuencia (en consultas de ORL) | Presencia de distorsiones (parosmia/fantosmia) |
|-------------------------------|---|----------------------------------|--|
| RSC                           | 6 - 21 %                                | 72%                              | Rara   |
| Post-infecciosa               | 26 - 40 %                               | 11%                              | Muy frecuente                                  |
| Post-traumática               | 16 - 39 %                               | 5%                               | Frecuente                                      |
| Idiopática                    | 14 - 22 %                               | 6%                               | Variable                                       |
| Neurológica/neurodegenerativa | 1 - 2 %                                 | n/a                              | Variable                                       |
| Congénita                     | 4 - 10 %                                | 1%                               | Muy poco frecuente                             |
| Otras causas (tóxicos...)     | 9 - 15 %                                | 5%                               | Variable                                       |

Tabla extraída de la Guía EPOS 2020<sup>16</sup>.

Los signos de complicación o de alarma que indican la necesidad de una atención urgente incluyen la fiebre elevada, la pérdida de visión o visión doble, la proptosis, el edema periorbitario grave, la oftalmoplejía, la cefalea grave, los signos meníngeos u otros signos neurológicos focales, y la epistaxis recurrente<sup>77</sup>.

### **1.4.1. Rinosinusitis crónica con poliposis nasal (RSCcPN)**

La RSCcPN se caracteriza por la presencia de pólipos nasales típicamente bilaterales en la cavidad nasal o en los senos paranasales. Los pólipos típicos de la RSCcPN son masas brillantes, gelatinosas, compuestas de material inflamatorio. Son translúcidos y de coloración



**Figura 5.** Pólipo nasal. Se aprecia el aspecto pálido y la irrigación pobre (fotografía propia).

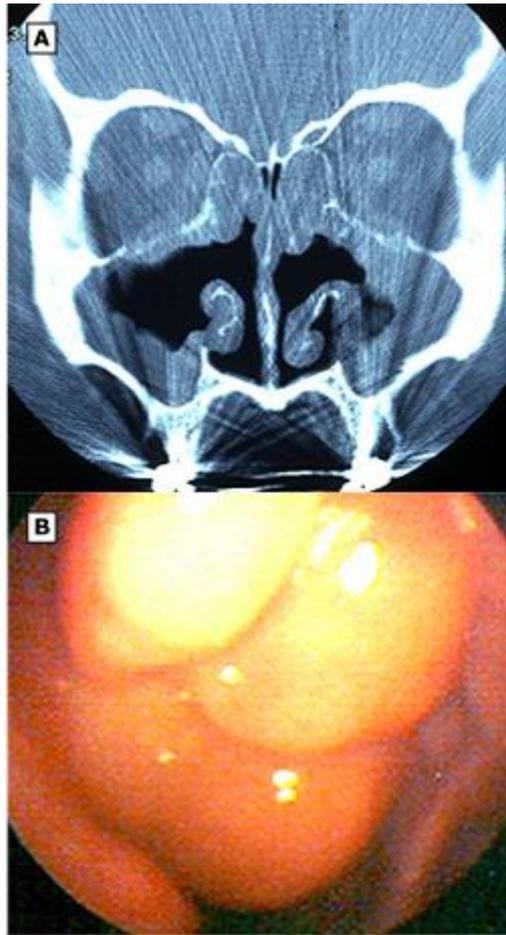
amarillenta a grisácea o blanquecina, debido a su pobre irrigación, como se aprecia en la figura 5. Los pólipos más grandes o extensos se pueden observar con rinoscopia anterior de forma directa, mientras que los más pequeños y posteriores precisan de técnicas endoscópicas y de imagen.

Característicamente, la RSCcPN suele presentarse con un empeoramiento gradual de la sintomatología (congestión/obstrucción, plenitud y presión en senos paranasales, secreción nasal posterior e hiposmia/anosmia), siendo menos frecuente la fiebre o el dolor facial intenso. Afecta normalmente a individuos inmunocompetentes.

- **Técnicas de imagen**

El diagnóstico por imagen se basa fundamentalmente en la tomografía computarizada (TC) (figura 6). Se observa un engrosamiento de la mucosa generalizado y bilateral. Los pólipos se diferencian por su forma y contorno (protrusiones redondeadas hacia las cavidades nasales y de senos), pero también presentan la misma densidad radiológica que la mucosa. A veces, las secreciones pueden quedar atrapadas entre los pólipos, otorgándoles una densidad mixta.

La resonancia magnética puede ser también de utilidad para clarificar casos más ambiguos.

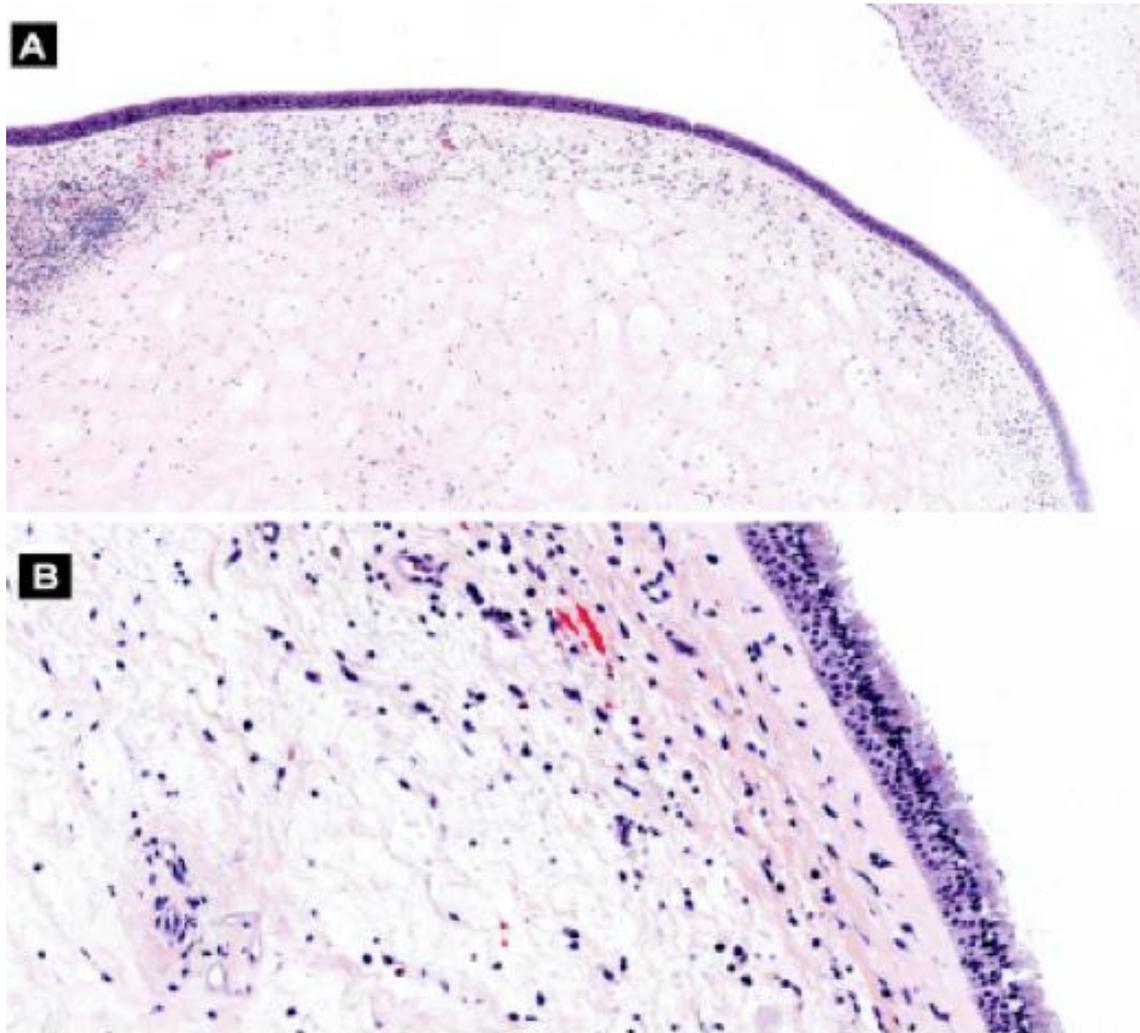


**Figura 6.** Características radiológicas y aspecto endoscópico de la RSCcPN. **a.** TC coronal que muestra la evidencia prequirúrgica de persistencia de mucosa polipoidea, engrosamiento de ambos senos maxilares y opacificación de los senos etmoidales anteriores. **b.** Imagen de endoscopia que muestra la típica apariencia de recrecimiento polipoideo en la región etmoidea anterior izquierda. Figura extraída de UpToDate (2021).

- **Características histológicas**

La biopsia de la mucosa polipoidea se caracteriza por la presencia de edema, la escasez de glándulas submucosas y la fibrosis estromal, con infiltración mixta de células mononucleadas y de eosinófilos, con predominio de estos últimos (figura 7).

El tejido polipoideo contiene niveles altos de citocinas T2, como la IL-5 y la IL-13, así como de histamina<sup>79</sup>.



**Figura 7.** Corte histológico de pólipo sinonasal donde se aprecia la expansión de la submucosa acompañada de infiltración por material fluido y proteico, a menor (a) y mayor aumento (b). Imagen extraída de <https://www.pathologyoutlines.com/>.

- **Etiopatogenia**

Existen diversos factores que pueden afectar al desarrollo de pólipos nasales y, en concordancia, diversas hipótesis sobre la etiopatogenia. Como la RSC, la formación de pólipos nasales es multifactorial y depende tanto de factores ambientales como hereditarios. La mayor parte de los pacientes asocian procesos inflamatorios T2 en la mucosa nasal, cuya etiología en pocas ocasiones se encuentra esclarecida. Algunos casos presentan asma, sinusitis fúngica u otras patologías concomitantes.

Existen diversas teorías sobre la etiopatogenia de los pólipos nasales, como pueden ser la influencia de la atopia (debido a la eosinofilia asociada a la poliposis), de las alteraciones en el flujo aéreo, que provocarían una modificación del flujo adecuado de la mucosidad nasal (variaciones anatómicas, afectación de las vías respiratorias superiores) o de las alteraciones vasomotoras (con el consecuente incremento de la permeabilidad vascular y formación de edema submucoso)<sup>163</sup>.

Sin embargo, la hipótesis más aceptada hoy en día, y que no está desligada completamente de las situaciones indicadas antes, es la de la influencia de procesos inflamatorios de tipo 2, como ya se ha mencionado con anterioridad, con la participación de linfocitos T<sub>H</sub>2, mastocitos e ILC2, aumento de la IgE y participación de las citocinas T2, principalmente IL4, IL5 e IL13, así como de las alarminas IL-25, IL-33 y TSLP.

De esta manera, los defectos en la funcionalidad del epitelio y la inflamación T2 contribuirían a la remodelación tisular y al crecimiento de los pólipos nasales, así como al estado inflamatorio crónico del tejido, como una respuesta adaptativa inmune del mismo<sup>164</sup>.

#### **1.4.2. Evaluación**

La evaluación de la RSC incluye, por lo tanto, la historia clínica, la demostración objetiva de enfermedad de la mucosa nasal (edema mucopurulento, poliposis nasal o engrosamiento de la mucosa u opacificación de senos paranasales demostrados por técnicas de imagen), el estudio alérgico y la evaluación de posibles defectos inmunológicos o complicaciones infecciosas.

La historia clínica debe tener en cuenta la presencia de los síntomas cardinales de la RSC, su duración, el estudio de posibles etiologías y exposiciones a agentes ambientales y alérgenos en

casa o en el trabajo, así como la consideración de estudios previos de imagen, tratamiento o intervenciones quirúrgicas previas.

La evaluación de una posible atopia aporta también información sobre la posible etiología o factores desencadenantes de la patología, y ayuda al diagnóstico diferencial con la rinitis alérgica. La prevalencia de la sensibilización alérgica en los pacientes con RSC se encuentra entre el 60 y el 84 %<sup>75,83</sup>.

La evaluación de la condición inmune del paciente es interesante en aquellos casos de episodios recurrentes de rinosinusitis aguda purulenta o cuando existe historia concomitante de infecciones pulmonares u otitis media de repetición. Las inmunodeficiencias se relacionan más frecuentemente con la RSCsPN que con la RSCcPN (alrededor de un 12 % de las RSCsPN<sup>75</sup>).

Para el estudio de otras posibles enfermedades sistémicas asociadas es recomendable una evaluación de perfiles de laboratorio hematimétricos, con recuento diferencial de células sanguíneas, de autoinmunidad (presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), relacionados con vasculitis autoinmunes) y bioquímicos generales (niveles de enzima convertidora de angiotensina (ECA) en sangre periférica, elevada en muchos casos de sarcoidosis). La radiografía de tórax, el test del sudor o el despistaje de posibles variantes génicas del gen *CFTR* descartan la asociación de fibrosis quística. Para la sospecha de discinesia ciliar primaria conviene realizar estudios de imagen de pulmón, biopsia nasal o bronquial y la medición de la fracción espirada de óxido nítrico (FeNO) nasal, que está típicamente disminuida.

### **1.4.3. Diagnóstico diferencial**

El solapamiento de la sintomatología con la de otras enfermedades nasales y la posible coexistencia de la RSC con estas patologías hacen necesario el diagnóstico diferencial.

Los síndromes que cursan con dolor facial (migrañas, cefaleas tensionales, en racimo...) conforman un abanico muy amplio y los síntomas son altamente inespecíficos, a pesar de ser muy

sensibles y frecuentes en pacientes con RSC. Conviene evaluar la posible coexistencia de patrones de dolor ante situaciones de enfermedades concomitantes.

La rinorrea anterior o posterior es característica también de la rinitis alérgica, la vasomotora o idiopática o la medicamentosa, sin necesidad de verse asociada a la sintomatología sinusal propia de la RSC. Otras causas mucho menos comunes son la rinorrea de líquido cefalorraquídeo, los tumores secretores, el papiloma invertido o la presencia de cuerpos extraños en la cavidad nasal. En estos casos, la secreción nasal, por lo general, no es mucopurulenta.

También hay que distinguir las posibles causas alternativas de hiposmia y anosmia, como traumatismos craneoencefálicos, infecciones respiratorias, alteraciones neurológicas o defectos asociados a la edad. La cacosmia (olor desagradable) no es sugestiva de RSC.<sup>35</sup>

#### **1.4.4. Sistemas de gradación en la poliposis nasal**

Existen diversas escalas para el establecimiento de los grados de poliposis nasal. A principios de los años 90, Lund y Mackay propusieron una escala visual analógica en la que el paciente evaluaba de forma subjetiva la gravedad de su sintomatología, así como cuáles eran los síntomas predominantes.

El sistema de gradación de Meltzer tiene en consideración el número y tamaño de los pólipos nasales (0 = sin pólipos; 1 = pólipos confinados al meato medio; 2 = múltiples pólipos en meato medio; 3 = pólipos que sobrepasan el meato medio; 4 = pólipos que obstruyen completamente la cavidad nasal)<sup>84</sup>.

La clasificación de Lildholdt se basa en hallazgos endoscópicos. El estadio 0 corresponde a ausencia de pólipos, 1 a la presencia de un pólipo pequeño que no llega al lomo del cornete inferior. El grado 2 cuando el pólipo sobrepasa el borde más craneal y caudal del cornete inferior, y el grado 3 cuando rebasa el borde inferior del cornete inferior<sup>85</sup>.

La clasificación de Lund-Mackay atiende a características tomográficas de los senos paranasales<sup>86</sup>. Consiste en un sistema de puntuación según la opacidad en la TC de cada uno de los senos paranasales. Una puntuación de 0 corresponde a una ausencia completa de opacidad, 1 si hay opacidad parcial y 2 si la opacidad es total. La puntuación final es la suma de estas puntuaciones, lo que resulta en un valor comprendido entre 0 y 24.

La escala modificada endoscópica de Lund-Kennedy tiene en cuenta la apariencia de ambas fosas nasales en términos de pólipos (0 = sin pólipos; 1 = pólipos confinados en meato medio; 2 = pólipos que sobrepasan el meato medio), edema (0 = sin edema; 1 = edema moderado; 2 = edema abundante) y secreción nasal (0 = ninguna; 1 = clara y fluida; 2 = espesa y mucopurulenta)<sup>87</sup>.

Existe también un sistema de estadiaje postoperatorio, como la Puntuación Endoscópica Modificada de Lund-Mackay (MLMES), basada en las características endoscópicas de todos los senos paranasales (maxilares, etmoidales, esfenoidales, frontales) y de la cavidad nasal. Se estudia la inflamación de la mucosa (0 = normal; 1 = mucosa moderadamente edematosa con cavidad patente; 2 = mucosa intensamente edematosa con cavidad comprometida; 3 = mucosa polipoidea moderada con cavidad patente; 4 = mucosa polipoidea extensa con cavidad comprometida; 5 = pólipo confinado a cavidad; 6 = pólipo que se extiende más allá de la cavidad), mucosidad (0 = ninguna; 1 = clara y fluida; 2 = espesa y eosinofílica) y secreción purulenta (de 0 a 2 según grado de presencia). La puntuación final está comprendida entre 0 y 100<sup>88</sup>.

## **1.5. BIOMARCADORES EN LA POLIPOSIS NASAL**

Los biomarcadores más frecuentemente empleados en el diagnóstico de la RSC se pueden obtener de una variedad de líquidos y secreciones biológicas, siendo la sangre periférica la más accesible y que requiere menos tiempo y menos experiencia. Sin embargo, no siempre la sangre periférica reflejará la inflamación local y el microambiente nasales. Las secreciones nasales obtenidas por lavado pueden tener utilidad diagnóstica, aunque no siempre corresponden los

resultados con los obtenidos de biopsias tisulares. Esto se podría deber probablemente a la variabilidad del microambiente inflamatorio entre secreción y tejido sinonasal, así como de la composición en citocinas y otras proteínas<sup>89</sup>. En la tabla 5 se muestran los biomarcadores de PN más estudiados.

**Tabla 5.** Lista de biomarcadores de poliposis nasal

| Biomarcador                          | Origen                            | Terapia dirigida        |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Eosinofilia                          | Sangre periférica, tejido         |                         |
| IgE                                  | Tejido                            | Omalizumab              |
| Citocinas                            |                                   |                         |
| IL-4                                 | Tejido                            | Dupilumab               |
| IL-5                                 | Tejido                            | Mepolizumab, Reslizumab |
| IL-13                                | Tejido                            | Dupilumab               |
| IL-25                                | Tejido                            |                         |
| IL-33                                | Tejido                            |                         |
| Linfopoyetina estromal tímica (TSLP) | Tejido                            | Tezepelumab             |
| Periostina                           | Tejido, secreción nasal           |                         |
| Glicoproteína P                      | Tejido, secreción nasal           | Verapamilo              |
| CXCL-12/CXCL-13                      | Tejido                            |                         |
| Células ILC2                         | Tejido                            |                         |
| Autoanticuerpos (IgG e IgA)          | Tejido                            |                         |
| Óxido Nítrico (NO)                   | Aire exhalado                     |                         |
| Receptores de gusto amargo y dulce   | Tejido, genotipado, test de gusto |                         |
| Microbioma                           | Secreción nasal                   |                         |
| IgE frente a <i>S.aureus</i>         | Tejido                            |                         |
| Enterotoxina                         |                                   |                         |
| Metaloproteinasas de matriz          | Tejido, secreción nasal           | Doxiciclina             |
| Oncostatina M                        | Tejido                            |                         |

Modificada de *Biomarkers in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps*. Workman AD, 2018<sup>89</sup>.

Un biomarcador ideal debe de proporcionar una alta especificidad y sensibilidad para la patología en cuestión y ser fácil de obtener. La propia facilidad de obtención de la muestra asegura en cierta medida una mayor reproducibilidad del estudio, dando consistencia y robustez a la técnica. La sangre periférica cumple este criterio de accesibilidad, y es una de las razones por las que el presente estudio se ha realizado buscando biomarcadores génicos de expresión en este tipo de muestra.

Muchos biomarcadores de RSC nacen de estudios de prueba de concepto de otros marcadores de enfermedades relacionadas, tales como el asma, la dermatitis atópica o alergias ambientales.

### **1.5.1. Principales biomarcadores**

#### **a. Eosinofilia asociada a la poliposis nasal**

La RSCcPN está clásicamente asociada a un incremento de inflamación eosinofílica, a diferencia de la RSCsPN. Sin embargo, la verdadera frecuencia de eosinofilia en los pacientes con PN no es tan alta, y existen evidencias de un elevado número de casos de RSCcPN sin una elevación de eosinófilos asociada.

La eosinofilia tisular no se considera un biomarcador de poliposis, aunque puede ser de utilidad como marcador predictivo de la progresión, gravedad y riesgo de recurrencia después de la cirugía de senos paranasales<sup>12</sup>. La sintomatología no refleja con exactitud la eosinofilia tisular y no puede ser predicha mediante puntuaciones del SNOT-22 ni relacionada con la presencia de asma o EREA<sup>90</sup>. Varios grupos de investigación han evaluado la utilidad de la microscopía tisular en la clasificación y el establecimiento de puntos de corte que determinan una mayor o menor mejora en la medida de la QoL posquirúrgica<sup>91,92</sup>. Muchos estudios afirman que es posible diferenciar cohortes de pacientes con poliposis nasal no eosinofílica y pacientes con poliposis nasal hipereosinofílica, pero la realidad es que muchos pacientes se sitúan en un espectro continuo que hace que el agrupamiento por eosinofilia sea difícil<sup>90</sup>. La eosinofilia sanguínea tampoco se correlaciona necesariamente con la del tejido<sup>93</sup>.

Con relación a la IgE, no está clara su utilidad como biomarcador PN en la RSCcPN, a pesar de haberse descrito su aparente relación con la probabilidad de recurrencia tras intervención quirúrgica o con la reducción del tamaño del pólipo y mejora de las puntuaciones tras el tratamiento con omalizumab, un anticuerpo monoclonal frente a IgE<sup>94</sup>.

### **b. Periostina**

La IL-4 e IL-13 promueven la secreción de periostina, una proteína extracelular que interacciona con moléculas de integrina relacionadas con la remodelación tisular, con un efecto directo sobre la fibrosis subepitelial de la vía respiratoria. Tiene también su función en la angiogénesis por medio del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y participa en el reclutamiento de eosinófilos.

Se ha observado un aumento de la periostina en pacientes con RSCcPN, independientemente de que presenten o no comorbilidades como asma o atopia, y que se encuentra especialmente elevada en aquellos con enfermedad activa<sup>89</sup>. Se ha establecido también un punto de corte de 48,5 ng/ml para la periostina sérica, que se asocia con un 93,5 % de sensibilidad para la presencia de IL-5 en el tejido remodelado. Al estar implicada en la regulación de la expresión de otras moléculas inflamatorias podría ser considerada su utilidad como marcador de la reducción de la inflamación<sup>95</sup>.

### **c. Glicoproteína P**

La glicoproteína P es una proteína transmembrana dependiente de ATP que actúa como bomba de eflujo. Se ha asociado a aumento de la secreción de citocinas en la inflamación relacionada con RSC<sup>96,97</sup>. Además de en el tejido, se encuentra en fluidos nasales, haciendo de la recolección de la muestra un proceso más sencillo que el de la biopsia tisular. Se encuentra elevada en todos los tipos de RSC y se han encontrado valores más aumentados en la RSCcPN, llegándose incluso a correlacionar con medidas subjetivas y objetivas de la gravedad de la patología<sup>98</sup>. El verapamilo, antagonista de la glicoproteína P, ha demostrado utilidad en el tratamiento de la RSCcPN, mejorando a su vez las puntuaciones en el SNOT-22 de una forma similar a la de los fármacos biológicos o los corticoides<sup>99</sup>.

#### **d. Células inmunes y autoanticuerpos**

A nivel local, dentro del propio tejido del pólipo nasal se produce una activación y proliferación de células inmunes, elevando, en consecuencia, las concentraciones de inmunoglobulinas, cambio que no se ve reflejado de igual manera a nivel sistémico. Tanto los linfocitos T y B como las células plasmáticas y los plasmablastos se expanden rápidamente<sup>100</sup>. Las células linfoides innatas (ILC2) se correlacionan con empeoramiento de la sintomatología nasal<sup>101</sup>. También se produce un incremento de moléculas CSCL-12 y CXCL-13, quimiocinas reconocidas por los leucocitos e implicadas en cascadas de activación inmunes.

Se ha estudiado también una asociación con diferentes autoanticuerpos. Tan et al. demostraron una elevación de autoanticuerpos de tipo IgG e IgA dentro del tejido del pólipo<sup>102</sup>. Los anticuerpos anti-dsDNA (antiDNA de doble cadena), ANCA (anticitoplasma de neutrófilos), ANA (antinucleares) u otros anticuerpos anticitocinas pueden estar presentes en la RSCcPN. Los ANCA pueden estar asociados a pacientes con poliposis difícil de tratar<sup>89,103</sup>.

#### **e. Microbioma**

El microbioma, o conjunto de material genético perteneciente a microorganismos presentes en nuestro cuerpo, puede desempeñar un papel relevante en la patogénesis de la RSC. Se piensa que la disbiosis (alteración del equilibrio de la microbiota) puede estar correlacionada con el estado de la RSC, y varios estudios han demostrado que la diversidad bacteriana disminuye con la enfermedad, así como aumenta la cantidad total de bacterias<sup>104</sup>.

Algunos investigadores se han llegado a aventurar asociando la presencia de determinados microorganismos con fenotipos de pacientes, entre los que se incluye la poliposis nasal. Se ha estudiado un aumento de colonización por *Staphylococcus aureus*, y un aumento de anticuerpos IgE frente a enterotoxinas de *S. aureus*. *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* serían responsables de la disrupción de la barrera epitelial que conllevaría los mecanismos patogénicos

de la RSCcPN<sup>105</sup>. La síntesis de moléculas antimicrobianas, como lisozima, proteína S100 o  $\beta$ -defensinas, se ve aumentada en pacientes con RSCcPN frente a grupos control<sup>106</sup>.

Se habla incluso de una teoría patogénica alternativa para la sinusitis mediada por células  $T_H2$ , en las que las mismas son sensibilizadas por alérgenos pertenecientes a hongos ambientales, promoviendo el estado hiperinflamatorio<sup>89,104</sup>.

#### **f. Óxido nítrico**

Debido a la oclusión ostial y a la afectación del intercambio gaseoso en la cavidad nasal, en los pacientes con RSCcPN, puede verse reducida la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO). Los pacientes con RSCsPN también pueden ver disminuido su FeNO, pero de forma significativamente menor que aquellos que presentan poliposis nasal<sup>107</sup>. Se han llegado a establecer incluso *puntos de corte* con cierta sensibilidad (81,3 %) y elevada especificidad (93,3 %) de FeNO para la presencia de pólipos nasales<sup>108</sup>, aunque se han detectado valores extremos en individuos atópicos con fracciones exhaladas elevadas, tanto en controles como pacientes, que restarían especificidad al marcador.

Actualmente, el FeNO se utiliza como biomarcador de control del asma, con niveles bajos correspondientes a un mejor control de la enfermedad. Su estudio como marcador de la poliposis nasal puede resultar de interés, sobre todo por sus características no invasivas.

#### **g. Citocinas**

Los perfiles de citocinas son probablemente los más estudiados en la RSC. La caracterización clásica de la RSCcPN incluye un microambiente de linfocitos  $T_H2$  con expresión aumentada de TSLP y otras alarminas e IL de tipo 2, como se ha comentado. En contraste, la RSCsPN se caracteriza por un microambiente  $T_H1$  y  $T_H17$ , con neutrofilia y expresión de TGF- $\beta$ , interferones de tipo I, IL-6, IL-8 o IL-17<sup>89</sup>.

La IL-5 se relaciona con el reclutamiento de eosinófilos, su activación y supervivencia. La IL-4 e IL-13 están involucradas en la producción de IgE local y estimulan la secreción de moco. Además, la IL-13 tiene un efecto sobre la diferenciación epitelial, produciendo metaplasia de células en cáliz y afectando a los cilios, contribuyendo de esta forma a un aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial sinonasal. A su vez, causa fibrosis subepitelial e hiperreactividad de la vía respiratoria.

La IL-25, IL-33 y TSLP son citocinas derivadas del epitelio que desempeñan un papel importante en la patogénesis tanto de la RSCcPN como del asma. La IL-25 parece estar relacionada con la cascada reguladora de IL-13, teniendo un efecto por lo tanto indirecto sobre las funciones de esta citocina. También se ha asociado con una mayor gravedad en parámetros de puntuación por TC<sup>109</sup> y con aumento de eosinófilos. Se ha estudiado un aumento de expresión en tejido<sup>110</sup>, sirviendo como posible biomarcador de RSCcPN. El aumento de la expresión de IL-33 se ha asociado sobre todo a pacientes con RSCcPN grave y recalcitrante<sup>111</sup>.

#### **h. Otros biomarcadores**

Otros biomarcadores descritos en la poliposis nasal son las metaloproteinasas de la matriz (MMP), que están involucradas en la remodelación tisular y se ven aumentadas de forma aparentemente específica en la PN. En estudios realizados con doxiciclina, que tiene un efecto antiMMP, se han evidenciado disminuciones en los niveles de MMP acompañados de reducción en el tamaño de los pólipos<sup>112</sup>.

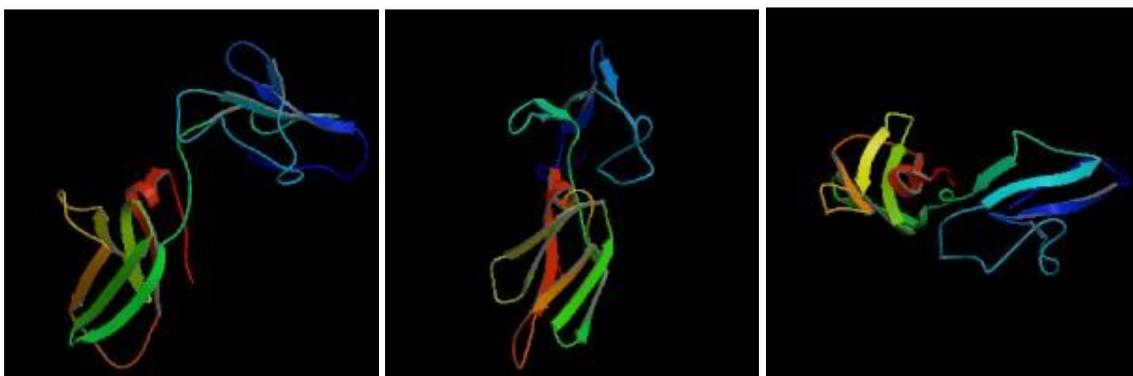
La oncostatina M es una molécula relacionada con IL-6 que se encuentra elevada en la RSCcPN e *in vitro* aumenta la permeabilidad tisular en células epiteliales<sup>89,113</sup>.

Se ha estudiado también la posibilidad de realizar tests básicos de estimulación de receptores del gusto dulce y amargo para la evaluación de su funcionalidad y su asociación con la RSC. En la RSCsPN parece que existe una disminución de la sensibilidad a receptores de gusto amargo, como el denatonium, mientras que, tanto en la RSCsPN como en la RSCcPN, la

sensibilidad a receptores dulces, evaluada con sacarosa, parece estar incrementada. Estos estudios podrían abrir puertas a la clasificación por endotipos basados en la evaluación del gusto de pacientes con RSC<sup>89</sup>.

### **1.5.2. Papel de la interleucina 5 (IL-5) y del receptor de IL-5 (IL-5R)**

La IL-5 se caracteriza por su actividad en distintas células diana, entre las que se incluyen linfocitos B, eosinófilos o basófilos. Es producida por linfocitos T, sobre todo Th2, ILC2 y mastocitos, y tiene efectos en la proliferación y diferenciación, a través de un receptor (IL-5R), un heterodímero compuesto por una subunidad  $\alpha$  específica de ligando (IL-5R $\alpha$ ) y otra subunidad  $\beta$ , común a otros receptores de citocinas. La estructura tridimensional se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Vistas frontal, lateral y superior de la estructura predictiva de IL-5R $\alpha$ . ModBase (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/>)

El IL-5R se localiza en la superficie de células como los eosinófilos y basófilos. La cadena  $\alpha$  (60 kD) se une de forma específica a la IL-5, mientras que la  $\beta$  (130 kD) aumenta la afinidad de la unión y juega un papel en la transducción de la señal, pero carece de capacidad de reconocimiento de la molécula. Las vías de transmisión de señales de IL-5R $\alpha$  incluyen JAK/STAT, Btk y Ras/Raf-ERK y conllevan el mantenimiento de la supervivencia y la funcionalidad de linfocitos B y eosinófilos y poblaciones de basófilos.

En 2001, Geijsen et al<sup>14</sup>, identificaron una interacción entre la IL-5R $\alpha$  y la sintenina, en concreto con los últimos 15 residuos C-terminales de IL-5R $\alpha$ , siendo de especial importancia la

fenilalanina terminal. La sintenina media la interacción a su vez de IL-5 con el factor de transcripción SOX4, actuando como una molécula adaptadora de la activación de SOX4 mediada por IL-5R $\alpha$ . La experimentación en ratones ha puesto en evidencia que tanto los defectos en IL-5R $\alpha$  como en SOX4 afectan al desarrollo de las células B<sup>114</sup>.

Debido a la relación de la poliposis nasal con un fenotipo T<sub>H</sub>2, la evolución de la poliposis nasal asociada al asma con eosinofilia se ha considerado un buen biomarcador para predecir la respuesta a los anticuerpos antiIL-5 en el asma<sup>89</sup>. Las terapias antagonistas de la IL-5 han demostrado ser de utilidad en pacientes asmáticos con un fenotipo T<sub>H</sub>2, siendo por lo tanto posible la extensión del potencial de dicho tratamiento al de la inflamación presente en RSCcPN. Los ensayos clínicos iniciales con anticuerpos antiIL-5 como mepolizumab o reslizumab en RSCcPN han demostrado reducción en el tamaño de los pólipos y en la necesidad de cirugías de revisión<sup>115,116</sup>. Sin embargo, no se ha demostrado una mejoría en las puntuaciones de síntomas nasales, y se necesita una selección cuidadosa del paciente que pueda ser beneficiado por la terapia, ya que el coste asociado a fármacos biológicos puede ser mayor que el de la cirugía. Por este motivo es necesaria también una evaluación detallada y longitudinal de estos biomarcadores para evaluar la efectividad terapéutica.

## **1.6. TRATAMIENTO**

A continuación, se presentan de forma resumida las estrategias terapéuticas en RSC, con distinción entre RSCcPN y RSCsPN.

En primer lugar y como ya se ha comentado antes, hay que tener en cuenta la naturaleza crónica de la patología, lo que supone una perspectiva terapéutica de paliación de síntomas, control de la inflamación, mantenimiento de una ventilación adecuada y la reducción del número de exacerbaciones agudas, con el objetivo de mejorar la calidad de vida del paciente.

Como medida preventiva de la progresión y empeoramiento de la enfermedad, es de obligada necesidad abandonar los hábitos tabáquicos, lo cual se asocia a mejora en la sintomatología, calidad de vida y necesidad de corticoides<sup>117</sup>.

Las medidas generales incluyen la irrigación con suero salino intranasal para reducir las secreciones posteriores y aclarar la cavidad nasal de posibles agentes alérgenos e irritantes; la irrigación con surfactantes, como champús pediátricos, que previenen la formación de biofilmes y aumentan el aclaramiento ciliar; el uso de corticoides tópicos intranasales (budesonida, fluticasona, mometasona, triamcinolona, ciclesonida, beclometasona...) en formato de spray nasal o soluciones para instilación; corticoides orales como la prednisona, en situaciones refractarias de edema de mucosa en RSCsPN o para reducir el tamaño de los pólipos en RSCcPN; la asociación de antibioterapia, cuya evidencia es limitada y se centra sobre todo en el tratamiento de exacerbaciones agudas o casos de infección bacteriana clara; o agentes antileucotrienos (montelukast, zafirlukast, zileuton) para reducir la inflamación, el edema y la permeabilidad vascular.

En los pacientes con RSCsPN existe cierto consenso en que, como opción de tratamiento, se combine el uso de antibióticos sistémicos de corta duración y corticoides orales<sup>118</sup>. En las guías europeas y británicas se recomienda el uso de macrólidos a dosis bajas<sup>165,166</sup>; sin embargo, existe discrepancia entre autores sobre su efectividad. Las cirugías endoscópicas de senos paranasales (septoplastia con turbinoplastia, etmoidectomía, antrostomía maxilar...) se plantean en casos refractarios a tratamiento médico<sup>119</sup>.

El tratamiento de la RSCcPN debe estar enfocado también al de la obstrucción causada por los pólipos. El uso de pautas cortas de corticoides orales (unos 10 a 15 días) puede resultar beneficioso en pacientes con obstrucción nasal y reducción del olfato, especialmente cuando las terapias tópicas medicamentosas son ineficaces debido a la barrera física que supone la presencia de las masas polipoideas. Los corticoides pueden disminuir el tamaño de los pólipos, mejorando el estado clínico del paciente. No se recomienda el uso de antibióticos en la RSCcPN, a menos de que se sospeche la infección<sup>119</sup>.

Las polipeptomías son procedimientos ambulatorios relativamente sencillos y rápidos, necesarios para el alivio de la sintomatología cuando la obstrucción es clara. Los distintos tipos de cirugía de los senos paranasales constituyen otra opción de tratamiento, aunque algunos autores opinan que hoy en día no existe evidencia suficiente como para recomendar la cirugía frente al tratamiento médico<sup>17</sup>. Los procedimientos quirúrgicos tienen como objetivo tanto permeabilizar los ostia para posibilitar su drenaje, como erradicar la mucosa de las masas laterales del etmoides y facilitar la acción posterior de la corticoterapia local<sup>85</sup>.

Una vez alcanzada la estabilidad, es preciso mantener un buen control con un tratamiento de mantenimiento a largo plazo, lo que incluye el empleo de suero salino y corticoides intranasales, el uso de anti-leucotrienos, el tratamiento de la rinitis alérgica de base o de los posibles estados de inmunodeficiencia, más típicos en RSCsPN.

A lo largo de los últimos años se han desarrollado distintos fármacos biológicos que suponen una terapia dirigida y un tratamiento personalizado del paciente, como pueden ser dupilumab (anti IL-4R $\alpha$ ), omalizumab (anti-IgE), mepolizumab, reslizumab (anti-IL-5) y benralizumab (anti-IL-5R $\alpha$ ), que serán descritos al final de la sección. Estos biológicos se encuentran actualmente disponibles para el tratamiento del asma grave en algunos países<sup>119</sup>.

Aparte de los estudios con dupilumab, mepolizumab y omalizumab, un ensayo reciente con benralizumab<sup>167</sup>, dirigido específicamente contra IL-5RA, ha demostrado una reducción significativa de la obstrucción nasal y una mejoría en las puntuaciones de poliposis nasal en pacientes con RSCcPN. Se destaca un mayor efecto del tratamiento en pacientes con asma asociada o con un elevado nivel de eosinófilos en sangre periférica, mencionando la variabilidad con la que la eosinofilia puede relacionarse con las manifestaciones clínicas de la RSCcPN.

## **1.7. ASMA Y RSCcPN. DEFINICIÓN DE ASMA. FENOTIPOS.**

El asma es una condición común que afecta en torno al 1-18 % de la población general. Según la definición propuesta por la GINA 2020 (*Global Initiative for Asthma*), se trata de una

enfermedad heterogénea, caracterizada normalmente por una inflamación crónica de la vía respiratoria. Se define por historia clínica de síntomas como sibilancias, dificultad respiratoria, presión en el pecho o tos, que puede ser variable en el tiempo y en intensidad, dependiendo de las actividades realizadas y del esfuerzo necesario para llevarlas a cabo, así como de otros factores como la alergia, el clima, la exposición a agentes irritantes o las infecciones respiratorias. Estos síntomas pueden estar silentes durante largos periodos de tiempo y manifestarse en las exacerbaciones propias de la enfermedad. Se caracteriza por hiperreactividad de la vía aérea a estímulos directos o indirectos, que pueden no estar acompañados necesariamente de sintomatología.

Se estima que en alrededor del 26 al 84 % de los pacientes con RSCcPN, ésta se asocia a asma<sup>120</sup>.

### **1.7.1. Fenotipos del asma**

El conjunto de patrones demográficos, clínicos y/o fisiopatológicos define los fenotipos del asma, y son de interés a la hora de un manejo más personalizado del paciente. Algunos de los fenotipos de mayor interés son<sup>177</sup>:

- **Asma alérgica**

El asma alérgica comienza normalmente en la infancia y se asocia a antecedentes familiares de atopia, como eccema, rinitis alérgica o sensibilización a distintos agentes. El análisis del esputo de estos pacientes revela la presencia de una inflamación eosinofílica de la vía respiratoria, que tiene interés a la hora de estudiar biomarcadores relacionados con los eosinófilos y de llevar a cabo un tratamiento dirigido. Presentan además buena respuesta a corticoides inhalados.

- **Asma no alérgica**

Por el contrario, el asma no alérgica cursa con pruebas cutáneas de atopia negativas, la inflamación es más inespecífica (neutrofílica, eosinofílica o paucigranulocítica) y la respuesta a corto plazo a corticoides tópicos de uso inhalado no es tan clara.

- **Asma de adulto de inicio tardío**

El asma de inicio tardío es más frecuente en mujeres.<sup>121</sup> Estos pacientes suelen ser no alérgicos y presentar peor respuesta a corticoterapia inhalada. El diagnóstico diferencial incluye el del asma de origen ocupacional, por posible exposición laboral a agentes desencadenantes.

- **Asma con limitación al flujo aéreo**

El asma con limitación persistente del flujo aéreo con reversibilidad incompleta puede deberse a la remodelación de la vía respiratoria. Supone una mayor carga clínica y un tratamiento más exhaustivo.

- **Asma y obesidad**

El asma asociada a la obesidad se caracteriza por síntomas respiratorios prominentes, pero con poca inflamación eosinofílica de la vía respiratoria.

También resulta de interés la clasificación del asma según la eosinofilia en sangre periférica y el resultado de la fracción espirada de óxido nítrico (FeNO). Según esto, se puede categorizar en<sup>179</sup>:

- **Asma Tipo 2 (T2):**

Fenotipo de asma caracterizado por nivel de eosinófilos totales en sangre periférica  $\geq 150/\mu\text{l}$  o FeNO  $\geq 25$  ppm o presencia de alergia.

- **Asma no Tipo 2 (No-T2):**

Nivel de eosinófilos totales en sangre periférica  $< 150/\mu\text{l}$  y FeNO  $< 25$  ppm y sin alergia.

### **1.7.2. Cuadro clínico del asma**

Como ya se ha mencionado, las sibilancias, la dificultad respiratoria, la presión en el pecho o la tos son síntomas presentes en el asma, pero no exclusivos. Su aparición junto a determinadas características en cuanto a su forma de presentación, pueden sugerir un cuadro más probable de asma. La amalgama de estos síntomas en un mismo individuo, que empeoren por la noche o a primera hora de la mañana, varíen en el tiempo y en intensidad y sean desencadenados por distintas situaciones como infecciones virales, ejercicio, exposición a alérgenos, cambios en el clima, la risa o irritantes como humo u olores fuertes, sugieren con más probabilidad un cuadro asmático. En cambio, si estos síntomas se presentan de forma aislada, existe producción crónica de esputo o dolor de pecho o la dificultad respiratoria se asocia a mareos o parestesias, la probabilidad de estar ante un caso de asma es menor<sup>121</sup>.

### **1.7.3. Diagnóstico del asma**

El diagnóstico del asma puede resultar en ocasiones esquivo, debido a la variabilidad entre episodios de exacerbación y los factores desencadenantes a los que pueda estar sometido el individuo, así como la falta de especificidad de los síntomas, que pueden llegar a confundir con otros cuadros cardiorrespiratorios<sup>122</sup>.

Es por ello importante el estudio en profundidad de la historia personal del paciente, así como de sus antecedentes familiares. Una historia de rinitis alérgica, eccema o dermatitis atópica puede estar relacionada con el desarrollo del asma, si bien es cierto que no con todos los fenotipos y que son síntomas y signos poco específicos.

La alteración más frecuentemente encontrada en la exploración física son las sibilancias espiratorias en la auscultación pulmonar, aunque la exploración física suele ser anodina. Pueden estar ausentes en las exacerbaciones muy graves, debido a una oclusión intensa de la vía respiratoria. No es un signo específico del asma y se puede presentar en otras patologías, como la obstrucción laríngea inducible, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), infecciones respiratorias, traqueomalacia o inhalación de cuerpo extraño.

La exploración nasal puede revelar la presencia concomitante de pólipos nasales o rinitis alérgica.

El cuadro se acompaña de alteraciones en pruebas funcionales respiratorias, que son las que confirmarían el diagnóstico. La limitación espiratoria y de la vía aérea se confirma mediante un test de broncodilatación reversible positivo, variabilidad del flujo espiratorio máximo (PEF), positividad de pruebas de provocación bronquial con metacolina o histamina y variabilidad del FEV<sub>1</sub> (volumen espiratorio forzado en un segundo) entre días<sup>121</sup>.

#### **1.7.4. Estudio genético del asma**

La naturaleza multifactorial del asma, como la de la RSCcPN, favorece la aparición de hallazgos en términos de causalidad, sobre todo en lo relacionado con las alteraciones a distintos niveles del genoma. Se han asociado SNV de genes como *IL12B*, *TNFA* o *ILB1* al asma, a su gravedad y a la condición de atopia<sup>123</sup>. Es importante siempre tener en cuenta el contexto genético, los haplotipos y el análisis de interacciones entre genes en estos estudios<sup>123</sup>.

A partir de resultados de estudios transcriptómicos de RNAseq, en nuestro grupo se ha llevado a cabo también la validación de la diferencia de expresión del gen de IL-5R $\alpha$  (*IL5RA*) en distintos fenotipos del asma<sup>124</sup>. En este caso, *IL5RA* fue uno de los transcritos codificantes más sobreexpresados en sangre periférica en pacientes asmáticos (*fold change* = 2.22, *p* = 8,63e-08) en estudios de RNAseq, mientras que en la validación por qPCR, se encontró un aumento significativo de la expresión del gen con respecto a los controles (*p*<0,001).

### **1.7.5. Enfermedad de Fernand Vidal (tríada del ASA o EREA)**

La enfermedad de Vidal consiste en una tríada de poliposis nasal, asma e hipersensibilidad a los AINE. Fue descrita por primera vez en 1922 y afecta a alrededor de un 13 % de los pacientes con RSCcPN. Además, entre un 10-30 % de los pacientes con RSCcPN presenta intolerancia a AINEs, y entre un 40 y un 60% de los pacientes con hipersensibilidad a los AINE presenta RSCcPN. La edad de aparición del síndrome se encuentra entre los 40 y los 50 años, pudiendo presentarse algunas de las características antes que otras. El asma asociada al síndrome es característicamente eosinofílica, patente en el lavado broncoalveolar<sup>85</sup>.

## **2. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA POLIPOSIS NASAL**

### **MARCADORES GÉNICOS EN RSCcPN**

A lo largo de los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios genéticos y proteómicos para caracterizar las bases genéticas de la rinosinusitis crónica. La naturaleza compleja de patologías como la RSC o el asma conlleva que la influencia de los distintos factores predisponentes en la patogénesis sea parcial y que la base genética de la enfermedad no sea tan obvia. Es preciso tener en cuenta la etiología multifactorial y, la interacción entre múltiples factores genéticos y ambientales a fin de proporcionar una aproximación al origen de estas enfermedades.

A pesar de no haberse identificado mutaciones o polimorfismos específicos asociados a la poliposis nasal (dejando a un lado las mutaciones características de la fibrosis quística) hay datos que apuntan a un incremento del riesgo de desarrollar pólipos nasales en familiares de primer grado de un paciente afectado. En un estudio realizado en 1638 pacientes con RSCcPN y 24 200 con RSCsPN, se identificó un riesgo 4,1 veces superior de desarrollar RSCcPN entre los familiares de primer grado, que resultó de 2,4 en el caso de la RSCsPN<sup>125</sup>. Otros estudios han ido arrojando luz sobre la naturaleza hereditaria de la RSCcPN<sup>168</sup>, demostrando la existencia de

antecedentes familiares en hasta un 52,7 % de la cohorte estudiada<sup>169</sup>, en algunos casos, o incluso postulando la existencia de un patrón de herencia autosómico recesivo<sup>170</sup>.

En estos últimos años, gracias a los avances en las técnicas de genética molecular [estudios de asociación en genoma completo (GWAS) mediante micromatrices (*microarrays*), secuenciación del transcriptoma (*RNA-seq*), secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS)], se han descrito más de 150 variantes genéticas en 99 genes, relacionadas con el desarrollo de la RSCcPN, con funciones biológicas ligadas con la actividad inflamatoria, la respuesta inmune, el metabolismo de los leucotrienos o genes relacionados con la matriz extracelular<sup>171</sup>.

De mayor interés que los polimorfismos en sí, son los patrones de cambios de expresión génica. Liu et al demostraron la sobreexpresión de 192 genes y la infraexpresión de otros 156 en tejidos de pólipos nasales, comparado con tejido sinusal sano, mediante estudios de asociación con micromatrices de DNA<sup>126</sup>. Algunos factores de transcripción que se han visto afectados son FOXP3 y SOCS3, relacionados con la regulación de linfocitos T, o GATA-3, un factor de transcripción asociado a T<sub>H</sub>2 que, recientemente, se ha evaluado en ensayos terapéuticos para disminuir las respuestas asmáticas<sup>89,127</sup>.

A partir de resultados de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se ha sospechado la implicación de genes relacionados con la integridad y la función de la barrera epitelial en la RSC. Esta disfunción epitelial ha sido confirmada en modelos *in vitro*, y ha mejorado el entendimiento de la RSC, abriendo la posibilidad de buscar nuevos biomarcadores y aproximaciones terapéuticas<sup>16</sup>. En la tabla 6 se detallan los genes asociados con la RSC.

**Tabla 6.** Lista de genes asociados con la RSC en más de un estudio, agrupados según su función biológica.

| <i>Sistema inmune</i>  |   |
|------------------------|---|
| <b>Gen</b>             | <b>Referencia</b>   |
| <i>ALOX5AP</i>         | Al-Shemari et al. 2008; Henmyr et al. 2014                          |
| <i>AOAH</i>            | Bossé et al. 2009; Zhang et al. 2012                                |
| <i>IL1A</i>            | Karjalainen et al. 2003; Erbek et al. 2007; Mfuna Endam et al. 2010 |
| <i>IL1B</i>            | Erbek et al. 2007; Bernstein et al. 2009                            |
| <i>IL10</i>            | Kim et al. 2009; Bernstein et al. 2009; Zhang 2012                  |
| <i>IL22RA1</i>         | Endam 2009; Henmyr 2014   |
| <i>IL33</i>            | Buysschaert 2010; Kristjansson 2019                                 |
| <i>IRAK-4</i>          | Tewfik et al. 2009; Zhang et al. 2011                               |
| <i>NOS1</i>            | Castano et al. 2009; Zhang et al. 2011; Henmyr et al. 2014          |
| <i>NOS1AP</i>          | Zhang et al. 2011; Henmyr et al. 2014                               |
| <i>TAS2R38</i>         | Adappa et al. 2014; Mfuna Endam et al. 2014; Purnell et al. 2019    |
| <i>TGFB1</i>           | Henmyr et al. 2014  |
| <i>TNFA</i>            | Erbek et al. 2007; Bernstein et al. 2009; Batikhan et al. 2010      |
| <i>Sin categorizar</i> |   |
| <b>Gen</b>             | <b>Referencia</b>   |
| <i>DCBL2</i>           | Pasaje et al. 2012; Henmyr et al. 2014                              |
| <i>PARS2</i>           | Bossé et al. 2009; Henmyr et al. 2014                               |
| <i>RYBP</i>            | Bossé et al. 2009; Zhang et al. 2011; Cormier et al. 2014           |

Tabla modificada de la guía EPOS 2020.

También destaca el estudio de genes relacionados con la colonización por *S. aureus* en pacientes con RSCcPN (*Sistema inmune: BDKRB2, CNTN5, IGFBP7, PDGFD, PRKCH, RAC1; Barrera y estructural: CACNA2D1, CDH23, GFRA1, K6IRS2, K6IRS4, TOMM34*)<sup>128</sup>. El estado de portador de *S. aureus* sugiere la posibilidad de una disfunción a nivel inmunológico que compromete la barrera epitelial y la hace especialmente sensible a la infección por niveles bajos crónicos de la bacteria, repercutiendo en el estado del epitelio y favoreciendo la patogénesis de la RSCcPN<sup>16</sup>.

Uno de los genes descritos, *TAS2R38*, codifica un tipo de receptor de gusto amargo, y se han encontrado polimorfismos asociados con la RSC<sup>129</sup>. La activación de T2R por estímulos amargos provoca la secreción de péptidos antimicrobianos, la producción de óxido nítrico y el aumento de la frecuencia de movimiento ciliar. En los pacientes con RSCsPN, las variantes en *TAS2R38* que se corresponden con disfunción del gen se asocian con una prevalencia mayor de

portadores de bacterias Gram negativas y peor pronóstico de la enfermedad. Es por ello por lo que en muchos centros se evalúa el perfil gustativo como parte del estudio de la RSC, aunque no por ello se clarifica el tratamiento. Por el contrario, se cree que los pacientes con RSCcPN no se comportan de igual manera con respecto a las alteraciones en el gusto<sup>16</sup>.

Los cambios que se producen a nivel epigenético suponen modificaciones en la expresión de los genes, derivadas de la interacción de estos con el medio ambiente, y no relacionadas con alteraciones en la secuencia de nucleótidos, y que pueden ser transmitidas generacionalmente. En la RSC, se han encontrado más cambios a nivel epigenético en epitelio nasal que en sangre periférica, lo que resalta la importancia del contacto con agentes externos ambientales<sup>16</sup>.

Los estudios de cambios epigenéticos relacionados con la RSCcPN engloban modificaciones como la acetilación de histonas (hiperacetilación de histonas H4 por inhibición de la histona deacetilasa (HDAC2); modificaciones del DNA a nivel de citosinas (bromación y cloración), como la elevación de los niveles de 5-bromocitosina en los pólipos nasales en comparación con el tejido etmoidal sano<sup>130</sup>; cambios en la metilación del DNA (hipometilación de promotores de *KRT19*, *NR2F2*, *ADAMTS1* o *ZNF222*<sup>131</sup>); o cambios en la regulación de miRNA y otros RNA no codificantes (sobreexpresión de miRNA relacionados con el ciclo celular, la proliferación y la inflamación; infraexpresión de miRNA relacionados con las vías de transmisión de señales mediadas por hormonas, la respuesta inmune o la inflamación)<sup>171</sup>.

En los estudios de análisis proteómico en individuos con RSCcPN se han descrito expresiones diferenciales en más de 300 proteínas de la mucosa. Entre algunas proteínas con expresión elevada en poliposis nasal se incluye la mucina 5B, la lipocalina-1, la mucina 5AC o la arfinasa-1<sup>132</sup>.

## 2.2. GEN *IL5RA*

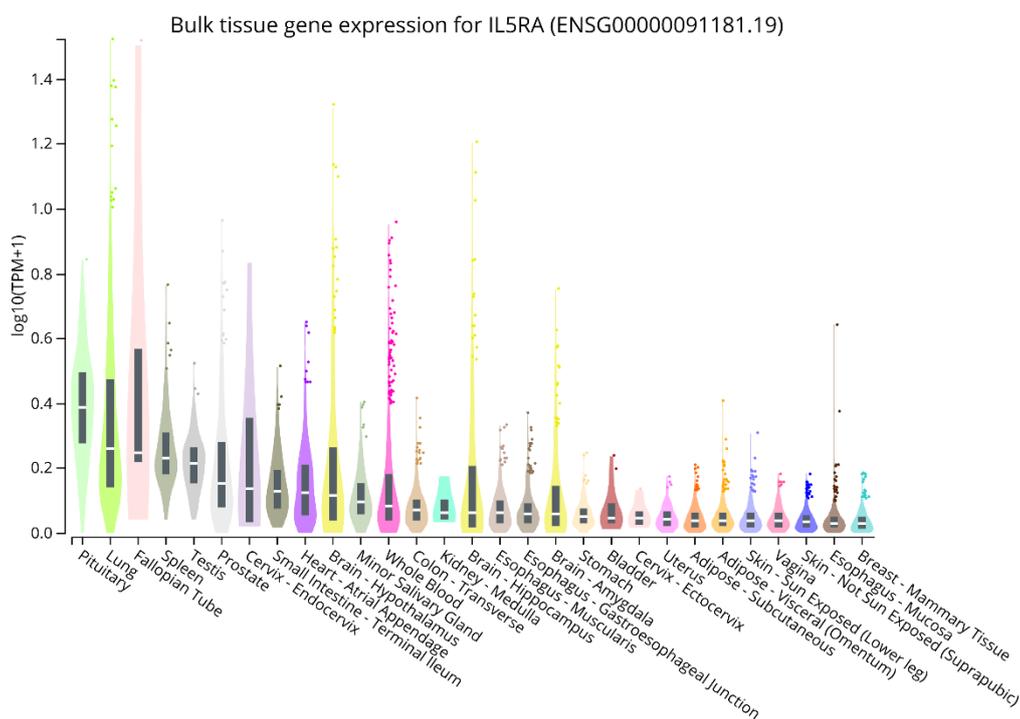
El gen *IL5RA* codifica la subunidad alfa del receptor de IL-5. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (localización citogenética 3p26.2; coordenadas genómicas

(GRCh38/hg38): 3:3,066,323-3,110,413). A partir del estudio en sublíneas eosinofílicas de promielocitos y mielocitos eosinofílicos humanos cultivados de sangre coriónica, se identificó un transcrito mayor de este gen, que codifica la forma soluble del receptor. Un segundo componente del receptor alberga similitudes con la cadena  $\beta$  del receptor de alta afinidad del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSFR, gen *CSF2RB*)<sup>133</sup>.

La expresión del gen *IL5RA* está regulada por un complejo de factores de transcripción, entre los que se incluyen E12, E47, Sp11, c/EPB $\beta$  y Oct2.

Las isoformas de membrana de la subunidad  $\alpha$  de IL-5R surgen de procesos de ajuste (*splicing*) alternativo, mientras que las formas solubles son el resultado de un proceso normal de ajuste o de ausencia de este<sup>133</sup>.

En la figura 9 se pueden observar los tejidos donde se expresa principalmente *IL5RA*.



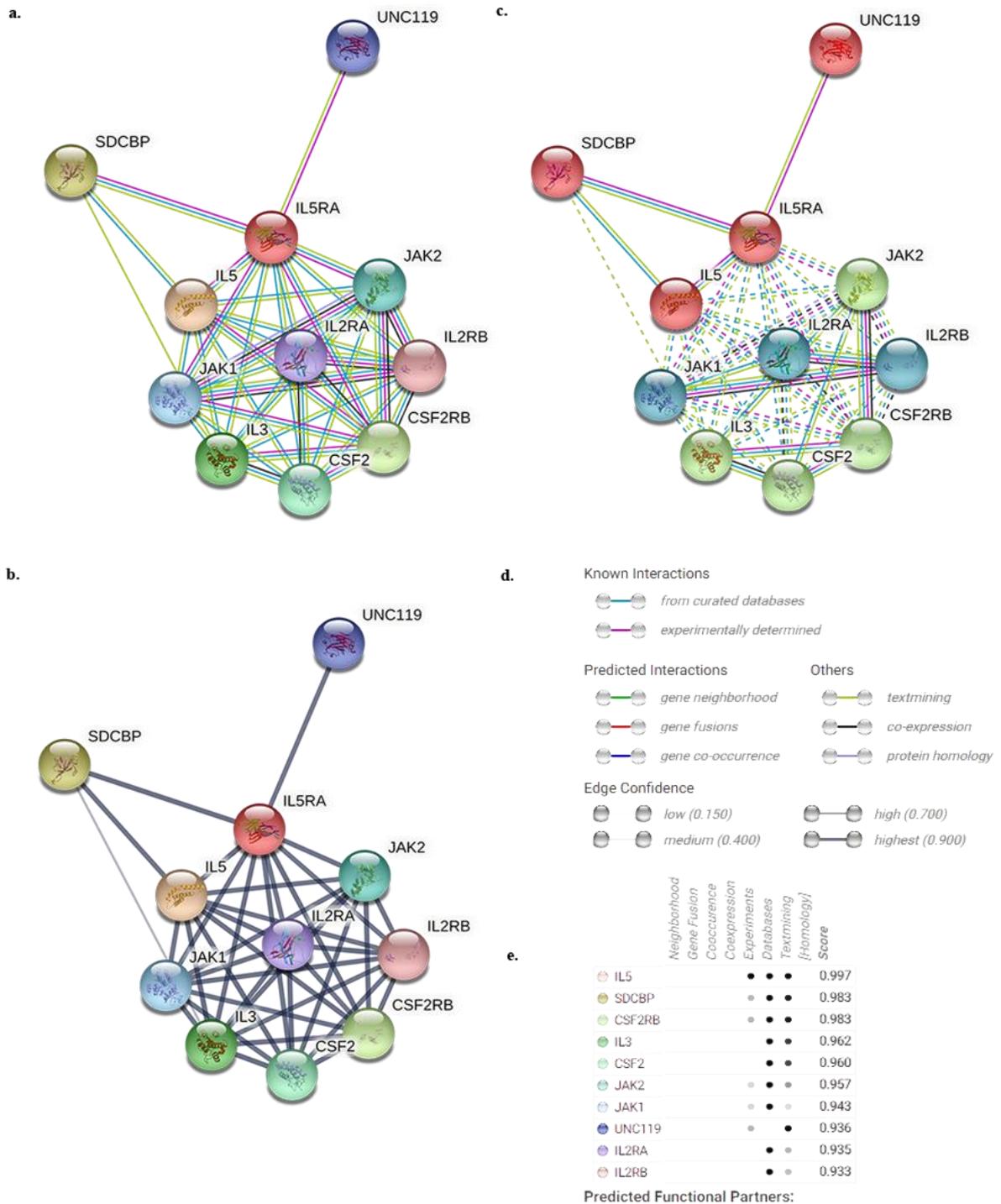
**Figura 9.** Diagramas de box-plots de las diferentes expresiones de *IL5RA* en tejidos, extraídos de GTExPortal (<https://www.gtexportal.org>). Expresión en genes en 53 tejidos de RNA-seq de GTEx de 570 donantes (V8, agosto 2019).

## Análisis de enriquecimiento génico

*STRING*, *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (<https://string-db.org/>, ©STRING CONSORTIUM 2020), es una herramienta web de análisis de enriquecimiento génico, generación de redes de interacción de proteínas y análisis ontológico de genes. Los genes son agrupados de acuerdo con características funcionales comunes, vías metabólicas y mediante categorías de Ontología Génica (*Gene Ontology*, GO; <http://geneontology.org/>), que provee un vocabulario estandarizado para la descripción del gen y de los atributos del producto proteico correspondiente en cualquier organismo. Dicho vocabulario es por lo tanto computable por una máquina, constituyendo variables semánticas que pueden ser analizadas mediante distintos paquetes estadísticos.

En la figura 10 se representa el análisis de interacción proteína-proteína de los transcritos relacionados con *IL5RA* en función de la relación basada en la similitud de funciones biológicas extraída de bases de datos o determinada experimentalmente, del grado de vecindad en el gen o de otros parámetros como la coexpresión, la homología entre proteínas o de resultados obtenidos a través de minería de textos de los artículos publicados.

Las interacciones presentadas en los diagramas de la figura 10 proceden en su gran mayoría de datos experimentales y bases de datos conocidas, así como del análisis ontológico de textos (*text mining*). El nivel de confianza de la interacción entre estos genes/proteínas es superior a 0,9. El análisis ontológico de enriquecimiento de términos GO de las funciones biológicas de *IL5RA* se presenta en la tabla 7, junto a los genes/proteínas de los diagramas anteriores con los que comparte función. Junto a ellos se adjunta el *False Discovery Rate* (FDR), que es la proporción esperada de errores tipo I ajustada a valor p.



**Figura 10.** Análisis de interacción de proteínas relacionadas a nivel funcional con IL-5Rα. Cada nodo representa todas las proteínas producidas por un único locus del gen codificante. Software *STRING*. **a.** Diagrama de interacción. Cada color representa un tipo de interacción (leyenda en **d.**) Se observan interacciones conocidas extraídas de bases de datos (azul claro) o determinadas experimentalmente (rosa), así como interacciones predichas por el análisis de minería de texto (amarillo) o coexpresión de genes (negro). **b.** El nivel de confianza de la interacción se representa según el grosor de la línea, siendo el de todas ellas superior a 0.9 (excepto *SDCBP* e *IL3*, entre 0.7 y 0.9). **c.** Agrupación (*clustering*) mediante algoritmo de *k-medias* de los genes analizados. Se diferencian 3 grupos o clústeres por colores. **d.** Leyenda de las representaciones de las interacciones. **e.** Tabla resumen con tipo de interacción y niveles de confianza. Herramienta web *STRING*.

**Tabla 7.** Análisis de enriquecimiento ontológico de *IL5RA*.

| ID del término | Descripción  | FDR      | Proteínas/genos coincidentes  |
|----------------|--|----------|---|
| GO:0000165     | Cascada MAPK   | 4.56e-12 | <i>IL2RB, IL5, IL3, CSF2, JAK1, IL2RA, JAK2, CSF2RB, IL5RA</i>                |
| GO:0018108     | Fosforilación peptidil-tirosina  | 7.97e-10 | <i>IL5, IL3, CSF2, JAK1, JAK2, CSF2RB, IL5RA</i>                              |
| GO:0019221     | Vía de transmisión de señales mediada por citocinas                          | 7.97e-10 | <i>IL2RB, IL5, IL3, CSF2, JAK1, IL2RA, JAK2, CSF2RB, IL5RA</i>                |
| GO:0035556     | Transducción de señales intracelulares                                       | 9.50e-09 | <i>IL2RB, IL5, SDCBP, IL3, CSF2, JAK1, IL2RA, JAK2, CSF2RB, IL5RA</i>         |
| GO:0007166     | Vía de transmisión de señales medida por receptores de la superficie celular | 2.41e-07 | <i>IL2RB, IL5, SDCBP, IL3, CSF2, JAK1, IL2RA, JAK2, CSF2RB, IL5RA</i>         |
| GO:0007165     | Transducción de señales intracelulares                                       | 6.05e-06 | <i>IL2RB, IL5, SDCBP, IL3, CSF2, UNC119, JAK1, IL2RA, JAK2, CSF2RB, IL5RA</i> |
| GO:0065009     | Regulación de función molecular  | 6.41e-06 | <i>IL2RB, IL5, IL3, CSF2, UNC119, JAK1, IL2RA, JAK2, CSF2RB, IL5RA</i>        |
| GO:0006955     | Respuesta inmune   | 7.23e-06 | <i>IL5, SDCBP, IL3, CSF2, JAK1, IL2RA, JAK2, IL5RA</i>                        |
| GO:0038043     | Vía de transmisión de señales mediada por IL-5                               | 4.41e-05 | <i>CSF2RB, IL5RA</i>  |
| GO:0006952     | Respuesta de defensa   | 0.00037  | <i>IL5, IL3, JAK1, IL2RA, JAK2, IL5RA</i>                                     |
| GO:0002437     | Respuesta inflamatoria a estímulo antigénico                                 | 0.0011   | <i>IL2RA, IL5RA</i>   |
| GO:0006954     | Respuesta inflamatoria   | 0.0012   | <i>IL5, IL3, IL2RA, IL5RA</i>   |
| GO:0051239     | Regulación de proceso en organismo multicelular                              | 0.0023   | <i>IL5, SDCBP, CSF2, JAK1, IL2RA, JAK2, IL5RA</i>                             |
| GO:0001817     | Regulación de producción de citocinas  | 0.0250   | <i>CSF2, JAK2, IL5RA</i>  |

Se muestran los genes anteriormente estudiados que comparten funciones biológicas con *IL5RA*. FDR, false discovery rate.

### 2.3. IL-5R $\alpha$ COMO DIANA TERAPÉUTICA. USO DE BENRALIZUMAB.

La presencia de eosinofilia tisular en pacientes con RSCcPN está relacionada con los niveles de IL-5<sup>19</sup>. El tratamiento anti-IL-5 está por lo tanto orientado a reducir la inflamación relacionada con eosinofilia y el tamaño del pólipo<sup>134</sup>.

En estos últimos años se han desarrollado nuevos fármacos biológicos utilizando IL-5 e IL-5R $\alpha$  como diana terapéutica. Mepolizumab y reslizumab son dos ejemplos de anticuerpos monoclonales humanizados frente a IL-5. Ambos están aprobados por la Agencia Europea del Medicamento y la *US Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en el tratamiento del asma eosinofílica grave<sup>135</sup>.

Estos fármacos biológicos, junto con otros dirigidos contra citocinas, se están desarrollando y utilizando actualmente en tratamientos para el asma, por lo que resulta lógico pensar en la posibilidad de extenderlos al tratamiento de la RSC, patología ampliamente asociada con el asma. En algunos estudios se ha llegado a utilizar la presencia de pólipos nasales como biomarcadores en la predicción de respuesta a anti-IL-5 en pacientes asmáticos con un fenotipo  $T_H2$  con eosinofilia. Un ensayo en fase 2 demostró una reducción significativa del número de eosinófilos en sangre y niveles de IL-5 nasales mediante la inyección intravenosa de reslizumab, mejorando a su vez las puntuaciones de poliposis nasal, siendo más pronunciado el efecto en pacientes con una elevación basal mayor de IL-5<sup>136</sup>. Parece ser necesario un endotipo rico en IL-5 para predecir la eficacia de estos fármacos<sup>89,137</sup>.

El benralizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a la cadena  $\alpha$  de IL-5R, a través de su dominio Fab, impidiendo la unión de IL-5 a su receptor. Fue desarrollado por MedImmune (Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos), filial de la empresa multinacional británica-sueca AstraZeneca (Cambridge, Reino Unido). A lo largo de estos últimos años se ha estudiado su uso como tratamiento del asma eosinofílica grave. Sin embargo, la respuesta a este anticuerpo entra en confrontación con la heterogeneidad inherente a la patología, y no todos los grupos de pacientes responden de la misma forma y con la misma efectividad.

Este anticuerpo monoclonal es capaz también de unirse, a través de su dominio Fc afucosilado, a la región Fc del receptor RIIIa de células NK, macrófagos y neutrófilos. De esta forma, se induce una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos que tiene como objetivo los eosinófilos. En combinación con la inhibición de la diferenciación y maduración de eosinófilos, se produce una depleción en su número de mayor intensidad que la producida por otros anticuerpos contra la vía de IL-5, como mepolizumab o reslizumab, alcanzando en los ensayos clínicos medianas de 0 en sangre periférica<sup>138</sup>.

El benralizumab induce una rápida y casi completa depleción del número de eosinófilos (actuando también sobre parte de los basófilos, los que expresan IL-5R $\beta$ ), y la expresión de genes relacionados con respuestas inflamatorias eosinofílicas, como *SIGLEC8*, *ALOX15*, *PRSS33*,

*CCL23*, e *IL5RA* se ve disminuida de forma significativa<sup>139</sup>. Por otro lado, aquellos pacientes con un predominio de expresión de genes típicamente relacionados con los neutrófilos, así como con un recuento menor de eosinófilos y mayor de neutrófilos en sangre periférica, presentan una respuesta considerablemente menor al benralizumab<sup>139</sup>.

El asma eosinofílica constituye el fenotipo más prevalente del asma grave, y cursa con una producción anormal de citocinas, como IL-5, por parte de células del sistema inmune, como los linfocitos Th2. El aumento de la producción de estas citocinas conlleva una activación persistente y un aumento de eosinófilos en sangre periférica y en las vías respiratorias, a pesar del tratamiento a altas dosis con corticoides<sup>138</sup>. El tratamiento con benralizumab induce la inhibición de la diferenciación y maduración de eosinófilos en la médula ósea, provocando una disminución en las citocinas inflamatorias derivadas de los eosinófilos. La expresión de *IL5RA*, que se encuentra elevada en sangre periférica de pacientes asmáticos, muestra una disminución significativa en aquellos individuos con asma tratados con benralizumab, acompañada de una disminución de los niveles de eosinófilos en sangre periférica<sup>124</sup>.

#### **2.4. EMPLEO DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS EN LA POLIPOSIS NASAL**

Actualmente, entre los fármacos biológicos para el tratamiento de la RSCcPN, se encuentra aprobado el dupilumab. También el mepolizumab y el omalizumab han finalizado los ensayos de fase III, y han sido recientemente aprobados por la FDA y la EMA para el tratamiento de la PN<sup>140</sup>. El mepolizumab ha demostrado mejora notable del olfato, medido en escala visual analógica (VAS), en pacientes que ya se habían sometido a cirugía (ensayo SYNAPSE<sup>1</sup>). El ensayo OSTRO con benralizumab ha demostrado resultados satisfactorios, como ya se ha mencionado antes<sup>141,167</sup>. Algunos ensayos con agentes biológicos no comercializados incluyen antagonistas de IL-33 o CRTH2 (ACT-774312, fevipirant). En el caso del tratamiento con fevipirant en las RSCcPN, el fármaco no ha cumplido los objetivos establecidos<sup>215</sup>. No obstante, se está discutiendo si la selección de pacientes para el tratamiento con antagonistas de DP2 fue la

adecuada<sup>172</sup>, no cerrando del todo las puertas a ensayos futuros enmarcados en un contexto de una medicina más personalizada, sobre todo en pacientes con EREA<sup>172,173</sup>.

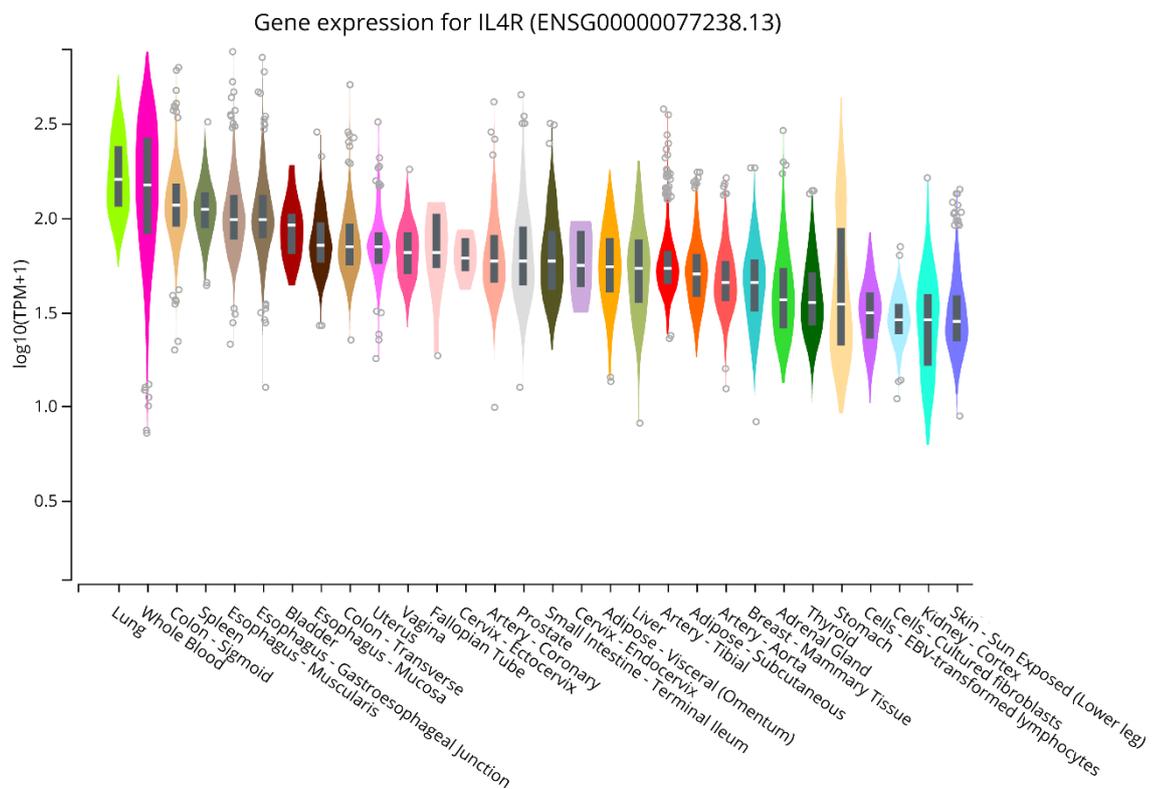
En un ensayo publicado en febrero de 2021 por Jody et al. sobre el efecto del benralizumab en la RSCcPN grave<sup>142</sup>, se demostró eficacia en términos de reducción del tamaño del pólipo, la ocupación de senos y la mejora de la sintomatología y del olfato en la mayoría de los pacientes (83 %). Se administraron cuatro dosis de 30 mg por vía subcutánea en un periodo de 20 semanas. La puntuación endoscópica de la PN mejoró en los pacientes tratados con benralizumab en comparación con aquellos tratados con placebo ( $-0,9 \pm 0,2$ ,  $p=0,004$ , frente a  $-0,3 \pm 0,3$ ,  $p=0,166$  para placebo). El tamaño de los pólipos se redujo, pero no de forma significativa frente al placebo ( $p=0,103$ ). Además, la ratio de eosinófilos en sangre frente a la positividad de pruebas cutáneas de alergia se correlacionó con la reducción del tamaño del pólipo. En cuanto al olfato, la media de los pacientes tratados con benralizumab cambió su clasificación de anosmia a hiposmia. Este estudio está limitado por el tamaño muestral, pero revela en cierta medida una tendencia positiva de los efectos del benralizumab en RSCcPN.

Otro estudio reciente realizado en Osaka<sup>143</sup>, notificó mejorías significativas en cuestionarios de QoL de asma (AQLQ, ACQ5) y pruebas funcionales respiratorias en pacientes asmáticos con RSCcPN frente a pacientes con asma sin poliposis.

Como ya se ha mencionado previamente, el tratamiento con biológicos en la RSCcPN requiere una identificación adecuada de los pacientes, considerando de forma cuidadosa la seguridad a largo plazo y la relación coste-efectividad. La recurrencia tras cirugía endoscópica en un corto periodo de tiempo, a pesar de las terapias tópicas intranasales, la necesidad de varias cirugías o aquellas situaciones de gravedad refractaria a otro tipo de tratamiento, contraindicación por patología asociada o casos graves con rechazo de cirugía por parte del paciente, pueden verse beneficiados por el tratamiento con biológicos<sup>141</sup>.

## 2.5. GEN *IL4R*

*IL4R* se localiza en el cromosoma 16 y codifica la cadena alfa del receptor de interleucina 4, una proteína transmembrana que se une a IL-4 e IL-13, que intervienen en la regulación de la producción de IgE. Promueve también la diferenciación de linfocitos  $T_H2$  y se han estudiado variantes alélicas asociadas con la atopia en rinitis alérgica, sinusitis, eccema o asma, así como a sensibilización a polen (*Cryptomeria japonica*, cedro japonés). En la figura 11 se muestran los principales tejidos donde se expresa *IL4R*.



**Figura 11.** Diagramas de box-plots de las diferentes expresiones de *IL4R* en tejidos, extraídos de GTExPortal (<https://www.gtexportal.org>). Expresión en genes en 53 tejidos de RNA-seq de GTEx de 570 donantes (V8, agosto 2019).

Las vías de transmisión de señales JAK/STAT son las principales vías, tanto para IL-4 como para IL-13, junto a la cinasa MAP y la fosfatidilinositol-3 cinasa<sup>144</sup>. Ambas citocinas poseen la capacidad de inducir el cambio de clase a IgE, sobre todo la IL-4. Promueven también la activación de otras células inmunes y hematopoyéticas, como los mastocitos, macrófagos y

basófilos. Entre sus funciones y acciones cabe destacar la hiperplasia de células caliciformes y la proliferación de músculo liso en vías respiratorias, así como la alteración de función de barrera de la epidermis por regulación de la expresión de componentes de diferenciación del complejo epidermal (filagrina, loricrina e involucrina), o el aumento de la susceptibilidad a infecciones por inhibición de la producción de péptidos antimicrobianos, como las  $\beta$ -defensinas 2 y 3; estas acciones se deben sobre todo a la IL-13<sup>144</sup>. Ambas citocinas, por lo tanto, influyen en la preparación del microambiente que conlleva los fenotipos propios de patologías como la dermatitis atópica, el asma o la RSCcPN.

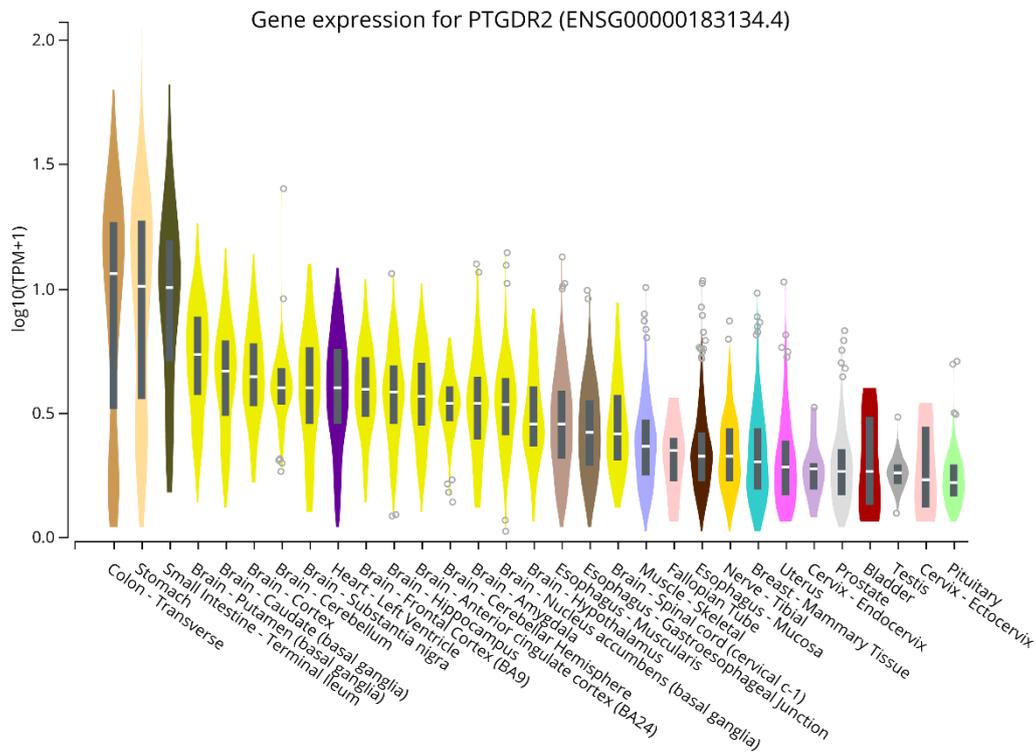
Se ha estudiado la asociación de SNP de *IL4R* con el asma (rs1801275, rs1805011), relacionados con los episodios de exacerbación, disminución de función pulmonar o inflamación tisular<sup>145,146</sup>, así como cambios epigenéticos a nivel de metilación que pueden incrementar el riesgo de aparición del asma<sup>147</sup>. En un estudio publicado en 2020 de perfiles de expresión de mRNA y análisis bioinformático de interacción de vías moleculares, destaca la sobreexpresión no significativa de *IL4R* en pacientes con RSCcPN, no encontrada en la del gen del propio ligando, *IL4*<sup>148</sup>.

El dupilumab se empezó a comercializar en 2018 como anticuerpo antirreceptor de IL4 en el tratamiento de la dermatitis atópica, y en 2019 para el asma<sup>144</sup>. El programa LIBERTY ASTHMA incluyó ensayos como el QUEST o el VENTURE para el empleo del dupilumab en el asma, a raíz de los cuáles fue aprobado para su uso en casos graves no controlados en los EEUU, Europa y Japón, en septiembre de 2019<sup>144</sup>. El fármaco mejoraba la FEV<sub>1</sub>, siendo más eficaz en pacientes con  $\geq 300$  eosinófilos/ $\mu$ l y FeNO  $\geq 25$  ppm.

## 2.6. GEN *PTGDR2*

El gen *PTGDR2*, alternativamente denominado *CRTH2*, codifica el receptor de tipo 2 de la prostaglandina D<sub>2</sub>, un receptor acoplado a proteína G que se expresa sobre todo en células T<sub>H</sub>2 CD4+, así como en eosinófilos, basófilos, macrófagos, mastocitos, células linfoides innatas tipo

2 (ILC2) o células dendríticas. El receptor media la quimiotaxis pro-inflamatoria de eosinófilos, basófilos y T<sub>H</sub>2 en la inflamación alérgica. Se muestran en la figura 12 los tejidos donde más se expresa este gen.



**Figura 12.** Diagramas de box-plots de las diferentes expresiones de *PTGDR2* en tejidos, extraídos de GTExPortal (<https://www.gtexportal.org>). Expresión en genes en 53 tejidos de RNA-seq de GTEx de 570 donantes (V8, agosto 2019).

PTGDR2 actúa como uno de los tres receptores de prostaglandinas acoplados a proteínas G, aumentando los niveles intracelulares de calcio y reduciendo los niveles de AMPc, y activando vías relacionadas con fosfolipasa C, fosfatidilinositol-3 kinasa o MAPK. La interacción entre la prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) y PTGDR2 está directamente implicada en la inflamación alérgica. Las células T<sub>H</sub>2 muestran una expresión aumentada de *PTGDR2* en comparación con otros subtipos de linfocitos<sup>149</sup>, y la transmisión de señales por la interacción PGD<sub>2</sub>-PTGDR2 recluta y activa eosinófilos y basófilos. Las células ILC2 muestran también una migración dependiente de PTGDR2 tras la exposición a PGD<sub>2</sub><sup>150</sup>.

Se han asociado determinadas variantes de un solo nucleótido (SNV) en la región 3' UTR del gen con la susceptibilidad a padecer asma. Se ha estudiado también su sobreexpresión en sangre periférica de pacientes asmáticos, particularmente elevada en aquellos casos con RSCcPN concomitante<sup>151</sup>.

La inhibición por anticuerpos monoclonales dirigidos contra CRTH2 y receptores de prostanoïdes, como la mediada por ramatroban, fue capaz de reducir la eosinofilia y la inflamación de la mucosa nasal y producir una mejoría de síntomas clínicos de la rinitis alérgica, patología para la cual se aprobó su uso. Otros anticuerpos como el setipirant reducían la fase tardía de la respuesta a alérgenos en pacientes asmáticos, pero no la fase temprana<sup>152</sup>.

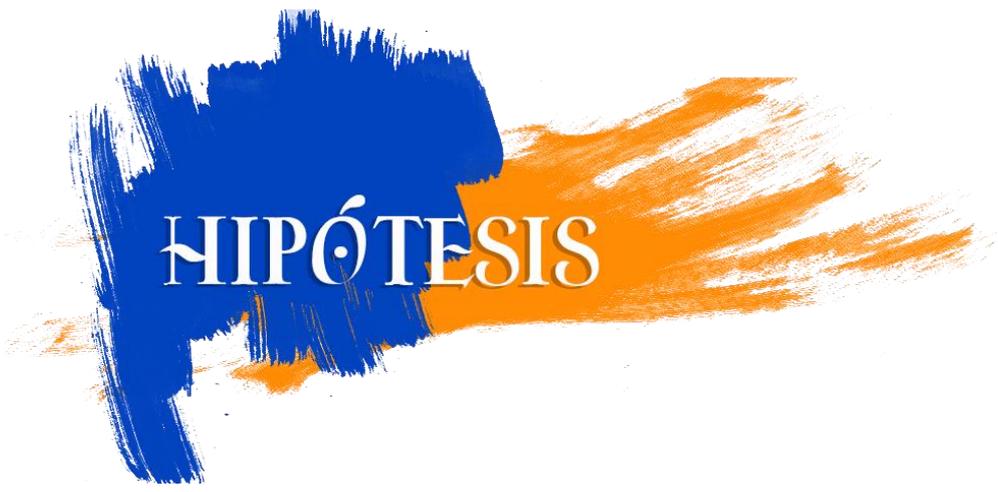
El fevipirant, inhibidor del receptor 2 de prostaglandina D2 (PTGDR2), ha sido estudiado para su empleo en pacientes con asma moderada-grave y recuento de eosinófilos en esputo  $>2\%$ <sup>153</sup>. Se detectó una reducción significativa del porcentaje de eosinófilos en esputo en comparación con el placebo, así como del conteo de eosinófilos en submucosa bronquial. Más recientemente, un ensayo en fase II en pacientes con asma alérgica no controlada, aportaba resultados más esclarecedores en la esfera respiratoria, con mejora de función pulmonar y reducción de sintomatología<sup>154</sup>. Sin embargo, los resultados en fase III para la RSCcPN no han llegado a cumplir los objetivos establecidos, como se comentó anteriormente<sup>172</sup>.

La inhibición de *PTGDR2* parece eficaz en el tratamiento de la rinitis alérgica o el asma, pero precisa de un estudio detallado del fenotipo para prescribir una terapia más dirigida y precisa que beneficie a cohortes determinadas de pacientes<sup>152</sup>.

### **3. MEDICINA DE PRECISIÓN EN RSCcPN**

La medicina de precisión tiene como objetivo el manejo personalizado de cada paciente de forma óptima, según el momento, las condiciones específicas y la presentación de su patología, así como de su estilo de vida, condiciones ambientales y perfil genético. Como se ha indicado, se conoce también por sus 4 P: Personalización del manejo clínico del paciente, Predicción de la evolución natural de la enfermedad, Prevención primaria, secundaria y terciaria y Participación y adherencia del paciente al plan terapéutico para obtener la mayor eficacia del tratamiento.

La práctica de la medicina personalizada se ha aplicado los últimos años a una variedad de enfermedades respiratorias, entre las que se encuentran el asma o la alergia, y ahora se fomenta en el tratamiento de la rinosinusitis crónica<sup>2,155</sup>. La búsqueda de biomarcadores en RSCcPN, su uso combinado o los cambios de perfiles de expresión génica según el fenotipo de la enfermedad, pueden ayudar a llevar a cabo este tratamiento más personalizado, acotando más los espectros de pacientes que se beneficiarían de cada determinado tipo de actitud terapéutica.

A decorative graphic element consisting of two overlapping brushstrokes. The left stroke is a vibrant blue, and the right stroke is a warm orange. The word 'HIPÓTESIS' is centered over the intersection of these two strokes.

# HIPÓTESIS



## HIPÓTESIS

La IL-5 se caracteriza por su actividad en distintas células diana, entre las que se incluyen los linfocitos B, eosinófilos o basófilos. Es producida por linfocitos T, sobre todo Th2, ILC2 y mastocitos, y ejerce efectos en la proliferación y diferenciación, a través de su receptor (IL-5R), un heterodímero compuesto por una subunidad  $\alpha$  específica de ligando (IL-5R $\alpha$ ) y otra subunidad  $\beta$ , común a otros receptores de citocinas.

Debido a la relación de la poliposis nasal con la inflamación T2, la evolución de la poliposis nasal asociada al asma con eosinofilia se ha considerado un biomarcador para predecir la respuesta a los anticuerpos antiIL-5 en el asma. La terapia antagonista de IL-5 ha demostrado ser de utilidad en pacientes asmáticos con un fenotipo T2, siendo por lo tanto extensible el potencial de dicho tratamiento al de la inflamación en RSCcPN.

La hipótesis principal de este estudio es que los pacientes con RSCcPN, asociados o no a otras patologías de vías respiratorias, atopia, hábitos tóxicos y a más variables clínicopatológicas, presentan una sobreexpresión del gen *IL5RA* respecto a los controles.

La hipótesis secundaria se extrapola de la anterior, y es la posibilidad de considerar *IL5RA* como un biomarcador de poliposis nasal que pueda ser útil tanto en el diagnóstico, como en el seguimiento y el tratamiento, facilitando una terapia dirigida a determinados grupos de pacientes.



A decorative graphic element consisting of several overlapping brushstrokes in shades of orange and blue, creating a textured, painterly effect. The word 'OBJETIVOS' is centered over this graphic.

# OBJETIVOS



## OBJETIVOS

En el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar los niveles de expresión del gen *IL5RA* en sangre periférica en una población de pacientes con poliposis nasal frente a un grupo control.
2. Analizar las diferencias de expresión entre distintos fenotipos clínicos.
3. Determinar los niveles de expresión de *IL5RA* en tejido polipoideo y estudiar su relación con los niveles de expresión en sangre periférica.
4. Estudiar la posible correlación entre la expresión de *IL5RA* y otros genes que caracterizan grupos patológicos de rinosinusitis crónica, asma y otras enfermedades alérgicas.





MATERIALES  
Y MÉTODOS



## MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó el estudio con el propósito de alcanzar los objetivos anteriormente descritos, analizando la expresión de los genes *IL4R* e *IL5RA* tanto en sangre periférica como en muestras histológicas de pólipos nasales.

### 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 1.1. Modelo experimental

Se ha llevado a cabo un estudio de tipo observacional y analítico, de casos y controles, con investigación retrospectiva de variables clínicopatológicas de los individuos incluidos.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 256 individuos del Servicio de Alergología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, y muestras de tejido polipoideo o de epitelio nasal de 39 de esos individuos. Todos los pacientes fueron informados sobre el estudio y previa firma de consentimiento informado. Se siguieron las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm, PI 2020-02-433) del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

#### 1.2. Muestreo

El tipo de muestreo es no probabilístico intencional o de conveniencia, que se caracteriza por la posibilidad de seleccionar los casos característicos de la población a criterio de la investigación, y por conveniencia, al ser pacientes pertenecientes al servicio de Alergología del Hospital Universitario de Salamanca<sup>174</sup>.

#### 1.3. Criterios de inclusión

##### - Grupo control

Los pacientes que integraron el grupo de controles fueron individuos que acudieron a consulta de Alergología con el fin de someterse a pruebas diagnósticas,

pero que no presentaron sintomatología ni patología alérgica en el momento de realizarse el estudio. Los criterios de inclusión de los controles fueron los siguientes:

- Ausencia de síntomas y antecedentes personales de alergia.
- Pruebas cutáneas negativas frente a una batería de aeroalérgenos comunes en nuestro medio (ácaros, epitelios, hongos, pólenes).
- Ausencia de síntomas y antecedentes personales de asma.
- Ausencia de síntomas y antecedentes personales de otras patologías respiratorias.
- Ausencia de antecedentes familiares de atopia, asma o rinitis alérgica.

#### - **Grupo experimental**

El grupo experimental incluyó aquellos pacientes que presentaban sintomatología respiratoria alérgica, diagnosticados de rinosinusitis crónica con poliposis nasal, acompañada o no de asma, y aquellos pacientes diagnosticados de asma, tanto con pruebas cutáneas positivas como negativas (asma alérgica y no alérgica).

#### **1.4. Descripción de la muestra**

Se analizaron muestras de pacientes durante un periodo de 5 años por el grupo de investigación Alergología, perteneciente al Área de Enfermedades Infecciosas, Inflamatorias y Metabólicas del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

#### **1.5. Variables de estudio**

Las variables fueron recogidas mediante un cuestionario que se cumplimentaba en el momento de la consulta, así como con los datos analíticos y clínicos obtenidos del sistema informático de laboratorio (SIL) y de las historias clínicas de los pacientes. El cuestionario se incluye como anexo al final de la sección Materiales y Métodos.

Las variables incluidas en el cuestionario comprendieron los datos demográficos de los pacientes (número de historia clínica, número de petición de laboratorio, edad, sexo, fecha de

nacimiento, fecha de la consulta, dirección y nombre del médico alergólogo solicitante), la positividad o no de las pruebas cutáneas a los grupos de alérgenos anteriormente descritos, el diagnóstico de asma, rinitis y poliposis, la edad de aparición de sintomatología, la presencia o no de hipersensibilidad a los AINE, así como la existencia de antecedentes familiares, el tratamiento inmunoterápico o con corticoides y los niveles de IgE total. Asimismo, a cada muestra le fue asignado un código alfanumérico propio del estudio. Salvo el sexo y la edad, el resto de los datos demográficos solo se emplearon para la identificación inicial de los individuos y la recogida de las muestras, después de lo cual los datos se disociaron, de modo que los datos de identificación no se vieran reflejados en ningún otro momento a lo largo del estudio.

En cuanto a las variables recogidas del SIL y de las historias clínicas, se incluyó el hemograma, determinado por citometría de flujo en un equipo Sysmex XN-1000 (Roche Diagnostics, Suiza) (hemoglobina, hematocrito y recuento de células en sangre periférica: hematíes, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, basófilos, monocitos, eosinófilos y plaquetas), y la fracción exhalada de óxido nítrico o FeNO.

#### - **Diagnóstico de atopia**

El criterio diagnóstico de atopia fue la positividad a al menos un alérgeno de una batería de pruebas intraepidérmicas (*prick tests*) frente a ácaros, epitelios, hongos, pólenes, adaptada al medio ambiente local.

Las pruebas se realizaron de acuerdo con las recomendaciones para la normalización de alérgenos y pruebas cutáneas emitidas por la European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)<sup>175</sup>. La batería de aeroalérgenos empleada fue una adaptación a la exposición local (ALK-Abelló, Madrid; Bial-Aristegui, Bilbao; CBF-Leti, Barcelona), que incluía ácaros: *Dermatophagoides pteronissynuss*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Acarus siro*, pólenes de gramíneas, malezas y árboles: *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Chenopodium album*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago*

*lanceolata*, *Olea europaea*, *Cupressus arizonica*, *Platanus hispanicus*, *Quercus ilex*; hongos: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, y epitelios: *Canis lupus*, *Felis domesticus*, *Mesocricetus auratus*, *Equus ferus caballus* y *Oryctolagus cuniculus*, así como los correspondientes controles negativo (suero fisiológico) y positivo (dihidrocloruro de histamina, 10 mg/ml).

Previamente a la realización de las pruebas, se les retiraron antihistamínicos y otros fármacos que pudieran interferir en el resultado, según las indicaciones de la EAACI. La prueba intraepidérmica se llevó a cabo mediante la punción perpendicular en la epidermis de una lanceta tipo Morrow-Brown (Stallergenes, Antony, Francia), de 1 mm de diámetro.

La reacción fue considerada positiva frente al antígeno en cuestión si se originaba una pápula de diámetro mayor o igual a 3 mm, contrastando con un control negativo que no produjese pápula. La condición de paciente atópico y de sensibilización se estableció sobre la base de que el paciente presentase una reacción positiva a al menos uno de los aeroalérgenos de la batería. Se consideró alergia frente a dicho aeroalérgeno si a su vez existían manifestaciones clínicas relacionadas con la exposición.

En función de las pruebas intradérmicas positivas de los pacientes incluidos en este estudio y del grupo establecido (ácaros, pólenes, hongos, epitelios), se consideraron monosensibilizados aquellos pacientes con reacción positiva a uno de los grupos, mientras que los polisensibilizados fueron aquellos que presentaron reacción positiva frente a aeroalérgenos pertenecientes a más de un grupo.

- **Diagnóstico de RSCcPN**

El diagnóstico de poliposis nasal se estableció de acuerdo con los criterios EPOS 2020<sup>16</sup>, que son los de la rinosinusitis crónica en adultos con presencia de pólipos nasales, presentados en la tabla 1.

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de rinosinusitis en los adultos<sup>16</sup>.

|  |   |
|--|---|
| <p><b>Rinosinusitis en adultos:</b><br/>                 Inflamación nasal o de los senos paranasales caracterizada por 2 o más síntomas, uno de los cuales debe ser obstrucción o congestión nasal o secreción nasal (anterior o posterior).<br/>                 Con o sin:<br/>                 - Dolor o presión facial<br/>                 - Reducción o pérdida de olfato</p> |   |
| <p><b>más uno de los siguientes</b></p>  |   |
| <p><b>Signos endoscópicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pólipos nasales y/o</li> <li>- Secreción mucopurulenta, principalmente del meato medio y/o</li> <li>- Edema u obstrucción mucosa, principalmente del meato medio</li> </ul>  | <p><b>Cambios radiológicos en la tomografía computerizada (TC)</b></p> <p>Cambios de la mucosa dentro del complejo ostiomeatal y/o senos paranasales.</p> |

Junto al diagnóstico de CRSwNP, se recogieron datos clínicos sobre la poliposis nasal en aquellos pacientes con muestra de tejido polipoideo, así como del estadiaje en el momento de la polipsectomía, según la escala de Lildtholdt, mostrada en la tabla 8<sup>176</sup>.

**Tabla 8.** Escala de Lildtholdt<sup>176</sup>.

| Puntuación  | Escala de Lildtholt ( <i>Nasal Polyp Score</i> )                           |
|---|--|
| 1   | Pólipos pequeños que no alcanzan el borde superior del cornete inferior    |
| 2   | Pólipos medianos que alcanzan hasta el borde inferior del cornete inferior |
| 3   | Pólipos grandes que sobrepasan el borde inferior del cornete inferior      |
| 4   | El pólipo causa obstrucción total de la fosa nasal                         |
| El puntaje se realiza para cada una de las fosas nasales, siendo el total, la suma de ambos |  |

El grado corresponde al pólipo o pólipos extirpados, considerándose siempre el grado mayor.

Otras variables clínicas recogidas fueron la presencia o ausencia de insuficiencia ventilatoria y obstrucción, o sintomatología como la congestión, anosmia/disosmia, rinorrea, epistaxis o tos, en algún momento durante la evolución de su patología. Asimismo, se especificó si al paciente se le había practicado polipectomía previa, cirugía de senos paranasales o radiofrecuencia ablativa. También se recogió la presencia o ausencia de tabaquismo y el índice de paquetes-año (IPA) ( $n^{\circ}$  de cigarrillos fumados al día  $\times$   $n^{\circ}$  de años fumando/20).

#### - **Diagnóstico de asma**

El diagnóstico de asma en la consulta médica se realizó según los criterios establecidos por la guía GEMA 4.2<sup>216</sup> y sucesivas. Como ya se ha explicado en la sección anterior, el diagnóstico de asma en adultos se establece a partir de una historia de sintomatología respiratoria (sibilancias, dificultad respiratoria, presión en el pecho o tos) que puede ocurrir de forma variable en el tiempo y en intensidad, empeorar en la noche, al caminar o con las infecciones, y ser desencadenados con el ejercicio, la alergia u otras situaciones. Esta limitación espiratoria y de la vía respiratoria debe de confirmarse mediante una prueba de broncodilatación positiva, variabilidad del PEF, pruebas de provocación bronquial con metacolina o histamina, pruebas de provocación con el ejercicio y variabilidad del FEV<sub>1</sub> entre días. También puede emplearse un FeNO superior a 40 ppb. Además, deben estar ausentes otras enfermedades pulmonares. El diagnóstico se confirma si, además, el paciente responde adecuadamente al tratamiento.

Se realizó una espirometría basal, siguiendo las normas de la ATS (*American Thoracic Society*<sup>178</sup>) para el diagnóstico de los pacientes con asma. A aquellos pacientes con un índice FEV<sub>1</sub>/FVC < 0,7, se les realizó una prueba de broncodilatación. Si el test era negativo, se prosiguió el estudio con pruebas de

provocación bronquial con metacolina, que fue considerada positiva cuando se observaba un incremento en el FEV<sub>1</sub> mayor del 12 % y más de 200 ml. Un resultado negativo correspondía a una PC<sub>20</sub> de metacolina < 16 mg/ml.

Clasificación del asma según la alergia:

- *Asma alérgica (AA)*: presencia de asma junto a pruebas cutáneas positivas y sintomatología compatible con la exposición al alérgeno sensibilizante.
- *Asma no alérgica (ANA)*: presencia de asma junto a pruebas cutáneas negativas.

Gravedad del asma:

La gravedad del asma se determinó en condiciones basales, siempre y cuando fue posible, clasificando el asma en una de las cuatro categorías que establece la GINA<sup>177</sup>. En caso de estar recibiendo tratamiento, se estableció la gravedad del asma en función de su escalón de tratamiento.

- *Asma intermitente*:
  - Síntomas con frecuencia < 1 vez por semana.
  - Síntomas nocturnos con frecuencia < 2 veces al mes.
  - Crisis de corta duración.
  - FEV<sub>1</sub> o PEF ≥ 80 %.
  - Variación de FEV<sub>1</sub> o PEF < 20 %.
- *Asma persistente leve*:
  - Síntomas > 1 vez por semana, pero no a diario.
  - Episodios nocturnos > 2 veces al mes.
  - FEV<sub>1</sub> o PEF ≥ 80 %.
  - Variación de FEV<sub>1</sub> o PEF ≥ 20 %, <30 %.
- *Asma persistente moderada*:
  - Síntomas diarios.
  - Las crisis pueden afectar a la vida diaria y al sueño.

- Necesidad diaria de  $\beta$ 2 agonistas inhalados.
- FEV<sub>1</sub> o PEF  $\geq$  60 %, < 80 %.
- Variación de FEV<sub>1</sub> o PEF > 30 %.
- *Asma persistente grave*:
  - Síntomas diarios.
  - Crisis frecuentes.
  - Episodios nocturnos frecuentes.
  - Limitación de las actividades físicas.
  - FEV<sub>1</sub> o PEF < 60 %.
  - Variación de FEV<sub>1</sub> o PEF > 30 %.

Clasificación del asma según la presencia de eosinofilia y atopia según la Guía Española para el Manejo del Asma – GEMA 5.1<sup>179</sup>:

*Asma Tipo 2 (T2)*: fenotipo de asma caracterizado por nivel de eosinófilos totales en sangre periférica  $\geq$  150/ $\mu$ l y FeNO  $\geq$  25 ppm o presencia de alergia.

*Asma no Tipo 2 (No-T2)*: nivel de eosinófilos totales en sangre periférica < 150/ $\mu$ l y FeNO < 25 ppm y ausencia de alergia.

#### - **Diagnóstico de la rinitis alérgica**

La rinitis se diagnosticó basándose en los criterios de la guía ARIA 2019 (*Allergic Rhinitis and its impact on Asthma*)<sup>180</sup>. Según la guía, los síntomas característicos de la rinitis incluyen la rinorrea, picor, la congestión y obstrucción nasal, goteo postnasal o tos.

Gravedad de la rinitis:

La gravedad de la rinitis fue establecida también en condiciones basales, cuando fuera posible (sin tratamiento), clasificándose según las categorías propuestas por la guía ARIA.

- *Rinitis intermitente:*
  - Síntomas menos de 4 días a la semana y además aparecen durante menos de 4 semanas consecutivas.
- *Rinitis persistente:*
  - Síntomas más de 4 días a la semana o aparecen durante más de 4 semanas consecutivas.
- *Rinitis leve:*
  - Síntomas presentes, pero no problemáticos.
  - Ausencia de:
    - Afectación de actividades básicas de la vida diaria, ocio y/o deporte.
    - Afectación de actividades en el trabajo o la escuela.
    - Alteraciones del sueño.
- *Rinitis moderada/grave:*
  - Síntomas presentes y problemáticos.
  - Presencia de uno de los siguientes ítems:
    - Afectación de actividades básicas de la vida diaria, ocio y/o deporte.
    - Afectación de actividades en el trabajo o la escuela.
    - Alteraciones del sueño.

- **Antecedentes familiares de atopia, asma, rinitis y/o enfermedad alérgica**

Los antecedentes familiares de atopia y/o enfermedad alérgica, así como la historia familiar de asma o rinitis, fueron recogidos en el cuestionario por los especialistas en Alergología al momento de hacer la entrevista para extraer la muestra al paciente.

- **Inmunoterapia y corticoides**

Se recogieron datos sobre la administración de inmunoterapia (actual y previamente), así como de corticoides en el momento de la toma de muestra, caracterizándolos en tópicos o sistémicos y clasificándolos según su principio activo.

- **Niveles de IgE total**

Los niveles de IgE total se determinaron mediante enzimoimmunoanálisis en un equipo *ImmunoCAP 250* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EEUU) empleando el kit *ImmunoCAP Total IgE*. La técnica inmunoenzimática consiste en un análisis de tipo sándwich en el que la fase sólida está constituida por anticuerpos anti-IgE, unidos covalentemente a los pocillos de la placa de *ImmunoCAP*, que se unen a la IgE presente en el suero del paciente. La adición posterior de otros anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgE, marcados enzimáticamente con  $\beta$ -galactosidasa, permite la formación de inmunocomplejos, cuya fluorescencia se determina tras una serie de lavados para eliminar el exceso de anticuerpo y la incubación con una solución que contiene el sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa. La realización de una curva patrón por ensayo permite interpolar los resultados y cuantificar de forma relativa la concentración de IgE total presente en cada muestra.

En aquellos casos en los que las pruebas cutáneas no fueron concluyentes, se realizó también una determinación de IgE específica (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU). Su fundamento es el mismo, pero la fase sólida está compuesta por alérgenos específicos, por lo que solamente las IgE del suero del paciente se unirán a su antígeno correspondiente. Se eliminan los restos de IgE no específica y se procede de igual manera que con los niveles de IgE total.

- **Fracción exhalada de Óxido Nítrico (FeNO) y espirometría**

La concentración fraccional de óxido nítrico (NO) exhalado (FeNO) se determinó en la consulta de Alergología mediante el uso de un dispositivo portátil (Niox Vero, Circassia, Oxford, RU). El paciente realiza una exhalación en la boquilla del dispositivo, obteniéndose la concentración de NO en partes por mil millones (ppb).

La espirometría permite valorar la función respiratoria del paciente. Se realizó mediante un espirómetro, un dispositivo que mide la capacidad inspiratoria y espiratoria. Se analizaron parámetros como el Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (FEV1), que es el volumen de aire espirado en el primer segundo de la medición tras una maniobra de inspiración máxima o la Capacidad Vital Forzada (FVC), que corresponde al volumen máximo de aire que puede ser exhalado de manera forzada tras una inspiración máxima. En condiciones normales, la FEV1 es mayor del 70 % de la FVC, si bien depende de la edad y es mejor ajustar por el límite inferior de la normalidad (LIN). La relación FEV1/FVC puede orientar también sobre la naturaleza de la alteración respiratoria del paciente. A grandes rasgos, cuando el cociente se encuentra disminuido (<80 %), el patrón es obstructivo si la FEV1 está reducida. Si el cociente es normal y la FVC se encuentra disminuida, el patrón es restrictivo. Si tanto la FEV1 como la FVC están reducidas, se considera un patrón mixto. Se empleó un espirómetro DatoSpir 500 (Sibel, Barcelona, España), que no permite ajustar por el LIN y un espirómetro MasterScope (CareFusion, Hoechberg, Alemania), que sí lo permite.

- **Niveles de expresión de *IL4R* e *IL5RA***

Los niveles de expresión de *IL4R* e *IL5RA* se determinaron experimentalmente. Los detalles se recogen en el apartado siguiente.

## 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *IL4R* E *IL5RA*

Se estudió la expresión de ambos genes mediante PCR en tiempo real, que permite determinar cuantitativamente los niveles de RNA mensajero (mRNA) de un gen, y, por lo tanto, comparar los niveles de expresión de dicho gen respecto a un gen de expresión constitutiva y a un calibrador compuesto por un conjunto (*pool*) de pacientes sanos.

### 2.1. Diseño de cebadores (*primers*)

El diseño de los cebadores u oligonucleótidos para la amplificación de las regiones génicas de interés se llevó a cabo mediante la consulta de bases de datos genómicas y la utilización de herramientas online de diseño de oligonucleótidos para PCR.

La búsqueda de la secuencia de los genes de *IL4R* e *IL5RA* se realizó en la base de datos *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) de la Universidad de Santa Cruz, California. La identificación de regiones óptimas en el gen para diseñar los cebadores se efectuó a través de las herramientas web *Primer3web* (<https://primer3.ut.ee>) y *Beacon Designer* de *Premier Biosoft* ([www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1](http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1)), que sugieren distintas posibilidades en función del tamaño del amplicón, el tamaño de los cebadores, las características predictivas de la reacción y la posible formación de estructuras secundarias. Las características que se tuvieron en cuenta fueron las siguientes:

- Tamaño mínimo del amplicón 75-150 pb.
- Tamaño del primer comprendido entre 18 y 25 pb (óptimo 20 pb).
- Temperaturas de disociación (*melting*) entre 59 y 61°C (óptimo 60°C), sin una diferencia mayor de 2°C entre ambos cebadores.
- Porcentaje de bases de guanina y citosina entre 45-55 %.
- Anclaje GC (*GC clamp*): presencia de bases de guanina o citosina en las 5 últimas bases del extremo 3', que condiciona la estabilidad de la unión del primer a la secuencia. Se aceptan menos de 3 G o C.
- Formación de estructuras secundarias:

- Horquillado (*Hairping*): interacciones intramoleculares del propio cebador.  $\Delta G > -2$  kcal/mol en el extremo 3',  $\Delta G > -6$  si son internos.
- Autodimerización (*SelfDimer*): formación de dímeros intermoleculares del mismo cebador.  $\Delta G > -5$  kcal/mol en el extremo 3',  $\Delta G > -6$  si son internos.
- Dimerización intermolecular (*CrossDimer*): formación de dímeros intermoleculares entre el cebador sentido 5' (*forward primer*) y el cebador sentido 3' (*reverse primer*).  $\Delta G > -5$  kcal/mol en el extremo 3',  $\Delta G > -6$  si son internos.

El  $\Delta G$  o energía libre de Gibbs representa la medida de la espontaneidad de la reacción o la energía necesaria para romper las estructuras secundarias formadas. Cuanto menor sea el valor de  $\Delta G$  (mayor valor absoluto), la estabilidad de la estructura es mayor.

- Repeticiones (*Runs*): repeticiones de una misma base dentro del primer. Se permiten como máximo 4.
- Ausencia de variantes descritas en la región del amplicón.

Una vez diseñado el cebador, debe comprobarse su viabilidad y que no presentan homología cruzada, los cebadores no deben amplificar otras regiones del genoma. Para ello se emplearon las herramientas *BLAT* y *PCR in silico* de *Genome Browser*, que simulan una PCR virtual para comprobar que los cebadores son exclusivos de la región del gen en estudio (que exista una correspondencia del 100 %).

En la tabla 9 se detallan los oligonucleótidos utilizados en el estudio, así como sus características. Los cebadores fueron diseñados de tal forma que amplificasen una región de DNA codificante (cDNA) para cada gen, evitando así la amplificación de DNA genómico, por lo que algunos de los oligonucleótidos están diseñados en la unión exón-exón, como es el caso del *reverse primer* de *IL5RA*. Los cebadores diseñados fueron encargados y fabricados por Integrated DNA Technologies, IDT (Coralville, IA, EEUU). Los oligonucleótidos de los genes de referencia, *GAPDH* y *TBP*, son diseños comerciales (Human Reference Gene Panel, Roche Diagnostics, Suiza).

**Tabla 9.** Características de los oligonucleótidos empleados en la qPCR de *IL4R*, *IL5RA*, *PTGDR2*, *GAPDH* y *TBP* (GRCh38/hg38).

| <b><i>IL5RA</i> (NM_175726)</b>              |         |       |          |                  |                 |              |
|--|---------|-------|----------|------------------|-----------------|--------------|
| <i>Forward</i> 5'-TGAAAGAGTGAAGAACCGCC-3'    |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 20   | 55.11   | 50    | 5        | -2.9             | 0               | 0            |
| <i>Reverse</i> 5'-CCTGGCCTGAGAAATGCG-3'      |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 18   | 54.92   | 61.11 | 5        | -2.9             | -4.4            | 0            |
| <b>Longitud del amplicón: 112 pb.</b>        |         |       |          |                  |                 |              |
| <b><i>IL4R</i> (NM_001257407)</b>            |         |       |          |                  |                 |              |
| <i>Forward</i> 5'-CGTCTGCCTGTTGTGCTATG-3'    |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 20   | 56.32   | 55    | 1        | -1.3             | 0               | 0            |
| <i>Reverse</i> 5'-GGAATCTGATCCCACCATTG-3'    |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 20   | 52.53   | 50    | 1        | -1.3             | -2              | -1.5         |
| <b>Longitud del amplicón: 63 pb.</b>         |         |       |          |                  |                 |              |
| <b><i>GAPDH</i> (NM_002046)</b>              |         |       |          |                  |                 |              |
| <i>Forward</i> 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3'   |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 20   | 56.83   | 60    | 1        | -1.8             | -3.1            | 0            |
| <i>Reverse</i> 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'    |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 20   | 55.22   | 50    | 1        | -1.8             | -1.9            | -1.9         |
| <b>Longitud del amplicón: 112 pb.</b>        |         |       |          |                  |                 |              |
| <b><i>TBP</i> (NM_001172085)</b>             |         |       |          |                  |                 |              |
| <i>Forward</i> 5'-GAACATCATGGATCAGAACAACA-3' |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 23   | 54.8    | 39.13 | 1        | -1.3             | -2.3            | -0.4         |
| <i>Reverse</i> 5'-ATAGGGATTCCGGGAGTCAT-3'    |         |       |          |                  |                 |              |
| Longitud (pb)                                | Tm (°C) | GC%   | GC Clamp | Cross Dimer (ΔG) | Self Dimer (ΔG) | Hairpin (ΔG) |
| 20   | 54.13   | 50    | 1        | -1.3             | -4.3            | 0            |
| <b>Longitud del amplicón: 87 pb.</b>         |         |       |          |                  |                 |              |

Longitud en pares de bases (pb). Tm: temperatura de *melting*; GC: guanina y citosina; ΔG: energía libre de Gibbs. Datos extraídos de *Beacon Designer* (Premier Biosoft).

## **2.2. Extracción y purificación del RNA mensajero en sangre periférica**

Se empleó el kit *RiboPure™-Blood RNA Purification* (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) para la extracción y purificación del RNA siguiendo el procedimiento incluido dentro de las instrucciones del fabricante, que consta de las siguientes fases:

### **0. Recogida de muestras y estabilización en *RNA later solution***

- 0.1. Las muestras de sangre de los pacientes se recogieron en tubos con anticoagulante (EDTA) de 9 ml.
- 0.2. Se añadieron 1.3 ml de *RNA later solution* para 300-500  $\mu$ l de sangre total. El volumen medio de sangre utilizada fue de 450  $\mu$ l.
  - a. Se dejaron los tubos en un agitador hasta su procesamiento.
  - b. Se añadieron 450  $\mu$ l de sangre a 1.3 ml de *RNA later* en un tubo *Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemania) *safe lock*, mezclando bien por inversión.
  - c. Se almacenaron las muestras a -20°C hasta la extracción.

El *RNA later solution* es un reactivo incluido dentro del kit *RiboPure™-Blood RNA Purification* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) que tiene como finalidad asegurar la estabilidad del RNA en sangre completa. Permite almacenar las muestras hasta 3 días a temperatura ambiente o a largo plazo a -20°C. Mantiene el perfil de expresión génica de las células, de tal forma que el RNA obtenido al final de la extracción es comparable al que se obtendría en caso de procesar las muestras directamente sin almacenar. Además, el reactivo reduce de forma considerable la contaminación genómica de las muestras.

1. **Lisis celular.** La lisis inicial de las células sanguíneas se llevó a cabo mediante la adición de acetato sódico y una solución de lisis con guanidina, con posterior agitación vigorosa en vórtex.
2. **Purificación inicial del RNA.** El empleo de fenol/cloroformo permite la separación de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra del resto de componentes.

3. **Purificación final del RNA.** Para aislar el RNA de la solución, se emplearon columnas de afinidad con filtros, a través de los cuales se hizo pasar la muestra y se realizaron lavados seriados.
4. **Elución.** La muestra fue precalentada a 75°C y el contenido retenido es eluído mediante la adición de una solución de elución a la columna.

Las muestras se sometieron a un proceso adicional de purificación, mediante tratamiento con una DNasa para la eliminación del DNA genómico y posterior inactivación de la enzima a través de un reactivo incluido en el kit, retirado finalmente por centrifugación.

## 1. Lisis celular

- 1.1. Se descongelaron las muestras y se centrifugaron 1 minuto a 13200 rpm (16000 g) en una microcentrífuga.
- 1.2. Se eliminó el sobrenadante por aspiración con micropipeta, asegurándose de eliminar toda la parte fluida, incluida la capa blanca que aparece en la superficie del pellet cuando se centrifuga sangre sin tratar. Se eliminó también cualquier fluido contenido en el tapón.
- 1.3. Ambos pasos 1.1 y 1.2 se repitieron.
- 1.4. Se añadieron 800 µl de *Lysis Solution* y 50 µl de acetato sódico, incluidos en el kit, al pellet de las muestras centrifugadas.
- 1.5. Se agitó mediante vórtex de forma vigorosa durante 2 minutos para asegurar la lisis de las células, confirmando mediante observación visual de una solución homogénea.

## 2. Purificación inicial del RNA

- 2.1. Se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo a cada muestra.
- 2.2. Se agitaron las muestras mediante vórtex durante 30 segundos y se mantuvieron 5 minutos a temperatura ambiente.

- 2.3. Se centrifugaron a temperatura ambiente durante 1 minuto a 13200 rpm para separar las fases. La fase acuosa (sobrenadante) contiene el RNA. Se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf *safe lock* de 2 ml.
- 2.4. Se repitieron los pasos 2.2 y 2.3. El volumen final de fase acuosa oscilaba entre 1 y 1.2 ml.
- 2.5. Se añadieron 600 µl de etanol 100 % a cada muestra (aproximadamente la mitad del volumen de la fase acuosa) y se agitó en vórtex brevemente.

### 3. Purificación final del RNA

- 3.1. Se transfirió cada muestra a una columna de afinidad montada en un tubo colector, de 700 en 700 µl, y se centrifugaron durante 10 segundos a 13200 rpm, descartando el eluído. El RNA se encuentra adherido a la membrana de la columna.
- 3.2. Se purificó la muestra mediante las soluciones de lavado (*Wash solution 1* y *2/3*). Se añadieron 700 µl de *Wash solution 1* y se centrifugó 10 segundos a 13200 rpm, descartando el eluído. Se añadieron 700 µl de *Wash solution 2/3*, previamente preparado con 56 ml de etanol 100% añadidos al bote, a cada muestra, centrifugando y descartando el eluído. El lavado con *Wash solution 2/3* se realizó 2 veces.
- 3.3. Se centrifugaron durante 1 minuto a 13200 rpm para eliminar cualquier líquido residual y se transfirieron las columnas a un nuevo tubo colector limpio.

### 4. Elución

- 3.1. Se añadieron 50 µl de *Elution Solution*, incluida en el kit y precalentada a 75°C, en el centro del filtro de cada columna, manteniendo a temperatura ambiente unos 20 segundos y centrifugando con posterioridad durante 1 minuto a temperatura ambiente y 13200 rpm, para eluir y recuperar el RNA.
- 3.2. Se volvieron a pasar los 50 µl del eluído por la columna y se volvieron a centrifugar, para incrementar la concentración de RNA recuperado. Se descartó la columna.

- 3.3. Se realizó un tratamiento final con DNasa I, incluida en el kit *RiboPure™-Blood RNA Purification*, para eliminar cualquier resto de DNA que pudiese estar presente. Para ello, se preparó un mix que contiene *DNase I* (1 µl por muestra) y *DNase Buffer* (2,5 µl por muestra), añadiendo 3,5 µl a cada muestra.
- 3.4. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
- 3.5. Se añadieron 10 µl de resina de inactivación de DNasas y se dejaron a temperatura ambiente 2 minutos. Se invirtió el tubo una o dos veces durante esta incubación para resuspender la resina. Posteriormente se centrifugaron a 13200 rpm durante 1 minuto para precipitar la resina y separar el sobrenadante, transfiriéndolo a un tubo Eppendorf *RNase free*. Se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 y se almacenó a -20°C, hasta su utilización.

### **2.3. Extracción y purificación del RNA mensajero en muestras de tejido**

El protocolo de extracción de RNA de tejido de poliposis nasal es esencialmente el mismo que para muestras de sangre periférica, pero difiere en algunos aspectos. Las muestras de pólipos se obtuvieron de pacientes con poliposis nasal a los que se les realizaron polipectomías endoscópicas con fines terapéuticos en la consulta de Otorrinolaringología. Las muestras de tejido nasal control se obtuvieron aprovechando cirugías de hipófisis en pacientes atópicos, no asmáticos y sin rinitis ni poliposis nasal.

Para la extracción y purificación del RNA desde tejido, se empleó el kit *RiboPure™* (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). El procedimiento consta de las siguientes partes:

#### **0. Recogida de muestras y estabilización en *RNA later solution***

- 0.1. Se recomienda eliminar todo el material extraño posible, como tejido adiposo o restos sanguíneos. Si es necesario, se corta el tejido en piezas de un tamaño más adecuado para su almacenamiento y procesamiento.

0.2. Las muestras de tejido fueron recogidas en tubos Eppendorf de 5 ml, se añadieron 3 ml de solución *RNA later* y se congelaron hasta su disrupción.

## 1. Disrupción celular y purificación inicial de RNA

1.1. Antes de su procesado se retiró el exceso de *RNA later* de la muestra mediante un papel absorbente.

1.2. Se utilizaron morteros y mazos de cerámica enfriados previamente con nitrógeno líquido para disgregar y homogeneizar el tejido. Se añadió el nitrógeno líquido necesario hasta la completa disgregación de la muestra, evitando en todo momento que esta se descongelase.

1.3. Una vez machacado el tejido hasta consistencia de polvo, se procedió a su homogeneización en 1 ml de reactivo *TRI*<sup>®</sup>, incluido en el kit (1 ml de *TRI* por cada 50-100 mg de tejido). Se incubaron los homogeneizados 5 minutos a temperatura ambiente y fueron congelados a -80°C hasta la extracción del RNA.

## 2. Extracción del RNA

2.1. Se transfirió 1 ml del homogeneizado a un tubo Eppendorf de 2 ml. Se añadieron 200 µl de cloroformo (sin alcohol isoamilo) a cada muestra y se mezclaron con vórtex a velocidad máxima 5 minutos.

2.2. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos.

2.3. Después se centrifugaron a 13200 rpm a 4°C durante 10 minutos, para separar la fase acuosa que contiene el RNA de la fase orgánica que contiene el DNA y proteínas. El volumen de la fase acuosa es típicamente alrededor del 60 % del volumen utilizado de *TRI*.

2.4. Se transfirieron entre 600 y 800 µl de la fase acuosa a nuevos tubos de microcentrifuga.

- 2.5. Se añadieron 0,5 volúmenes de Etanol 100 % (300 o 400  $\mu$ l según la cantidad de fase acuosa obtenida) y se mezcló mediante vórtex de forma inmediata a velocidad máxima 5 segundos, para evitar la precipitación de RNA.
- 2.6. Se transfirió cada muestra a una columna de afinidad insertada en un tubo colector, de 700 en 700  $\mu$ l, y se centrifugaron durante 30 segundos a 13200 rpm, descartando el eluido. En este paso el RNA se encuentra unido a la membrana de la columna.
- 2.7. Se purificaron las muestras mediante la solución de lavado (*Wash solution*), incluida en el kit *RiboPure*<sup>TM</sup>. Se añadieron 500  $\mu$ l de la solución de lavado, previamente preparada con 48 ml de etanol 100 % añadidos al bote, a cada muestra, centrifugando y descartando el eluido. El lavado se realizó 2 veces.
- 2.8. Se centrifugaron durante 1 minuto a 13200 rpm para eliminar cualquier líquido residual y se transfirieron las columnas a un nuevo tubo colector limpio.

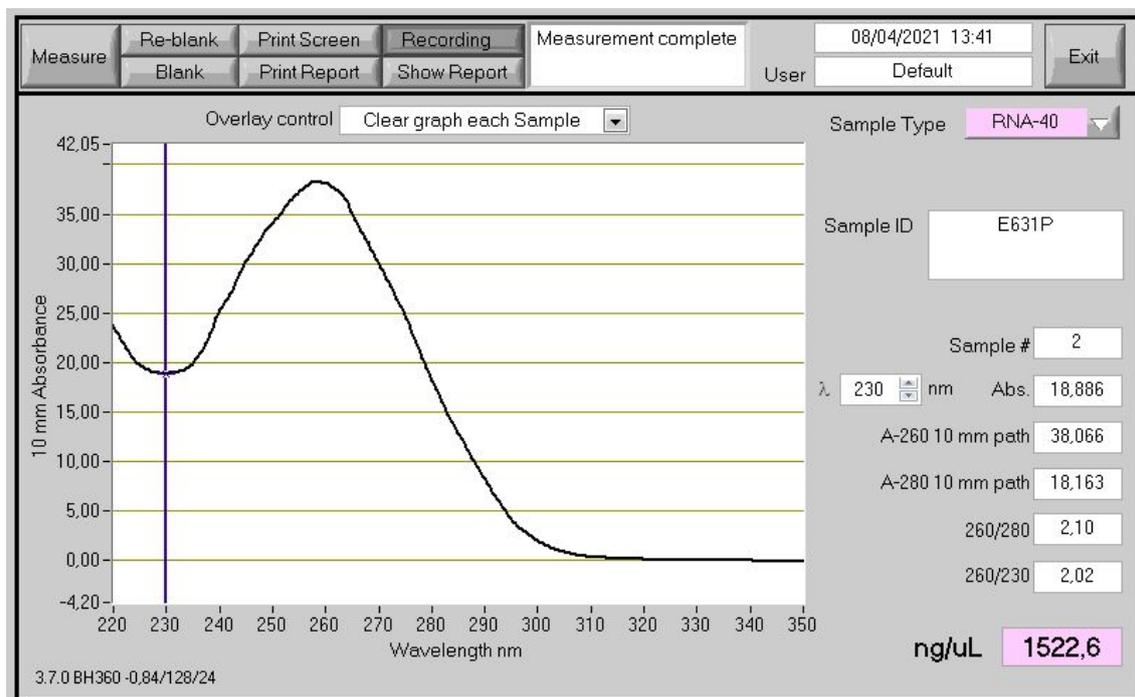
### 3. Elución

- 3.1. Se añadieron 100  $\mu$ l de *Elution Solution*, incluida en el kit y precalentada a 75°C, en el centro del filtro de cada columna, manteniendo a temperatura ambiente unos 20 segundos y centrifugando con posterioridad durante 1 minuto a temperatura ambiente y 13200 rpm, para eluir y recuperar el RNA.
- 3.2. Se volvieron a pasar los 100  $\mu$ l del eluido por la columna y se volvieron a centrifugar, para incrementar la concentración de RNA recuperado. Se descartó la columna.
- 3.3. Se realizó un tratamiento final con DNasa I, incluida en el kit *RiboPure*<sup>TM</sup>-*Blood RNA Purification*, para eliminar cualquier resto de DNA que pudiese estar presente. Para ello, se preparó un mix que contiene *DNase I* (1  $\mu$ l por muestra) y *DNase Buffer* (2,5  $\mu$ l por muestra), añadiendo 3,5  $\mu$ l a cada muestra.
- 3.4. Se incubaron a 37°C durante 37 minutos.
- 3.5. Se añadieron 10  $\mu$ l de resina de inactivación de DNasas y se dejaron a temperatura ambiente 2 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 13200 rpm durante 1 minuto

para precipitar la resina y separar el sobrenadante, transfiriéndolo a un tubo Eppendorf *RNase free*. Se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 y se almacenó  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización.

#### 2.4. Cuantificación del RNA mensajero

El RNA mensajero se cuantificó mediante espectrofotometría ultravioleta con el espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La longitud de onda empleada fue de 260 nm. Asimismo, se verificó la pureza del RNA analizado empleando la ratio de absorbancias 260/280 nm, que determina la contaminación por proteínas de la muestra (figura 13). Una ratio entre 2 y 2.2 indica una pureza óptima. Se descartaron valores inferiores a 1,5. La ratio 260/230 nm indica contaminación por reactivos empleados en la extracción, sobretudo el fenol. También se descartaron valores inferiores a 1,5.



**Figura 13.** Ejemplo de medición de concentración de RNA en *NanoDrop 1000*, software *NanoDrop Operating System* (v.3.8.1), expresada en  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , de una muestra de tejido polipoideo. Las ratios se encuentran en torno a 2 y son superiores a 1,5. La concentración de RNA obtenida de tejidos (en torno a 600-1200  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) fue bastante superior a la obtenida en muestras de sangre periférica (30-80  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ).

## Retrotranscripción

Una vez extraído y cuantificado el RNA, se llevó a cabo la retrotranscripción mediante el uso de un kit comercial, *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El sistema permite la síntesis de DNA complementario (cDNA) partiendo de RNA total, y opera en un rango de temperaturas de 42 a 55°C. La inhibición de la *SuperScript® III RT* por RNA ribosomal y de transferencia no es significativa.

El volumen inicial de muestra requerido en el kit es de 8 µl, y la cantidad de RNA total de la que se puede partir abarca de 1 pg a 5 µg. Se utilizaron 500 ng de RNA en todas las muestras de sangre periférica y entre 1-2 µg en el caso del tejido polipoideo o tejido de epitelio nasal.

Basándose en la cantidad de RNA cuantificada en el paso anterior, se calculó el volumen necesario para obtener 500 ng (1000 o 2000 ng en muestras de tejido, que contenían una concentración de RNA mayor). Si el volumen era inferior a 8 µl, se añadía agua destilada hasta alcanzarlo. Si el volumen excedía los 8 µl, las muestras serían concentradas al vacío empleando el equipo *Concentrator Plus* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

El proceso de retrotranscripción y PCR, llevado a cabo en un termociclador *MultiGene™ Optimax* (Labnet International, Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.), consta de las siguientes fases. Primero se llevó a cabo la preparación previa de una mezcla que contenía 1 µl/muestra de primer (hexámeros aleatorios) y 1 µl/muestra de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 10 µM,

**Asimismo, se preparó una segunda mezcla** con 2 µl/muestra de tampón, 4 µl/muestra de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl/muestra DTT 0.1 M, 1 µl/muestra de *RNaseOUT™* (40 U/µl) y 1 µl/muestra de *SuperScript® III RT*.

1. **Desnaturalización (65°C - 5 minutos)**
2. **Hibridación con cebadores (25°C – 10 minutos; 50°C – 50 minutos):** se emplearon hexámeros aleatorios (*random hexameres*) como cebadores en la reacción. Los hexámeros aleatorios son el método de cebado menos específico, ya que hibridan con RNA total,

pudiéndose de esta manera abarcar mayor cantidad de mRNA que la que se podría obtener con unos cebadores más específicos, como Oligo(dT) (que hibridan con secuencias poli(A) del extremo 3', presentes en aproximadamente el 1-2% del RNA total). La especificidad se consiguió, a posteriori, utilizando cebadores específicos de los genes en estudio en la PCR a tiempo real.

3. **Síntesis de cDNA (50°C – 50 minutos):** se realizó a partir de una solución de desoxinucleótidos trifosfato (*dNTP mix*). Se utilizó el *RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor* en la reacción, como medida adicional de salvaguarda contra la degradación del RNA diana por contaminación con ribonucleasas.
4. **Reacción de terminación (85°C – 5 minutos)**
5. **Eliminación de RNA residual:** la adición de la enzima RNasa H de *E. coli*, eliminó los restos de RNA molde de la muestra. Se pipeteó 1 µl/muestra de RNasa H e incubó a 37°C 20 minutos.

### **Cuantificación del RNA mensajero (mRNA) mediante PCR en tiempo real**

La PCR en tiempo real (RT-PCR) permite la cuantificación relativa de ácidos nucleicos mediante la medición de la fluorescencia del proceso de amplificación. Un fluorómetro acoplado a un termociclador detecta la fluorescencia en tiempo real de los ciclos de PCR, dando información sobre la velocidad y tiempo de reacción y traduciéndolos a términos relativos de cantidad de DNA presente. Una de las ventajas de la técnica es la posibilidad de cuantificar la expresión génica (PCR cuantitativa o qPCR), partiendo del mRNA retrotranscrito a cDNA como material base, lo que proporciona información sobre los niveles de expresión de un gen en una muestra concreta. De este modo, se cuantificó el cDNA obtenido en los pasos anteriores.

La qPCR se llevó a cabo en un equipo *LightCycler® 480* (Roche Diagnostics, Suiza).

Se determinó la expresión de mRNA de los genes *IL4R*, *IL5RA*, *GAPDH* y *TBP* mediante qPCR, utilizando el *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche Diagnostics, Suiza). El SYBR Green es una mezcla comercial que contiene DNA polimerasa *FastStart Taq* y tinción

específica de DNA de doble cadena para la detección y caracterización del DNA a estudio. La actuación del fluoróforo SYBR Green se basa en su unión de gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, produciéndose un aumento de su fluorescencia de hasta 1000 veces. La intercalación del colorante es directamente proporcional al DNA sintetizado y sigue una progresión lineal, lo que facilita la cuantificación del producto de la PCR. Su ventaja radica en su fácil uso, puesto que sólo requiere la adición de cebadores y del DNA molde, minimizando el riesgo de error y de contaminación por pipeteo.

- **Preparación de la solución de calibradores**

El calibrador empleado se obtuvo de un RNA total comercial procedente de linfocitos de sangre periférica de 426 individuos de etnia asiática (hombres y mujeres de edades comprendidas entre los 18 y 54 años) (Human Blood, Peripheral Leukocytes Total RNA, Takara, Kioto, Japón). El RNA total fue retrotranscrito a cDNA usando el kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ), a partir de hexámeros aleatorios.

- a) El RNA total de leucocitos de sangre periférica humana, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) se envió al laboratorio refrigerado con hielo seco, en tubos de 1,5 ml. Se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.
- b) Al realizar la retrotranscripción, se descongelaron los tubos en hielo y se centrifugaron para recoger todo el contenido del fondo.
- c) Se determinó la cantidad de RNA presente en el tubo y, en función de ello, se ajustaron los reactivos a utilizar.
- d) Se llevó a cabo el proceso de retrotranscripción conforme al protocolo descrito anteriormente.

Una vez obtenido el cDNA, se juntaron todos los productos de la reacción en un tubo Eppendorf y se prepararon alícuotas de 20 o 30  $\mu\text{l}$ , que fueron utilizadas como calibrador en las placas de qPCR.

- **Estudio de las eficiencias entre los genes de referencia y genes problema.**

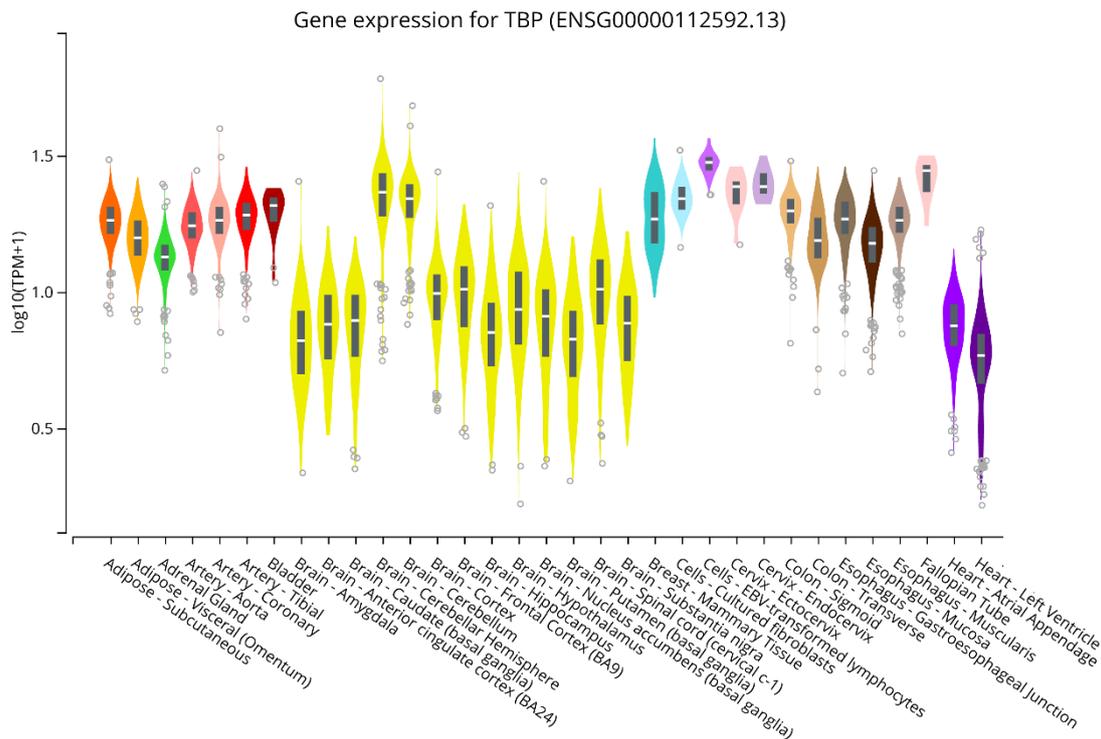
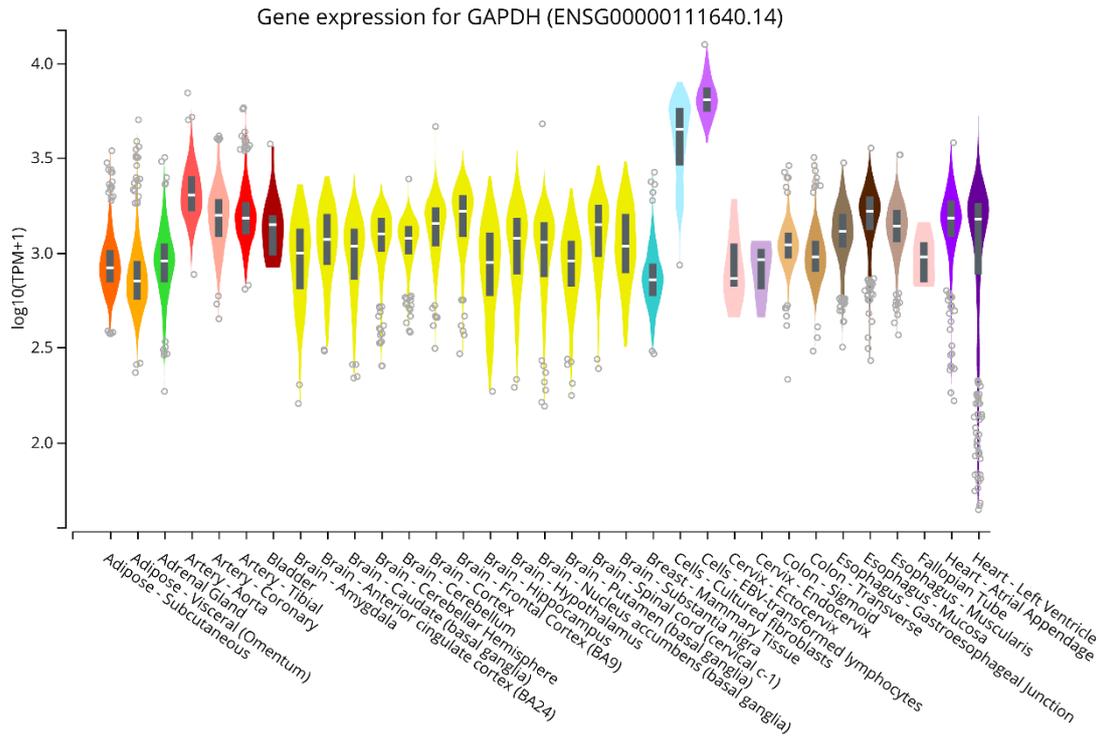
Se utilizaron los genes *GAPDH* y *TBP* como genes de referencia, puesto que muestran una expresión homogénea e independiente del estado del paciente y de su patología.

El gen *GAPDH* es el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, situado en el cromosoma 12, que cataliza la reacción glucolítica de D-gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato. Por su parte, el gen *TBP* codifica la proteína de unión a la caja TATA, y se sitúa en el cromosoma 6. La proteína TBP forma parte de un complejo proteico de pre-iniciación de la RNA polimerasa II, TFIID (factor de transcripción II D), que se une a regiones del promotor de algunos genes eucariotas. Las características de ambos genes se detallan a continuación (tabla 10 y tabla 14).

**Tabla 10.** Características genómicas de *GAPDH* y *TBP*, extraídas de Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

|  |
|--|
| <p><b>Gen:</b> <i>GAPDH</i><br/> <b>Descripción:</b> <i>Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 1, mRNA.</i><br/> <b>ID Ensembl:</b> ENSG00000111640.14<br/> <b>Clase:</b> codificante<br/> <b>Expresión mediana más alta:</b> 6385.00 TPM en células – linfocitos transformados - EBV<br/> <b>Expresión mediana total:</b> 70706.51 TPM<br/> <b>Posición genómica:</b> hg19 chr12:6643093-6647540</p> |
| <p><b>Gen:</b> <i>TBP</i><br/> <b>Descripción:</b> <i>Homo sapiens TATA box binding protein (TBP), transcript variant 1, mRNA.</i><br/> <b>ID Ensembl:</b> ENSG00000112592.13<br/> <b>Clase:</b> codificante<br/> <b>Expresión mediana más alta:</b> 52.48 TPM en testículos<br/> <b>Expresión mediana total:</b> 837.73 TPM<br/> <b>Posición genómica:</b> hg19 chr6:170863390-170881958</p>  |

Para poder realizar los cálculos de la expresión mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta C_t$  que se explicará en detalle más adelante, es imprescindible analizar si las eficiencias de amplificación de los genes problema y los genes de referencia son similares. Para ello se realizaron qPCR con cantidades decrecientes de DNA (100, 10, 1, 0,1 y 0,01 ng de DNA) con el objetivo de la elaboración de curvas patrón y el cálculo de la eficiencia de los genes constitutivos al ser comparados con los genes problema<sup>181</sup>.



**Figura 14.** Diagramas de cajas (*box-plots*) de las diferentes expresiones de *GAPDH* y *TBP* en tejidos, extraídos de GTExPortal (<https://www.gtexportal.org>). Expresión en genes en 54 tejidos de RNA-seq de GTEx de 17382 muestras, 948 donantes (V8, agosto 2019).

A partir de los valores logarítmicos de los resultados de expresión para cada concentración de DNA, se calculó la ecuación de la recta de regresión lineal para cada gen y su eficiencia.

$$eficiencia = 10^{-1/pendiente} - 1$$

Las rectas de expresión de los genes problema (*IL4R*, *IL5RA*) fueron comparadas con las de los genes constitutivos (*GAPDH* y *TBP*) mediante la elaboración de una nueva recta de regresión lineal, cuyos puntos fueron la diferencia entre los valores de expresión de los genes problema con los constitutivos, y el cálculo del coeficiente de determinación de esa nueva recta. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) da información sobre la calidad del modelo para predecir nuevos resultados y la proporción de varianza total que pueda ser explicada el propio modelo de regresión lineal. Su rango de valores comprende entre 0 y 1, y cuanto más cerca esté de 1, mayor será el ajuste del modelo a la variable.

$$R^2 = \frac{\sum_{t=1}^T (\hat{Y}_t - \bar{Y})^2}{\sum_{t=1}^T (Y_t - \bar{Y})^2}$$

El coeficiente de determinación es la fracción entre la varianza de la estimación de la variable ( $\hat{Y}$ ), que es la diferencia de expresión entre los genes, y la varianza de la propia variable ( $Y$ ). Tras el cálculo de eficiencias, se validaron *GAPDH* y *TBP* como genes de referencia para la determinación de la expresión de *IL4R* y *IL5RA* en las muestras del estudio.

- **PCR cuantitativa en *LightCycler*® 480**

- Preparación de mezcla de cebadores a una concentración 10  $\mu$ M:

Los cebadores, que se sirven liofilizados, se reconstituyeron a 100  $\mu$ M (concentración base) y se almacenaron a -20°C. A partir de esta alícuota, se preparó la dilución de trabajo a la concentración de 10  $\mu$ M, que también se almacenó a -20°C.

- Cálculo y diseño de placas:

La placa de PCR de 96 pocillos se diseñó de forma que se pudieran analizar 4 genes (los 2 genes a estudio, *IL4R* e *IL5RA*, y 2 genes constitutivos (*GAPDH* y *TBP*) en 6 muestras, cada una de ellas por triplicado para cada gen. Además, se añadió una fila de calibrador y otra de control negativo, NTC (agua destilada).

Se realizaron los cálculos para obtener una mezcla de *SYBR Green* con los cebadores, de la cual se repartirían 10  $\mu$ l por pocillo (7,5  $\mu$ l de *SYBR Green Master Mix*, 1,3  $\mu$ l de mezcla de cebadores 10  $\mu$ M y 1.2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada). Por otra parte, se prepararon tubos con la solución de cDNA de cada muestra en estudio, de las que se añadirían 5  $\mu$ l a cada pocillo correspondiente. Un tubo con el cDNA calibrador para añadir 5  $\mu$ l en los pocillos designados) y 1 tubo con agua para añadir 5  $\mu$ l a los pocillos de control negativo.

- Preparación de la placa de PCR:

Para la preparación de la placa y el pipeteo de los volúmenes mencionados anteriormente, se utilizó un sistema automatizado, *Eppendorf epMotion® 5070* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania; figuras 15 a 17). El sistema automatizado asegura una buena reproducibilidad del método y menor variabilidad interplaca.

El software del equipo (*epBlue ID™ v.10.000*) permite la programación de métodos de pipeteo, estableciendo el volumen y las posiciones de los pocillos con los que se desee trabajar, minimizando así el error humano. El equipo se programó para pipetear en cada pocillo 10  $\mu$ l de la solución de *SYBR Green* y 5  $\mu$ l de la solución de cDNA o calibrador o control negativo correspondiente, obteniéndose un volumen final de 15  $\mu$ l.



**Figura 15.** Eppendorf epMotion® 5070.



**Figura 16.** Rack para 24 tubos safelock.



**Figura 17.** Thermoadapter para placa de PCR de 96 pocillos

- LightCycler® 480:

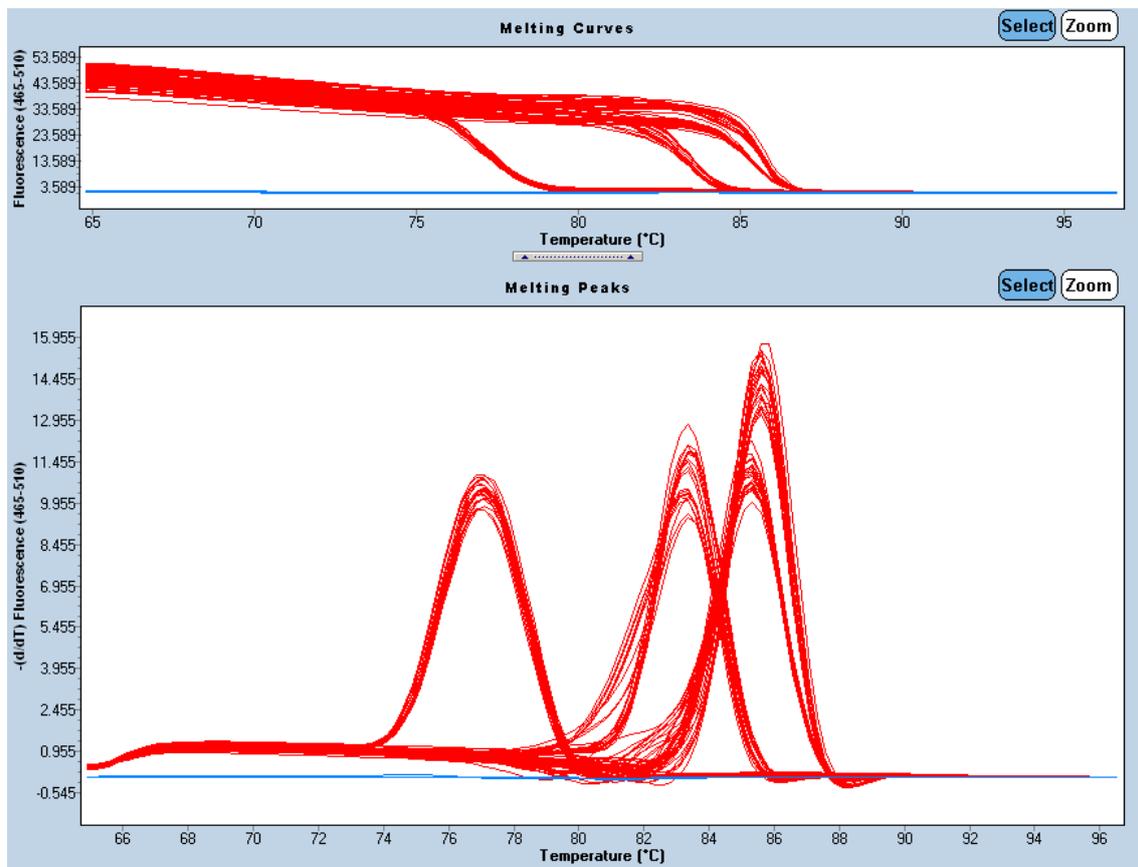
Una vez preparada la placa, se procedió a realizar la qPCR en el aparato *LightCycler® 480*. Se empleó el programa propio de *SYBR Green*, que consta de las siguientes partes:

- 1 ciclo de pre-incubación de activación de la Taq Polimerasa a 95°C durante 5 minutos. Rampa de 4,4°C/s.
- 45 ciclos de amplificación, cada uno de ellos constituido por 10 segundos a 95°C (rampa de 4,4 °C/s), 10 segundos a 60°C (rampa de 2,2 °C/s) y 10 segundos a 72°C (rampa de 4,4 °C/s).

- 1 ciclo de la curva de *melting*, 5 segundos a 95°C (rampa de 4,4 °C/s), 1 minuto a 65°C (rampa de 2,2 °C/s) y temperatura objetivo de 97°C.
- Finalmente, el ciclo de *cooling* o enfriamiento hasta alcanzar los 40°C en 30 segundos (rampa de 2,2 °C/s).

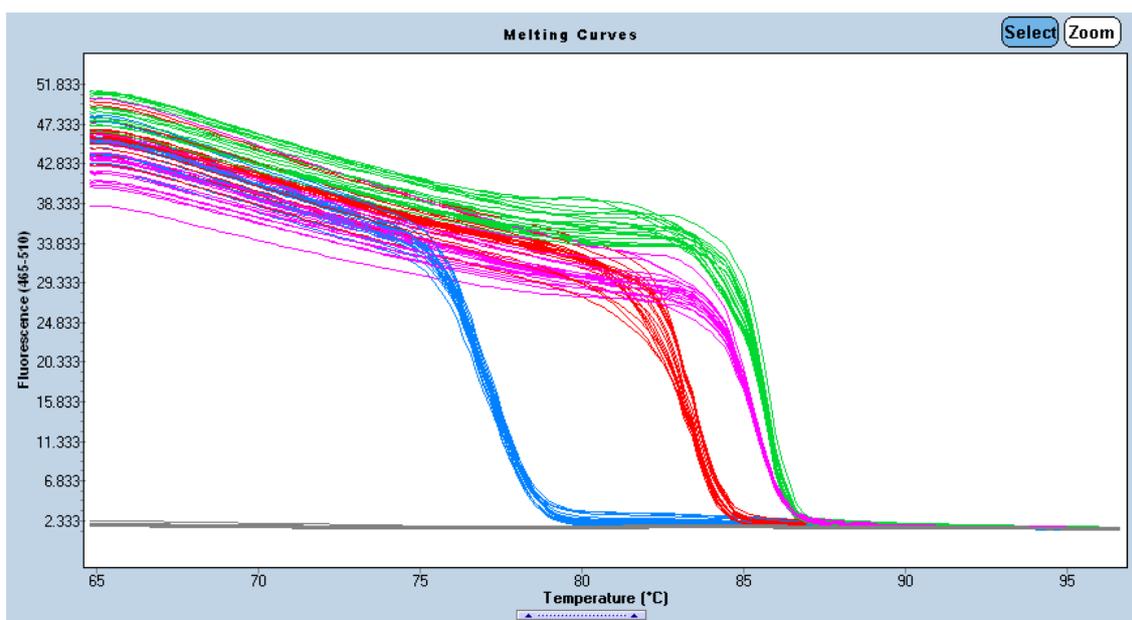
### **Obtención y análisis de datos del *LightCycler*® 480**

El software propio del equipo, *LightCycler*® 480 Software v.1.5.1.62, IDEAS 2.0, permite analizar las curvas de amplificación y de fusión de la placa. En primer lugar, se comprueba que las temperaturas de fusión ( $T_m$ , *temperature of melting*) se corresponden con la del fragmento amplificado y que no hay otros picos de fusión presentes, que podrían indicar una posible contaminación o formación de dímeros de los cebadores (figura 18).



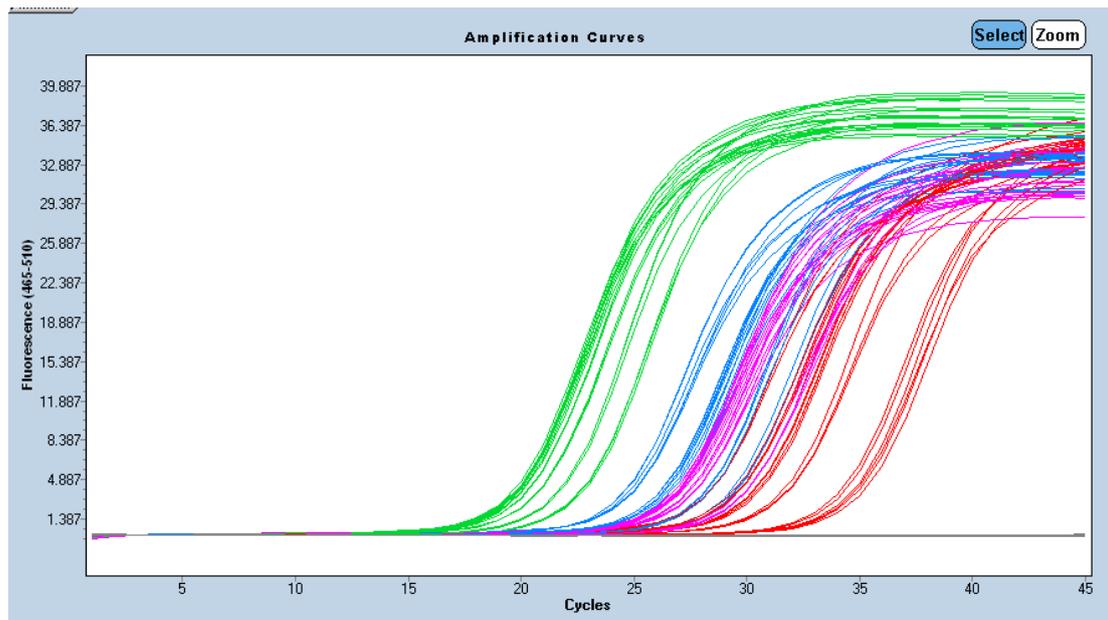
**Figura 18.** Temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) de una placa de ejemplo. Se representa la fluorescencia (medida a longitudes de onda 445-510 nm) frente a la temperatura (°C). Software IDEAS 2.0.

En este ejemplo de la figura 19, de una placa de 8 muestras (6 muestras problema, 1 control sano y el calibrador), podemos ver 4 curvas o picos de fluorescencia frente a la temperatura de *melting* (°C), correspondientes a los 4 fragmentos de los 4 genes presentes en la placa (*IL4R*, *IL5RA*, *GAPDH* y *TBP*). Cada uno de ellos presenta una  $T_m$  concreta y 24 curvas de fusión de las 8 muestras por triplicado.

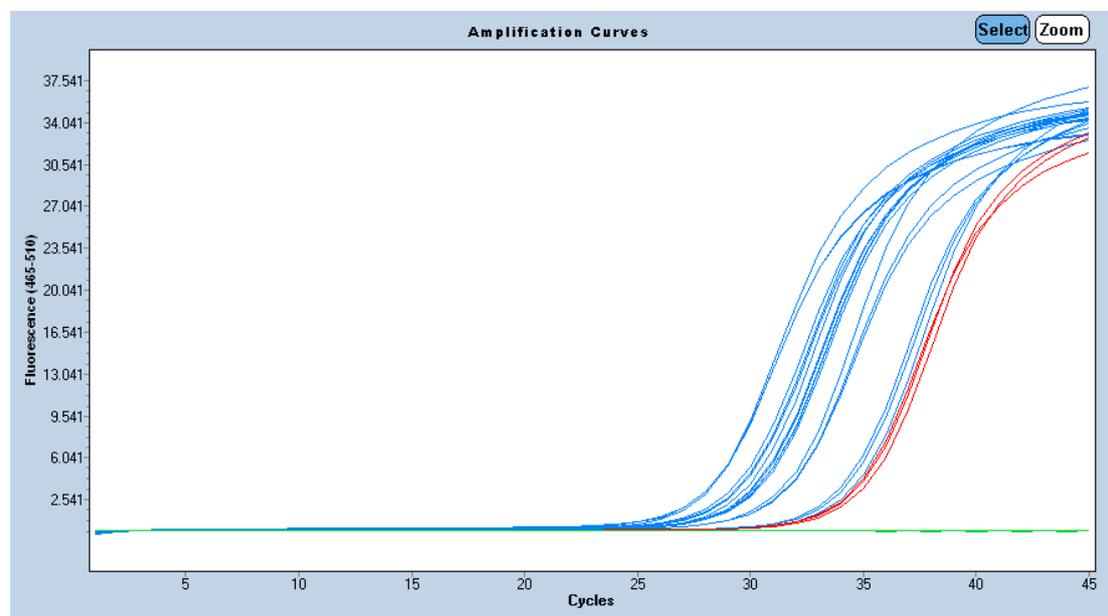


**Figura 19.** Curvas de temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) de la misma placa. Los colores diferencian los 4 genes. Software IDEAS 2.0.

La cuantificación de la expresión de los genes se realizó por medio de los valores de  $C_t$  (*Cycle Threshold*) para cada curva. El  $C_t$  corresponde al punto de la curva de amplificación en el que ésta comienza a ser exponencial, y que es a su vez la intersección entre la curva de amplificación y la *threshold line*, o línea de umbral. Como cada muestra se analizó por triplicado para cada gen, se obtiene el valor medio y la desviación estándar de los 3 resultados de  $C_t$ . Como criterio de validez de los resultados del ensayo, se estableció un límite máximo de 0,35 de desviación estándar como aceptación (variabilidad intraensayo). Los  $C_t$  obtenidos se encontraron siempre por debajo del límite de detección del equipo de 40 ciclos, que según la recta patrón calculada para *GAPDH*, corresponde a una concentración de  $1,98e-5$  ng. Algunos ejemplos, de curvas de amplificación del ensayo, se muestran en la figura 20.



a.



b.

**Figura 20.** Curvas de amplificación. Fluorescencia (longitudes de onda 445 - 510 nm) frente a número de ciclos. **a.** Curvas de amplificación de una placa diferenciadas por colores según el gen (azul, *IL4R*; rojo, *IL5RA*; verde, *GAPDH*; morado, *TBP*). Se puede observar la diferencia de ciclos media necesaria para cada fragmento según su  $T_m$ . **b.** Curvas de amplificación de *IL5RA*. Muestras problema (azul) y calibrador (rojo). El Ct en el calibrador (el número de ciclos necesarios para que la amplificación sea exponencial) es más elevado que en las muestras. Esto se traduce en una menor expresión del gen en el calibrador, que está formado por una mezcla de cDNA de individuos sanos, en comparación con las muestras. *Software* IDEAS 2.0.

El cálculo de la expresión se realizó mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta C_t^{182}$ , que tiene en cuenta tanto la diferencia de expresión de la muestra problema con la de los genes constitutivos (*GAPDH* y *TBP*), como con la del calibrador en la misma placa.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra\ problema} - \Delta Ct_{calibrador}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{gen\ problema} - Ct_{gen\ constitutivo})_{muestra\ problema} - (Ct_{gen\ problema} - Ct_{gen\ constitutivo})_{calibrador}$$

Finalmente, la expresión relativa se obtuvo mediante la fórmula:

$$Expresión\ relativa = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En cada experimento de qPCR se añadieron NTC (*No Template Control* o control sin oligonucleótidos) en forma de agua destilada. Los NTC permiten detectar posibles contaminaciones que produzcan resultados falsos positivos. Los cálculos fueron realizados en Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmon, WA, EE.UU.).

Al normalizarse la expresión de los genes problema con los genes de referencia en cada placa, cuya expresión es independiente de la patología subyacente, y con el calibrador, se asegura una mayor reproducibilidad y una disminución de la variabilidad inter-ensayo, permitiendo la comparación de resultados entre placas.

Todos los métodos de cálculo de expresión por qPCR siguieron las recomendaciones de la guía MIQE (*Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quatitative PCR*)<sup>183</sup>, que establece los criterios de información mínima que se requieren para la publicación de resultados obtenidos por PCR cuantitativa. Las reglas esenciales de la guía MIQE se muestran al final de la sección de Materiales y Métodos (anexo 2).

### **Análisis estadístico**

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante hojas de cálculo *Excel* (Microsoft, Redmond, Washington, EE. UU.) y el uso de los softwares estadísticos *SPSS Statistics* v.15 y 17 (IBM, Endicott, Nueva York, EE. UU.), *GraphPad Prism 6* (GraphPad, San Diego, California, EE. UU.) y *R* (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria), con los paquetes *ggplot2*, *tidyverse*, *fastDummies*, *heatmaply*, *pROC*, *dplyr* y *skimr*<sup>217-223</sup>.

- **Métodos estadísticos empleados**

- *Z de Kolmogorov-Smirnov*: método estadístico utilizado para analizar la normalidad de la distribución de la muestra.
- *Test de Levene*: permite el estudio de homogeneidad de las varianzas.
- *t de Student*: método estadístico de contraste de comparación de medias de 2 poblaciones que siguen una distribución normal.
- *U de Mann-Whitney*: método estadístico de contraste de comparación de medias de 2 poblaciones que no siguen una distribución normal y el tamaño muestral es pequeño.
- *ANOVA*: método estadístico de contraste de comparación de medias de K poblaciones ( $K > 2$ ) que siguen una distribución normal.
- *Kruskall-Wallis*: método estadístico de contraste de comparación de medias de K poblaciones ( $K > 2$ ) que no siguen una distribución normal.
- *Correlación de Pearson*: mide el grado y el tipo de dependencia lineal entre 2 variables cuantitativas continuas aleatorias.

### 3. ANEXOS. MATERIALES Y MÉTODOS.

Anexo 1. Plantilla de trabajo para la preparación de la placa de qPCR.

| PLACA N°<br>FECHA     |   |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------|---|-----------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|                       |   |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | min 262         |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | x27             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Reactivos             | Volumen   |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H2O                   | 1,3 ul  |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Master Mix Syber G 2x | 7,5 ul  |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Primers (10uM each)   | 1,2 ul  |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cDNA                  | 5ul   |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| TOTAL                 | 15ul  |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 35,1            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 202,5           |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 32,4            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 270             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | min 74          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | x15             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cDNA                  | 20ng/reacción<br>20ng=0,8ulcDNA (RT 500ng/20ul) |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| cDNA                  | 0,8 ul  |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H2O                   | 4,2 ul  |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | 5 ul  |                 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 12              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 63              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | NTC (H2O) 75 ul |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | x15             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 0,4             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 4,6             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 5 ul            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 6               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 69              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |   | 75              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Anexo 2.** Relación de los ítems que hay que controlar en publicaciones de qPCR, según la guía MIQE<sup>186</sup>.

### **Diseño experimental**

- Definición de grupo control y experimental
- Número dentro de cada grupo

### **Muestra**

- Descripción
- Volumen/masa de muestra procesada\*
- Procedimiento de procesado
- Técnica y tiempo de congelación
- Condiciones de almacenamiento de muestras y duración

### **Primers de la qPCR**

- Secuencia de los *primers*
- Localización e identificación de alguna modificación
- Fabricante de los *primers*\*
- Método de purificación\*

### **Extracción de ácidos nucleicos**

- Procedimiento y/o instrumentación
- Nombre del kit y detalles de algunas modificaciones
- Detalles del tratamiento con DNasa o RNasa
- Medición de la contaminación del DNA o RNA
- Cuantificación de ácidos nucleicos
- Instrumento y método
- Pureza (A260/A280)\*
- Rendimiento\*
- Integridad del RNA: método/instrumento
- Ct de 3' y 5' del transcrito
- Test de inhibición (diluciones de Ct)

### **Transcripción inversa**

- Condiciones de reacción
- Cantidad de RNA y volumen de reacción
- Cebado de oligonucleótidos y concentración
- Transcriptasa inversa y concentración
- Temperatura y tiempo
- Fabricante y número de catálogo de reactivos
- Condiciones de almacenamiento del cDNA\*

### **Información del gen a estudiar por qPCR**

- Símbolo del gen
- Número de acceso a la secuencia
- Localización del amplicón\*
- Tamaño del amplicón\*
- Especificidad *in silico*
- Localización del primer en exón o intrón
- Variantes del *splicing* a las que están dirigidas

### **Protocolo de qPCR**

- Condiciones de reacción
- Volumen de reacción y cantidad de cDNA/DNA
- Primers*, concentración de Mg<sup>2+</sup>, dNTP
- Identificación de la polimerasa y concentración
- Fabricante e identificación del kit/tampón
- Aditivos (*SYBR Green*)
- Fabricante de placas y número de catálogo\*
- Parámetros completos del termociclador
- Preparación de la reacción (manual/automatizado)\*
- Fabricante del instrumento para qPCR

### **Validación de la qPCR**

- Especificidad (gel, curva de fusión...)
- Ct de los NTC
- Curva de calibración: pendiente e intersección en el eje Y
- Eficiencia de la PCR calculada por la pendiente
- R<sup>2</sup> de la curva de calibrado
- Rango dinámico lineal
- Variación de Ct al límite de detección
- Evidenciar el límite de detección

### **Análisis de datos**

- Programa de análisis de qPCR y versión
- Método de determinación del Ct
- Identificación de *outliers*
- Resultados de los NTC
- Justificación del número y elección de los genes de referencia
- Descripción del método de normalización
- Número de réplicas
- Repetitividad (variación intraensayo)
- Reproducibilidad (variación interensayo, CV)\*
- Análisis de Poder\*
- Método estadístico para la significancia de los resultados
- Software (versión)

\*Los elementos con asterisco forman parte del grupo de ítems no esenciales, pero recomendables.







# RESULTADOS



## RESULTADOS

### 1. CARACTERIZACIÓN DEMOGRÁFICA DE LA MUESTRA

La muestra quedó conformada por un total de 256 individuos, de los cuales 102 (39,85%) pertenecían al grupo control y 154 (60,15%) al grupo experimental. Se incluyeron en el estudio 140 (54,7%) mujeres y 116 (45,3%) varones; estos porcentajes fueron del 67% y del 33% en el grupo control y del 47% y del 53% en el grupo experimental. La media de edad de la muestra global fue de 55,34±16,68 (media±SD), siendo de 56,97±17,43 en el grupo control y de 54,25±16,13 en el experimental.

**Tabla 12.** Características demográficas de la muestra a estudio.

|                           | <i>n</i> | <i>Sexo</i> <sup>†</sup> | <i>Edad</i> | <i>IgE</i>     | <i>EOS</i>    |
|---------------------------|----------|--------------------------|-------------|----------------|---------------|
| <b>Controles</b>          | 102      | 0,67                     | 56,97±17,43 | 68,41±113,96   | 132,43±90,4   |
| <b>Pacientes</b>          | 154      | 0,47                     | 54,25±16,13 | 289,71±556,85  | 444,23±366,45 |
| <b>RSCcPN</b>             | 121      | 0,40                     | 53,86±16,16 | 329,71±602,5   | 510,02±382,9  |
| <b>RSCcPN c/Atopia</b>    | 49       | 0,31                     | 46,6±15,26  | 526,72±836,79  | 524,81±307,57 |
| <b>RSCcPN s/Atopia</b>    | 72       | 0,46                     | 58,69±14,98 | 191,2±293,34   | 499,76±429,61 |
| <b>RSCcPN c/Asma</b>      | 87       | 0,45                     | 54,17±15,61 | 400,05±684,57  | 547,69±403,02 |
| <b>RSCcPN c/AA</b>        | 38       | 0,37                     | 46,57±15,53 | 609,35±924,31  | 561,68±323,65 |
| <b>RSCcPN c/ANA</b>       | 49       | 0,51                     | 59,92±13,13 | 233,56±332,45  | 536,1±426,36  |
| <b>RSCcPN s/Asma</b>      | 34       | 0,27                     | 53,06±17,7  | 144,5±206,1    | 415,83±313,77 |
| <b>Asma</b>               | 120      | 0,52                     | 54,6±15,72  | 329,31±613,79  | 452,26±381    |
| <b>ANA</b>                | 82       | 0,60                     | 58,22±14,49 | 198,63±328,62  | 400,6±396,93  |
| <b>ANA s/PN</b>           | 33       | 0,73                     | 55,7±16,19  | 149,04±321,92  | 221,39±171,93 |
| <b>EREA</b>               | 26       | 0,50                     | 57,31±12,57 | 304,81±347,67  | 503,18±386,98 |
| <b>Atopia</b>             | 49       | 0,31                     | 46,6±15,26  | 526,72±836,79  | 524,81±307,57 |
| <b>Polisensibilizados</b> | 24       | 0,29                     | 40,62±12,91 | 689,91±1081,93 | 570±368±21    |
| <b>Monosensibilizados</b> | 25       | 0,32                     | 52,58±15,31 | 356,1±425,62   | 477,48±227,38 |
| <b>Ácaros</b>             | 25       | 0,24                     | 45,36±13,42 | 591,46±1043,64 | 462,92±296,13 |
| <b>Polen</b>              | 37       | 0,35                     | 46,44±14,87 | 530,23±909,85  | 565,53±323,71 |
| <b>Epitelios</b>          | 19       | 0,32                     | 39,58±14,06 | 874,71±1208,47 | 662,35±360,03 |
| <b>Hongos</b>             | 7        | 0,29                     | 34,43±14,03 | 876,69±766,98  | 605,71±439,24 |

Resultados expresados en media±SD. *n*, número de casos. <sup>†</sup>Sexo femenino (porcentaje). IgE (kU/L). Eosinófilos (concentración expresada en células/μL). RSCcPN: rinosinusitis crónica con poliposis nasal. AA: asma alérgica. ANA: asma no alérgica. EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por ácido acetilsalicílico. c/: con. s/: sin.

El grupo experimental incluyó 121 pacientes con poliposis nasal (RSCcPN), de los cuales 34 presentaban poliposis simple sin asma (RSCcPN sin asma); y 120 pacientes con asma (82 con asma no alérgica). En la tabla 12 se muestra el análisis de frecuencias de las distintas variables demográficas de la población a estudio.

### **1.1. Distribución por grupos clínicos**

Dentro de los grandes grupos clínicos analizados (rinosinusitis crónica con poliposis nasal, RSCcPN con o sin asma asociada; y asma no alérgica sin poliposis, ANA s/PN), la distribución de los pacientes se decantó por la RSCcPN (79%), dentro de la cual, predominaron aquellos con asma asociada (71.9% de RSCcPN y 33.98% del total), frente a la poliposis simple o RSCcPN sin asma (28.1% de RSCcPN y 13.28% del total).

En cuanto a la atopía, 49 individuos (19.14% del conjunto de pacientes), presentaron pruebas cutáneas positivas. Este porcentaje supone el 40.05% de los pacientes con RSCcPN. En cuanto a los pacientes con RSCcPN y asma, 38 (43.68%) fueron atópicos.

En cuanto a la corticoterapia concomitante, 126 pacientes estaban sometidos a tratamiento con corticoides, de los cuales 111 estaban tratados de forma tópica, 4 con corticoides sistémicos y 11 con ambos tipos.

Del total de pacientes con RSCcPN, se obtuvieron muestras de pólipos nasales de 36 individuos, junto a 3 muestras de tejido nasal sano control, obtenido de cirugías hipofisarias. De las muestras de tejido, 6 correspondieron a PN grado I de la clasificación de Lindholdt, 17 a PN grado II y 11 a PN grado III. No se consiguieron datos del estadiaje de 2 de los pacientes con RSCcPN.

### **1.2. Nivel de eosinófilos por grupos**

En la nuestra global, la concentración media de eosinófilos en sangre periférica fue de  $318,42 \pm 326,55$  (células/ $\mu$ L), siendo de  $132,43 \pm 90,4$  en los controles y de  $444,23 \pm 366,45$  en los pacientes. Las medias más elevadas correspondieron al grupo de pacientes con PN con asma

concomitante (RSCcPN c/Asma,  $547,69 \pm 403,02$ ), de PN con asma alérgica (RSCcPN c/AA,  $561,68 \pm 323,65$ ), de PN con asma no alérgica (RSCcPN c/ANA,  $536,1 \pm 426,36$ ) y de poliposis con atopia (RSCcPN c/Atopia,  $524,81 \pm 307,57$ ). Dentro de este último grupo, la media de eosinófilos se elevó en algunos subgrupos, como el grupo con sensibilización a pólenes, a epitelios o a hongos ( $565,53 \pm 323,71$ ,  $662,35 \pm 360,03$  y  $605,71 \pm 439,24$ , respectivamente). Las diferencias de eosinófilos de todos los grupos anteriores, con respecto a los controles, ha sido significativa ( $p < 0,001$ ). La diferencia entre RSCcPN c/Asma y RSCcPN s/Asma no ha sido significativa ( $p = 0,108$ ). Sin embargo, si lo fue la diferencia de eosinófilos entre RSCcPN c/AA y RSCcPN s/Asma ( $p = 0,02$ )

### **1.3. IgE por grupos**

La concentración de IgE se determinó en 240 individuos siendo la media de la muestra global de  $199,69 \pm 447,81$  (kU/L); por su parte, fue de  $68,41 \pm 113,96$  en los controles, y de  $289,71 \pm 556,85$  en los pacientes. La concentración media más elevada correspondió al grupo de RSCcPN c/AA ( $609,35 \pm 924,31$ ); destacan también los subgrupos con sensibilización a los pólenes, los epitelios y a los hongos ( $530,23 \pm 909,85$ ,  $874,71 \pm 1208,47$  y  $876,69 \pm 766,98$ , respectivamente).

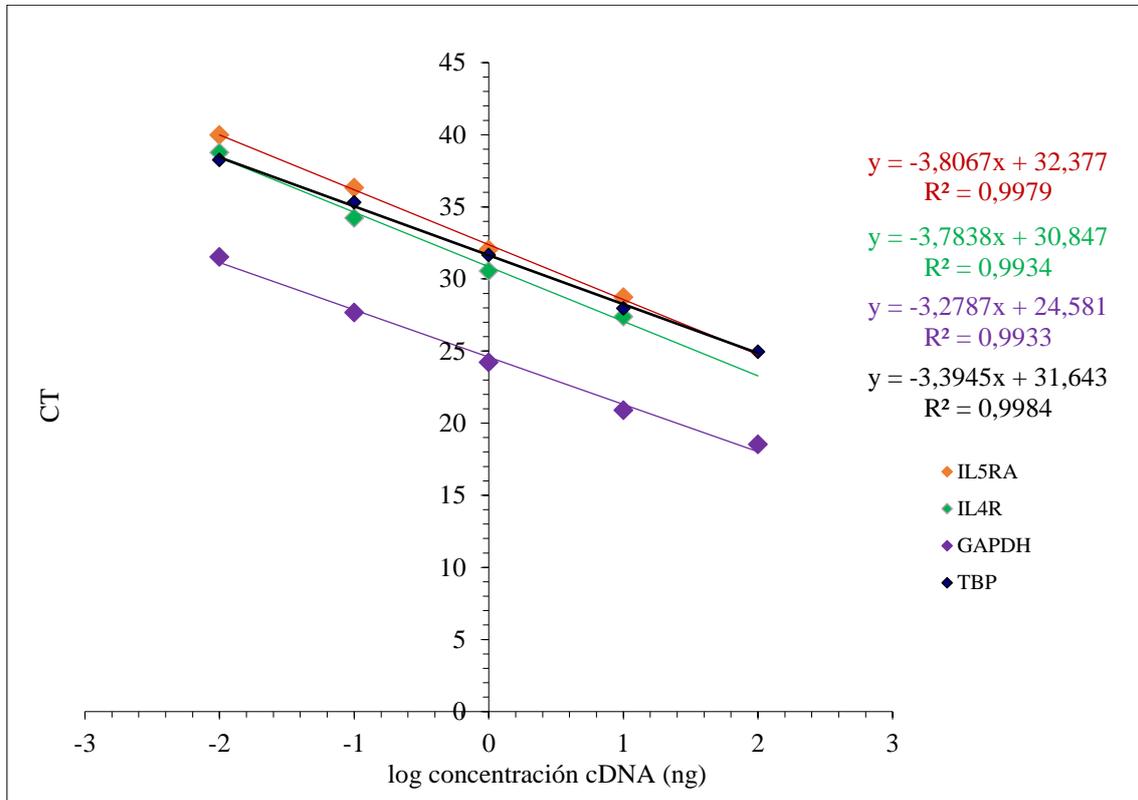
## **2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE *IL5RA***

### **2.1. Genes de referencia**

- **Cálculo de eficiencia y elaboración de rectas patrón**

Como ya se ha explicado con anterioridad, se realizó una qPCR inicial para la validación de los genes de referencia (*GAPDH* y *TBP*), utilizando para ello un conjunto de muestras de controles sanos. A partir de los valores logarítmicos de los resultados de expresión para cada concentración de DNA, se calculó la ecuación de la recta de regresión lineal para cada gen y su eficiencia.

A continuación, en la figura 22, se muestran las rectas patrón de ambos genes y los genes problema (*IL5RA* e *IL4R*), obtenidas mediante qPCR, junto a los resultados del cálculo de eficiencia para *GAPDH* y *TBP* para su uso como genes de referencia. Se puede observar cómo las 4 rectas siguen una tendencia decreciente lineal similar.



**Figura 22.** Rectas patrón para concentraciones decrecientes de cDNA (100, 10, 1, 0,1 y 0,01 ng/μl) para cada uno de los genes. Se adjuntan las ecuaciones de las rectas de regresión lineal y el coeficiente de correlación (R²).

Las rectas de expresión de los genes problema fueron comparadas con las de los genes de referencia (*IL4R* vs *GAPDH* y *TBP* e *IL5RA* vs *GAPDH* y *TBP*) mediante la elaboración de una nueva recta de regresión lineal cuyos puntos son la diferencia entre los valores de expresión de los genes problema con los de referencia, y el cálculo del coeficiente de determinación (R²) de esa nueva recta.

$$eficiencia = (10^{-1/pendiente} - 1) \times 100$$

$$R^2 = \frac{\sum_{t=1}^T (\hat{Y}_t - \bar{Y})^2}{\sum_{t=1}^T (Y_t - \bar{Y})^2}$$

Los resultados de eficiencia y los coeficientes de determinación de *IL5RA* frente a ambos genes de referencia se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Cálculos de eficiencia y coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

|              | <i>Eficiencia (%)</i> |
|--------------|-----------------------|
| <i>IL5RA</i> | 83,11                 |
| <i>IL4R</i>  | 83,77                 |
| <i>GAPDH</i> | 101,84                |
| <i>TBP</i>   | 97,06                 |

|                              | $R^2$ |
|------------------------------|-------|
| <i>IL5RA</i> vs <i>GAPDH</i> | 0,68  |
| <i>IL5RA</i> vs <i>TBP</i>   | 0,65  |
| <i>IL4R</i> vs <i>GAPDH</i>  | 0,62  |
| <i>IL4R</i> vs <i>TBP</i>    | 0,63  |

Los coeficientes de determinación de *IL5RA* frente a los genes de referencia son superiores a 0,5. Se consideró que los genes de estudio (*IL5RA* y *TBP*) tenían una eficiencia similar y, por lo tanto, se validaron para los ensayos de qPCR y se pudo utilizar el método  $\Delta\Delta Ct$ .

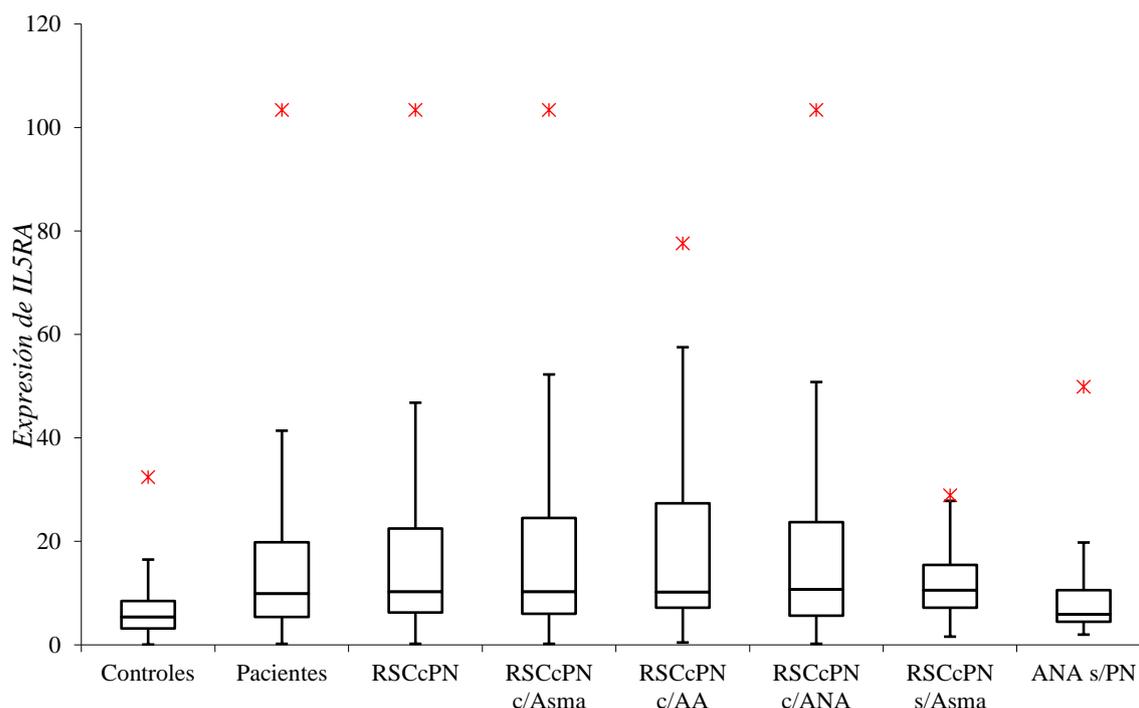
## **2.2. Expresión de *IL4R* e *IL5RA* en sangre periférica**

La cuantificación de la expresión de los genes se realizó por medio de los valores de Ct (*Cycle Threshold*) para cada curva. El Ct corresponde al punto de la curva de amplificación en el que ésta comienza a ser exponencial, y que es, a su vez, la intersección entre la curva de amplificación y la *threshold line* o línea umbral. Como cada muestra se analizó por triplicado para cada gen, se obtuvo el valor medio y la desviación estándar de los 3 resultados de Ct. Como criterio de validez de los resultados del ensayo se estableció un límite máximo de 0,35 de desviación estándar como aceptación. Los Ct obtenidos se encontraron siempre por debajo del límite de detección superior del equipo de 40 ciclos que, según la recta patrón calculada para *GAPDH*, corresponde a una concentración de  $1,98e-5$  ng. Los resultados de expresión relativa y de las pruebas de contraste se exponen en la tabla 14. La figura 23 muestra una representación, en diagramas de caja, de las expresiones de *IL5RA* en los grandes grupos.

- Estadística de contraste

|                           | IL4RA / GAPDH |                |            | IL4RA / TBP |                |            | IL5R / GAPDH |                |            | IL5R / TBP |                |            |          |
|---------------------------|---------------|----------------|------------|-------------|----------------|------------|--------------|----------------|------------|------------|----------------|------------|----------|
|                           | <i>n</i>      | <i>Mediana</i> | <i>RIQ</i> | <i>p</i>    | <i>Mediana</i> | <i>RIQ</i> | <i>p</i>     | <i>Mediana</i> | <i>RIQ</i> | <i>p</i>   | <i>Mediana</i> | <i>RIQ</i> | <i>p</i> |
| <b>Controles</b>          | 102           | 1,9            | 1,36       | -           | 0,651          | 0,442      | -            | 5,42           | 5,33       | -          | 1,68           | 2,22       | -        |
| <b>Pacientes</b>          | 154           | 1,82           | 1,25       | 0,951       | 0,639          | 0,393      | 0,787        | 9,9            | 14,4       | <0,001     | 3,48           | 4,81       | <0,001   |
| <b>RSCcPN</b>             | 121           | 1,75           | 1,22       | 0,461       | 0,64           | 0,419      | 0,737        | 10,3           | 16,2       | <0,001     | 4,12           | 6,55       | <0,001   |
| <b>RSCcPN c/Atopia</b>    | 49            | 1,65           | 0,902      | 0,188       | 0,658          | 0,381      | 0,887        | 10,1           | 11,3       | <0,001     | 4,73           | 5,9        | <0,001   |
| <b>RSCcPN s/Atopia</b>    | 72            | 1,82           | 1,23       | 0,961       | 0,615          | 0,441      | 0,702        | 11,4           | 17,5       | <0,001     | 3,88           | 4,97       | <0,001   |
| <b>RSCcPN c/Asma</b>      | 87            | 1,79           | 1,21       | 0,685       | 0,62           | 0,396      | 0,955        | 10,3           | 18,5       | <0,001     | 4,12           | 6,55       | <0,001   |
| <b>RSCcPN c/AA</b>        | 38            | 1,74           | 1,04       | 0,318       | 0,633          | 0,389      | 0,803        | 10,2           | 20,1       | <0,001     | 4,92           | 7,49       | <0,001   |
| <b>RSCcPN c/ANA</b>       | 49            | 1,84           | 1,14       | 0,803       | 0,62           | 0,369      | 0,894        | 10,7           | 18,1       | <0,001     | 3,49           | 5,59       | <0,001   |
| <b>RSCcPN s/Asma</b>      | 34            | 1,63           | 1,25       | 0,331       | 0,71           | 0,529      | 0,363        | 10,6           | 8,26       | <0,001     | 4,15           | 3,34       | <0,001   |
| <b>Asma</b>               | 120           | 1,87           | 1,21       | 0,734       | 0,628          | 0,365      | 0,951        | 9,65           | 16,9       | <0,001     | 3,31           | 5,98       | <0,001   |
| <b>ANA</b>                | 82            | 2,03           | 1,18       | 0,296       | 0,628          | 0,362      | 0,945        | 8,19           | 16,1       | <0,001     | 2,92           | 4,96       | <0,001   |
| <b>ANA s/PN</b>           | 33            | 2,13           | 1,66       | 0,111       | 0,639          | 0,283      | 0,97         | 5,86           | 6,14       | 0,088      | 2,15           | 2,04       | 0,36     |
| <b>EREA</b>               | 26            | 1,81           | 1,35       | 0,881       | 0,615          | 0,404      | 0,939        | 11,4           | 13,1       | <0,001     | 4,04           | 5,42       | <0,001   |
| <b>Atopia</b>             | 49            | 1,65           | 0,902      | 0,191       | 0,658          | 0,381      | 0,896        | 10,1           | 11,3       | <0,001     | 4,73           | 5,9        | <0,001   |
| <b>Polisensibilizados</b> | 24            | 1,65           | 0,995      | 0,142       | 0,674          | 0,346      | 0,898        | 9,72           | 13,8       | <0,001     | 3,97           | 5,08       | <0,001   |
| <b>Monosensibilizados</b> | 25            | 1,61           | 1,25       | 0,57        | 0,648          | 0,451      | 0,735        | 10,1           | 10,2       | <0,001     | 4,97           | 4,55       | <0,001   |
| <b>Ácaros</b>             | 25            | 1,65           | 1,24       | 0,226       | 0,62           | 0,401      | 0,45         | 10,2           | 11,1       | <0,001     | 4,88           | 3,62       | <0,001   |
| <b>Polen</b>              | 37            | 1,65           | 0,881      | 0,275       | 0,701          | 0,36       | 0,266        | 9,26           | 12,1       | <0,001     | 4,73           | 5,9        | <0,001   |
| <b>Epitelios</b>          | 19            | 1,65           | 0,961      | 0,065       | 0,592          | 0,292      | 0,517        | 11,8           | 20,8       | <0,001     | 4,95           | 8,08       | <0,001   |
| <b>Hongos</b>             | 7             | 1,29           | 1,1        | 0,241       | 0,452          | 0,244      | 0,232        | 11,8           | 22,1       | 0,011      | 3,82           | 9,42       | 0,125    |

**Tabla 14.** Resultados de los estudios de contraste de la expresión de *IL4RA* e *IL5RA*. Test de Kruskal-Wallis (p). Los cálculos se realizaron mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta Ct$ . Todos los procedimientos siguieron las recomendaciones de la guía MIQE. n=número de casos; RIQ=Rango intercuartílico.



|                     | Controles | Pacientes | RSCcPN | RSCcPN c/Asma | RSCcPN c/AA | RSCcPN c/ANA | RSCcPN s/Asma | ANA s/PN |
|---------------------|-----------|-----------|--------|---------------|-------------|--------------|---------------|----------|
| Mínimo              | 0,07      | 0,21      | 0,21   | 0,21          | 0,46        | 0,21         | 1,59          | 1,98     |
| Q <sub>1</sub>      | 3,18      | 5,4175    | 6,29   | 6,02          | 7,205       | 5,63         | 7,17          | 4,44     |
| Mediana             | 5,42      | 9,9       | 10,26  | 10,26         | 10,215      | 10,73        | 10,6          | 5,86     |
| Q <sub>3</sub>      | 8,505     | 19,81     | 22,5   | 24,52         | 27,335      | 23,7         | 15,435        | 10,58    |
| Máximo              | 32,45     | 103,37    | 103,37 | 103,37        | 77,62       | 103,37       | 28,91         | 49,87    |
| RIQ                 | 5,325     | 14,3925   | 16,21  | 18,5          | 20,13       | 18,07        | 8,265         | 6,14     |
| Outliers superiores | 9         | 9         | 7      | 5             | 2           | 2            | 1             | 4        |
| Outliers inferiores | 0         | 0         | 0      | 0             | 0           | 0            | 0             | 0        |

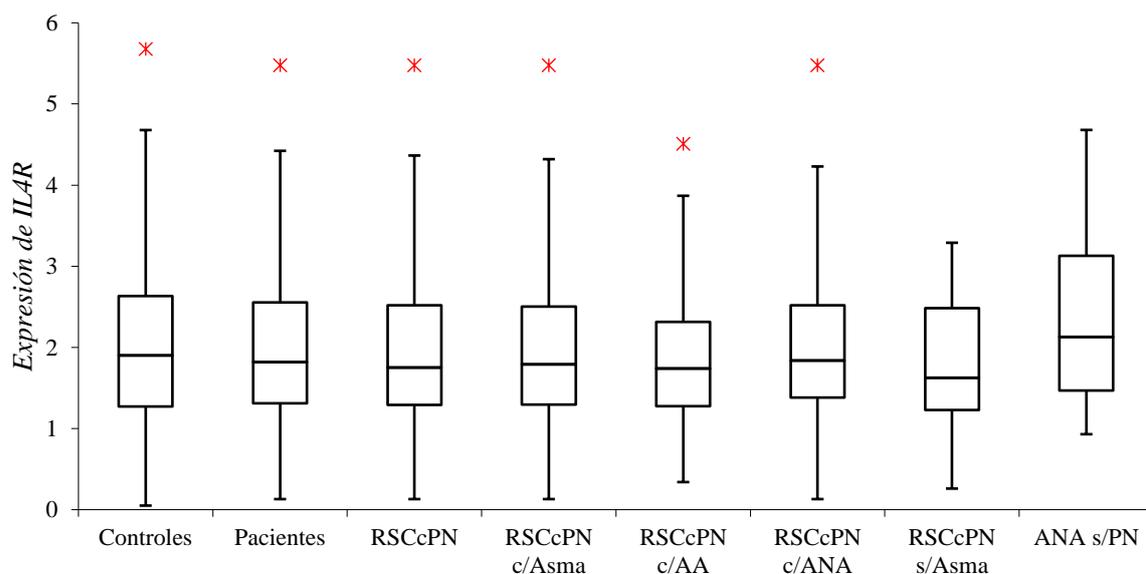
**Figura 23.** Representación en diagramas de caja de los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica. Niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica, frente a *GAPDH* (eje de ordenadas). *Outliers*: valores extremos o atípicos.

En casi todos los grupos clínicos de pacientes y respecto al grupo control se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de *IL5RA* ( $p < 0.001$ ). El único grupo que no alcanzó la significación fue el de asma no alérgica sin PN (ANA s/PN).

Se observó una expresión relativa de *IL5RA* similar, tanto con *GAPDH* como con *TBP* como genes de referencia. Por lo que a partir de ahora se considerarán únicamente los valores de expresión de *IL5RA* relativos frente a *GAPDH*, debido a su amplia

aceptación en la literatura científica y en trabajos de investigación similares. La mediana de expresión de *IL5RA* de la muestra global de pacientes fue de  $9,9 \pm 14,4$  (mediana  $\pm$  RIQ), frente a la mediana del grupo control, que fue de  $5,42 \pm 5,33$ . Los grupos con una mayor mediana de expresión fueron el de RSCcPN s/Atopia ( $11,4 \pm 17,5$ ), y el de la EREA ( $11,4 \pm 13,1$ ).

En cuanto a la expresión de *IL4RA*, no se hallaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de pacientes y controles, en ninguno de los grupos clínicos. Debido a este hecho el estudio se centró en el análisis de los niveles de expresión de *IL5RA*. En la figura 24 se muestran los diagramas de caja de las expresiones de *IL4R* en los principales grupos clínicos.



|                     | Controles | Pacientes | RSCcPN | RSCcPN c/Asma | RSCcPN c/AA | RSCcPN c/ANA | RSCcPN s/Asma | ANA s/PN |
|---------------------|-----------|-----------|--------|---------------|-------------|--------------|---------------|----------|
| Mínimo              | 0,05      | 0,13      | 0,13   | 0,13          | 0,34        | 0,13         | 0,26          | 0,93     |
| Q <sub>1</sub>      | 1,2725    | 1,31      | 1,29   | 1,295         | 1,275       | 1,38         | 1,2275        | 1,47     |
| Mediana             | 1,9       | 1,82      | 1,75   | 1,79          | 1,74        | 1,84         | 1,625         | 2,13     |
| Q <sub>3</sub>      | 2,635     | 2,555     | 2,52   | 2,505         | 2,3125      | 2,52         | 2,4825        | 3,13     |
| Máximo              | 5,68      | 5,48      | 5,48   | 5,48          | 4,51        | 5,48         | 3,29          | 4,68     |
| RIQ                 | 1,3625    | 1,245     | 1,23   | 1,21          | 1,0375      | 1,14         | 1,255         | 1,66     |
| Outliers superiores | 4         | 3         | 2      | 2             | 1           | 1            | 0             | 0        |
| Outliers inferiores | 0         | 0         | 0      | 0             | 0           | 0            | 0             | 0        |

**Figura 24.** Representación en diagramas de caja de los niveles de expresión de *IL4R* en sangre periférica. Niveles de expresión de *IL4R* en sangre periférica, frente a *GAPDH* (eje de ordenadas). *Outliers*: valores extremos o atípicos.

- ***IL5RA* y sensibilización alérgica**

Se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de *IL5RA* en el grupo de pacientes con poliposis atópica (n=49, con pruebas cutáneas positivas) con respecto al grupo de controles (p<0,001), con una mediana de 10,1±11,3 en los pacientes atópicos.

Los pacientes atópicos con pruebas cutáneas positivas a dos o más grupos de aeroalérgenos (pacientes que se consideraron polisensibilizados) presentaron un aumento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de *IL5RA* con respecto al grupo control (p<0,001), La expresión mediana de *IL5RA* fue de 9,72±13,8.

Los pacientes atópicos con pruebas cutáneas positivas a un solo grupo de aeroalérgenos (pacientes que se consideraron monosensibilizados) presentaron un incremento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de *IL5RA* con respecto al grupo control (p<0,001). La mediana de la expresión de *IL5RA* fue de 10,1±10,2. La diferencia de niveles de expresión entre el grupo atópico y el no atópico no resultó estadísticamente significativa (p=0,155).

En cuanto a la sensibilización a grupos de aeroalérgenos concretos, los pacientes atópicos con pruebas cutáneas positivas a los ácaros, el polen, los epitelios y los hongos, presentaron también un aumento significativo de los niveles de expresión de *IL5RA* con respecto al grupo control (p<0,001, p=0,011 para hongos), siendo la mediana de la expresión de *IL5RA* de 10,2±11,1, 9,26±12,1, 11,8±20,8 y de 11,8±22,1, respectivamente.

- ***IL5RA* y RSCcPN**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de *IL5RA* en el grupo RSCcPN (n=121) con respecto al grupo de controles (p<0,001), con una mediana de 10,3±16,2 en los pacientes con poliposis nasal, frente a 5,42±5,33 en los controles.

Tanto el grupo de pacientes con RSCcPN c/Atopia como el de pacientes con RSCcPN s/Atopia presentaron un incremento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de *IL5RA* (10,1±11,3 y 11,4±17,5, respectivamente) con respecto al grupo control (p<0,001).

En los grupos de poliposis con y sin asma asociada (RSCcPN c/Asma y RSCcPN s/Asma) se observaron también diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *IL5RA* con respecto al grupo control ( $p < 0,001$ ). Las medianas de expresión fueron de  $10,3 \pm 18,5$  y  $10,6 \pm 8,26$ , respectivamente. No se hallaron diferencias significativas entre los niveles de expresión en RSCcPN c/Asma y en RSCcPN s/Asma ( $p = 0,329$ ).

Además, se encontró también un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) entre los niveles de expresión de *IL5RA* de los grupos RSCcPN c/AA y RSCcPN c/ANA con respecto a los controles. Las medianas de la expresión fueron de  $10,2 \pm 20,1$  y  $10,7 \pm 18,1$ , respectivamente. No se hallaron tampoco diferencias significativas entre los niveles de expresión en RSCcPN c/AA y en RSCcPN s/ANA ( $p = 0,411$ ).

- ***IL5RA* y asma**

Se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de *IL5RA* en el grupo de pacientes asmáticos ( $n = 120$ ) con respecto al grupo de controles ( $p < 0,001$ ), con una mediana de  $9,65 \pm 16,9$  en los pacientes con asma, frente a  $5,42 \pm 5,33$  en los controles. Cabe señalar, que en este grupo de pacientes asmáticos incluía tanto pacientes con poliposis nasal como sin poliposis nasal asociada.

Dentro del grupo de pacientes con asma, se seleccionó un grupo con asma no alérgica (ANA,  $n = 82$ ). El grupo de ANA también presentó una elevación estadísticamente significativa de los niveles de expresión de *IL5RA* ( $p < 0,001$ ), con una mediana de  $8,19 \pm 16,1$ . Sin embargo, en el subgrupo de pacientes con ANA, pero sin poliposis nasal (ANA s/PN), la elevación de los niveles de expresión no llegó a alcanzar significación ( $p = 0,088$ ), con una mediana de  $5,86 \pm 6,14$ . En cuanto a la diferencia entre los grupos de CRSwNP c/ANA y ANA s/PN, no llegó a ser significativa, pero se obtuvo un valor  $p$  bajo ( $p = 0,081$ ).

- ***IL5RA* y Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Ácido acetilsalicílico (EREA)**

Los niveles de expresión de *IL5RA* en el grupo de pacientes con EREA (n=26), estaban elevados de forma estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ) respecto al grupo control, con una mediana de  $11,4\pm 13,1$ , frente a  $5,42\pm 5,33$  en los controles.

- ***IL5RA* y corticoterapia**

Se evaluó la influencia de la corticoterapia en los resultados de expresión. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de *IL5RA* entre los pacientes en tratamiento corticoideo y aquellos sin él ( $p=0,239$ ). Tampoco se obtuvo una diferencia significativa entre pacientes tratado con corticoides sistémicos y tópicos ( $p=0,541$ ).

- **Estudio de las correlaciones de la expresión de *IL5RA* con los niveles de eosinófilos y de IgE total**

Se observó una correlación positiva de los niveles de expresión de *IL5RA* ( $p<0,001$ ) con la concentración de eosinófilos en sangre periférica. También se observó una correlación positiva de los niveles de expresión de *IL5RA* ( $p<0,001$ ) con la concentración de IgE en sangre periférica. Los coeficientes de correlación (Pearson, r) se presentan en la tabla 15.

En la tabla 16 se muestran las correlaciones (Pearson, r) de la expresión de *IL5RA* frente a las distintas líneas celulares, observándose una correlación positiva significativa con eosinófilos, basófilos y con la suma de ambos.

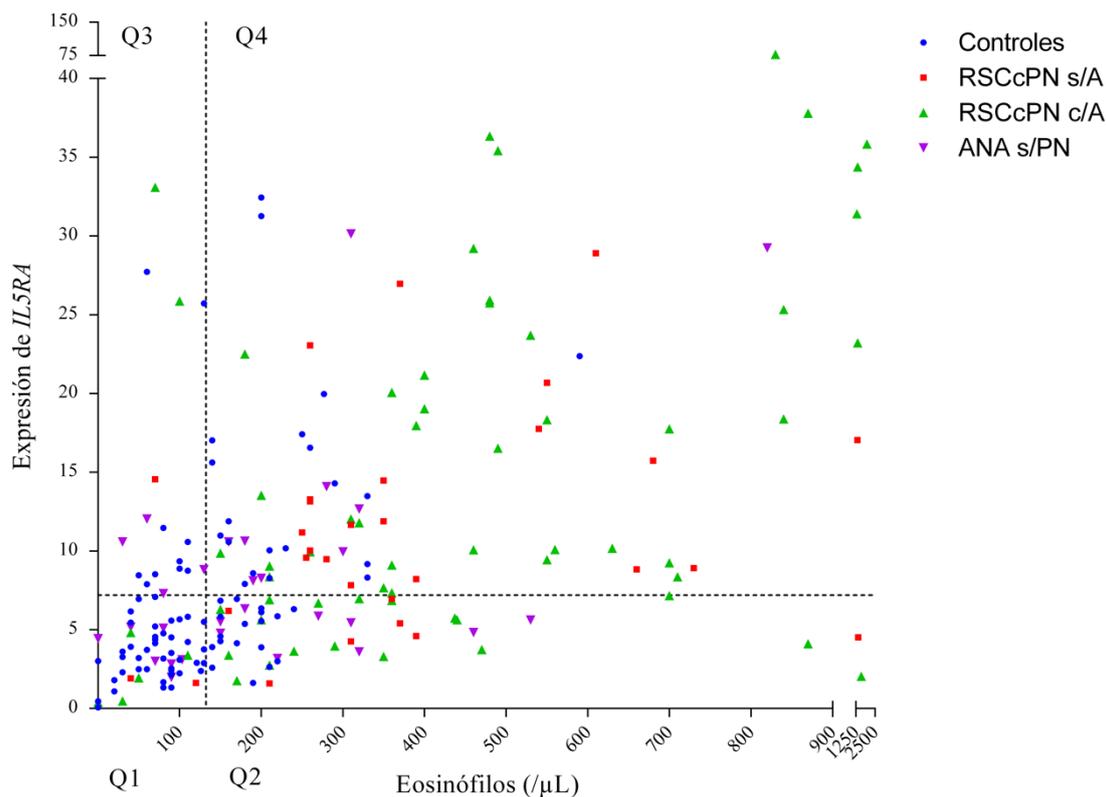
**Tabla 15.** Correlaciones por grupos. Niveles de expresión de *IL5RA* frente a niveles séricos de IgE y recuento de eosinófilos en sangre periférica. Correlación (Pearson, r). Se destaca en negrita las correlaciones significativas.

|                           | <i>n</i> | <i>IL5RA e IgE</i>       | <i>IL5RA y EOS</i>       |
|---------------------------|----------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Controles</b>          | 102      | -0,1 (p=0,339)           | <b>0,46 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>Pacientes</b>          | 154      | <b>0,28 (p&lt;0,001)</b> | <b>0,49 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>RSCcPN</b>             | 121      | <b>0,26 (p=0,007)</b>    | <b>0,47 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>RSCcPN c/Atopia</b>    | 49       | <b>0,38 (p=0,011)</b>    | <b>0,54 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>RSCcPN s/Atopia</b>    | 72       | 0,21 (p=0,092)           | <b>0,44 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>RSCcPN c/Asma</b>      | 87       | <b>0,27 (p=0,017)</b>    | <b>0,49 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>RSCcPN c/AA</b>        | 38       | <b>0,36 (p=0,036)</b>    | <b>0,52 (p=0,002)</b>    |
| <b>RSCcPN c/ANA</b>       | 49       | 0,21 (p=0,182)           | <b>0,48 (p=0,002)</b>    |
| <b>RSCcPN s/Asma</b>      | 34       | -0,01 (p=0,952)          | 0,18 (p=0,333)           |
| <b>Asma</b>               | 120      | <b>0,28 (p=0,003)</b>    | <b>0,53 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>ANA</b>                | 82       | <b>0,25 (p=0,032)</b>    | <b>0,52 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>ANA s/PN</b>           | 33       | 0,31 (p=0,085)           | <b>0,48 (p=0,007)</b>    |
| <b>EREA</b>               | 26       | <b>0,67 (p&lt;0,001)</b> | 0,31 (p=0,165)           |
| <b>Atopia</b>             | 49       | <b>0,38 (p=0,011)</b>    | <b>0,54 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>Polisensibilizados</b> | 24       | <b>0,6 (p=0,013)</b>     | <b>0,75 (p=0,001)</b>    |
| <b>Monosensibilizados</b> | 25       | 0,1 (p=0,67)             | <b>0,57 (p=0,008)</b>    |
| <b>Ácaros</b>             | 25       | 0,29 (p=0,174)           | 0,26 (p=0,227)           |
| <b>Polen</b>              | 37       | <b>0,44 (p=0,008)</b>    | <b>0,68 (p&lt;0,001)</b> |
| <b>Epitelios</b>          | 19       | <b>0,56 (p=0,02)</b>     | 0,55 (p=0,021)           |
| <b>Hongos</b>             | 7        | <b>-0,94 (p=0,002)</b>   | <b>0,87 (p=0,01)</b>     |

**Tabla 16.** Correlaciones entre niveles de expresión de *IL5RA* y recuento de células sanguíneas (células/ $\mu$ l)

|                    |   | <b>Correlaciones</b>  |             |            |           |             |           |         |
|--------------------|---|-----------------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|---------|
|                    |   | Leucocitos<br>totales | Neutrófilos | Linfocitos | Monocitos | Eosinófilos | Basófilos | Eos+Bas |
| <i>IL5RA</i>       | r | 0,017                 | -0,115      | 0,096      | 0,008     | 0,55        | 0,343     | 0,557   |
| (vs <i>GAPDH</i> ) | p | 0,801                 | 0,082       | 0,147      | 0,903     | <0,001      | <0,001    | <0,001  |

En la distribución de niveles de expresión de *IL5RA* frente al recuento de eosinófilos en sangre periférica (figura 24), se puede observar, además de una gran dispersión de la nube de puntos, la presencia de valores atípicos, de casos con nivel de eosinófilos bajo en sangre, pero con elevada expresión de *IL5RA* (y al revés).



**Figura 24.** Diagrama de dispersión de las expresiones de *IL5RA* y el recuento de eosinófilos (EOS) en sangre periférica (células/ $\mu\text{L}$ ). Los cálculos se realizaron mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta\text{C}$ . Todos los procedimientos siguieron las recomendaciones de la guía MIQE. Q1: cuadrante 1 (EOS  $\leq$  132,43; IL5RA  $\leq$  7,2); Q2: cuadrante 2 (EOS  $>$  132,43; IL5RA  $\leq$  7,2); Q3: cuadrante 3 (EOS  $\leq$  132,43; IL5RA  $>$  7,2); Q4: cuadrante 4 (EOS  $>$  132,43; IL5RA  $>$  7,2). Los puntos de corte corresponden a los valores medios en controles de ambas variables. RSCcPN: rinosinusitis crónica con poliposis nasal; A: asma; ANA: asma no alérgica.

### 2.3. Expresión de *IL5RA* en muestras de tejido

Se analizaron 39 muestras de tejido de pacientes del estudio, 36 muestras de tejido polipoideo de pacientes con RSCcPN y 3 muestras de tejido nasal de la zona del cornete inferior de individuos sin rinitis ni poliposis nasal.

- **Estadística de contraste**

**Tabla 17.** Resultados de los estudios de contraste de la expresión *IL5RA*.

| a)   | <i>IL5RA GAPDH</i> |                |            |          |
|--|--------------------|----------------|------------|----------|
|  | <i>n</i>           | <i>Mediana</i> | <i>RIQ</i> | <i>p</i> |
| <b>Controles</b>                               | 3                  | 11,7           | 15,6       | -        |
| <b>Pacientes (RSCcPN)</b>                      | 36                 | 13,6           | 16,7       | 0,599    |
| <b>RSCcPN c/Atopia</b>                         | 18                 | 11,7           | 17,9       | 0,412    |
| <b>RSCcPN s/Atopia</b>                         | 18                 | 15,8           | 15,1       | 0,894    |
| <b>RSCcPN c/Asma</b>                           | 18                 | 11,8           | 16,5       | 0,468    |
| <b>RSCcPN c/AA</b>                             | 10                 | 9,63           | 7,44       | 0,2      |
| <b>RSCcPN c/ANA</b>                            | 8                  | 17,1           | 15,0       | 0,919    |
| <b>RSCcPN s/Asma</b>                           | 18                 | 14,4           | 16,3       | 0,813    |
| <b>EREA</b>                                    | 7                  | 13,4           | 20,4       | 0,824    |
| b)   |                    |                |            |          |
| <b>RSCcPN c/Atopia</b>                         | 18                 | 11,7           | 17,9       | 0,309    |
| <b>RSCcPN s/Atopia</b>                         | 18                 | 15,8           | 15,1       |          |
| <b>RSCcPN c/AA</b>                             | 10                 | 9,63           | 7,44       | 0,057    |
| <b>RSCcPN c/ANA</b>                            | 8                  | 17,1           | 15,0       |          |
| <b>RSCcPN c/Asma</b>                           | 18                 | 11,8           | 16,5       | 0,547    |
| <b>RSCcPN s/Asma</b>                           | 18                 | 14,4           | 16,3       |          |
| c)   |                    |                |            |          |
| <b>Grado I</b>                                 | 6                  | 13,40          | 7,80       | 0,155    |
| <b>Grado II</b>                                | 17                 | 19,20          | 22,70      |          |
| <b>Grado III</b>                               | 11                 | 10,90          | 13,20      |          |
| <b>Polipectomía previa</b>                     | 15                 | 16,7           | 16,7       | 0,307    |
| <b>Sin polipectomía previa</b>                 | 20                 | 12,6           | 11,7       |          |
| <b>Cirugía de senos paranasales previa</b>     | 11                 | 25             | 16,7       | 0,303    |
| <b>Sin cirugía de senos paranasales previa</b> | 24                 | 13,1           | 11,7       |          |
| <b>Hábito tabáquico</b>                        | 9                  | 12,4           | 4,54       | 0,581    |
| <b>Sin hábito tabáquico</b>                    | 27                 | 14,9           | 17         |          |

Test de Kruskal-Wallis (p). Los cálculos se realizaron mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta Ct$ . Todos los procedimientos siguieron las recomendaciones de la guía MIQE. n=número de casos; Median=mediana; RIQ=Rango intercuartílico. a. Estadística de contraste comparando los niveles de expresión en tejido entre los grandes grupos clínicos y los controles. b. Estadística de contraste comparando los niveles de expresión entre pares de grupos. c. Igual que el anterior, pero teniendo en cuenta variables clínicas y factores concomitantes de la PN.

En el estudio de contraste de expresión de *IL5RA* en tejido polipoideo (tabla 17), no se encontraron diferencias significativas ni en la comparación de los grupos clínicos con los controles (n=3) ni entre grupos clínicos entre sí (atópicos vs no atópicos, AA vs ANA o RSCcPN con asma vs RSCcPN sin asma). Esto puede ser debido probablemente al tamaño muestral del grupo control. Sin embargo, en la mayoría de las comparaciones, los niveles de expresión de *IL5RA*, son mayores en los pacientes que en los controles.

- ***IL5RA* y grados de poliposis**

El estudio estadístico de contraste de la expresión de *IL5RA* entre los tres grados de la clasificación Lildholdt para la RSCcPN no obtuvo diferencias significativas. La mediana de expresión en el grado I fue de  $13,4 \pm 7,8$ , en el grado II  $19,2 \pm 22,7$  y en el grado III  $10,9 \pm 13,2$ .

- ***IL5RA* según manifestaciones clínicas de la poliposis**

Se analizó también la diferencia de expresión según variables clínicas asociadas a la poliposis, como son la gradación de Lildholdt, los antecedentes de cirugía endoscópica previa o el hábito tabáquico. Se comparó la expresión de *IL5RA* en función de la presencia o ausencia de estas características. No se hallaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones.

- **Correlación entre la expresión de *IL5RA* en sangre periférica y en tejido**

Se estudió la posible correlación entre los niveles de expresión de *IL5RA* en tejido con los niveles de expresión en las mismas muestras en sangre periférica, así como con el recuento de eosinófilos en sangre periférica, sin obtenerse resultados significativos ( $p=0,184$  y  $p=0,619$ , respectivamente).

- **Estudio de casos individuales**

En la tabla 18 se exponen casos atípicos (*outliers*) encontrados en el análisis comparativo de expresiones entre sangre periférica y tejido, en donde la expresión relativa de una no se corresponde con la del otro.

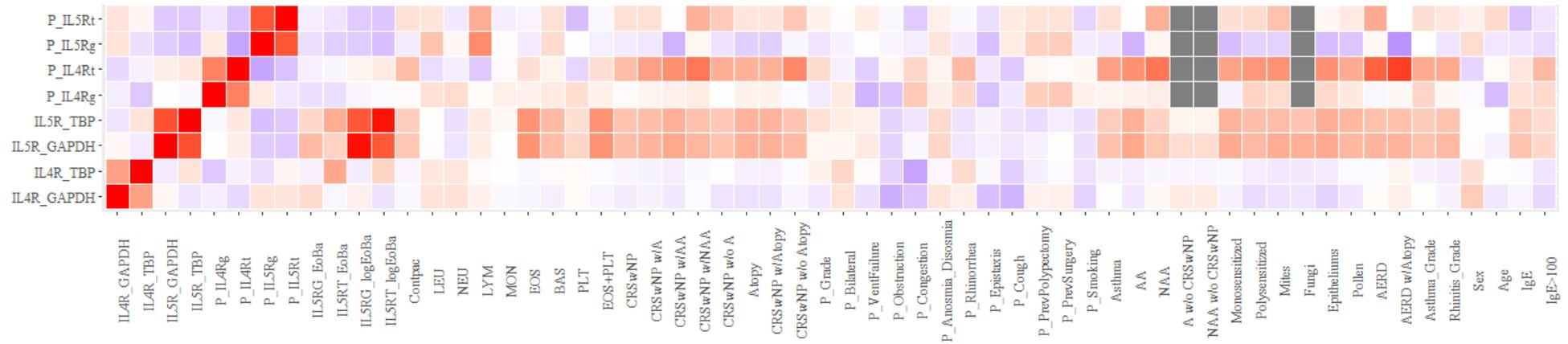
**Tabla 18.** Exposición de casos individuales del estudio de expresión sangre vs tejido

| <i>Muestra</i> | <i>IL5RA</i> | <i>P_IL5RA</i> | <i>PC</i> | <i>Grado</i> | <i>Polipectomía<br/>previa</i> | <i>Cirugía<br/>previa</i> | <i>Tabaco</i> | <i>Observaciones</i>                          |
|----------------|--------------|----------------|-----------|--------------|--------------------------------|---------------------------|---------------|---|
| <b>E5 63</b>   | 10,03        | 40,32          | Neg       | 2            | Si                             | No                        | Si            | Exfumador 4 farías/día. Papiloma escamoso     |
| <b>E5 03</b>   | 10,26        | 35,3           | Pos       | 2            | No                             | No                        | No            |   |
| <b>E4 51</b>   | 14,47        | 33,94          | Pos       | 2            | No                             | No                        | Si            |   |
| <b>E4 73</b>   | 5,41         | 30,98          | Neg       | 2            | No                             | No                        | No            |   |
| <b>E5 04</b>   | 4,12         | 29,21          | Pos       | 2            | Si                             | Si                        | No            | Mucho edema, mucho moco muy espeso. Cirugías. |

*IL5RA*, niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica (frente a *GAPDH*). *P\_IL5RA*, niveles de expresión de *IL5RA* en tejido polipoideo (frente a *GAPDH*).

A la vista de la tabla, los cinco primeros casos corresponden a individuos con unos niveles de expresión más o menos elevados en sangre periférica, que no se corresponden con la gran elevación que presentan en el tejido polipoideo. La diferencia de condiciones clínicas de la poliposis nasal que presentan estos individuos no es concluyente, habría que estudiar cada caso en concreto en más profundidad con el fin de hallar un patrón de comportamiento común.

Se elaboró una matriz de correlaciones (figura 25) con todas las variables del estudio. Las variables cualitativas fueron expresadas en términos binarios, como variables *dummy* o ficticias (0=ausencia de la condición; 1=presencia de la condición). Se añadieron las variables correspondientes de la normalización de las expresiones de *IL5RA*, tanto frente a *GAPDH* como a *TBP*, con la suma de las concentraciones de eosinófilos más basófilos, así como los logaritmos de estas sumas. El objetivo fue minimizar la influencia de las concentraciones de eosinófilos y basófilos en sangre periférica (células donde se expresa en mayor medida el gen *IL5RA*) a la hora de estudiar el aumento de expresión de dicho gen en los distintos grupos de pacientes. La correlación de la expresión normalizada con el logaritmo de la concentración de eosinófilos más basófilos se mantiene con respecto a la expresión del gen sin normalizar, como se puede comprobar por el código de colores de la matriz. Sin embargo, se pierde en algunos grupos clínicos al dividir la expresión entre la concentración en bruto.



**Figura 25.** Matriz colorimétrica de correlaciones. Se representa en color azul la correlación negativa, y en rojo la positiva. La intensidad del color se corresponde con el grado de correlación (coeficientes de correlación (Pearson) más próximos a -1 y 1). Un color blanco denota coeficientes de correlación cercanos a 0. IL4RA/IL5R\_GAPDH/TBP: expresión de *IL4RA* o *IL5RA* utilizando *GAPDH* o *TBP* como gen constitutivo. Contpac: control=0, paciente=1. LEU: concentración de leucocitos en sangre periférica. NEU: neutrófilos. LYM: linfocitos. MON: monocitos. EOS: eosinófilos. BAS: basófilos. PLT: plaquetas. P\_: variables referentes al tejido polipoideo. P\_Grade: grado de poliposis nasal, según la escala de Lildholdt. P\_Bilateral: pólipos nasales unilaterales=0, bilaterales=1. VentFailure: insuficiencia ventilatoria. PrevPolypectomy: polipectomía previa. PrevSurgery: cirugía de senos para nasales previa. Smoking: sin tabaquismo asociado=0, con tabaquismo asociado=1. . CRSwNP: RSCcPN. NAA: ANA. AERD: EREA. Asthma\_Grade: grado de asma. Rhinitis\_Grade: grado de rinitis. IgE: concentración de IgE en kU/L. IgE>100: concentración de IgE mayor de 100 kU/L.

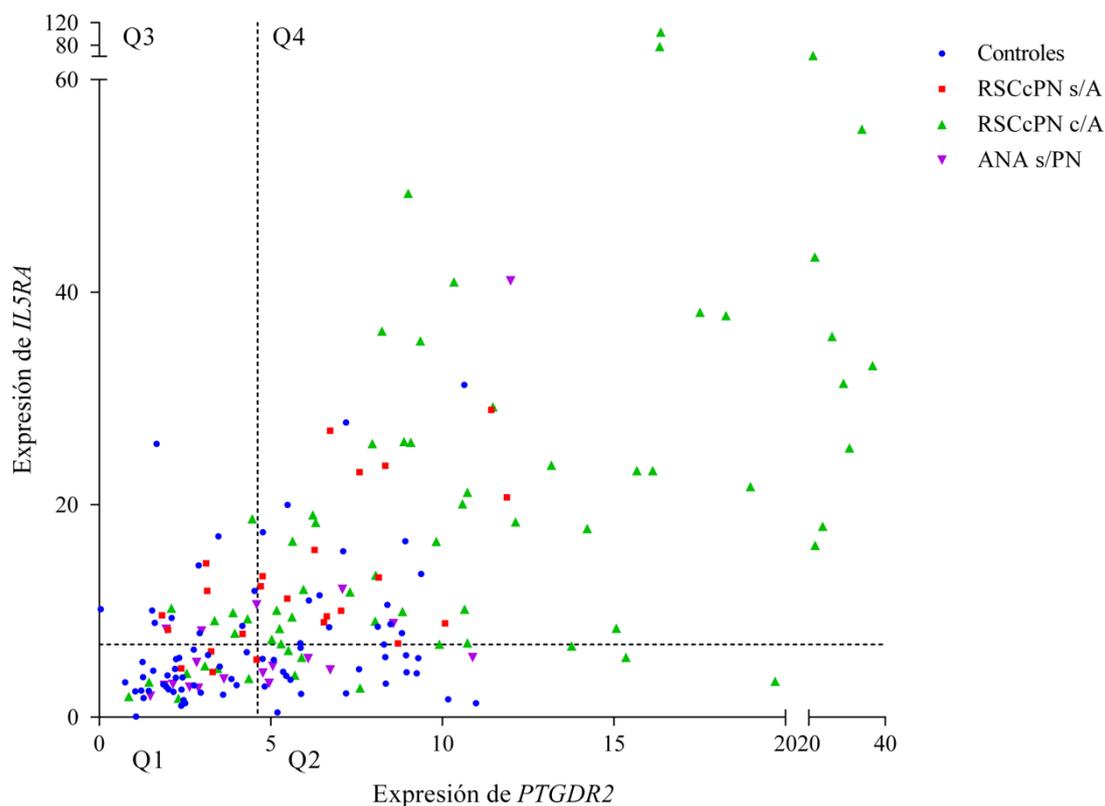
Las expresiones de *IL5RA* presentan correlaciones positivas con la mayor parte de grupos clínicos, siendo menor en el grupo de asma no alérgica sin poliposis nasal (ANA s/PN). No se observó correlación entre los niveles de expresión del gen y el sexo o la edad. Se observa también una correlación positiva entre la expresión de *IL4R* normalizada con *TBP* en tejido y los distintos grupos clínicos.

#### **2.4. Co-expresión de *IL5RA* y *PTGDR2***

Se compararon los resultados de expresión de *IL5RA* obtenidos en el estudio con los niveles de expresión de *PTGDR2* recogidos de estudios previos del grupo de investigación<sup>173</sup>, ya que se ha determinado experimentalmente un incremento significativo de la expresión de este gen en poliposis nasal. De esta forma, se determinó el potencial de la utilización de ambos biomarcadores de forma conjunta en la caracterización de las patologías objeto de estudio. La expresión de ambos genes fue determinada por qPCR.

De los sujetos analizados en nuestro estudio, a 188 se le había estudiado la expresión de *PTGDR2*, de los cuales 77 eran controles y 111, pacientes. De estos 111 pacientes, 92 presentaban RSCcPN y 19 asma no alérgica (ANA) sin poliposis asociada. Se realizaron estudios de correlación y contraste y los resultados fueron categorizados en 4 cuadrantes (Q1 a Q4) según los niveles de expresión de *IL5RA* y *PTGDR2* (por encima o por debajo de los niveles medios de expresión en el grupo control).

En la tabla 19 se detallan los datos de expresión de *IL5RA* y *PTGDR2* por grupos, así como el número de casos y los niveles de eosinófilos en sangre periférica, divididos por los cuadrantes presentados en la figura 26. También se presentan los datos de correlación entre la expresión de los genes y los eosinófilos.



**Figura 26.** Diagrama de dispersión de las expresiones de *IL5RA* y *PTGDR2*. Los cálculos se realizaron mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta C$ . Todos los procedimientos siguieron las recomendaciones de la guía MIQE. Q1: cuadrante 1 ( $PTGDR2 \leq 4,62$ ;  $IL5RA \leq 6,85$ ); Q2: cuadrante 2 ( $PTGDR2 > 4,62$ ;  $IL5RA \leq 6,85$ ); Q3: cuadrante 3 ( $PTGDR2 \leq 4,62$ ;  $IL5RA > 6,85$ ); Q4: cuadrante 4 ( $PTGDR2 > 4,62$ ;  $IL5RA > 6,85$ ). RSCcPN: rinosinusitis crónica con poliposis nasal; A: asma; ANA: asma no alérgica.

El coeficiente de correlación (Pearson,  $r$ ) entre los niveles de expresión de *IL5RA* y *PTGDR2* fue de 0.6 ( $p < 0,001$ ). La correlación fue significativa en todos los grupos de pacientes. También fue significativa la correlación de ambos genes con el recuento de eosinófilos, salvo en el grupo de RSCcPN s/Asma. Se observó una clara diferencia entre la distribución de controles y pacientes entre Q1 (bajos niveles de expresión de ambos genes) y Q4 (altos niveles) (42% vs. 19% para los controles y 17% vs. 59% en pacientes). La mayor parte de los pacientes con RSCcPN s/Asma presentaron niveles altos de *IL5RA*, pero no de *PTGDR2*. Los pacientes asmáticos presentaron altos niveles de expresión de ambos genes y se distribuyeron de forma similar en Q2, Q3 y Q4.

**Tabla 19.** Características fenotípicas de los cuatro cuadrantes

| Q1 (PTGDR2≤4,62; IL5RA≤6,85) |     |                   |                  |               |               |             |            |
|------------------------------|-----|-------------------|------------------|---------------|---------------|-------------|------------|
|                              | n   | n (%)             | Sex <sup>†</sup> | Age, y        | EO            | IL5RA       | PTGDR2     |
| <b>Controles</b>             | 32  | 41,56             | 65,63            | 59,16±17,35   | 96,03±66,92   | 3,37±1,55   | 2,28±0,91  |
| <b>Pacientes</b>             | 19  | 17,12             | 57,89            | 54,53±16,66   | 298,41±352,73 | 3,77±1,24   | 2,73±0,95  |
| <b>RSCcPN</b>                | 12  | 13,04             | 41,67            | 57,33±19,1    | 396,36±405,05 | 4,1±1,29    | 2,85±1,07  |
| <b>RSCcPN s/A</b>            | 5   | 20                | 0                | 64±14,98      | 528±501,22    | 4,99±0,8    | 3,24±0,85  |
| <b>RSCcPN c/A</b>            | 7   | 10,45             | 71,43            | 52,57±21,34   | 286,67±308,85 | 3,46±1,21   | 2,58±1,19  |
| <b>ANA s/PN</b>              | 7   | 36,84             | 85,71            | 49,71±10,1    | 118,83±100,98 | 3,19±0,99   | 2,5±0,71   |
| Q2 (PTGDR2>4,62; IL5RA≤6,85) |     |                   |                  |               |               |             |            |
|                              | n   | n (%)             | Sex <sup>†</sup> | Age, y        | EO            | IL5RA       | PTGDR2     |
| <b>Controles</b>             | 20  | 25,97             | 60               | 62,45±14,76   | 110±44,22     | 3,99±1,79   | 7,27±1,98  |
| <b>Pacientes</b>             | 13  | 11,71             | 38,46            | 50,69±19,72   | 226,67±143,68 | 4,77±1,24   | 8,62±4,81  |
| <b>RSCcPN</b>                | 7   | 7,61              | 14,29            | 58,43±21,11   | 238,57±108,69 | 4,91±1,53   | 10,5±5,72  |
| <b>RSCcPN s/A</b>            | 0   | 0                 | n/a              | n/a           | n/a           | n/a         | n/a        |
| <b>RSCcPN c/A</b>            | 7   | 10,45             | 14,29            | 58,43±21,11   | 238,57±108,69 | 4,91±1,53   | 10,5±5,72  |
| <b>ANA s/PN</b>              | 6   | 31,58             | 66,67            | 41,67±14,73   | 210±196,09    | 4,61±0,91   | 6,41±2,32  |
| Q3 (PTGDR2≤4,62; IL5RA>6,85) |     |                   |                  |               |               |             |            |
|                              | n   | n (%)             | Sex <sup>†</sup> | Age, y        | EO            | IL5RA       | PTGDR2     |
| <b>Controles</b>             | 10  | 12,99             | 80               | 60,7±15,29    | 173±60,01     | 12,39±5,48  | 2,5±1,37   |
| <b>Pacientes</b>             | 14  | 12,61             | 42,86            | 54,5±14,5     | 298,64±172,14 | 10,29±3,02  | 3,28±0,99  |
| <b>RSCcPN</b>                | 11  | 11,96             | 36,36            | 48,64±9,51    | 358,13±157,8  | 10,64±3,29  | 3,31±0,96  |
| <b>RSCcPN s/A</b>            | 5   | 20                | 40               | 46,2±11,12    | 331±51,04     | 10,4±2,78   | 2,86±0,97  |
| <b>RSCcPN c/A</b>            | 6   | 8,96              | 33,33            | 50,67±8,43    | 403,33±277,55 | 10,85±3,92  | 3,68±0,87  |
| <b>ANA s/PN</b>              | 3   | 15,79             | 66,67            | 76±5,57       | 140±95,39     | 8,99±1,38   | 3,18±1,33  |
| Q4 (PTGDR2>4,62; IL5RA>6,85) |     |                   |                  |               |               |             |            |
|                              | n   | n (%)             | Sex <sup>†</sup> | Age, y        | EO            | IL5RA       | PTGDR2     |
| <b>Controles</b>             | 15  | 19,48             | 86,67            | 52,33±20,89   | 149,8±93,51   | 14,38±7,29  | 7,49±1,64  |
| <b>Pacientes</b>             | 65  | 58,56             | 49,23            | 53,33±17,85   | 564,43±361,84 | 23,25±17,55 | 12±7,33    |
| <b>RSCcPN</b>                | 62  | 67,39             | 46,77            | 53,87±17,89   | 583,45±359,44 | 23,37±17,68 | 12,13±7,47 |
| <b>RSCcPN s/A</b>            | 15  | 60                | 40               | 51,13±21,36   | 425,38±189,5  | 15,54±7,21  | 7,62±2,19  |
| <b>RSCcPN c/A</b>            | 47  | 70,15             | 48,94            | 54,76±16,78   | 629,11±384,79 | 25,87±19,29 | 13,57±7,99 |
| <b>ANA s/PN</b>              | 3   | 15,79             | 100              | 42,33±15,5    | 196,67±179,54 | 20,64±17,76 | 9,22±2,51  |
| Correlaciones (Pearson, r)   |     |                   |                  |               |               |             |            |
|                              | n   | IL5RAvs<br>PTGDR2 | IL5RAvsEO        | PTGDR2vsEO    | EO            | IL5RA       | PTGDR2     |
| <b>Total</b>                 | 188 | 0,6 (p<0,05)      | 0,58 (p<0,05)    | 0,58 (p<0,05) | 309,65±316,1  | 12,32±13,68 | 7,16±6,13  |
| <b>Controles</b>             | 77  | 0,26 (p<0,05)     | 0,44 (p<0,05)    | 0,12 (p=0,3)  | 120,59±72,17  | 6,85±6,13   | 4,62±2,9   |
| <b>Pacientes</b>             | 111 | 0,58 (p<0,05)     | 0,51 (p<0,05)    | 0,52 (p<0,05) | 450,57±352,27 | 16,11±16,02 | 8,92±7,1   |
| <b>RSCcPN</b>                | 92  | 0,55 (p<0,05)     | 0,47 (p<0,05)    | 0,48 (p<0,05) | 508,75±354,07 | 17,93±16,61 | 9,74±7,42  |
| <b>RSCcPN s/A</b>            | 25  | 0,6 (p<0,05)      | -0,05 (p=0,83)   | 0,09 (p=0,68) | 427,17±264,86 | 12,4±7,08   | 5,79±2,88  |
| <b>RSCcPN c/A</b>            | 67  | 0,52 (p<0,05)     | 0,51 (p<0,05)    | 0,5 (p<0,05)  | 539,51±379,72 | 19,99±18,61 | 11,22±8,04 |
| <b>ANA s/PN</b>              | 19  | 0,64 (p<0,05)     | 0,38 (p=0,13)    | 0,56 (p<0,05) | 163,12±140,35 | 7,31±8,66   | 4,9±3,03   |

**Tabla 19.** Características fenotípicas de los cuatro cuadrantes obtenidos al categorizar según las expresiones medias de *IL5RA* y *PTGDR2* en el grupo control. Número de casos, porcentaje. Resultados expresados en media±SD. †Sexo femenino (%). Contaje de eosinófilos en sangre periférica (EO) expresado en células/μl. Coeficientes de correlación (Pearson) entre los genes y con el contaje de eosinófilos (EO). RSCcPN: rinosinusitis crónica con poliposis nasal; A: asma; ANA: asma no alérgica.

En las pruebas de contraste (tabla 20), los niveles de *IL5RA* fueron significativamente más elevados ( $p < 0,001$ ) en el grupo de RSCcPN s/Asma, mientras que no sucedió así con los de *PTGDR2* ( $p = 0,072$ ), siendo las medianas de  $10,6 \pm 6,67$  y  $5,88 \pm 4,43$ , respectivamente, frente a  $4,77 \pm 5,69$  y  $4 \pm 4,9$  en los controles. En la comparación del grupo de asma no alérgica sin poliposis (ANA s/PN) frente al grupo de los controles, la diferencia de expresión de ambos genes no fue significativa ( $p = 0,871$  para *IL5RA* y  $p = 0,67$  para *PTGDR2*). En el resto de los grupos (RSCcPN y RSCcPN c/Asma), la elevación de la expresión de ambos genes sí resultó significativa ( $p < 0,001$ ).

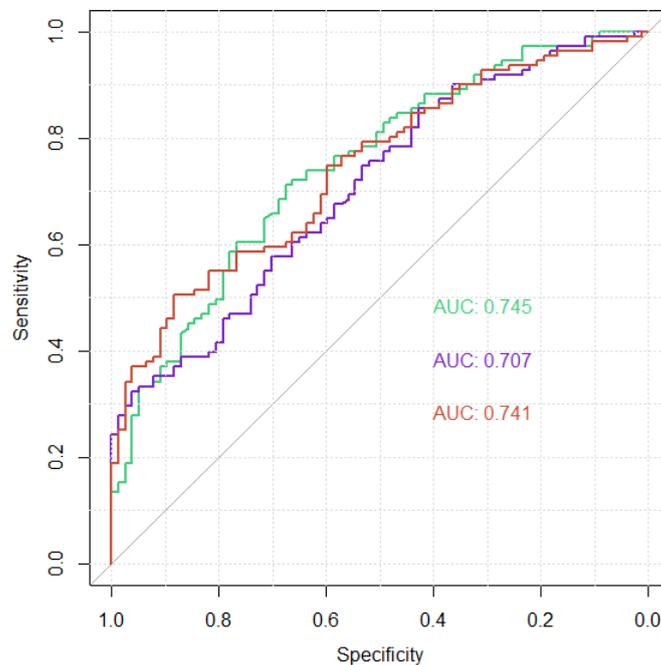
En el estudio de contraste del grupo de pacientes con RSCcPN s/Asma frente a RSCcPN c/Asma, la elevación de la expresión de *PTGDR2* resultó estadísticamente significativa ( $p = 0,001$ ), mientras que la de *IL5RA* no lo fue ( $p = 0,17$ ).

**Tabla 20.** Resultados de los estudios de contraste de la expresión de *IL5RA* y *PTGDR2*.

|                      | <i>IL5RA GAPDH</i> |                |            |          | <i>PTGDR2 GAPDH</i> |            |          |
|----------------------|--------------------|----------------|------------|----------|---------------------|------------|----------|
|                      | <i>n</i>           | <i>Mediana</i> | <i>RIQ</i> | <i>p</i> | <i>Mediana</i>      | <i>RIQ</i> | <i>p</i> |
| <b>Controles</b>     | 77                 | 4,77           | 5,69       | <0,001   | 4                   | 4,9        | <0,001   |
| <b>Pacientes</b>     | 111                | 10             | 15,8       |          | 6,73                | 6,56       |          |
| <b>Controles</b>     | 77                 | 4,77           | 5,69       | <0,001   | 4                   | 4,9        | <0,001   |
| <b>RSCcPN</b>        | 92                 | 12             | 16,1       |          | 7,78                | 7,26       |          |
| <b>Controles</b>     | 77                 | 4,77           | 5,69       | <0,001   | 4                   | 4,9        | 0,072    |
| <b>RSCcPN s/Asma</b> | 25                 | 10,6           | 6,67       |          | 5,88                | 4,43       |          |
| <b>Controles</b>     | 77                 | 4,77           | 5,69       | <0,001   | 4,00                | 4,9        | <0,001   |
| <b>RSCcPN c/Asma</b> | 67                 | 16,2           | 18,7       |          | 9                   | 10,1       |          |
| <b>RSCcPN s/Asma</b> | 25                 | 10,6           | 6,67       | 0,17     | 5,88                | 4,43       | 0,001    |
| <b>RSCcPN c/Asma</b> | 67                 | 16,2           | 18,7       |          | 9                   | 10,1       |          |
| <b>Controles</b>     | 77                 | 4,77           | 5,69       | 0,871    | 4                   | 4,9        | 0,67     |
| <b>ANA s/PN</b>      | 19                 | 4,78           | 5,05       |          | 4,59                | 3,67       |          |

Diferencias de expresión entre pares de grupos. Test de Kruskal-Wallis (*p*). Los cálculos se realizaron mediante el método comparativo de  $\Delta\Delta Ct$ . Todos los procedimientos siguieron las recomendaciones de la guía MIQE. *n*=número de casos; Median=mediana; RIQ=Rango intercuartílico.

El rendimiento de ambos biomarcadores fue estudiado mediante curvas ROC, estableciendo los valores de los puntos de corte (*cut-offs*) óptimos mediante el estadístico J de Youden. Para *IL5RA*, el mejor punto de corte coincidió con la media de expresión en los controles (6,85; sensibilidad (SE)=0,71, especificidad (ES)=0,68). Para *PTGDR2* fue superior a la expresión media (9,6; SE=0,32, ES=0,96). Sin embargo, el estadístico de Youden fue algo menor, pero similar, con un punto de corte de 4.31 (SE=0,75, ES=0,53), que puede ser más interesante en términos de maximizar la sensibilidad, y se aproxima más a la expresión media en el grupo control. Mediante un modelo de regresión logística binaria se generó una nueva variable de probabilidad predictiva, en la que se consideró la combinación de ambos biomarcadores. Para la generación de la nueva variable, se consideró la interacción entre ambos biomarcadores, pero fue descartada por pérdida de significancia. El uso de ambos biomarcadores no mejora el AUC, dado el modelo de regresión ( $0,741 \pm 0,035$ ).



**Figura 27.** Representación de curvas ROC para *IL5RA* (verde), *PTGDR2* (violeta) y la combinación de ambas (rojo). El área bajo la curva (AUC) más alta corresponde a *IL5RA* ( $0,745 \pm 0,037$ ).



# DISCUSIÓN



## DISCVSIÓN

En el presente estudio se ha analizado si la determinación de la expresión de *IL5RA* en sangre periférica puede constituir un buen marcador para el diagnóstico de una enfermedad que, en nuestro ámbito, es fundamentalmente eosinofílica, como es la RSCcPN. En el mismo se ha encontrado queUn biomarcador es un indicador mensurable de una enfermedad, de su gravedad o de la respuesta al tratamiento<sup>184</sup>. Se han descrito varios requisitos que debe de cumplir un biomarcador ideal<sup>185</sup>: debe de estar presente en niveles estables en los individuos sin enfermedad; debe de tener valores diferentes en los pacientes y en los sujetos sin enfermedad; debe de reflejar mecanismos fisiopatológicos subyacentes o tratables; debe de ser fácil de determinar, fiable, repetible y barato y, por último, debe de tener valores adecuados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN)

Los motivos para seleccionar la expresión de *IL5RA* en sangre periférica han sido diversos, siempre con la intención de ajustarse a los requisitos antedichos.

En primer lugar, la fácil accesibilidad a la muestra, la comodidad y el prácticamente nulo riesgo que supone para el paciente que supone emplear la sangre periférica. Claramente, supera a otras muestras de obtención más complejas, como el esputo inducido en el caso del asma o la biopsia en el caso de la RSCcPN.

En segundo lugar, en lo que concierne a la facilidad de determinar, si bien no es tan sencilla ni está tan automatizada como la determinación de eosinófilos en sangre periférica, hoy en día las técnicas de expresión de RNA se han simplificado notablemente.<sup>186</sup> En tercer lugar, el biomarcador elegido se adapta claramente al hecho de reflejar mecanismos etiopatogénicos de la RSCcPN. En este sentido, como se ha indicado, en nuestro medio esta enfermedad cursa con eosinofilia tisular y en sangre periférica. Además, la IL5 es una citocina esencial en la producción, maduración, migración y activación de los eosinófilos<sup>6</sup>. Por ende, se dispone de un tratamiento monoclonal específicamente dirigido con IL-5R $\alpha$ , el benralizumab, por lo que la determinación

de la expresión de este receptor puede tener implicaciones en la respuesta terapéutica a este compuesto biológico.

## 1. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

En el presente estudio se ha reunido una muestra importante de pacientes y controles. En el caso de los pacientes, se han incluido paciente con RSCcPN, que podían presentar asma o no y se han agrupado también según fueran atópicos o no, a fin de evaluar si este aspecto podía originar diferencias en la expresión de *IL5RA*. La mayor parte de los pacientes con RSCcPN presentaba asma (71,90%); esta cifra es algo superior a la que suele observarse en estos pacientes (48-56%)<sup>188</sup>, pero probablemente guarde relación con el hecho de que nuestro centro es un centro terciario, que recoge pacientes con mayor gravedad. En cuanto a los pacientes con asma, el porcentaje de pacientes con RSCcPN fue del 72,5%, frente a un 30-45%<sup>189,190</sup>. No obstante, este hecho se debe a que el interés fundamental de este estudio se centra en la RSCcPN. También cabe destacar que se obtuvo una muestra de pacientes con RSCcPN sin asma (n=43) y de asma sin RSCcPN (n=33) con la finalidad de evaluar la influencia de cada entidad en los niveles de expresión de *IL5RA*. Finalmente, el porcentaje de pacientes con EREA fue del 21,66% de los asmáticos, en consonancia con los datos de otras series<sup>191</sup>.

En lo relativo a los pacientes, obviamente, tanto los niveles de eosinofilia como de IgE en SP fueron más elevados que en los controles. Este dato es lógico y corrobora la adecuada selección de los controles, en los cuales se descartó mediante pruebas cutáneas la existencia de atopía, hecho que no suele ser habitual en este tipo de estudios, pues las poblaciones control con frecuencia se obtienen de bancos de muestras, donde no suele existir esta caracterización. Por otra parte, también se descartó la existencia de antecedentes familiares de atopía, de asma y de RSCcPN. Esto supone un valor añadido importante de esta muestra, que podemos calificar como de supercontroles hipernormales para las entidades nosológicas del estudio. Este hecho resulta crucial a la hora de establecer los valores de normalidad para la expresión de *IL5RA*.

Los niveles de IgE total resultaron más elevados en los pacientes con atopia respecto a los individuos no atópicos y a los controles. Este hecho está ampliamente descrito en la literatura y lo hemos descrito también en estudios de nuestro grupo. Una mención especial merecen los niveles de eosinófilos en SP. Como se ha comentado, fueron más elevados en todos los grupos que en los controles. Si bien la asociación de las distintas enfermedades (RSCcPN, asma y atopia) tendió a presentar niveles más elevados de eosinofilia. En el caso de la RSCcPN y sin asma los niveles fueron los menos elevados, lo que probablemente refleje el grado de inflamación. Niveles de  $(p=0,02)$ . Estos aspectos guardan relación con los niveles de expresión de *IL5RA* y se comentará más adelante.

## 2. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN

### 2.1. Estudio de expresión de *IL4R*

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *IL4R* entre los pacientes y los controles. En este sentido, se descartó un posible error en el diseño de los oligonucleótidos utilizados, revisando las condiciones de hibridación y el posible solapamiento con otras regiones del genoma; el resultado fue que todo había sido correcto. El receptor IL-4R es importante en las enfermedades T2, y su bloqueo evita la transmisión de señales de la IL-4 y de la IL-13 por lo que está implicado en enfermedades como el asma o la RSCcPN<sup>192</sup>. Por otra parte, se han descrito asociaciones de polimorfismos de *IL4R* en pacientes asmáticos<sup>193</sup> y elevación de expresión de *IL4R* en células B, apoyado por estudios transcriptómicos de RNA-seq<sup>194</sup>. Los resultados de expresión del actual estudio no parecen arrojar luz sobre una posible diferencia significativa de expresión de *IL4R* en la RSCcPN, con o sin presencia de asma, habiéndose obtenido una mayor diferencia de expresión en el caso de *IL5RA*, y en este caso, significativa, como se comentará más adelante. La posible diferencia puede radicar en la selección de la población celular, pudiendo estar la expresión de *IL4R* más limitada a un tipo celular concreto y que sea muy baja en sangre periférica. La IL-4 se caracteriza por ejecutar funciones

específicas en tipos celulares concretos a través de STAT6. En este sentido, el complejo IL-4/IL-4R $\alpha$  se dimeriza con un receptor secundario (IL-2R $\gamma$ c o IL-13R $\alpha$ 1), cuya expresión varía en función del tipo celular, e influye de forma directa en la transmisión de señales de esta citocina<sup>208</sup>.

## **2.2. Expresión de *IL5RA* en sangre periférica**

A diferencia de la expresión de *IL4R* en sangre periférica, la expresión de *IL5RA* en pacientes con RSCcPN presentó diferencias significativas respecto a los controles. En general, los niveles medianos fueron prácticamente el doble en el caso de los pacientes con RSCcPN que los centrales. Este dato es relevante, puesto que refleja la capacidad del biomarcador elegido para distinguir entre pacientes y controles, hecho relevante cuando se busca un biomarcador. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, en el ámbito clínico, la prueba que se realiza es la visualización de los pólipos nasales mediante rinoscopia anterior, endoscopia nasal o pruebas de imagen. No obstante, esta circunstancia no invalida en sí la capacidad como biomarcador de la expresión de *IL5RA* en sangre periférica.

Otro análisis importante es evaluar la capacidad del biomarcador en distintas situaciones clínicas, por ejemplo, entidades asociadas como el asma o la alergia respiratoria. En este sentido, se han analizado las diferencias en los niveles de expresión en pacientes con asma asociada y sin ella, y con atopia y sin ella y en la EREA. En líneas generales, las medianas de expresión fueron más elevadas en aquellos grupos que combinaban RSCcPN con asma y/o con atopia, si bien no se consiguió obtener diferencias estadísticamente significativas entre los principales grupos (ver Resultados 2.2. Expresión de *IL4RA* e *IL5RA* en sangre periférica)). No obstante, en el caso de los pacientes diagnosticados de asma no alérgica que no presentaban RSCcPN, los niveles fueron muy cercanos a los de los controles y la *p* no resultó significativa, si bien estuvo cercana a la misma respecto a los controles (*p*=0,088); este aspecto podría indicar que en este tipo de asma (muy probablemente un asma no T2), los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica podría ayudar a diferenciar entre asma T2 y no T2. No obstante, es preciso señalar que el tamaño muestral de este grupo fue el menor de todas, y pudiera ser que un incremento del tamaño

muestral diera lugar a una significación estadística, aunque los niveles son bastante cercanos a los de los controles.

Un aspecto importante es analizar cómo pueden contribuir las distintas entidades a los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica. En hecho de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión en pacientes RSCcPN con asma y sin asma, pero sí entre ambos grupos con los controles, sugiere que el peso de la diferencia de expresión en los pacientes con PN pueda no ser debida a la presencia de asma. No se hallaron tampoco diferencias significativas entre los niveles de expresión en RSCcPN c/AA y en RSCcPN s/ANA, lo que indica también que la presencia de alergia no parece actuar como un factor diferencial de la expresión. Hay que destacar también la diferencia en los niveles de expresión observada entre los pacientes con PN asociada a asma no alérgica (RSCcPN c/ANA) y aquellos con asma no alérgica sin poliposis nasal asociada (ANA s/PN). Esto podría reforzar el hecho de que la PN pudiera ser la responsable del aumento de expresión del gen *IL5RA*. Se obtuvo un valor *p* cercano a la significación ( $p=0.081$ ). Este dato juega a favor de un mayor peso de la PN en la diferencia de expresión, en comparación con el ANA.

Algunos estudios previos parecen indicar que el gen *IL5RA* podría tener una implicación en el desarrollo de la poliposis nasal en pacientes con ASA tríada o EREA<sup>195</sup>. La diferencia de expresión de *IL5RA* observada en estos pacientes respecto a los controles es significativa, pese a que el tamaño del grupo es pequeño (26 pacientes afectados de EREA).

El aumento de la expresión de *IL5RA* sigue patente a pesar de la distribución de la muestra a estudio en subgrupos con una *n* más pequeña, como pueden ser los correspondientes a los distintos tipos de aeroalérgenos (ácaros, polen, epitelios) o al número de aeroalérgenos a los que el paciente está sensibilizado (grupos mono- o polisensibilizados).

### **2.3. Expresión de *IL5RA* vs eosinofilia**

Una de las principales cuestiones que sugiere el estudio es que, partiendo de que el incremento en los niveles de expresión de *IL5RA* se ve acompañado en todas las situaciones de

un incremento en la concentración de eosinófilos en sangre periférica, que son las células sanguíneas donde predominantemente se expresa dicho gen, por lo que se puede plantear si los cambios de expresión en *IL5RA* puedan aportar información añadida a la identificación de los pacientes con RSCcPN y ser un biomarcador independiente de los eosinófilos. La determinación hematimétrica por citometría de flujo de la concentración de las principales líneas celulares sanguíneas es una práctica habitual del día a día en los laboratorios clínicos, con una metodología muy accesible y rápida y relativo bajo coste. ¿Cuál es el aporte extra de analizar la expresión de un gen por técnicas más complejas y menos accesibles, a priori?

Ciertamente, existe una correlación entre los niveles de eosinófilos y la expresión de *IL5RA*, ambos en sangre periférica. Sin embargo, esta correlación, aunque significativa, no resultó demasiado elevada. Puede darse el escenario de que el incremento de la expresión del gen no se deba exclusivamente al aumento del número total de eosinófilos, sino a una mayor ratio de expresión por eosinófilo, de ahí que se mantenga la significancia. Una forma de corroborar dicho escenario podría ser la realización de estudios de citometría de flujo utilizando el receptor de IL-5 como marcador, para verificar el verdadero aumento de actividad<sup>195</sup>.

Por otra parte, al comparar la expresión de *IL5RA* con el recuento de eosinófilos (tabla 15), se puede observar la presencia de algunos casos atípicos, que presentan una elevada expresión del gen a pesar de no tener eosinofilia. Es cierto que también ocurre el caso contrario, pacientes con altos niveles de eosinófilos y baja expresión de *IL5RA*, pero la presencia de estos valores extremos (*outliers*) apoya la independencia entre ambas variables, al menos en algunos pacientes, es decir, que no necesariamente deban estar correlacionadas en todos los casos. Este aspecto puede ser relevante porque se dispone de un fármaco, el benralizumab, dirigido específicamente frente a este receptor (ver más adelante). Sería muy estimulante suponer que los pacientes con mayor expresión de *IL5RA* en sangre periférica pudieran responder mejor a este fármaco. Esta es una línea que se está explorando en nuestro grupo. De hecho, nuestro grupo ha publicado recientemente un estudio que parece avalar la eficacia del benralizumab en función de los niveles de expresión de *IL5RA*, mejorando la FEV<sub>1</sub> y las puntuaciones en el test de control del asma

(ACT)<sup>124</sup>. Asimismo, los pacientes tratados veían asociada una depleción en el recuento de eosinófilos en sangre periférica (niveles post-tratamiento de 0 a 10 células/ $\mu$ l). En otro estudio reciente, por Nakajima y colaboradores<sup>139</sup>, se identificó un grupo de pacientes superrespondedores a benralizumab, que presentaron una reducción significativa de la expresión de *IL5RA* post-tratamiento (entre otros genes asociados a inflamación eosinofílica).

Cabe destacar también la falta de correlación entre la expresión de *IL5RA* y los eosinófilos en el grupo de RSCcPN sin asma (0,18,  $p=0,333$ ; tabla 15), cuando las diferencias de expresión entre este grupo y los controles sí que fueron significativas ( $p<0,001$ ; tabla 14). En cambio, en el grupo de ANA s/PN ocurre lo contrario: la correlación entre *IL5RA* y eosinófilos fue significativa (0,48,  $p=0,007$ ), mientras que la diferencia de expresión frente a controles no lo fue ( $p=0,088$ ). Esto apoyaría también la independencia entre ambos biomarcadores.

En la figura 24 de Resultados, podemos observar, en rasgos generales, que niveles elevados de eosinofilia se ven acompañados de niveles altos de expresión de *IL5RA*. Sin embargo, hay algunos puntos correspondientes a casos atípicos, como son los que presentan una expresión elevada, pero bajo recuento de eosinófilos, y otro en que, a pesar de tener un número elevado de eosinófilos, la expresión es similar al de los controles. Estos datos podrían ser interesantes a la hora de evaluar la respuesta al benralizumab, teniendo en cuenta los niveles pre y post-tratamiento de ambos biomarcadores, y ver cuáles son mejor respondedores.

Si tanto la eosinofilia como el aumento de expresión de *IL5RA* ocurren en pacientes con RSCcPN, pero si la ratio de expresión por eosinófilo aumenta, la eosinofilia se comportaría, de forma relativa, en comparación con la expresión del gen, como un incremento lineal, mientras que la expresión lo haría de forma exponencial (a mayor número de eosinófilos totales, se incrementaría exponencialmente la expresión de *IL5RA*).

La correlación entre *IL5RA* y los niveles de basófilos en sangre periférica es también significativa (tabla 16), ya que el gen también se expresa en basófilos y es lo que cabría esperar, a nivel fisiológico.

#### **2.4. Expresión de *IL5RA* en muestras de tejido**

En el análisis de muestras de tejido polipoideo de pacientes con RSCcPN frente a muestras de tejido nasal del cornete inferior de pacientes sin rinosinusitis ni patología polipoidea, se observó un aumento de expresión de *IL5RA* en el tejido polipoideo en algunos grupos de pacientes, pero se deben tener en consideración ciertas limitaciones.

La primera limitación que se debe considerar es el número de muestras de tejido nasal del cornete inferior de individuos sin patología polipoidea (n=3) y la selección de dichos controles. Las tres muestras de tejido sano no polipoideo fueron obtenidas de pacientes sometidos a una cirugía transesfenoidal programada, por una patología hipofisaria concreta, siendo, por lo tanto, de naturaleza histológica diferente al tejido polipoideo de los pacientes,

Las muestras de tejido nasal del cornete inferior se han descrito en otros estudios para comparar con el tejido polipoideo<sup>196</sup>. Se desconocía el grado de infiltración eosinofílica de las muestras de tejido, que podría influir directamente en la medición de la expresión de *IL5RA*. El análisis inmunohistoquímico de las distintas muestras, para valorar el grado de eosinofilia tisular, junto a la expresión génica, podrían haber generado resultados más concluyentes, pero no se contempló dentro del alcance de esta tesis.

La comparación entre los pacientes con poliposis nasal asociada al asma alérgica (RSCcPN c/AA) y con poliposis asociada a asma no alérgica (RSCcPN c/ANA), se aproximaron a alcanzar la significación estadística, siendo mayores los niveles de expresión en el grupo de RSCcPN c/ANA. De nuevo, es necesario indicar el limitado número de casos

Las muestras de tejido polipoideo pueden estar sesgadas por interferencias debidas a la mayor o menor presencia de irrigación en el pólipo, pudiendo aportar resultados falsamente elevados en caso de que la aportación de la concentración de eosinofilia tisular en la muestra a estudio sea mayor en un caso que en otro. Para mitigar estos posibles errores, sería interesante la realización paralela de estudios inmunohistoquímicos para evaluar el grado de infiltración eosinofílica de cada muestra antes de analizarla, así como poder evaluar de forma histológica el

marcaje de la subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-5<sup>197</sup>. La eosinofilia en tejido nasal en pacientes con RSCcPN con asma asociada ha sido descrita, así como la presencia de niveles elevados de IgE, en comparación con la RSCcPN sin asma, como cabría esperar de una respuesta inflamatoria excesiva tipo 2<sup>198</sup>.

En cuanto a las diferencias significativas entre la expresión de *IL4R* normalizada frente a *TBP*, no se pueden extraer conclusiones claras. La baja expresión de *IL4R* frente a *TBP* en los tres controles puede estar sesgada por el número de pacientes. O quizás sí pudiera ser representativa del tipo de muestra y no podamos considerar a *TBP* como gen constitutivo para muestras de tejido nasal, ya que, al contrario que con *TBP*, las diferencias de expresión de *IL4R* frente a *GAPDH* no fueron significativas.

## **2.5. Co-expresión de IL5RA y PTGDR2**

A partir de los resultados del estudio comparativo entre *IL5RA* y *PTGDR2*, la expresión tanto de un gen como del otro podrían jugar un papel clave como biomarcadores de la RSCcPN. Ambos se encuentran sobreexpresados en la poliposis nasal y los niveles están correlacionados con el aumento de eosinófilos en sangre periférica. En la figura 26 de Resultados, se observan niveles altos de expresión de *IL5RA* en pacientes con RSCcPN sin asma, pero los niveles de expresión de *PTGDR2* no se elevan por igual, presentando *IL5RA* una aparente asociación mayor con la PN más que con el asma. Sin embargo, muchos pacientes con ANA s/PN presentan niveles elevados de *PTGDR2*, pero no así de *IL5RA*, pudiendo sugerir una relación mayor de *PTGDR2* con el asma. La diferencia de patrones de co-expresión de ambos genes en RSCcPN con o sin asma asociada, y la independencia de los eosinófilos en el grupo de RSCcPN sin asma, podría ser interesante a la hora de categorizar a los pacientes, utilizando uno u otro biomarcador o el uso simultáneo de ambos.

Por otro lado, las diferencias de expresión de *IL5RA* siguen siendo significativas entre el grupo de RSCcPN s/Asma y los controles, pero no se observa una correlación entre la expresión

del gen y los eosinófilos, apoyando de nuevo la posibilidad de que ambos biomarcadores no tengan por qué estar siempre relacionados.

La combinación de ambas variables como método de cribado combinado, no aporta una mayor AUC que la utilización de la expresión de los dos genes por separado (figura 27). Se puede observar también en los resultados de expresión (tabla 20), que mientras *IL5RA* distingue mejor que *PTGDR2* a los pacientes con RSCcPN sin asma asociada de los controles, *PTGDR2* hace lo propio para diferenciar a los pacientes con RSCcPN con y sin asma asociada, debido a la menor expresión del gen en estos últimos pacientes. De aquí se podría derivar la idea de que *PTGDR2* es más dependiente del asma, como parecen indicar estudios transcriptómicos de RNA-seq<sup>173</sup>, mientras que *IL5RA* podría tener una mayor especificidad a la hora de distinguir la RSCcPN. Serían necesarios estudios en mayor profundidad, con un mayor número de pacientes en cada subgrupo, para poder llegar a una conclusión más clara.

### **3. PRESENTE Y FUTURO DE LA MEDICINA DE PRECISIÓN EN LA RSCcPN**

La medicina de precisión tiene como objetivo el manejo personalizado de cada paciente de la forma óptima, según el momento, las condiciones específicas y la presentación de su patología, así como de su estilo de vida, condiciones ambientales y perfil genético. Se conoce también por sus 4 P: Personalización del manejo clínico del paciente, Predicción de la evolución natural de la enfermedad, Prevención primaria, secundaria y terciaria y Participación y adherencia del paciente al plan terapéutico para obtener la mayor eficacia del tratamiento<sup>199</sup>.

La práctica de la medicina personalizada se ha aplicado los últimos años a una variedad de enfermedades respiratorias, entre las que se encuentran el asma o la alergia, y ahora comienza su empleo en el tratamiento de la rinosinusitis crónica<sup>200</sup>. La búsqueda de biomarcadores en RSC, como podrían ser los cambios de perfiles de expresión génica según el endotipo de la enfermedad, pueden ayudar a llevar a cabo este tratamiento más personalizado, acotando más los espectros de pacientes que se beneficiarían de cada tipo determinado de actitud terapéutica. El desarrollo en

los últimos años de terapias biológicas en el campo de la inmunología ofrece un nuevo abanico de posibilidades para el tratamiento de patologías como el asma o la RSCcPN.

El dupilumab se encuentra actualmente aprobado para el tratamiento de la RSCcPN<sup>201</sup>, siendo la primera terapia biológica aprobada para el tratamiento de adultos con control inadecuado de la RSCcPN, tanto en la Unión Europea como en los Estados Unidos. Un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ). Los resultados del presente estudio no han demostrado una diferencia de expresión significativa en los niveles de *IL4RA* entre pacientes y controles. Sin embargo, su utilidad en la reducción de la sintomatología, en la opacificación de senos paranasales, y la mejoría clínica y de scores de calidad de vida de los pacientes con RSCcPN han sido demostrados<sup>202</sup>, junto a la necesidad reducida de uso de corticosteroides y cirugía sinonasal. Otros fármacos biológicos que han estado recientemente en ensayo clínico para el tratamiento de la RSCcPN, como ya se mencionó anteriormente, son mepolizumab, omalizumab<sup>140</sup> y fevipirant.

El omalizumab ha demostrado seguridad y eficacia en el tratamiento de la RSCcPN después de 52 semanas de tratamiento<sup>203</sup>, mejorando las puntuaciones en calidad de vida (QoL), sugiriendo incluso un beneficio mayor conforme se prolonga el tratamiento (52 semanas frente a 24) y una menor necesidad de cirugía nasosinusal en el futuro. Se destaca su papel en casos refractarios a tratamiento corticoideo, así como aquellos pacientes con comorbilidad de asma grave.

Los resultados recientes del ensayo SYNAPSE con el mepolizumab<sup>204</sup> han resultado también esperanzadores para la calidad de vida de los pacientes con RSCcPN, en comparación con el placebo, siendo más eficaz en pacientes que asociaban asma o EREA, pero con una tendencia similar en aquellos individuos sin comorbilidades.

El caso del fevipirant ya se ha comentado previamente. A pesar de no haberse cumplido los objetivos establecidos, no se cierran las puertas a evaluar su eficacia en grupos de pacientes

más concretos, como puede ser el caso de la EREA, que todavía requiere de ensayos clínicos más dirigidos con fármacos biológicos.

El tratamiento con benralizumab parece tener una proyección futura en la RSCcPN, al igual que lo está teniendo en la actualidad con el asma<sup>205,206</sup>. A partir de los hallazgos en los últimos años de la efectividad del benralizumab en el tratamiento del asma y, teniendo en cuenta los factores inflamatorios compartidos entre el asma y la RSCcPN, así como de las características clínicas comunes en los individuos que padecen de dichas condiciones, con términos de comorbilidad incluidos, y que son muy frecuentes (poliposis nasal asociada a asma), la decisión de estudiar la posible sobreexpresión de *IL5RA* en pacientes con RSCcPN era lógica y necesaria. Es por ello por lo que se llevó a cabo este estudio.

El ensayo OSTRO con el benralizumab en pacientes con RSCcPN, ha demostrado seguridad y tolerabilidad, y mejoría clínica en términos de reducción de obstrucción nasal u olfato, en comparación con el placebo<sup>167</sup>. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en otros aspectos, como en el tiempo hasta la primera cirugía de PN o en la necesidad del uso de corticoides sistémicos.

En una revisión sistemática y metanálisis<sup>207</sup>, en la que se han comparado las eficacias de los distintos biológicos en la RSCcPN, el benralizumab ha sido beneficioso, pero no tanto como el mepolizumab o el omalizumab

La demostración de que *IL5RA* se encuentra sobreexpresado en la poliposis nasal puede aportar una base al tratamiento de la RSCcPN con nuevas terapias biológicas anti-IL-5R- $\alpha$ , cuya efectividad se ha estado valorando en los últimos años mediante ensayos clínicos concretos<sup>141,142</sup>, con resultados que demuestran la eficacia en términos de reducción de tamaño del pólipo, su ocupación de senos paranasales y la mejoría de síntomas y capacidad olfativa. El papel que puede jugar *IL5RA* como biomarcador y como diana terapéutica de la RSCcPN queda apoyado por los presentes resultados.

Serán necesarios más estudios en los próximos años que ayuden a identificar posibles rasgos genéticos individuales o complejos que determinen la susceptibilidad a la RSCcPN, la evolución de la enfermedad o la respuesta al tratamiento médico o quirúrgico<sup>16</sup>. De la misma forma, la evaluación de la eficacia de benralizumab debe estar planteada con subgrupos de pacientes bien diferenciados, en los que se tenga en cuenta la distinta respuesta que puedan tener individuos con o sin asma asociada, atópicos y no atópicos, con y sin hábitos tóxicos asociados, en un contexto o no de EREA y en función de la edad, la progresión de la enfermedad o la refractariedad a otros tratamientos. La naturaleza multifactorial de entidades como la RSCcPN no debe ser vista como un obstáculo y la solución no ha de ser necesariamente elusiva, ya que puede ser explotada mediante el estudio de modelos predictivos basados en *data-mining* y *machine learning*, integrando todos los posibles componentes y su interacción, así como su relación con la respuesta al tratamiento farmacológico.

Es necesario siempre estudiar cada caso y valorar la relación coste-efectividad, así como la seguridad a largo plazo del tratamiento con fármacos biológicos. De esta manera, la personalización del manejo clínico y la individualización de cada caso concreto nos permitirá obtener el tratamiento óptimo para cada paciente, en aras de una nueva era farmacogenética basada en la medicina de precisión.





# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** Los pacientes con poliposis nasal presentan niveles elevados de expresión del gen *IL5RA* en sangre periférica respecto a los controles, lo que apoya su uso como biomarcador para distinguir pacientes con poliposis nasal de aquellos que no la padecen.

**SEGUNDA.** La determinación de la expresión de *IL5RA* en sangre periférica es un método sencillo, reproducible, accesible, escasamente invasivo y de relativo bajo coste, lo que, unido al hecho de discriminar entre pacientes y controles y de reflejar mecanismos etiopatogénicos subyacentes en la poliposis nasal, hace que reúna las características adecuadas para ser un biomarcador.

**TERCERA.** La expresión de *IL5RA* en sangre periférica no discrimina entre distintos fenotipos de la enfermedad, salvo en el caso del asma no alérgica sin poliposis nasal. Sin embargo, se observa una población de pacientes con discordancia entre los niveles de expresión de *IL5RA* y los niveles de eosinófilos en sangre periférica, lo que, dentro de un contexto de medicina de precisión, podría aportar información adicional que permita seleccionar pacientes que de otro modo no podrían beneficiarse de un determinado tratamiento.

**CUARTA.** El estudio en muestras de tejido polipoideo requiere mayor complejidad, en cuanto al diseño experimental; además, en nuestra muestra no fue de utilidad para discriminar entre pacientes y controles, si bien en la mayoría de las comparaciones, los niveles de expresión de *IL5RA* resultaron superiores en los pacientes, lo que induce a pensar que puede ser un problema de tamaño muestral. No parece existir correlación con los niveles de expresión en sangre periférica, si bien se observan discrepancias notables en algunos pacientes, por lo que son necesarios más estudios en este sentido.

**QUINTA.** Se obtuvo una correlación significativa entre la expresión de *IL5RA* y otros posibles marcadores de la rinosinusitis crónica, como la expresión de *PTGDR2* o la eosinofilia en sangre periférica. Los pacientes con asma tendieron a presentar niveles más elevados de expresión de *PTGDR* que los pacientes con poliposis nasal. De nuevo, el estudio de los distintos patrones de expresión individual de los pacientes podría aportar información relevante a la hora de aplicar una terapéutica basada en la medicina de precisión.





# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

1. Tabberer M, Trigg A, Busse W, et al. Mepolizumab reduces disease symptoms for Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Data from the SYNAPSE study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021;147(2):AB126. doi:10.1016/j.jaci.2020.12.462
2. Muraro A, Fokkens WJ, Pietikainen S, et al. European Symposium on Precision Medicine in Allergy and Airways Diseases: Report of the European Union Parliament Symposium (October 14, 2015). *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;71(5):583-587. doi:10.1111/all.12819
3. Mayrhuber EAS, Peersman W, van de Kraats N, et al. "with fever it's the real flu i would say": Laypersons' perception of common cold and influenza and their differences - A qualitative study in Austria, Belgium and Croatia. *BMC Infectious Diseases*. 2018;18(1). doi:10.1186/s12879-018-3568-9
4. Zhang J, Chen J, Robinson C. Cellular and molecular events in the airway epithelium defining the interaction between house dust mite group 1 allergens and innate defences. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(11). doi:10.3390/ijms19113549
5. Schleimer RP. Immunopathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2017;12:331-357. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100401
6. Laidlaw TM, Buchheit KM. Biologics in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2020;124(4):326-332. doi:10.1016/j.anai.2019.12.001
7. McGarry G, Melia L. Nasal polyps: An update. In: *British Journal of Hospital Medicine*. Vol 70. MA Healthcare Ltd; 2009:500-504. doi:10.12968/hmed.2009.70.9.43865
8. Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, et al. Prevalence of nasal polyposis in France: A cross-sectional, case-control study. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;60(2):233-237. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00688.x
9. Fokkens WJ, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinology*. 2007;45(SUPPL. 20):1-136. doi:10.1055/b-0034-97635
10. Çekin E, Ipcioglu OM, Erkul BE, et al. The association of oxidative stress and nasal polyposis. *Journal of International Medical Research*. 2009;37(2):325-330. doi:10.1177/147323000903700206
11. Nasal polyposis: is there an inheritance pattern? A single family study - PubMed. Accessed January 26, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18575014/>
12. SEaic-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project - PubMed. Accessed January 26, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21714471/>
13. Muñoz del Castillo F, Jurado-Ramos A, et al. Allergenic profile of nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. Published online 2009:110-116. Accessed May 6, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19476014/>
14. Radenne F, Lamblin C, Vandezande LM, et al. Quality of life in nasal polyposis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999;104(1):79-84. doi:10.1016/S0091-6749(99)70117-X

15. Alobid I, Benítez P, Bernal-Sprekelsen M, et al. Nasal polyposis and its impact on quality of life: Comparison between the effects of medical and surgical treatments. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;60(4):452-458. doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00725.x
16. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*. 2020;58(Suppl S29):1-464. doi:10.4193/Rhin20.600
17. GLIKLICH R, METSON R. The health impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 1995;113(1). doi:10.1016/S0194-5998(95)70152-4
18. Stjärne P, Odebäck P, Ställberg B, Lundberg J, Olsson P. High costs and burden of illness in acute rhinosinusitis: Real-life treatment patterns and outcomes in Swedish primary care. *Primary Care Respiratory Journal*. 2012;21(2):174-179. doi:10.4104/pcrj.2012.00011
19. Teul I ZWBSCFLJ. Quality of life of patients with diseases of sinuses. *J Physiol Pharmacol* 2007;58 Suppl 5(Pt 2):691-697.
20. Garbutt J, Spitznagel E, Piccirillo J. Use of the modified SNOT-16 in primary care patients with clinically diagnosed acute rhinosinusitis. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2011;137(8):792-797. doi:10.1001/archoto.2011.120
21. Hopkins C, Browne JP, Slack R, et al. The national comparative audit of surgery for nasal polyposis and chronic rhinosinusitis. *Clinical Otolaryngology*. 2006;31(5):390-398. doi:10.1111/j.1749-4486.2006.01275.x
22. Bhattacharyya N. Contemporary assessment of the disease burden of sinusitis. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2009;23(4):392-395. doi:10.2500/ajra.2009.23.3355
23. Goetzel RZ, Hawkins K, Ozminkowski RJ, Wang S. The Health and Productivity Cost Burden of the "Top 10" Physical and Mental Health Conditions Affecting Six Large U.S. Employers in 1999. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2003;45(1). doi:10.1097/00043764-200301000-00007
24. Gross RD, Sheridan MF, Burgess LP. Endoscopic Sinus Surgery Complications in Residency. *The Laryngoscope*. 1997;107(8). doi:10.1097/00005537-199708000-00014
25. Bhattacharyya N, Orlandi RR, Grebner J, Martinson M. Cost of burden of chronic rhinosinusitis: A claims-based study. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2011;144(3):440-445. doi:10.1177/0194599810391852
26. Blackwell DL CJCR. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 1997. *Vital Health Stat* 10 2002;(205):1-109.
27. Pilan RR, Pinna FR, et al. Prevalence of chronic rhinosinusitis in Sao Paulo. *Rhinology*. Published online 2012:129-138. Accessed May 6, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22616073/>
28. Shi JB, Fu QL, Zhang H, et al. Epidemiology of chronic rhinosinusitis: Results from a cross-sectional survey in seven Chinese cities. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;70(5):533-539. doi:10.1111/all.12577
29. Kim JH, Cho C, Lee EJ, Suh YS, Choi BI, Kim KS. Prevalence and risk factors of chronic rhinosinusitis in South Korea according to diagnostic criteria. *Rhinology journal*. 2016;54(4):329-335. doi:10.4193/rhin15.157
30. Hirsch AG, Stewart WF, Sundaresan AS, et al. Nasal and sinus symptoms and chronic rhinosinusitis in a population-based sample. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;72(2):274-281. doi:10.1111/all.13042

31. Hoffmans R, Wagemakers A, van Drunen C, Hellings P, Fokkens W. Acute and chronic rhinosinusitis and allergic rhinitis in relation to comorbidity, ethnicity and environment. *PLoS ONE*. 2018;13(2). doi:10.1371/journal.pone.0192330
32. Ostovar A, Fokkens WJ, Vahdat K, Raeisi A, Mallahzadeh A, Farrokhi S. Epidemiology of chronic rhinosinusitis in Bushehr, southwestern region of Iran: A GA2LEN study. *Rhinology*. 2019;57(1):43-48. doi:10.4193/Rhin18.061
33. Hirsch AG, Nordberg C, Bandeen-Roche K, et al. Radiologic sinus inflammation and symptoms of chronic rhinosinusitis in a population-based sample. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;75(4):911-920. doi:10.1111/all.14106
34. Tomassen P, Newson RB, Hoffmans R, et al. Reliability of EP3OS symptom criteria and nasal endoscopy in the assessment of chronic rhinosinusitis - A GA2LEN study. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;66(4):556-561. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02503.x
35. Hamilos D, Holbrook E. Chronic rhinosinusitis: Clinical manifestations, pathophysiology, and diagnosis - UpToDate. Accessed May 6, 2021. <https://www.uptodate.com/contents/chronic-rhinosinusitis-clinical-manifestations-pathophysiology-and-diagnosis>
36. Shashy RG, Moore EJ, Weaver A. Prevalence of the Chronic Sinusitis Diagnosis in Olmsted County, Minnesota. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2004;130(3):320-323. doi:10.1001/archotol.130.3.320
37. Wilson KF, McMains KC, Orlandi RR. The association between allergy and chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: An evidence-based review with recommendations. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2014;4(2):93-103. doi:10.1002/alr.21258
38. Marcus S, Schertzer J, Roland LT, Wise SK, Levy JM, DelGaudio JM. Central compartment atopic disease: prevalence of allergy and asthma compared with other subtypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2020;10(2):183-189. doi:10.1002/alr.22454
39. Philpott CM, Erskine S, Hopkins C, et al. Prevalence of asthma, aspirin sensitivity and allergy in chronic rhinosinusitis: Data from the UK National Chronic Rhinosinusitis Epidemiology Study. *Respiratory Research*. 2018;19(1). doi:10.1186/s12931-018-0823-y
40. Chen YT, Chien CY, Tai SY, Huang CM, Lee CTC. Asthma associated with chronic rhinosinusitis: a population-based study. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2016;6(12):1284-1293. doi:10.1002/alr.21813
41. Yoshimura K, Kawata R, Haruna S, et al. Clinical epidemiological study of 553 patients with chronic rhinosinusitis in Japan. *Allergology International*. 2011;60(4):491-496. doi:10.2332/allergolint.10-OA-0234
42. Phillips KM, Talat R, Caradonna DS, Gray ST, Sedaghat AR. Quality of life impairment due to chronic rhinosinusitis in asthmatics is mediated by asthma control. *Rhinology*. 2019;57(6):430-435. doi:10.4193/Rhin19.207
43. Miłkowska-Dymanowska J, Białas AJ, Zalewska-Janowska A, Górski P, Piotrowski WJ. Underrecognized comorbidities of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD*. 2015;10:1331-1341. doi:10.2147/COPD.S82420
44. Chien CY, Tai SY, Wang LF, Lee CTC. Chronic obstructive pulmonary disease predicts chronic rhinosinusitis without nasal polyps: A population-based study. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2015;29(3):e75-e80. doi:10.2500/ajra.2015.29.4172

45. Guilemany JM, Angrill J, Alobid I, et al. United airways again: High prevalence of rhinosinusitis and nasal polyps in bronchiectasis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;64(5):790-797. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01892.x
46. Kowalski ML, Agache I, Bavbek S, et al. Diagnosis and management of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (N-ERD)—a EAACI position paper. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019;74(1):28-39. doi:10.1111/all.13599
47. Stevens WW, Peters AT, Hirsch AG, et al. Clinical Characteristics of Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps, Asthma, and Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2017;5(4):1061-1070.e3. doi:10.1016/j.jaip.2016.12.027
48. Stevens WW, Schleimer RP. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease as an Endotype of Chronic Rhinosinusitis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2016;36(4):669-680. doi:10.1016/j.iac.2016.06.004
49. Ocampo CJ, Peters AT. Antibody deficiency in chronic rhinosinusitis: Epidemiology and burden of illness. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2013;27(1):34-38. doi:10.2500/ajra.2013.27.3831
50. Schwitzguébel AJP, Jandus P, Lacroix JS, Seebach JD, Harr T. Immunoglobulin deficiency in patients with chronic rhinosinusitis: Systematic review of the literature and meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(6):1523-1531. doi:10.1016/j.jaci.2015.07.016
51. Leason SR, Barham HP, Oakley G, et al. Association of gastro-oesophageal reflux and chronic rhinosinusitis: systematic review and meta-analysis. *Rhinology journal*. 2017;55(1):3-16. doi:10.4193/rhin16.177
52. Katle EJ, Hatlebakk JG, Grimstad T, Kvaloy JT, Karmhus Steinsvag S. Gastro-oesophageal reflux in patients with chronic rhinosinusitis investigated with multichannel impedance - pH monitoring. *Rhinology journal*. 2017;55(1):27-33. doi:10.4193/rhin16.275
53. Orlandi RR. A systematic analysis of septal deviation associated with rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2010;120(8):1687-1695. doi:10.1002/lary.20992
54. Tiwari R, Goyal R. Study of Anatomical Variations on CT in Chronic Sinusitis. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*. 2015;67(1):18-20. doi:10.1007/s12070-014-0734-2
55. Sedaghat AR, Gray ST, Chambers KJ, Wilke CO, Caradonna DS. Sinonasal anatomic variants and asthma are associated with faster development of chronic rhinosinusitis in patients with allergic rhinitis. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2013;3(9):755-761. doi:10.1002/alr.21163
56. Kim YC, Won HK, Lee JW, et al. Staphylococcus aureus Nasal Colonization and Asthma in Adults: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2019;7(2):606-615.e9. doi:10.1016/j.jaip.2018.08.020
57. Wagner Mackenzie B, Chang K, Zoing M, et al. Longitudinal study of the bacterial and fungal microbiota in the human sinuses reveals seasonal and annual changes in diversity. *Scientific Reports*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-53975-9
58. Rowan NR, Lee S, Sahu N, et al. The role of viruses in the clinical presentation of chronic rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2015;29(6):e197-e200. doi:10.2500/ajra.2015.29.4242

59. Pawełczyk M, Kowalski ML. The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in the Immunopathology of the Respiratory Tract. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2017;17(3). doi:10.1007/s11882-017-0685-2
60. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe - An underestimated disease. A GA 2LEN study. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;66(9):1216-1223. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02646.x
61. Christensen DN, Franks ZG, McCrary HC, Saleh AA, Chang EH. A Systematic Review of the Association between Cigarette Smoke Exposure and Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. 2018;158(5):801-816. doi:10.1177/0194599818757697
62. Hur K, Liang J, Lin SY. The role of secondhand smoke in sinusitis: A systematic review. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2014;4(1):22-28. doi:10.1002/alr.21232
63. Mady LJ, Schwarzbach HL, Moore JA, Boudreau RM, Willson TJ, Lee SE. Air pollutants may be environmental risk factors in chronic rhinosinusitis disease progression. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2018;8(3):377-384. doi:10.1002/alr.22052
64. Sundaresan AS, Hirsch AG, Storm M, et al. Occupational and environmental risk factors for chronic rhinosinusitis: A systematic review. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2015;5(11):996-1003. doi:10.1002/alr.21573
65. Veloso-Teles R, Cerejeira R, Roque-Farinha R, Buchwald C von. Higher prevalence of nasal polyposis among textile workers: An endoscopic based and controlled study. *Rhinology*. 2018;56(2):99-105. doi:10.4193/Rhin17.228
66. Kao LT, Hung SH, Lin HC, Liu CK, Huang HM, Wu CS. Obstructive Sleep Apnea and the Subsequent Risk of Chronic Rhinosinusitis: A Population-Based Study. *Scientific Reports*. 2016;6. doi:10.1038/srep20786
67. Jiang RS, Liang KL, Hsin CH, Su MC. The impact of chronic rhinosinusitis on sleep-disordered breathing. *Rhinology journal*. 2016;54(1):75-79. doi:10.4193/rhin15.204
68. Lee EJ, Hwang HJ, Jung CM, Kim MK, Kang MS, Kim KS. The relationship between chronic rhinosinusitis and metabolic syndrome. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2017;31(4):222-227. doi:10.2500/ajra.2017.31.4445
69. de Schryver E, Derycke L, Campo P, et al. Alcohol hyper-responsiveness in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clinical and Experimental Allergy*. 2017;47(2):245-253. doi:10.1111/cea.12836
70. Lohrmann C, Uhl M, Warnatz K, Kotter E, Ghanem N, Langer M. Sinonasal computed tomography in patients with Wegener's granulomatosis. *Journal of Computer Assisted Tomography*. 2006;30(1):122-125. doi:10.1097/01.rct.0000191134.67674.c6
71. Reed J, Deshazo RD, Houle TT, Stringer S, Wright L, Moak JS. Clinical features of sarcoid rhinosinusitis. *American Journal of Medicine*. 2010;123(9):856-862. doi:10.1016/j.amjmed.2010.05.012
72. DelGaudio JM, Wise SK, Wise JC. Association of radiological evidence of frontal sinus disease with the presence of frontal pain. *Am J Rhinol*. Published online 2005:167-173. Accessed May 5, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15921216/>
73. Rosbe KW, Jones KR. Usefulness of patient symptoms and nasal endoscopy in the diagnosis of chronic sinusitis. *American Journal of Rhinology*. 1998;12(3):167-171. doi:10.2500/105065898781390208
74. Holbrook EH, Brown CL, Lyden ER, Leopold DA. Lack of significant correlation between rhinosinusitis symptoms and specific regions of sinus computer tomography scans - PubMed.

- Am J Rhinol*. Published online 2005:382-387. Accessed May 5, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16171173/>
75. Hamilos DL. Chronic rhinosinusitis patterns of illness. *Clin Allergy Immunol*. Published online 2007:1-13. Accessed May 5, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17534042/>
  76. Escada P. [Localization and distribution of human olfactory mucosa in the nasal cavities]. *Acta Med Port*. Published online 2013:200-207. Accessed May 5, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23815832/>
  77. Harvey R, Lund V. Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research - PubMed. *Rhinology*. Published online 2007:3-13. Accessed May 5, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17432062/>
  78. Jani AL, Hamilos DL. Current thinking on the relationship between rhinosinusitis and asthma. *Journal of Asthma*. 2005;42(1):1-7. doi:10.1081/JAS-200044744
  79. Drake-Lee AB, McLaughlan P. Clinical symptoms, free histamine and IgE in patients with nasal polyposis. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 1982;69(3):268-271. doi:10.1159/000233182
  80. Subramanian HN, Schechtman KB, Hamilos DL. A retrospective analysis of treatment outcomes and time to relapse after intensive medical treatment for chronic sinusitis. *American Journal of Rhinology*. 2002;16(6):303-312. doi:10.1177/194589240201600605
  81. Malekzadeh S, Hamburger MD, Whelan PJ, Biedlingmaier JF, Baraniuk JN. Density of middle turbinate subepithelial mucous glands in patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2002;127(3):190-195. doi:10.1067/mhn.2002.126800
  82. Berger G, Kogan T, Paker M, Berger-Achituv S, Ebner Y. Pediatric chronic rhinosinusitis histopathology: Differences and similarities with the adult form. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2011;144(1):85-90. doi:10.1177/0194599810390443
  83. Asero R, Bottazzi G. Nasal polyposis: A study of its association with airborne allergen hypersensitivity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2001;86(3):283-285. doi:10.1016/S1081-1206(10)63299-1
  84. Lourijzen ES, de Borgie CAJM, Vleming M, Fokkens WJ. Endoscopic sinus surgery in adult patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps (PolypESS): Study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017;18(1). doi:10.1186/s13063-016-1728-z
  85. Fernández E, Fernandez P, Lopez M, et al. *Libro Virtual de Formación En ORL POLIPOSIS NASOSINUSAL*.
  86. Monteiro-Zappellini CE S-RTHVFDP-DI et al. Perfil tomográfico según la clasificación de Lund-Mackay de pacientes atendidos en una clínica ambulatoria de Otorrinolaringología. *An Orl Mex* 2015;60:6-10 .
  87. Psaltis AJ, Li G, Vaezaefshar R, Cho KS, Hwang PH. Modification of the Lund-Kennedy endoscopic scoring system improves its reliability and correlation with patient-reported outcome measures. *Laryngoscope*. 2014;124(10):2216-2223. doi:10.1002/lary.24654
  88. Snidvongs K, Dalgorf D, Kalish L, Sacks R, Pratt E, Harvey RJ. Modified Lund Mackay Postoperative Endoscopy Score for defining inflammatory burden in chronic rhinosinusitis. *Rhinology journal*. 2014;52(1):53-59. doi:10.4193/rhin13.056
  89. Workman AD, Kohanski MA, Cohen NA. Biomarkers in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2018;38(4):679-692. doi:10.1016/j.iac.2018.06.006

90. Steinke JW, Smith AR, Carpenter DJ, Patrie JT, Payne SC, Borish L. Lack of Efficacy of Symptoms and Medical History in Distinguishing the Degree of Eosinophilia in Nasal Polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2017;5(6):1582-1588.e3. doi:10.1016/j.jaip.2017.04.009
91. Kountakis SE, Arango P, Bradley D, Wade ZK, Borish L. Molecular and cellular staging for the severity of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2004;114(11):1895-1905. doi:10.1097/01.mlg.0000147917.43615.c0
92. Soler ZM, Sauer D, Mace J, Smith TL. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2010;142(1):64-71. doi:10.1016/j.otohns.2009.10.005
93. Zuo K, Guo J, Chen F, et al. Clinical characteristics and surrogate markers of eosinophilic chronic rhinosinusitis in Southern China. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2014;271(9):2461-2468. doi:10.1007/s00405-014-2910-0
94. Gevaert P, Calus L, van Zele T, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(1). doi:10.1016/j.jaci.2012.07.047
95. Xu M, Chen D, Zhou H, Zhang W, Xu J, Chen L. The Role of Periostin in the Occurrence and Progression of Eosinophilic Chronic Sinusitis with Nasal Polyps. *Scientific Reports*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-08375-2
96. Bleier BS. Regional expression of epithelial MDR1/P-glycoprotein in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2012;2(2):122-125. doi:10.1002/alr.21004
97. Feldman RE, Lam AC, Sadow PM, Bleier BS. P-glycoprotein is a marker of tissue eosinophilia and radiographic inflammation in chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2013;3(8):684-687. doi:10.1002/alr.21176
98. Nocera AL, Meurer AT, Miyake MM, Sadow PM, Han X, Bleier BS. Secreted P-glycoprotein is a noninvasive biomarker of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2017;127(1):E1-E4. doi:10.1002/lary.26249
99. Miyake MM, Nocera A, Levesque P, et al. Double-blind placebo-controlled randomized clinical trial of verapamil for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;140(1):271-273. doi:10.1016/j.jaci.2016.11.014
100. Hulse KE, Norton JE, Suh L, et al. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by B-cell inflammation and EBV-induced protein 2 expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(4). doi:10.1016/j.jaci.2013.01.043
101. Ho J, Bailey M, Zaunders J, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clinical and Experimental Allergy*. 2015;45(2):394-403. doi:10.1111/cea.12462
102. Tan BK, Li QZ, Suh L, et al. Evidence for intranasal antinuclear autoantibodies in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(6). doi:10.1016/j.jaci.2011.08.037
103. Gonçalves C, Pinaffi J v., Carvalho JF, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in chronic rhinosinusitis may be a marker of undisclosed vasculitis. *American Journal of Rhinology*. 2007;21(6):691-694. doi:10.2500/ajr.2007.21.3092

104. Mahdavinia M, Keshavarzian A, Tobin MC, Landay AL, Schleimer RP. A comprehensive review of the nasal microbiome in chronic rhinosinusitis (CRS). *Clinical and Experimental Allergy*. 2016;46(1):21-41. doi:10.1111/cea.12666
105. Malik Z, Roscioli E, Murphy J, et al. Staphylococcus aureus impairs the airway epithelial barrier in vitro. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2015;5(6):551-556. doi:10.1002/alr.21517
106. Seshadri S, Lin DC, Rosati M, et al. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;67(7):920-928. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02848.x
107. Liu C, Zheng M, He F, Wang X, Zhang L. Role of exhaled nasal nitric oxide in distinguishing between chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2017;31(6):389-394. doi:10.2500/ajra.2017.31.4480
108. Jeong JH, Yoo HS, Lee SH, Kim KR, Yoon HJ, Kim SH. Nasal and exhaled nitric oxide in chronic rhinosinusitis with polyps. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2014;28(1). doi:10.2500/ajra.2014.28.3984
109. Tomassen P, Vandeplass G, van Zele T, et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(5):1449-1456.e4. doi:10.1016/j.jaci.2015.12.1324
110. Lam M, Hull L, Imrie A, et al. Interleukin-25 and interleukin-33 as mediators of eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2015;29(3):175-181. doi:10.2500/ajra.2015.29.4176
111. Ozturan A, Eyigor H, Eyigor M, et al. The role of IL-25 and IL-33 in chronic rhinosinusitis with or without nasal polyps. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2017;274(1):283-288. doi:10.1007/s00405-016-4260-6
112. Pinto Bezerra Soter AC, Bezerra TF, Pezato R, et al. Prospective open-label evaluation of long-term low-dose doxycycline for difficult-to-treat chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology journal*. 2017;55(2):175-180. doi:10.4193/rhin15.291
113. Pothoven KL, Norton JE, Hulse KE, et al. Oncostatin M promotes mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with eosinophilic mucosal disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(3):737-746.e4. doi:10.1016/j.jaci.2015.01.043
114. Geijsen N, Uings IJ, Pals C, et al. Cytokine-specific transcriptional regulation through an IL-5R $\alpha$  interacting protein. *Science*. 2001;293(5532):1136-1138. doi:10.1126/science.1059157
115. Gevaert P, van Bruaene N, Cattaert T, et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(5). doi:10.1016/j.jaci.2011.07.056
116. Bachert C, Sousa AR, Lund VJ, et al. Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;140(4):1024-1031.e14. doi:10.1016/j.jaci.2017.05.044
117. Phillips KM, Hoehle L, Bergmark RW, Caradonna DS, Gray ST, Sedaghat AR. Reversal of Smoking Effects on Chronic Rhinosinusitis after Smoking Cessation. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. 2017;157(4):737-742. doi:10.1177/0194599817717960
118. Peters AT, Spector S, Hsu J, et al. Diagnosis and management of rhinosinusitis: A practice parameter update. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2014;113(4):347-385. doi:10.1016/j.anai.2014.07.025

119. Hamilos D, Holbrook E. Chronic rhinosinusitis: Management - UpToDate. Accessed May 6, 2021. [https://www.uptodate.com/contents/chronic-rhinosinusitis-management?search=chronic%20rhinosinusitis&source=search\\_result&selectedTitle=1~146&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/chronic-rhinosinusitis-management?search=chronic%20rhinosinusitis&source=search_result&selectedTitle=1~146&usage_type=default&display_rank=1)
120. Stevens WW, Schleimer RP, Kern RC. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2016;4(4):565-572. doi:10.1016/j.jaip.2016.04.012
121. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention—updated 2020. April 2020.
122. Aaron SD, Vandemheen KL, FitzGerald JM, et al. Reevaluation of diagnosis in adults with physician-diagnosed asthma. In: *JAMA - Journal of the American Medical Association*. Vol 317. American Medical Association; 2017:269-279. doi:10.1001/jama.2016.19627
123. Padrón-Morales J, Sanz C, Dávila I, Muñoz-Bellido F, Lorente F, Isidoro-García M. Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2013;23(7):487-494. Accessed June 4, 2021. <https://europepmc.org/article/med/24654313>
124. Elena-Pérez S, Heredero-Jung DH, García-Sánchez A, et al. Molecular Analysis of IL-5 Receptor Subunit Alpha as a Possible Pharmacogenetic Biomarker in Asthma. *Frontiers in Medicine*. 2021;7. doi:10.3389/fmed.2020.624576
125. Oakley GM, Curtin K, Orb Q, Schaefer C, Orlandi RR, Alt JA. Familial risk of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: Genetics or environment. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2015;5(4):276-282. doi:10.1002/alr.21469
126. Liu Z, Kim J, Sypek JP, et al. Gene expression profiles in human nasal polyp tissues studied by means of DNA microarray. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;114(4):783-790. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.052
127. Lan F, Zhang N, Zhang J, et al. Forkhead box protein 3 in human nasal polyp regulatory T cells is regulated by the protein suppressor of cytokine signaling 3. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;132(6):1314-1321.e3. doi:10.1016/j.jaci.2013.06.010
128. Cormier C, Mfunam Endam L, Filali-Mouhim A, et al. A pooling-based genomewide association study identifies genetic variants associated with *Staphylococcus aureus* colonization in chronic rhinosinusitis patients. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2014;4(3):207-215. doi:10.1002/alr.21276
129. Adappa ND, Zhang Z, Palmer JN, et al. The bitter taste receptor T2R38 is an independent risk factor for chronic rhinosinusitis requiring sinus surgery. *International Forum of Allergy and Rhinology*. 2014;4(1):3-7. doi:10.1002/alr.21253
130. Tian P, Sun Y, Li Y, et al. A Global Analysis of Tandem 3'UTRs in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *PLoS ONE*. 2012;7(11). doi:10.1371/journal.pone.0048997
131. Kim JY, Kim DK, Yu MS, Cha MJ, Yu SL, Kang J. Role of epigenetics in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Molecular Medicine Reports*. 2018;17(1):1219-1227. doi:10.3892/mmr.2017.8001
132. Kim YS, Han D, Kim JY, et al. In-depth, proteomic analysis of nasal secretions from patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Allergy, Asthma and Immunology Research*. 2019;11(5):691-708. doi:10.4168/aair.2019.11.5.691

133. Tavernier J, Devos R, Cornelis S, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific  $\alpha$  chain and a  $\beta$  chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell*. 1991;66(6):1175-1184. doi:10.1016/0092-8674(91)90040-6
134. Nussbaum JC, van Dyken SJ, von Moltke J, et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature*. 2013;502(7470):245-248. doi:10.1038/nature12526
135. Castro M, Mathur S, Hargreave F, et al. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: A randomized, placebo-controlled study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011;184(10):1125-1132. doi:10.1164/rccm.201103-0396OC
136. Gevaert P, Lang-Loidolt D, Lackner A, et al. Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;118(5):1133-1141. doi:10.1016/j.jaci.2006.05.031
137. Naclerio RM, Baroody FM, Pinto JM. Nasal Polyps and Biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2017;5(6):1589-1590. doi:10.1016/j.jaip.2017.05.007
138. Dávila González I, Moreno Benítez F, Quirce S. Benralizumab: A New approach for the treatment of severe eosinophilic asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2019;29(2):84-93. doi:10.18176/jiaci.0385
139. Nakajima M, Matsuyama M, Arai N, et al. Identification of whole blood gene expressions correlated with responsiveness to benralizumab. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Published online 2020. doi:10.1016/j.jaci.2020.08.004
140. Patel GB, Peters AT. The Role of Biologics in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Ear, Nose and Throat Journal*. 2021;100(1):44-47. doi:10.1177/0145561320964653
141. Franzese CB. The Role of Biologics in the Treatment of Nasal Polyps. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2020;40(2):295-302. doi:10.1016/j.iac.2019.12.006
142. Tversky J, Lane AP, Azar A. Benralizumab effect on severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP): A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Clinical and Experimental Allergy*. Published online 2021. doi:10.1111/cea.13852
143. Matsuno O, Minamoto S. Rapid effect of benralizumab for severe asthma with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2020;64. doi:10.1016/j.pupt.2020.101965
144. Matsunaga K, Katoh N, Fujieda S, Izuhara K, Oishi K. Dupilumab: Basic aspects and applications to allergic diseases. *Allergology International*. 2020;69(2):187-196. doi:10.1016/j.alit.2020.01.002
145. Zhu N, Gong Y, Chen XD, et al. Association between the polymorphisms of interleukin-4, the interleukin-4 receptor gene and asthma. *Chinese Medical Journal*. 2013;126(15):2943-2951. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20123060
146. Wenzel SE, Balzar S, Ampleford E, et al. IL4R $\alpha$  mutations are associated with asthma exacerbations and mast cell/IgE expression. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(6):570-576. doi:10.1164/rccm.200607-909OC
147. Soto-Ramírez N, Arshad SH, Holloway JW, et al. The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years. *Clinical Epigenetics*. 2013;5(1). doi:10.1186/1868-7083-5-1
148. Lee EJ, Gawel DR, Lilja S, et al. Analysis of expression profiling data suggests explanation for difficulties in finding biomarkers for nasal polyps. *Rhinology*. 2020;58(4):1-8. doi:10.4193/Rhin19.407

149. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;193(2):255-261. doi:10.1084/jem.193.2.255
150. Singh D, Ravi A, Southworth T. CRTH2 antagonists in asthma: Current perspectives. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2017;9:165-173. doi:10.2147/CPAA.S119295
151. Dávila I, García-Sánchez A, Estravís M, et al. Relationship between CRTH2 mRNA expression in peripheral blood and IgE and eosinophil levels in adult patients with asthma. In: *European Respiratory Journal*. Vol 54. European Respiratory Society (ERS); 2019:PA535. doi:10.1183/13993003.congress-2019.pa535
152. Kupczyk M, Kuna P. Targeting the PGD2/CRTH2/DP1 Signaling Pathway in Asthma and Allergic Disease: Current Status and Future Perspectives. *Drugs*. 2017;77(12):1281-1294. doi:10.1007/s40265-017-0777-2
153. Gonem S, Berair R, Singapuri A, et al. Fevipiprant, a prostaglandin D2 receptor 2 antagonist, in patients with persistent eosinophilic asthma: a single-centre, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2016;4(9):699-707. doi:10.1016/S2213-2600(16)30179-5
154. Bateman ED, Guerreros AG, Brockhaus F, et al. Fevipiprant, an oral prostaglandin DP2 receptor (CRTh2) antagonist, in allergic asthma uncontrolled on low-dose inhaled corticosteroids. *The European respiratory journal*. 2017;50(2). doi:10.1183/13993003.00670-2017
155. Canonica GW, Bachert C, Hellings P, et al. Allergen Immunotherapy (AIT): A prototype of Precision Medicine. *World Allergy Organization Journal*. 2015;8(1). doi:10.1186/s40413-015-0079-7
156. Jarvis D, Newson R, Lotvall J, et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy*. 2012;67(1):91-98. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02709.x
157. Arlen D. Meyers. Fast Five Quiz: Sinusitis With Nasal Polyps - Medscape - Jun 18, 2021.
158. Rajan JP, Wineinger NE, Stevenson DD, White AA. Prevalence of aspirin-exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: A meta-analysis of the literature. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):676-81.e1. doi:10.1016/j.jaci.2014.08.020
159. Stevens WW, Peters AT, Hirsch AG, et al. Clinical Characteristics of Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps, Asthma, and Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(4):1061-1070.e3. doi:10.1016/j.jaip.2016.12.027
160. Haque R, White AA, Jackson DJ, Hopkins C. Clinical evaluation and diagnosis of aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(2):283-291. doi:10.1016/j.jaci.2021.06.018
161. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J*. 2000;16(3):432-436. doi:10.1034/j.1399-3003.2000.016003432.x
162. Ramakrishnan Y, Shields RC, Elbadawey MR, Wilson JA. Biofilms in chronic rhinosinusitis: what is new and where next?. *J Laryngol Otol*. 2015;129(8):744-751. doi:10.1017/S0022215115001620
163. Fernández Pascual E, Fernández-Miranda López P, Ruiz Gómez M. Poliposis nasosinusal. Libro virtual de formación en ORL. Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cervico-Facial SEORL-PCF. 2015. <https://seorl.net>

164. Hulse KE, Stevens WW, Tan BK, Schleimer RP. Pathogenesis of nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(2):328-346. doi:10.1111/cea.12472
165. Scadding GK, Durham SR, Mirakian R, et al. BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(2):260-275. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02889.x
166. Lasso A, Masoudian P, Quinn JG, et al. Long-term low-dose macrolides for chronic rhinosinusitis in adults - a systematic review of the literature. *Clin Otolaryngol*. 2017;42(3):637-650. doi:10.1111/coa.12787
167. Bachert C, Han JK, Desrosiers MY, et al. Efficacy and safety of benralizumab in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: A randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(4):1309-1317.e12. doi:10.1016/j.jaci.2021.08.030
168. Greisner WA 3rd, Settipane GA. Hereditary factor for nasal polyps. *Allergy Asthma Proc*. 1996;17(5):283-286. doi:10.2500/108854196778662192
169. Rugina M, Serrano E, Klossek JM, et al. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. *Rhinology*. 2002;40(2):75-79.
170. Delagrang A, Gilbert-Dussardier B, Burg S, et al. Nasal polyposis: is there an inheritance pattern? A single family study. *Rhinology*. 2008;46(2):125-130.
171. Martin MJ, Garcia-Sanchez A, Estravis M, et al. Genetics and Epigenetics of Nasal Polyposis: A Systematic Review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021;31(3):196-211. doi:10.18176/jiaci.0673
172. Cahill KN. Fevipiprant in CRSwNP and comorbid asthma: Wrong target population or wrong PGD2 receptor?. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(5):1587-1589. doi:10.1016/j.jaci.2022.03.001
173. García-Sánchez, A., Estravis, M., Martín, M. J., Pérez-Pazos, J., Martín-García, C., Gil-Melcón, M., Ramos-González, J., Eguluz-Gracia, I., Triviño, J. C., Isidoro-García, M., Dávila, I., & Sanz, C. (2021). PTGDR2 Expression in Peripheral Blood as a Potential Biomarker in Adult Patients with Asthma. *Journal of personalized medicine*, 11(9), 827. <https://doi.org/10.3390/jpm11090827>
174. Ávila-Baray H. *Introducción a la metodología de la investigación*. 2006
175. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*. 1989;44(s10):11-59
176. Lildholdt T, Rundcrantz H, Bende M, Larsen K. Glucocorticoid treatment for nasal polyps. The use of topical budesonide powder, intramuscular betamethasone, and surgical treatment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123(6):595-600. doi:10.1001/archotol.1997.01900060037006
177. Global Initiative for Asthma Global Strategy for Asthma Management and prevention; 2022 update
178. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005;26(5):948-968. doi:10.1183/09031936.05.00035205
179. GEMA 5.1. Guía Española para el Manejo del Asma. Disponible en: <https://www.gemasma.com>
180. Klimek L, Bachert C, Pfaar O, et al. ARIA guideline 2019: treatment of allergic rhinitis in the German health system. *Allergol Select*. 2019;3(1):22-50. Published 2019 Dec 30. doi:10.5414/ALX02120E
181. Relative Quantitation of Gene Expression: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System: User Bulletin #2: Rev B. (AppliedBiosystems PN 4303859). Applied Biosystems. 1977

182. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
183. Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Applied Biosystems. 2008
184. Breiteneder H, Peng YQ, Agache I, et al. Biomarkers for diagnosis and prediction of therapy responses in allergic diseases and asthma. *Allergy*. 2020;75(12):3039-3068. doi:10.1111/all.14582
185. Hanania NA, Diamant Z. The road to precision medicine in asthma: challenges and opportunities. *Curr Opin Pulm Med*. 2018;24(1):1-3. doi:10.1097/MCP.0000000000000444
186. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
187. Khan A, Vandeplass G, Huynh TMT, et al. The Global Allergy and Asthma European Network (GALEN rhinosinusitis cohort: a large European cross-sectional study of chronic rhinosinusitis patients with and without nasal polyps. *Rhinology*. 2019;57(1):32-42. Doi:10.4193/Rhin17.255
188. Khan A, Vandeplass G, Huynh TMT, et al. The Global Allergy and Asthma European Network (GALEN rhinosinusitis cohort: a large European cross-sectional study of chronic rhinosinusitis patients with and without nasal polyps. *Rhinology*. 2019;57(1):32-42. doi:10.4193/Rhin17.255
189. Heffler E, Blasi F, Latorre M, et al. The Severe Asthma Network in Italy: Findings and Perspectives. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(5):1462-1468. doi:10.1016/j.jaip.2018.10.016
190. Laidlaw TM, Mullol J, Woessner KM, Amin N, Mannent LP. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(3):1133-1141. doi:10.1016/j.jaip.2020.09.063
191. White AA, Stevenson DD. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(11):1060-1070. doi:10.1056/NEJMra1712125
192. Sastre J, Dávila I. Dupilumab: A New Paradigm for the Treatment of Allergic Diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(3):139-150. doi:10.18176/jiaci.0254
193. Isidoro-García M, Dávila I, Laffond E, Moreno E, Lorente F, González-Sarmiento R. Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study. *Clin Mol Allergy*. 2005;3:15. Published 2005 Nov 29. doi:10.1186/1476-7961-3-15
194. Pascual M, Roa S, García-Sánchez A, et al. Genome-wide expression profiling of B lymphocytes reveals IL4R increase in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(4):972-975. doi:10.1016/j.jaci.2014.05.015
195. Buchheit KM, Dwyer DF, Ordovas-Montanes J, et al. IL-5R $\alpha$  marks nasal polyp IgG4- and IgE-expressing cells in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(6):1574-1584. doi:10.1016/j.jaci.2020.02.035
196. Ordovas-Montanes J, Dwyer DF, Nyquist SK, et al. Allergic inflammatory memory in human respiratory epithelial progenitor cells. *Nature*. 2018;560(7720):649-654. doi:10.1038/s41586-018-0449-8
197. Viksne RJ, Sumeraga G, Pilmane M. Characterization of Cytokines and Proliferation Marker Ki67 in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: A Pilot Study. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(6):607. Published 2021 Jun 11. doi:10.3390/medicina57060607

198. Wang M, Bu X, Luan G, et al. Distinct type 2-high inflammation associated molecular signatures of chronic rhinosinusitis with nasal polyps with comorbid asthma. *Clin Transl Allergy*. 2020;10:26. Published 2020 Jul 3. doi:10.1186/s13601-020-00332-z
199. Jameson JL, Longo DL. Precision medicine--personalized, problematic, and promising. *N Engl J Med*. 2015;372(23):2229-2234. doi:10.1056/NEJMs1503104
200. Canonica GW, Bachert C, Hellings P, et al. Allergen Immunotherapy (AIT): a prototype of Precision Medicine. *World Allergy Organ J*. 2015;8(1):31. Published 2015 Nov 10. doi:10.1186/s40413-015-0079-7
201. Hoy SM. Dupilumab: A Review in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Drugs*. 2020;80(7):711-717. doi:10.1007/s40265-020-01298-9
202. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials [published correction appears in *Lancet*. 2019 Nov 2;394(10209):1618]. *Lancet*. 2019;394(10209):1638-1650. doi:10.1016/S0140-6736(19)31881-1
203. Gevaert P, Saenz R, Corren J, et al. Long-term efficacy and safety of omalizumab for nasal polyposis in an open-label extension study. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(3):957-965.e3. doi:10.1016/j.jaci.2021.07.045
204. Bachert C, Sousa AR, Han JK, et al. Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps: Treatment efficacy by comorbidity and blood eosinophil count. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(5):1711-1721.e6. doi:10.1016/j.jaci.2021.10.040
205. Kupczyk M, Kuna P. Benralizumab: an anti-IL-5 receptor  $\alpha$  monoclonal antibody in the treatment of asthma. *Immunotherapy*. 2018;10(5):349-359. doi:10.2217/imt-2017-0161
206. Numata T, Miyagawa H, Nishioka S, et al. Efficacy of benralizumab for patients with severe eosinophilic asthma: a retrospective, real-life study. *BMC Pulm Med*. 2020;20(1):207. Published 2020 Aug 3. doi:10.1186/s12890-020-01248-x
207. Oykhman P, Paramo FA, Bousquet J, Kennedy DW, Brignardello-Petersen R, Chu DK. Comparative efficacy and safety of monoclonal antibodies and aspirin desensitization for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: A systematic review and network meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(4):1286-1295. doi:10.1016/j.jaci.2021.09.009
208. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol*. 2018;9:888. Published 2018 Jun 7. doi:10.3389/fimmu.2018.00888
209. Alobid I, Antón E, Armengot M, et al. SEAIC-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21 Suppl 1:1-58.
210. Singhal D, Psaltis AJ, Foreman A, Wormald PJ. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;24(3):169-174. doi:10.2500/ajra.2010.24.3462
211. Zhang J, Li Y, Lu X, et al. Distinguishing the dominant species of pathogen in maxillary sinusitis by sequencing DNA dataset analysis. *Gene*. 2015;561(2):256-260. doi:10.1016/j.gene.2015.02.037
212. Gudis D, Zhao KQ, Cohen NA. Acquired cilia dysfunction in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(1):1-6. doi:10.2500/ajra.2012.26.3716
213. Seybt MW, McMains KC, Kountakis SE. The prevalence and effect of asthma on adults with chronic rhinosinusitis. *Ear Nose Throat J*. 2007;86(7):409-411.

214. Agache I, Song Y, Alonso-Coello P, et al. Efficacy and safety of treatment with biologicals for severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps: A systematic review for the EAACI guidelines. *Allergy*. 2021;76(8):2337-2353. doi:10.1111/all.14809
215. Gevaert P, Bachert C, Maspero JF, et al. Phase 3b randomized controlled trial of fevipiprant in patients with nasal polyposis with asthma (THUNDER). *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(5):1675-1682.e3. doi:10.1016/j.jaci.2021.12.759
216. GEMA 4.2. Guía Española para el Manejo del Asma. Disponible en: <https://www.gemasma.com>
217. Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>
218. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Grolemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H (2019). "Welcome to the tidyverse." *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. doi: [10.21105/joss.01686](https://doi.org/10.21105/joss.01686).
219. FastDummies. Fast Creation of Dummy (Binary) Columns and Rows from Categorical Variables. <https://cran.r-project.org/web/packages/fastDummies/index.html>
220. Galili, Tal, O'Callaghan, Alan, Sidi, Jonathan, Sievert, Carson (2017). "heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing." *Bioinformatics*. doi: [10.1093/bioinformatics/btx657](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx657), <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-pdf/doi/10.1093/bioinformatics/btx657/21358327/btx657.pdf>, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx657>
221. Wickham H, François R, Henry L, Müller K (2022). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://dplyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/dplyr>
222. Waring E, Quinn M, McNamara A, Arino de la Rubia E, Zhu H, Ellis S (2022). *skimr: Compact and Flexible Summaries of Data*. <https://docs.ropensci.org/skimr/> (website), <https://github.com/ropensci/skimr/>
223. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J, Müller M (2011). "pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves." *BMC Bioinformatics*, 12, 77



# Co-expression of *IL5RA* and *PTGDR2* in patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps.

## Synergy of two biomarkers.

Herederó-Jung D. H.<sup>1</sup>, Elena-Pérez S.<sup>1</sup>, García-Sánchez A.<sup>2,3,4</sup>, Estravís M.<sup>3,4,5</sup>, Martín M.J.<sup>3,4,5</sup>, Muñoz-Bellido F.<sup>3,6</sup>, Isidoro-García M.<sup>1,3</sup>, Sanz C.<sup>3,4,7</sup>, Dávila I.<sup>2,3,4,6</sup>

<sup>1</sup>. Dept. of Clinical Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>2</sup>. Dept. of Biomedical and Diagnostic Sciences, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>3</sup>. Institute for Biomedical Research of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>4</sup>. Asthma, allergic and adverse reactions (ARADY/AL) network for cooperative research in health of Instituto de Salud Carlos III; <sup>5</sup>. Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>6</sup>. Dept. of Immunology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>7</sup>. Dept. of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

### Background and aim

Chronic Rhinosinusitis (CRS) has a significant impact on quality of life, loss of productivity, and public healthcare costs. CRS is often associated with nasal polyps (CRSwNP), affecting 1 to 4.5% of the adult population and 0.1% of children. The search for reliable biomarkers, which could be used both as therapeutic targets and for patient monitoring, is an unmet need. This study aimed to investigate the role of *IL5RA* and *PTGDR2* separately or combined as possible biomarkers in CRSwNP.

### Methods

Seventy-seven non-atopic controls without CRS or asthma, 92 atopic and non-atopic patients with CRSwNP, and 19 non-atopic asthmatic patients without CRS, were included in the study. The expression of *IL5RA* and *PTGDR2* in peripheral blood was determined by qPCR, as well as the eosinophil count. Correlation and contrast studies were performed, and results were categorized in four quadrants (Q1 to 4), according to the levels of *IL5RA* and *PTGDR2* expression (below or above the mean expressions in controls).

### Results

Pearson correlation ( $r$ ) between *IL5RA* and *PTGDR2* was 0.6 ( $p < 0.001$ ). The correlation was significant in all groups of patients. There was a clear difference in the distribution of controls and patients between Q1 (low expression of both genes) and Q4 (high expression) (42% vs. 19% for controls and 17% vs. 59% for patients, respectively). Most patients with CRSwNP w/o asthma had high levels of *IL5RA* but not high levels of *PTGDR2*. High expression levels of both genes were similarly distributed in asthmatic patients. In the contrast tests, *IL5RA* levels were significantly higher in CRSwNP without asthma, while *PTGDR2* levels were not. However, *PTGDR2* was significantly higher in CRSwNP with asthma, compared to CRSwNP without asthma. A positive

correlation of the expression of both genes with eosinophil counts was significant in all groups, except for CRSwNP without asthma, but the correlation between the expression of *IL5RA* and *PTGDR2* was maintained.

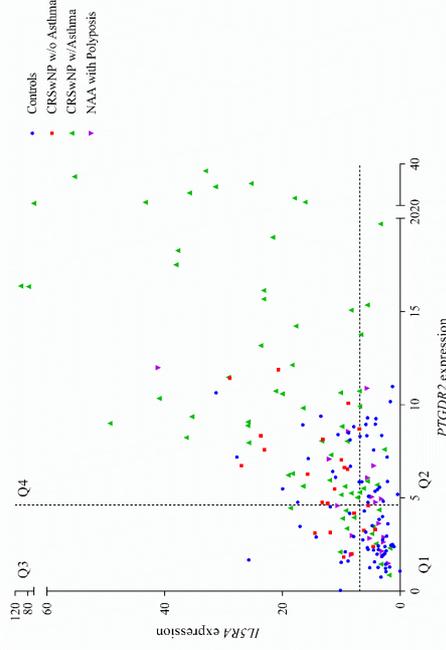


Figure 1. Scatterplot of *IL5RA* and *PTGDR2* expressions. Calculations were made by the comparative ΔΔCt method. All procedures followed the MIQE guidelines. Q1: quadrant 1 (*PTGDR2* ≤ 4.62; *IL5RA* ≤ 6.85); Q2: quadrant 2 (*PTGDR2* > 4.62; *IL5RA* ≤ 6.85); Q3: quadrant 3 (*PTGDR2* ≤ 4.62; *IL5RA* > 6.85); Q4: quadrant 4 (*PTGDR2* > 4.62; *IL5RA* > 6.85). CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyps; NAA: non-allergic asthma.

The performance of both biomarkers was studied via ROC curves, establishing the optimal cut-off values using the Youden's J statistic. For *IL5RA*, the cut-off was the same as the mean expression in controls (6.85; SE=0.71, SP=0.68). As for *PTGDR2*, it was higher than the mean expression (9.6; SE=0.32, SP=0.96). However, the Youden index was a bit lower but similar for a cut-off value of

4.31 (SE=0.75, SP=0.53), which could be more interesting in regards of maximizing the sensitivity, and approaches more to the mean expression in controls. A new predicted probability variable was rendered using a binary logistic regression model, using both biomarkers. Interaction between them was also considered, but discarded due to loss of significance.

### Conclusions

The expression of *IL5RA* and *PTGDR2* could play a role as biomarkers in CRSwNP. Although both are co-expressed and correlated with eosinophils, different combinations of the three variables could help in classifying the patients. The different expression patterns between CRSwNP with or without associated asthma and the independence from eosinophils in CRSwNP without asthma could be interesting for these biomarkers. Further studies are required.

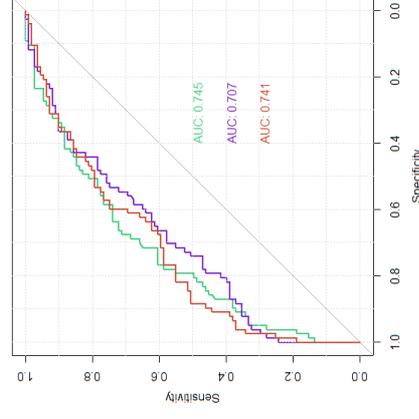


Figure 2. Representation of ROC curves for *IL5RA* (green), *PTGDR2* (purple) and the combination of both (red). Highest AUC corresponds to *IL5RA* (0.745±0.057). The use of both biomarkers does not improve the AUC, given the regression model (0.741±0.035).



# Molecular Analysis of IL-5 Receptor Subunit Alpha as a Possible Pharmacogenetic Biomarker in Asthma

Sandra Elena-Pérez<sup>1</sup>, David Hansoe Heredero-Jung<sup>1</sup>, Asunción García-Sánchez<sup>2,3,4</sup>, Miguel Estravís<sup>2,3,4</sup>, María J. Martín<sup>2,4</sup>, Jacinto Ramos-González<sup>5</sup>, Juan Carlos Triviño<sup>6</sup>, María Isidoro-García<sup>1,2,4,7</sup>, Catalina Sanz<sup>2,4,8\*</sup> and Ignacio Dávila<sup>2,3,4,9</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>2</sup> Allergic Disease Research Group IIMD-01, Institute for Biomedical Research of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>3</sup> Department of Biomedical Sciences and Diagnostics, University of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>4</sup> Network for Cooperative Research in Health - RETICS ARADyAL, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain, <sup>5</sup> Department of Pneumology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>6</sup> Sistemas Genómicos, Paterna, Spain, <sup>7</sup> Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>8</sup> Department of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>9</sup> Department of Allergy, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Bassam Mahboub,  
Rashid Hospital, United Arab Emirates

### Reviewed by:

Ubaldo Martin,  
AstraZeneca, United States  
Jose Antonio Cañas,  
Health Research Institute Foundation  
Jimenez Díaz (IIS-FJD), Spain

### \*Correspondence:

Catalina Sanz  
catsof@usal.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Pulmonary Medicine,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 31 October 2020

**Accepted:** 30 December 2020

**Published:** 11 February 2021

### Citation:

Elena-Pérez S, Heredero-Jung DH, García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Ramos-González J, Triviño JC, Isidoro-García M, Sanz C and Dávila I (2021) Molecular Analysis of IL-5 Receptor Subunit Alpha as a Possible Pharmacogenetic Biomarker in Asthma. *Front. Med.* 7:624576. doi: 10.3389/fmed.2020.624576

**Background:** Asthma is a heterogeneous syndrome with a broad clinical spectrum and high drug response variability. The inflammatory response in asthma involves multiple effector cells and mediator molecules. Based on asthma immunopathogenesis, precision medicine can be a promising strategy for identifying biomarkers. Biologic therapies acting on the IL-5/IL-5 receptor axis have been developed. IL-5 promotes proliferation, differentiation and activation of eosinophils by binding to the IL-5 receptor, located on the surface of eosinophils and basophils. This study aimed to investigate the expression of *IL5RA* in patients with several types of asthma and its expression after treatment with benralizumab, a biologic directed against IL-5 receptor subunit alpha.

**Methods:** Sixty peripheral blood samples, 30 from healthy controls and 30 from asthmatic patients, were selected for a transcriptomic RNAseq study. Differential expression analysis was performed by statistical assessment of fold changes and *P*-values. A validation study of *IL5RA* expression was developed using qPCR in 100 controls and 187 asthmatic patients. The effect of benralizumab on *IL5RA* expression was evaluated in five patients by comparing expression levels between pretreatment and after 3 months of treatment. The *IL5RA* mRNA levels were normalized to *GAPDH* and *TBP* expression values for each sample. Calculations were made by the comparative  $\Delta\Delta C_t$  method. All procedures followed the MIQE guidelines.

**Results:** *IL5RA* was one of the most differentially overexpressed coding transcripts in the peripheral blood of asthmatic patients ( $P = 8.63E-08$  and fold change of 2.22). In the qPCR validation study, *IL5RA* expression levels were significantly higher in asthmatic patients than in controls ( $P < 0.001$ ). Significant expression differences were present in different asthmatic types. In the biological drug study, patients treated with benralizumab showed a significant decrease in *IL5RA* expression and blood eosinophil counts. A notable improvement in ACT and lung function was also observed in these patients.

**Conclusions:** These results indicate that *IL5RA* is overexpressed in patients with different types of asthma. It could help identify which asthmatic patients will respond more efficiently to benralizumab, moving toward a more personalized asthma management. Although further studies are required, *IL5RA* could play a role as a biomarker and pharmacogenetic factor in asthma.

**Keywords:** asthma, pharmacogenetic biomarker, transcriptomic, *IL5RA*, benralizumab, precision medicine

## INTRODUCTION

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways affecting more than 300 million people worldwide, and its prevalence is increasing, becoming a health and economic problem (1). It is defined by variable expiratory airflow limitation and respiratory symptoms such as wheeze, cough and shortness of breath, which vary in frequency and intensity (2). Asthma is recognized as a heterogeneous syndrome with different underlying disease processes, determined by complex interactions between genetic and environmental factors. This variety of interactions results in different clinical presentations, phenotypes and response to treatment (3).

Despite the broad clinical spectrum of asthma, the presence of inflammation of the airway is a common pathologic feature and the primary treatment target. Nevertheless, the relationship between the intensity of inflammation and the severity of asthma has not been consistently established (4). The characteristic inflammatory pattern in most asthmatic patients includes an increase in type 2 helper T (Th2) lymphocytes, eosinophils, basophils, mast cells and type 2 innate lymphoid cells (ILC2). These effector cells release numerous mediating molecules that cause disease symptoms (5). Type 2 inflammation is characterized by an increase in type 2 cytokines, particularly IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13, involved in eosinophil activation and immunoglobulin E production (6).

Asthma comprises different phenotypes with similar clinical manifestations but probably involving different underlying mechanisms (7). These phenotypes have been characterized based on the age of onset of disease, clinical presentation, severity and presence of other disorders such as atopy and eosinophilia (8–10). Eosinophilic asthma is the best-studied inflammatory phenotype and is characterized by elevated eosinophils in peripheral blood and sputum. Patients in whom eosinophilic inflammation persists despite treatment with high doses of corticosteroids are often associated with more severe asthma and a higher risk of exacerbations (11, 12). Therefore, phenotype characterization in patients with severe uncontrolled or poorly controlled asthma could help in guiding specific treatments (13).

Asthma management aims to achieve and maintain control of the disease and reduce the risk of exacerbations. Understanding the underlying pathophysiologic mechanisms is necessary for stratifying patients toward individualized therapy. The implementation of precision medicine requires identifying specific biomarkers easily measurable in biological fluids, which can help in evaluating treatment effectiveness (14, 15). In this context, new biologic therapies are being developed targeting

cytokines and their receptors. IL-5 plays a crucial role in eosinophilic asthma pathophysiology and has been proposed as a novel therapeutic target. This cytokine is involved in the proliferation, differentiation, survival and activation of eosinophils by binding to the IL-5 receptor, located on the surface of eosinophils and basophils (16, 17). The IL-5 receptor is a heterodimer comprising one alpha subunit (IL-5RA) and one beta subunit, also found in both IL-3 and GM-CSF receptors (18).

In recent years, new drugs based on monoclonal antibodies have been developed against the action of IL-5 in eosinophil-mediated inflammation. Benralizumab is a humanized IgG1κ monoclonal antibody that binds to IL-5RA via its Fab domain with high affinity and specificity, blocking IL-5 signaling (19). Besides, this antibody can bind through its afucosylated Fc domain to the Fcγ receptor IIIa, expressed on the surface of natural killer cells, macrophages and neutrophils, thus inducing antibody-directed cell-mediated cytotoxicity of eosinophils and basophils. As a result, the administration of benralizumab results in a dramatic depletion of eosinophils counts in blood, sputum, airway mucosa and bone marrow (20). In this context, benralizumab has proved effectivity in treating patients with severe eosinophilic asthma, improving lung function and asthma control and reducing the rate of exacerbations (21).

The present study aims to investigate the expression of *IL5RA* in patients with different types of asthma and its role as a possible biomarker of response to treatment with benralizumab.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

The study involved 347 unrelated Caucasian individuals, 130 controls and 217 asthmatic patients, from the Allergy Department of the University Hospital of Salamanca. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) (PI 2020-02-433) and all participants signed a written informed consent. Controls had to fulfill the following criteria: (i) no symptoms or history of asthma, rhinitis or other pulmonary diseases; (ii) no symptoms or history of allergic diseases; (iii) negative skin prick tests with a battery of locally adapted common aeroallergens; (iv) absence of family history of asthma, rhinitis or atopy; and (v) age >16 years old. Asthmatic patients were recruited if they met all the following criteria: (i) at least two symptoms consistent with asthma (cough, wheeze and dyspnea); (ii) either a positive bronchodilator or methacholine test; and (iii) absence of other pulmonary disorders; and (iv) age >16 years old.

Lung function was measured by spirometry according to the American Thoracic Society (ATS) criteria (22). Asthma severity was established following the Spanish Guide for the Management of Asthma (GEMA) guidelines (7) and severe asthma was diagnosed according to the ERS/ATS criteria (23). Skin prick tests were performed with a battery of common aeroallergens (24), according to The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) recommendations (25). Skin tests were considered positive if there was at least one wheal reaction of >3 mm of diameter. Patients were considered atopic if they had a positive skin prick test to at least one allergen. Patients were considered monosensitized if they had a positive skin prick test result to only one group of aeroallergens (pollens, mites, molds or animal dander) and polysensitized if they had positive skin tests for two or more groups. Early-onset asthma was defined as the presence of asthma symptoms that appeared before 18 years, and late-onset asthma was defined as the presence after the age of 18 years (26). Asthmatic patients were classified into two subgroups, eosinophilic and non-eosinophilic asthma, according to the number of eosinophils (cut-off point of 150 cells per  $\mu\text{l}$ ) (2). Blood cell counts were determined on the XN-1000 hematology analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) and total serum IgE levels were measured using a fluoroenzyme immunoassay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

## Transcriptomic RNAseq Study

A total of 60 peripheral blood samples, 30 from healthy controls and 30 from patients with pollen allergic asthma, were selected for a transcriptomic RNAseq study. Total RNA extraction was performed using the Ambion RiboPure<sup>TM</sup>-Blood kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After Ambion DNase I treatment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), RNA was purified and concentrated with the RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany). All purification protocols were performed with the modifications indicated by the manufacturers. RNA was quantified by Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA integrity number (RIN) algorithm was used to determine RNA quality on the Agilent 2100 Bioanalyzer using the Eukaryote Total RNA Nano kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). RNA samples with a RIN value above 8 were used. Globin transcripts and ribosomal RNA were removed, and RNA was cleaved to prepare RNA strand-specific libraries. Finally, the generated libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

## Bioinformatic Analysis

In the bioinformatic analysis of the transcriptomic data, the FastQC software (27) was used to analyze the quality of raw reads. Sequencing reads were mapped on the human reference genome (GRCh38) using the TopHat2 software (28). The low-quality readings were removed with Picard Tools (29) and the unmapped and non-properly paired reads were re-mapped using the BWA-MEM algorithm (30). Gene and isoform prediction were estimated using the Cufflinks method (31). The HTSeq software (v.0.6.0) (32) was used to calculate gene expression levels. Differential expression analysis was performed by DESeq2

package (33) and only the transcripts with a fold change value  $\geq 1.5$  or  $\leq -1.5$  and a FDR-adjusted  $P$ -value  $< 0.05$  were considered as differentially expressed genes. Potential interactions between selected proteins were examined by cluster analysis using the STRING software (34), a database which include functional and physical associations between known and predicted proteins.

## qPCR Validation Assays

For the validation of the transcriptomic gene expression data, 287 peripheral blood samples were selected including 100 samples from controls and 187 from asthmatic patients. Total RNA was isolated using the RiboPure-Blood kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). DNase treatment was performed using Ambion DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Concentrations and RNA quality ratios were determined in a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). cDNA was generated from 500 ng of total RNA using Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ . Conditions for PCR included a single cycle and incubation periods of 65°C for 5 min, 25°C for 10 min, 50°C for 50 min, 85°C for 5 min, and 37°C for 20 min.

qPCR reactions were performed in a LightCycler480 system (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). *IL5RA* primers were designed using Primer 3.0 (35) and the Beacon Designer (36) software. *GAPDH* and *TBP* reference gene primers were chosen from The Real Time ready Human Reference GenePanel (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). The sequence of the primers used are shown in **Table 1**. Primers efficacies were analyzed by amplifying serial dilutions of cDNA sample of known concentration and according to the following equation:  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ . All efficiencies ranged from 90 to 110%. The reaction mixture in each well-contained a final volume of 15  $\mu\text{l}$  based on 7.5  $\mu\text{l}$  of Master Mix SYBR Green I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), 10  $\mu\text{M}$  of each primers and 20 ng of cDNA. All reactions were performed in triplicate. In each experiment, non-template controls and calibrator were included. The PCR conditions included 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 10 s at 95°C for denaturation, 10 s at 60°C for annealing and 10 s at 72°C for polymerization. Finally, melting curve analyses were carried out to verify the specificity of the qPCR products. *IL5RA* mRNA levels were normalized to *GAPDH* and *TBP* expression levels

**TABLE 1** | Sequences of primers used in the qPCR assay.

|              | Primer  | Sequence 5' → 3'        |
|--------------|---------|-------------------------|
| <i>IL5RA</i> | Forward | TGAAAGAGTGAAGAACCGCC    |
|              | Reverse | CCTGGCCTGAGAATGCG       |
| <i>GAPDH</i> | Forward | CTCTGCTCCTCTGTTTCGAC    |
|              | Reverse | ACGACCAAATCCGTTGACTC    |
| <i>TBP</i>   | Forward | GAACATCATGGATCAGAACAACA |
|              | Reverse | ATAGGGATTCCGGGAGTCAT    |

**TABLE 2** | Characteristics of the study population in the RNAseq study and the validation analyses.

|                            | <b>N</b>         | <b>Sex<br/>(% Female)</b> | <b>Age<br/>(Mean ± SD)</b> | <b>FeNO, ppb<br/>(Mean ± SD)</b> | <b>IgE, kU/l (Median ±<br/>IQR)</b> |
|----------------------------|------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>RNAseq study</b>        |                  |                           |                            |                                  |                                     |
| Controls                   | 30               | 46.7                      | 57 ± 17                    | -                                | 46.7 ± 87.8                         |
| Asthmatic patients         | 30               | 56.7                      | 30 ± 13                    | -                                | 179.0 ± 239.0                       |
| <b>Validation analysis</b> |                  |                           |                            |                                  |                                     |
| Controls                   | 100              | 66.0                      | 57 ± 17                    | -                                | 28.8 ± 57.7                         |
| Asthmatic patients         | 187              | 55.1                      | 45 ± 19                    | 44.8 ± 48.3                      | 174.0 ± 398.2                       |
| Non-allergic asthma (NAA)  | 76               | 60.5                      | 58 ± 15                    | 38.1 ± 40.6                      | 77.0 ± 118.8                        |
| NAA without NP             | 33               | 72.7                      | 56 ± 16                    | 24.8 ± 19.3                      | 37.9 ± 103.5                        |
| NAA with NP                | 43               | 51.2                      | 61 ± 14                    | 52.2 ± 51.7                      | 83.0 ± 258.7                        |
| Allergic asthma (AA)       | 111              | 51.4                      | 35 ± 16                    | 49.8 ± 53.0                      | 312.5 ± 472.3                       |
| AA without NP              | 82               | 57.3                      | 31 ± 14                    | 39.8 ± 29.5                      | 312.5 ± 445.5                       |
| AA with NP                 | 29               | 34.5                      | 46 ± 17                    | 79.6 ± 88.7                      | 307.0 ± 747.0                       |
| Early-onset asthma         | 76               | 61.8                      | 31 ± 17                    | 42.5 ± 43.1                      | 271.0 ± 402.1                       |
| Late-onset asthma          | 111              | 50.5                      | 54 ± 16                    | 46.5 ± 51.9                      | 126.0 ± 406.5                       |
| Non-eosinophilic asthma    | 32 <sup>a</sup>  | 59.4                      | 44 ± 17                    | 26.4 ± 18.2                      | 109.0 ± 260.5                       |
| Eosinophilic asthma        | 120 <sup>a</sup> | 53.3                      | 46 ± 20                    | 49.7 ± 54.5                      | 196.0 ± 405.4                       |

SD, standard deviation; IQR, interquartile range.

<sup>a</sup>Blood eosinophil counts were not available for all non-eosinophilic and eosinophilic asthma patients.

using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  by the comparative  $\Delta\Delta Ct$  method (37). All procedures followed the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (MIQE) guidelines (38).

## Pharmacogenetic Study

A proof-of-concept study of the *IL5RA* expression in peripheral blood before and after 3 months of treatment with benralizumab was performed in five severe eosinophilic asthmatic patients. Benralizumab was administered at a dose of 30 mg by subcutaneous injection once every 4 weeks. Asthma control test (ACT), fractional exhaled nitric oxide (FeNO) and lung function parameters were performed before and after 3 months of treatment. Patients were considered responders in the ACT score if they achieved a score of 25 or an increase of 3 or more points after 3 months of treatment. Also, they were considered FEV1 responders if they achieved a FEV1.0  $\geq$  200 ml or FEV1.0  $\geq$  12% after 3 months of treatment. As only three doses were evaluated, exacerbations were not considered. Blood samples were collected and lung function tests were performed at each time point. All patients provided their informed consent to receive benralizumab therapy.

## Statistical Analysis

Descriptive analysis was carried out using central (mean and median) and dispersion tendency (standard deviation and interquartile range) measurements, followed by bivariate and multivariate analysis. The normality distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnov test and the homoscedasticity was also tested before applying statistical tests. Continuous variables were evaluated using either ANOVA or Kruskal-Wallis test. Statistical significance was assessed by Wilcoxon's test for changes before

**TABLE 3** | The 26 protein-coding transcripts most differentially expressed ( $P < 0.025$ ) between the group of controls and patients with allergic asthma, listed by their fold change value.

| <b>Ensemble ID</b>               | <b>External ID gene</b> | <b>Fold change</b> | <b>P-value</b> |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------|
| <b>Up-regulated expression</b>   |                         |                    |                |
| ENSG00000161905                  | <i>ALOX15</i>           | 2.45               | 3.91E-05       |
| ENSG00000091181                  | <i>IL5RA</i>            | 2.22               | 8.63E-08       |
| ENSG00000103056                  | <i>SMPD3</i>            | 2.16               | 1.44E-07       |
| ENSG00000105205                  | <i>CLC</i>              | 2.04               | 4.63E-06       |
| ENSG00000183134                  | <i>PTGDR2</i>           | 1.99               | 2.64E-06       |
| ENSG00000134489                  | <i>HRH4</i>             | 1.93               | 7.21E-07       |
| ENSG00000152207                  | <i>CYSLTR2</i>          | 1.84               | 1.15E-09       |
| ENSG00000171659                  | <i>GPR34</i>            | 1.83               | 1.27E-08       |
| ENSG00000143297                  | <i>FCRL5</i>            | 1.75               | 3.18E-05       |
| ENSG00000255587                  | <i>RAB44</i>            | 1.74               | 8.10E-06       |
| ENSG00000132465                  | <i>JCHAIN</i>           | 1.70               | 0.007          |
| ENSG00000276231                  | <i>PIK3R6</i>           | 1.67               | 9.12E-06       |
| ENSG00000131203                  | <i>IDO1</i>             | 1.67               | 0.014          |
| <b>Down-regulated expression</b> |                         |                    |                |
| ENSG00000118113                  | <i>MMP8</i>             | -2.75              | 3.17E-04       |
| ENSG00000012223                  | <i>LTF</i>              | -2.35              | 4.79E-04       |
| ENSG00000124469                  | <i>CEACAM8</i>          | -2.19              | 2.47E-03       |
| ENSG00000123689                  | <i>G0S2</i>             | -2.02              | 4.95E-03       |
| ENSG00000118520                  | <i>ARG1</i>             | -2.00              | 4.51E-05       |
| ENSG00000168209                  | <i>DDIT4</i>            | -1.91              | 4.11E-04       |
| ENSG00000179094                  | <i>PER1</i>             | -1.86              | 6.80E-04       |
| ENSG00000096006                  | <i>CRISP3</i>           | -1.78              | 0.002          |
| ENSG00000005961                  | <i>ITGA2B</i>           | -1.75              | 6.90E-04       |
| ENSG00000179869                  | <i>ABCA13</i>           | -1.73              | 0.001          |
| ENSG00000100985                  | <i>MMP9</i>             | -1.69              | 0.001          |
| ENSG00000124102                  | <i>PI3</i>              | -1.65              | 7.32E-04       |
| ENSG00000122025                  | <i>FLT3</i>             | -1.64              | 3.66E-05       |

and after treatment. A  $P$ -value  $<0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS Statistics version 21 (IBM, Armonk, NY, USA). Graphs were plotted using GraphPad Prism version 6 (San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### Study Population

The phenotypic characteristics of the studied subjects of the RNAseq study and the validation analysis are shown in **Table 2**. In both assays, control individuals were older to permit a more extended period for asthma to have appeared. Thus, age was significantly higher in the control group than in patients ( $P < 0.001$ ), except in the case of non-allergic and late-onset asthma groups, in which the disease had begun at older ages. According

to the inclusion criteria, total IgE levels were significantly higher in all patient groups than in controls ( $P \leq 0.001$ ). Moderate persistent asthma was the most common type in both the RNAseq study and the validation analysis (43.3 and 45.7%, respectively), followed by intermittent asthma (33.3 and 26.3%, respectively). The most common aeroallergen sensitization in the validation analysis patients was pollen, followed by animal dander. No patient was receiving oral corticosteroids.

### Transcriptomic RNAseq Study

Significant differences between control and asthmatic patients were observed in the transcriptomic assay ( $P < 0.05$ ). **Table 3** shows the top 26 most differentially expressed transcripts between controls and patients with allergic asthma, according to  $P$ -value and fold change. The main biological roles of these

**TABLE 4** | Gene Ontology term enrichment analysis of the more differentially expressed genes.

| Term ID                      | Biological process                             | FDR      | Genes  |
|------------------------------|--|----------|--|
| <b>Immune system</b>         |  |          |  |
| GO:0002376                   | Immune system process                          | 1.74E-07 | <i>ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, IDO1, IL5RA, LTF, MMP8, MMP9, PI3, PTGDR2, RAB44, SMPD3.</i>   |
| GO:0006955                   | Immune response                                | 5.94E-06 | <i>ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, CYSLTR2, IL5RA, LTF, MMP8, MMP9, PI3, PTGDR2, RAB44.</i>   |
| GO:0043312                   | Neutrophil degranulation                       | 7.28E-05 | <i>ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, LTF, MMP8, MMP9, RAB44.</i>  |
| <b>Cellular process</b>      |  |          |  |
| GO:0001775                   | Cell activation                                | 1.32E-06 | <i>ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, FLT3, ITGA2B, LTF, MMP8, MMP9, PIK3R6, RAB44.</i>  |
| GO:0019221                   | Cytokine-mediated signaling pathway            | 8.10E-03 | <i>ALOX15, FLT3, IL5RA, MMP9.</i>  |
| GO:0007166                   | Cell surface receptor signaling pathway        | 0.017    | <i>ALOX15, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, IL5RA, MMP9.</i>  |
| GO:0007165                   | Signal transduction                            | 0.012    | <i>ALOX15, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, HRH4, IL5RA, MMP9, PIK3R6, PTGDR2.</i>   |
| <b>Cellular response</b>     |  |          |  |
| GO:0050896                   | Response to stimulus                           | 2.52E-06 | <i>ABCA13, ALOX15, ARG1, CEACAM8, CRISP3, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, HRH4, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP8, MMP9, PER1, PI3, PIK3R6, PTGDR2, RAB44.</i> |
| GO:0006952                   | Defense response                               | 9.28E-05 | <i>ALOX15, ARG1, CRISP3, DDIT4, HRH4, IDO1, IL5RA, LTF.</i>  |
| GO:0006950                   | Response to stress                             | 3.00E-04 | <i>ALOX15, ARG1, CRISP3, DDIT4, HRH4, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP9, PIK3R6.</i>  |
| GO:0006954                   | Inflammatory response                          | 2.50E-03 | <i>ALOX15, HRH4, IDO1, IL5RA.</i>  |
| GO:0071345                   | Cellular response to cytokine stimulus         | 9.30E-03 | <i>ALOX15, ARG1, FLT3, IL5RA, MMP9.</i>  |
| <b>Biological regulation</b> |  |          |  |
| GO:0048583                   | Regulation of response to stimulus             | 6.84E-05 | <i>ALOX15, ARG1, CLC, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, HRH4, IDO1, LTF, MMP9, PER1, PIK3R6, PTGDR2.</i>   |
| GO:0009966                   | Regulation of signal transduction              | 6.84E-05 | <i>ALOX15, ARG1, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, HRH4, LTF, MMP9, PER1, PIK3R6, PTGDR2.</i>  |
| GO:0051239                   | Regulation of multicellular organismal process | 2.30E-04 | <i>ARG1, CLC, CYSLTR2, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP9, PER1, PIK3R6, PTGDR2.</i>   |
| GO:0001817                   | Regulation of cytokine production              | 6.20E-03 | <i>ARG1, CLC, IDO1, IL5RA, LTF, PER1.</i>  |
| GO:0050794                   | Regulation of cellular process                 | 0.018    | <i>ALOX15, ARG1, CLC, CRY2, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, HRH4, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP9, PER1, PI3, PIK3R6, PTGDR2, SMPD3.</i>                     |

FDR, false discovery rate.

genes are described in **Table 4**, which highlights the biological processes related to the immune system. Among these genes, *IL5RA* attracted our attention as a putative asthma biomarker because it was the best positioned when considering both fold change and *P*-value data, and because of its role in different immune processes.

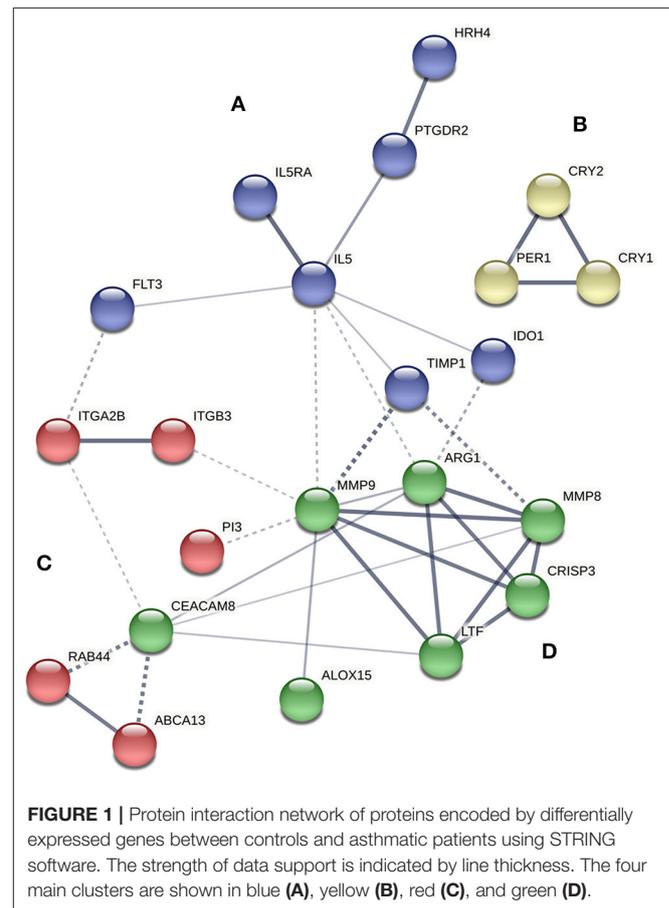
A protein-protein interaction network analysis was performed with the selected transcripts to analyze the interactions among them. Four main clusters were obtained, referred to as clusters A, B, C, and D (**Figure 1**). *IL5RA* was found in cluster A, which included seven genes: *IL5RA*, *IL5*, *FLT3* (receptor-type tyrosine-protein kinase), *PTGDR2* (prostaglandin D2 receptor 2), *HRH4* (histamine H4 receptor), *TIMP1* (metalloproteinase inhibitor 1) and *IDO1* (indoleamine 2,3-dioxygenase 1). Regarding the role of *IL5RA* in biological processes, the most significant terms were “immune system process” (FDR 1.74E-07) and “response to stimulus” (FDR 2.52E-06) (**Table 4**), as well as in Reactome pathways, such as “signaling by interleukins” and “RAF/MAP kinase cascade.”

### qPCR Validation Assays

A validation qPCR analysis was performed to confirm the differences observed in the RNAseq study. Patients were classified according to the presence of atopy and nasal polyposis (NP), the severity of asthma and the age of onset of asthma. As summarized in **Table 5**, asthmatic patients had significantly higher levels of peripheral blood eosinophil counts and *IL5RA* expression than controls ( $P < 0.001$ ). That also occurred in all subgroups except for non-eosinophilic asthma ( $P = 0.707$ ). Interestingly, the lower increase in *IL5RA* expression levels was observed in patients with non-allergic asthma (NAA) without NP ( $10.3 \pm 11.2$ ;  $P = 0.037$ ). Significant differences were observed when comparing these patients with the subgroup of patients who had NAA with NP ( $P = 0.047$ ). These significant differences were not observed among the other subgroups, although *IL5RA* expression levels were significantly higher in eosinophilic asthma than in non-eosinophilic asthma ( $P < 0.001$ ). Also, *IL5RA* expression levels were slightly higher in monosensitized patients to pollens.

In general, there was an association between asthma severity and increased levels of *IL5RA* expression (**Table 5**). Patients with intermittent asthma had the lowest expression levels of *IL5RA* ( $12.0 \pm 13.7$ ), while patients with severe asthma had the highest levels ( $19.9 \pm 20.3$ ;  $P = 0.056$ ). In addition, there was a statistically significant association between asthma severity and the number of eosinophils ( $P = 0.015$ ).

To discard a possible influence of anti-inflammatory treatments on the expression of *IL5RA*, patients receiving inhaled corticosteroids or allergen immunotherapy were compared with patients not receiving these treatments. One hundred thirty-nine patients were receiving therapy with inhaled corticosteroids; 54 patients were receiving allergen immunotherapy. No statistically significant differences in the *IL5RA* expression levels were observed between patients receiving corticosteroid treatment or allergen immunotherapy and patients not receiving these treatments.



The relationship between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts was also analyzed, observing some correlation with a Pearson’s correlation coefficient of 0.520 ( $P < 0.001$ ). Remarkably, as shown in **Figure 2A**, there were patients with the same eosinophil counts and very different expression levels of *IL5RA*. In addition, an eosinophil count-dependent increase in both *IL5RA* expression levels and dispersion was observed when the eosinophil counts were divided into quartiles (**Figure 2B**). This fact was also observed according to asthma severity. The more severe the asthma was, the greater the *IL5RA* levels were (**Figure 3**).

### Pharmacogenetic Study

The clinical parameters of the patients included in the proof-of-concept study are shown in **Table 6**. Three of the patients had NP, and three were sensitized to pollens, without present clinical relevance. All patients were in treatment with high dose inhaled corticosteroids and tiotropium bromide at entry, although no patient was treated with oral corticosteroids. Before treatment with benralizumab, *IL5RA* expression levels and eosinophil counts were high in two patients, intermediate in two, and lower in another one. After 3 months of treatment, a dramatic reduction (90–100%) of peripheral eosinophil count was observed in all patients ( $P = 0.042$ ) (**Figure 4A**). *IL5RA*

**TABLE 5** | Blood eosinophil counts and *IL5RA* expression levels according to asthma diagnosis, sensitization and severity.

|                                 | <b>N</b> | <b>Eosinophils/<math>\mu</math>l<sup>a</sup><br/>(Mean <math>\pm</math> SD)</b> | <b><i>IL5RA</i>, relative<br/>expression<br/>(Mean <math>\pm</math> SD)</b> | <b>P-value<sup>b</sup></b> | <b>P-value<sup>c</sup></b> |
|---------------------------------|----------|---|---|----------------------------|----------------------------|
| Controls                        | 100      | 127.8 $\pm$ 89.4  | 7.1 $\pm$ 6.3   |                            |                            |
| Asthmatic patients              | 187      | 380.4 $\pm$ 331.0   | 15.5 $\pm$ 15.4   | <0.001                     |                            |
| Non-allergic asthma (NAA)       | 76       | 373.4 $\pm$ 367.1   | 13.9 $\pm$ 13.7   | <0.001                     |                            |
| NAA without NP                  | 33       | 223.7 $\pm$ 169.4   | 10.3 $\pm$ 11.2   | 0.037                      | 0.047                      |
| NAA with NP                     | 43       | 510.0 $\pm$ 441.6   | 16.6 $\pm$ 14.9   | <0.001                     |                            |
| Allergic asthma (AA)            | 111      | 385.6 $\pm$ 303.3   | 16.6 $\pm$ 16.4   | <0.001                     |                            |
| AA without NP                   | 82       | 308.4 $\pm$ 222.9   | 16.5 $\pm$ 17.0   | <0.001                     | 0.982                      |
| AA with NP                      | 29       | 577.1 $\pm$ 386.9   | 16.6 $\pm$ 15.0   | <0.001                     |                            |
| Monosensitized to pollens       | 22       | 478.7 $\pm$ 301.6   | 20.2 $\pm$ 17.3   | <0.001                     |                            |
| Monosensitized to animal dander | 6        | 300.0 $\pm$ 205.2   | 21.4 $\pm$ 29.2   | 0.050                      |                            |
| Monosensitized to mites         | 10       | 411.1 $\pm$ 513.4   | 14.5 $\pm$ 14.5   | 0.064                      |                            |
| Polysensitized                  | 73       | 358.8 $\pm$ 266.4   | 15.2 $\pm$ 14.7   | <0.001                     |                            |
| Intermittent asthma             | 49       | 290.8 $\pm$ 199.3   | 12.0 $\pm$ 13.7   | 0.003                      | 0.056                      |
| Mild persistent asthma          | 29       | 337.4 $\pm$ 192.7   | 17.7 $\pm$ 18.4   | <0.001                     |                            |
| Moderate persistent asthma      | 85       | 380.5 $\pm$ 340.9   | 15.4 $\pm$ 13.4   | <0.001                     |                            |
| Severe persistent asthma        | 23       | 574.0 $\pm$ 494.3   | 19.9 $\pm$ 20.3   | <0.001                     |                            |
| Early-onset asthma              | 76       | 364.0 $\pm$ 307.4   | 14.5 $\pm$ 14.4   | <0.001                     |                            |
| Late-onset asthma               | 111      | 391.1 $\pm$ 346.7   | 16.1 $\pm$ 16.0   | <0.001                     |                            |
| Non-eosinophilic asthma         | 32       | 98.5 $\pm$ 66.1   | 6.6 $\pm$ 5.8   | 0.707                      | <0.001                     |
| Eosinophilic asthma             | 120      | 455.6 $\pm$ 332.9   | 18.2 $\pm$ 15.4   | <0.001                     |                            |

SD, standard deviation.

<sup>a</sup>All P-value results for blood eosinophil counts were significant ( $P < 0.05$ ) among each patient group vs. controls, except for non-eosinophilic asthma ( $P = 0.082$ ).

<sup>b</sup>P-value obtained for the comparison of *IL5RA* expression levels from each patient group vs. controls.

<sup>c</sup>P-value obtained for comparison of *IL5RA* expression levels from NAA without NP vs. NAA with NP; AA without NP vs. AA with NP; intermittent asthma vs. severe persistent asthma; and non-eosinophilic asthma vs. eosinophilic asthma, respectively.

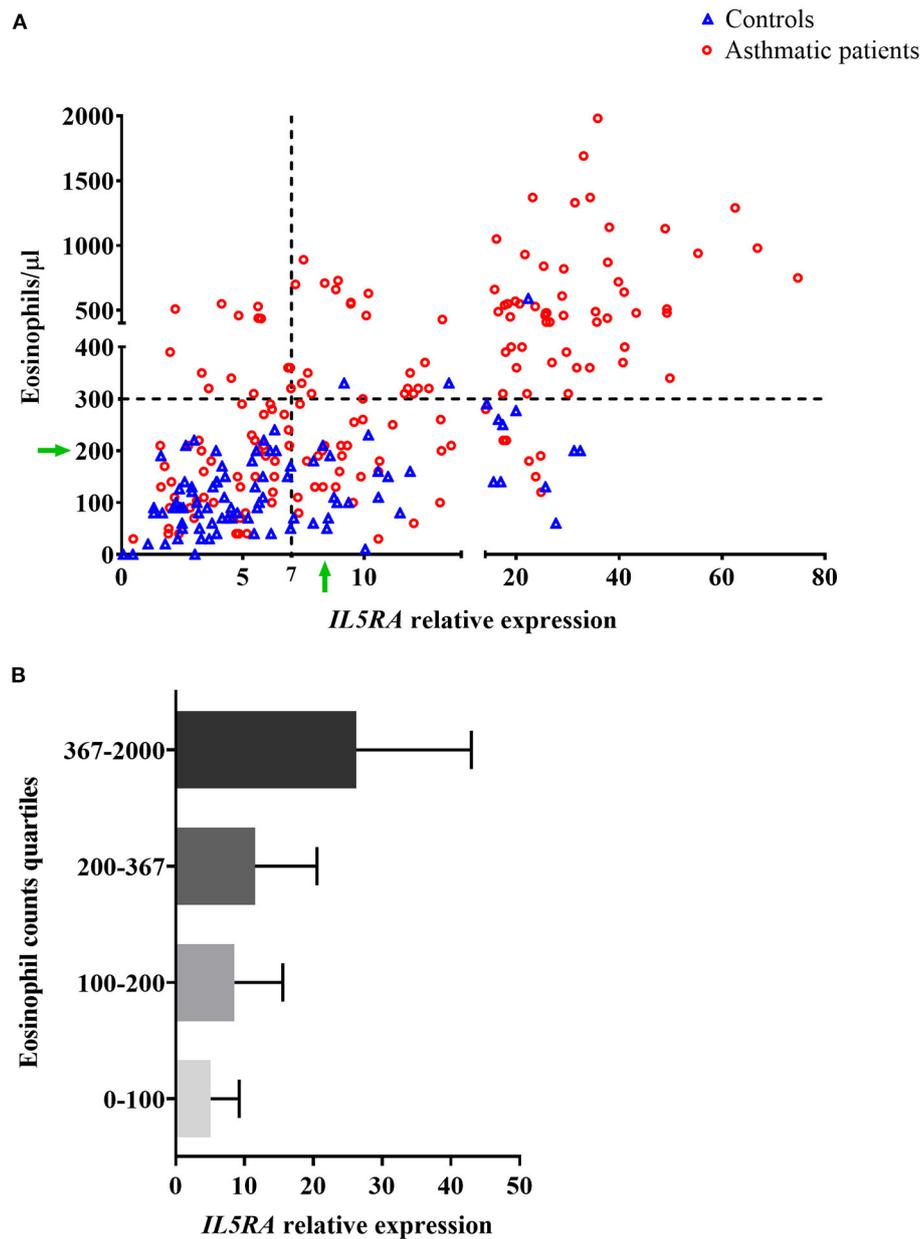
expression levels were reduced between 70–96% after treatment ( $P = 0.043$ ) (**Figure 4B**). A strong correlation was found between *IL5RA* levels and peripheral blood eosinophil counts at pretreatment (**Figure 4C**) with a Pearson's correlation coefficient of 0.940 ( $P = 0.017$ ). In addition, all patients achieved an ACT score  $>20$  and a mean increase of 30% in FEV1, except patient 4. This patient had the highest pretreatment levels of *IL5RA* expression, and the improvement of FEV1 reached 50% (**Figure 5**).

## DISCUSSION

Novel biological therapies have increased clinical treatment options for asthma. The necessity of identifying biomarkers to achieve a proper selection of these expensive compounds has led to the application of transcriptomic methods as a starting point for discovering new genes involved in the disease. In a previous transcriptomic study, increased expression of interleukin-4 receptor (IL-4R) on B cells was observed in allergic asthma patients (39). In the present study, we have focused on another type 2 cytokine, IL-5, which is also involved in asthma pathophysiology. Thus, IL-5RA has been analyzed due to its implication with eosinophilic-mediated immunity.

In the RNAseq study, significant gene expression differences were observed between the peripheral blood samples of controls and allergic asthmatic patients, with a top 26 differentially expressed genes, as shown in **Table 3**. Interestingly, most of these genes are involved in biological processes related to the immune system, suggesting their potential implication in the pathophysiology of asthma. *IL5RA* turned out to be one of the genes with the highest differential expression, which is also supported by its relevant role in asthma (16, 17) and its interactions with other immune response effector molecules that were detected in the protein-protein interaction network analysis. All proteins of the *IL5RA* cluster had already been reported to participate in functions related to inflammatory response, signal transduction and eosinophil mediated immunity, such as eosinophil chemotaxis, regulation of type 2 cytokine production or cell differentiation and proliferation (40–44). These functions are consistent with the biological processes obtained in our transcriptomic study, described in **Table 4**. Furthermore, differential *IL5RA* expression levels have also been described in the literature, both between asthmatic patients and controls (45, 46) and pre and post-benralizumab treatment samples (47).

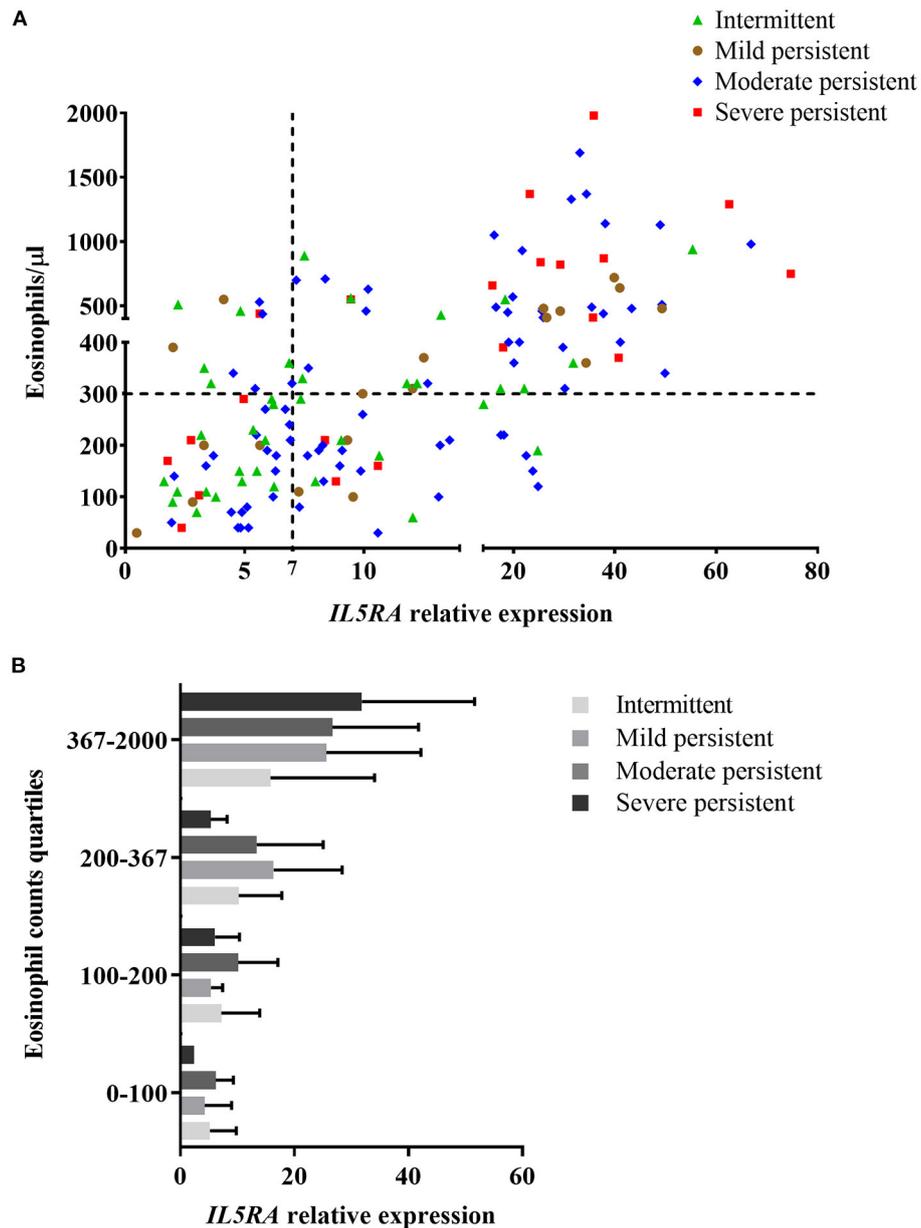
Following the results obtained in the RNAseq study, we decided to carry out a qPCR validation study to evaluate



**FIGURE 2 | (A)** Correlation between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts of controls and asthmatic patients from the validation analysis. Four quadrants were obtained by dividing according to the normality values for eosinophil counts (300/ $\mu\text{l}$ ) and *IL5RA* expression (7-fold). The green arrows indicate a constant value of eosinophils at which a wide range of expressed *IL5RA* values is observed, and vice versa. **(B)** *IL5RA* expression levels (mean  $\pm$  SD) in eosinophil count quartiles.

the performance of the peripheral blood *IL5RA* expression levels in the diagnosis of asthma. Levels were significantly higher in asthmatic patients than in controls, independently of the type of asthma (Table 5). This result suggests that it could be a potential marker in the diagnosis of asthma. One main limitation is its correlation with eosinophil counts, as a moderate correlation was observed ( $r = 0.520$ ). Nevertheless, as shown by green arrows in Figure 2A, there was a notable dispersion of values, and some patients had high *IL5RA*

expression levels compared to their eosinophil counts and vice versa. Also, we found that patients with the same eosinophil counts can show very different *IL5RA* expression levels. For example, *IL5RA* expression values ranging from 4 to 32 were observed for counts of 200 eosinophils/ $\mu\text{l}$ . This distribution was also found in controls, as variability in *IL5RA* expression levels was observed at low eosinophil counts. However, the dispersion was considerably more significant in patients with high eosinophil counts. This dispersion was also observed



**FIGURE 3 | (A)** Correlation between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts according to asthma severity of patients from the validation analysis. Four quadrants were obtained by dividing according to the normality values for eosinophil counts (300/ $\mu$ l) and *IL5RA* expression (7-fold). **(B)** *IL5RA* expression levels (mean  $\pm$  SD) in eosinophil count quartiles according to asthma severity.

in all subgroups according to asthma severity. It can be speculated that differences could be due to different levels of expression of the *IL5RA* by eosinophils, caused by unknown elements, such as genetic or environmental factors driving the expression of the receptor. Besides, differences could reflect the expression by other cell types, such as basophils (20). In this sense, basophils have been involved in the immunology of eosinophilic asthma (48). Furthermore, this differential expression of *IL5RA* could be related to the different responses observed to biologics directed against *IL5RA*. In fact, in the

proof-of-concept study, the patient with the highest levels of *IL5RA* expression was the best responder in terms of ACT and FEV1 (see below).

Concerning the different types of asthma, *IL5RA* expression levels were elevated in both allergic and non-allergic asthma. This finding is in agreement with the fact that responses to benralizumab are not influenced by the atopy status (49). In addition, we observed a progressive increase in the expression of *IL5RA* levels from intermittent to severe asthma, which could be related to the number of eosinophils to a great extent.

**TABLE 6** | *IL5RA* expression levels and clinical parameters in pretreatment and after 3 months of benralizumab treatment.

|                              | Eosinophils/ $\mu$ l | <i>IL5RA</i> ,<br>relative<br>expression | FEV1, ml | FeNO, ppb | ACT |
|------------------------------|----------------------|--|----------|-----------|-----|
| <b>Patient 1</b>             |                      |  |          |           |     |
| Pretreatment                 | 630                  | 1.8                                      | 1,897    | 43        | 13  |
| 3 months                     | 10                   | 0.6                                      | 2,462    | 68        | 22  |
| <b>Patient 2</b>             |                      |  |          |           |     |
| Pretreatment                 | 820                  | 29.2                                     | 1,960    | -         | 8   |
| 3 months                     | 10                   | 1.2                                      | 2,520    | -         | 24  |
| <b>Patient 3<sup>a</sup></b> |                      |  |          |           |     |
| Pretreatment                 | 437                  | 10.9                                     | 2,310    | 154       | 12  |
| 3 months                     | 0                    | 1.0                                      | 3,100    | 113       | 22  |
| <b>Patient 4</b>             |                      |  |          |           |     |
| Pretreatment                 | 1,290                | 62.5                                     | 1,890    | 66        | 19  |
| 3 months                     | 0                    | 4.7                                      | 2,840    | 198       | 25  |
| <b>Patient 5<sup>a</sup></b> |                      |  |          |           |     |
| Pretreatment                 | 630                  | 12.6                                     | 2,060    | 65        | 12  |
| 3 months                     | 10                   | 0.8                                      | 2,630    | 64        | 21  |

<sup>a</sup>Patients previously treated with other biological drugs, but no improvement was observed.

One striking feature was that *IL5RA* expression levels were significantly higher in non-allergic asthma patients with NP respect to non-allergic asthma patients without NP. In this sense, it has been described that *IL5RA* expression is increased in patients with NP, particularly those with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease (50). Whether this could be related to response to the treatment with biologics in patients with chronic rhinosinusitis with NP remains speculative.

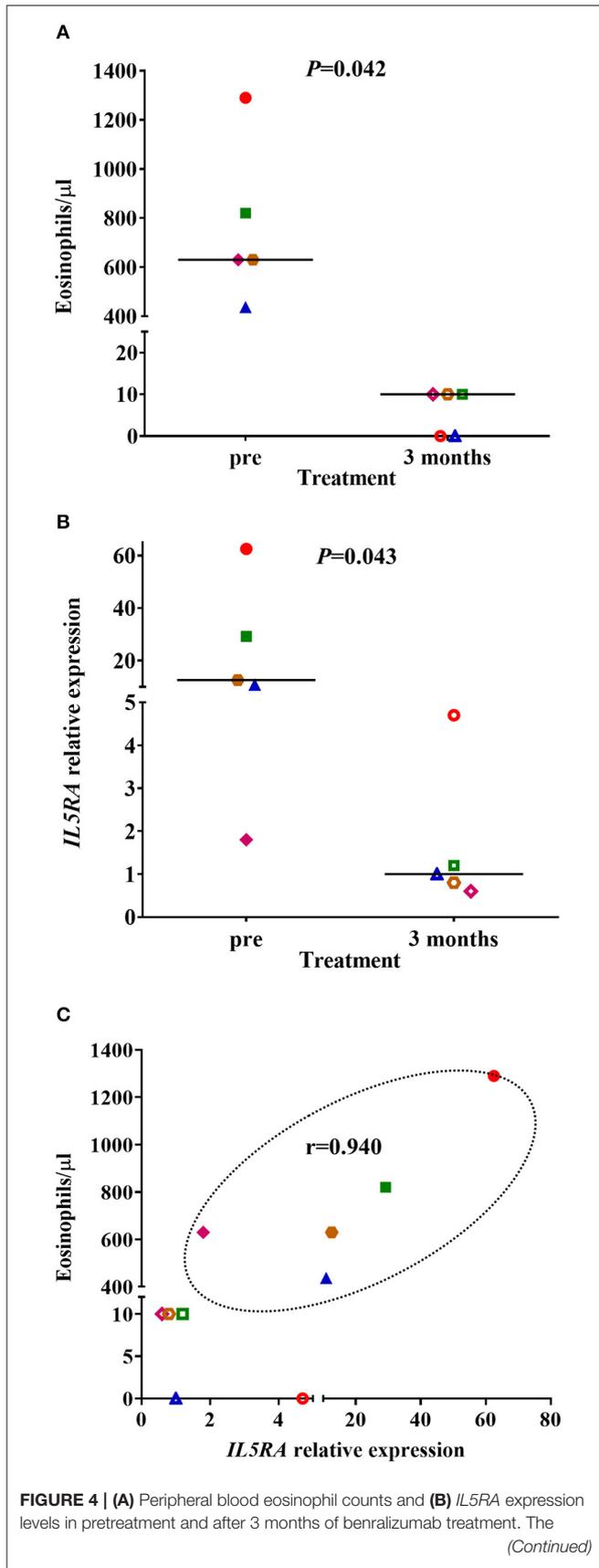
In the proof-of-concept pharmacogenetic study, we selected peripheral blood because it is easily accessible, a crucial characteristic of an ideal biomarker (51). In addition, as we were trying to check the *IL5RA* expression as a biomarker, we selected benralizumab treatment as it is directed against *IL5RA* (21). All patients were good responders, as demonstrated by the increase of ACT and FEV1. It is known that anti-IL-5 and anti-IL-5RA treatments do not significantly modify FeNO levels (52), as it happened in most of our patients. The increase observed in some of them could be due to acute exposure to allergens (53) because adherence to inhaled corticosteroids seemed to be appropriated. Due to the short follow-up period, exacerbations were not considered, although no patient had an exacerbation after treatment with benralizumab; even more, they almost did not require rescue bronchodilators. All patients showed a dramatic decrease in peripheral blood eosinophil counts with values between 0 and 10 eosinophils/ $\mu$ l, as observed in the phase III studies (21). The pretreatment levels of *IL5RA* were highly variable in patients, ranging from 1.8 to 62.5, and were strongly correlated with pretreatment peripheral blood eosinophil counts ( $r = 0.940$ ). Thus, we believe that *IL5RA* expression level could add value to peripheral blood eosinophil counts. Accordingly, the patient with the highest *IL5RA* expression levels showed the best lung function response and reached an ACT of 25. In a very recent study, Nakajima et al. (54) described a group of super

responder to benralizumab patients that had higher expression of genes related to eosinophils in peripheral blood, together with significant reductions in the expressions of genes associated with eosinophilic inflammatory responses after treatment with benralizumab, with *IL5RA* among them. So, the expression of *IL5RA* could be a useful biomarker of response, as it seems to be more discriminant than eosinophil counts.

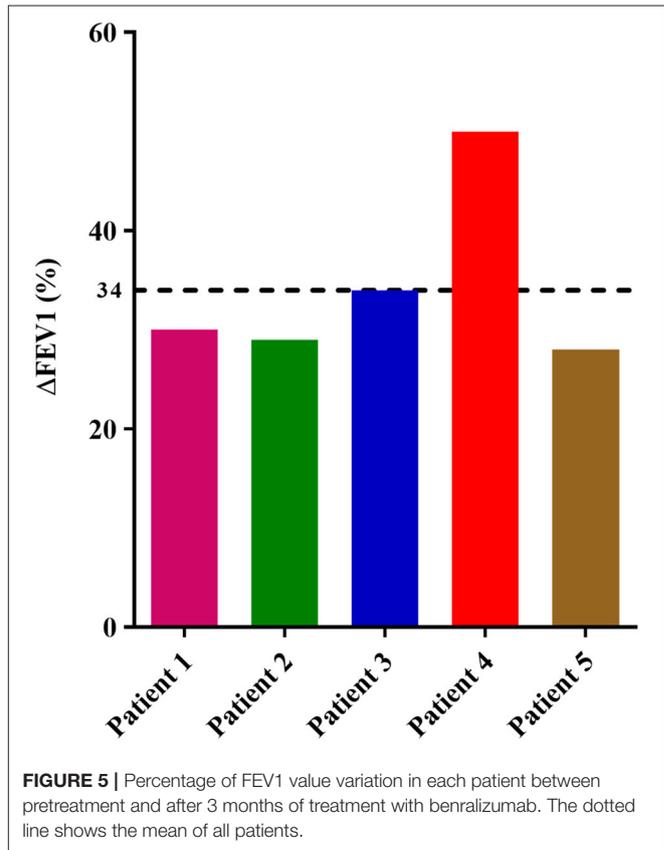
This study is not without limitations since it is a unicentric study, and the number of patients is low. Nevertheless, this fact gives uniformity to the study. Additionally, we have mainly focused on *IL5RA*, and other genes may also be relevant in response to treatment. Nevertheless, we selected *IL5RA* by its crucial implication in the immunology of T2-asthma and because benralizumab is directed against this molecule. Finally, the proof-of-concept study has a limited number of patients and a short period of follow-up.

## CONCLUSION

There is an urgent need for biomarkers of response to biologics in asthma. In this study, we have explored the peripheral blood *IL5RA* expression levels as a possible useful biomarker for several reasons. First, *IL5RA* is a plausible etiopathogenic target and a biologic target for the treatment of asthma. Second, peripheral blood is easily accessible. Third, its expression is easily measurable and reproducible. Fourth, it varies in different types of asthma. And, finally, although it has a moderate correlation with eosinophils, *IL5RA* expression levels probably do not reflect the same, as these levels vary for a particular count of peripheral blood eosinophils. Further studies are required for confirming the findings of the present study.



**FIGURE 4 |** median of each group is also shown. **(C)** Correlation between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts at pretreatment and after 3 months of benralizumab treatment. Pearson's correlation coefficient in the pretreatment is also shown. Each symbol represents a patient (◆ Patient 1; ■ Patient 2; ▲ Patient 3; ● Patient 4; ● Patient 5). The filled symbols correspond to the pretreatment and the empty symbols to after 3 months of benralizumab treatment.



**DATA AVAILABILITY STATEMENT**

The required data is now publicly accessible in the NCBI repository with the code PRJNA686899.

**ETHICS STATEMENT**

The studies involving human participants were reviewed and approved by The Clinical Research Ethics Committee of the Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) (PI 2020-02-433). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

SE-P, DH-J, AG-S, ME, MM, JR-G, JT, MI-G, CS, and ID have contributed in designing research studies, conducting experiments, acquiring data, analyzing data, and writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund (Grant Nos. PI17/00818 and PI20/00268), by a grant of the Junta

de Castilla y León and the European Regional Development Fund (IES161P20) and by a grant of the Instituto de Salud Carlos III to the Red temática de investigación en salud Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas (ARADYAL) RD16/0006/0019.

## REFERENCES

- Vos T, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abate KH, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet*. (2017) 390:1211–59. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2
- Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. (2020). Available online at: <https://www.ginasthma.org/> (accessed April 25, 2020).
- Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* (2012) 18:716–25. doi: 10.1038/nm.2678
- Levine SJ, Wenzel SE. Narrative review: The role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. *Ann. Intern. Med.* (2010) 152:232–7. doi: 10.7326/0003-4819-152-4-201002160-00008
- Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* (2015) 16:45–56. doi: 10.1038/ni.3049
- Caminati M, Le Pham D, Bagnasco D, Canonica GW. Type 2 immunity in asthma. *World Allergy Organ. J.* (2018) 11:13. doi: 10.1186/s40413-018-0192-5
- GEMA 4.4. *Guía española para el manejo del asma*. (2020). Available online at: <https://www.gemasma.com/> (accessed May 1, 2020).
- Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: moving toward precision medicine. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2019) 144:1–12. doi: 10.1016/j.jaci.2019.05.031
- Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2010) 181:315–23. doi: 10.1164/rccm.200906-0896OC
- Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2008) 178:218–24. doi: 10.1164/rccm.200711-1754OC
- Coumou H, Bel EH. Improving the diagnosis of eosinophilic asthma. *Expert Rev. Respir. Med.* (2016) 10:1093–103. doi: 10.1080/17476348.2017.1236688
- Buhl R, Humbert M, Bjermer L, Chanez P, Heaney LG, Pavord I, et al. Severe eosinophilic asthma: a roadmap to consensus. *Eur. Respir. J.* (2017) 49:1700634. doi: 10.1183/13993003.00634-2017
- Fitzpatrick AM, Moore WC. Severe asthma phenotypes—how should they guide evaluation and treatment? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* (2017) 5:901–8. doi: 10.1016/j.jaip.2017.05.015
- Isidoro-García M, Sánchez-Martín A, García-Sánchez A, Sanz C, García-Berrolcal B, Dávila I. Pharmacogenetics and the treatment of asthma. *Pharmacogenomics*. (2017) 18:1271–80. doi: 10.2217/pgs-2017-0024
- Canonica GW, Ferrando M, Baiardini I, Puggioni F, Racca F, Passalacqua G, et al. Asthma: personalized and precision medicine. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* (2018) 18:51–8. doi: 10.1097/ACI.0000000000000416
- Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int. Immunol.* (2009) 21:1303–9. doi: 10.1093/intimm/dxp102
- Brussino L, Heffler E, Bucca C, Nicola S, Rolla G. Eosinophils target therapy for severe asthma: critical points. *Biomed. Res. Int.* (2018) 2018:7582057. doi: 10.1155/2018/7582057
- Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific  $\alpha$  chain and a  $\beta$  chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell*. (1991) 66:1175–84. doi: 10.1016/0092-8674(91)90040-6
- Kupczyk M, Kuna P. Benralizumab: an anti-IL-5 receptor  $\alpha$  monoclonal antibody in the treatment of asthma. *Immunotherapy*. (2018) 10:349–59. doi: 10.2217/imt-2017-0161
- Kolbeck R, Kozhich A, Koike M, Peng L, Andersson CK, Damschroder MM, et al. MEDI-563, a humanized anti-IL-5 receptor  $\alpha$  mAb with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010) 125:1344–53. doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.004
- Dávila González I, Moreno Benítez F, Quirce S. Benralizumab: a new approach for the treatment of severe eosinophilic asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* (2019) 29:84–93. doi: 10.18176/jiaci.0385
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (1995) 152:77–121.
- Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur. Respir. J.* (2014) 43:343–73. doi: 10.1183/09031936.00202013
- Sanz C, Isidoro-García M, Dávila I, Moreno E, Laffond E, Ávila C, et al. Promoter genetic variants of prostanoid DP receptor (PTGDR) gene in patients with asthma. *Allergy*. (2006) 61:543–8. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01025.x
- Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. *Allergy*. (1989) 44 Suppl 10:1–59.
- Sendin-Hernández MP, Ávila-Zarza C, Sanz C, García-Sánchez A, Marcos-Vadillo E, Muñoz-Bellido FJ, et al. Cluster analysis identifies 3 phenotypes within allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* (2018) 6:955–61. doi: 10.1016/j.jaip.2017.10.006
- Babraham Bioinformatics. *FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. (2020). Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed August 17, 2020).
- Kim D, Perlea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* (2013) 14:R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36
- Picard Tools. By Broad Institute (2020). Available online at: <http://broadinstitute.github.io/picard/> (accessed August 28, 2020).
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. (2013) *arXiv[Preprint]*. arXiv:1303.3997.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* (2010) 28:511–5. doi: 10.1038/nbt.1621
- Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. (2015) 31:166–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* (2014) 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- STRING. *Functional Protein Association Networks*. (2020). Available online at: <https://string-db.org/> (accessed October 13, 2020).
- Primer3.0. (2018). Available online at: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (accessed March 6, 2018).
- Beacon Designer (2020). Available online at: <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1> (accessed March 6, 2018).
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. (2001) 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* (2009) 55:611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797

39. Pascual M, Roa S, García-Sánchez A, Sanz C, Hernandez-Hernandez L, Grealley JM, et al. Genome-wide expression profiling of B lymphocytes reveals IL4R increase in allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2014) 134:972–5. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.015
40. Agrawal DK, Hopfenspirger MT, Chavez J, Talmadge JE. Flt3 ligand: a novel cytokine prevents allergic asthma in a mouse model. *Int. Immunopharmacol.* (2001) 1:2081–9. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00122-9
41. Domingo C, Palomares O, Sandham DA, Erpenbeck VJ, Altman P. The prostaglandin D2 receptor 2 pathway in asthma: a key player in airway inflammation 11 medical and health sciences 1107 immunology 11 medical and health sciences 1102 Cardiorespiratory Medicine and Haematology. *Respir. Res.* (2018) 19:189. doi: 10.1186/s12931-018-0893-x
42. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br. J. Pharmacol.* (2004) 142:161–71. doi: 10.1038/sj.bjp.0705729
43. Hassan N, Mohamed-Hussein A, Mohamed E, Mohamed O, Mohamed H, Tammam M. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) as non-invasive biomarkers of remodelling in asthma. *Eur. Respir. J.* (2015) 46(Suppl. 59):OA1467. doi: 10.1183/13993003.congress-2015.OA1467
44. Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* (2004) 114:270–9. doi: 10.1172/JCI21275
45. Bigler J, Boedigheimer M, Schofield JPR, Skipp PJ, Corfield J, Rowe A, et al. A severe asthma disease signature from gene expression profiling of peripheral blood from U-BIOPRED cohorts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2017) 195:1311–20. doi: 10.1164/rccm.201604-0866OC
46. Virkud Y V., Kelly RS, Croteau-Chonka DC, Celedón JC, Dahlin A, Avila L, et al. Novel eosinophilic gene expression networks associated with IgE in two distinct asthma populations. *Clin. Exp. Allergy.* (2018) 48:1654–64. doi: 10.1111/cea.13249
47. Sridhar S, Liu H, Pham TH, Damera G, Newbold P. Modulation of blood inflammatory markers by benralizumab in patients with eosinophilic airway diseases. *Respir. Res.* (2019) 20:14. doi: 10.1186/s12931-018-0968-8
48. Suzuki Y, Wakahara K, Nishio T, Ito S, Hasegawa Y. Airway basophils are increased and activated in eosinophilic asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* (2017) 72:1532–9. doi: 10.1111/all.13197
49. Chipps BE, Newbold P, Hirsch I, Trudo F, Goldman M. Benralizumab efficacy by atopy status and serum immunoglobulin E for patients with severe, uncontrolled asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* (2018) 120:504–11. doi: 10.1016/j.anai.2018.01.030
50. Buchheit KM, Dwyer DF, Ordovas-Montanes J, Katz HR, Lewis E, Vukovic M, et al. IL-5R $\alpha$  marks nasal polyp IgG4- and IgE-expressing cells in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2020) 145:1574–84. doi: 10.1016/j.jaci.2020.02.035
51. Medrek SK, Parulekar AD, Hanania NA. Predictive biomarkers for asthma therapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* (2017) 17:69. doi: 10.1007/s11882-017-0739-5
52. Hoyte FCL, Gross LM, Katial RK. Exhaled nitric oxide: an update. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* (2018) 38:573–85. doi: 10.1016/j.iac.2018.06.001
53. Sordillo JE, Webb T, Kwan D, Kamel J, Hoffman E, Milton DK, et al. Allergen exposure modifies the relation of sensitization to fraction of exhaled nitric oxide levels in children at risk for allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2011) 127:1165–72.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2011.01.066
54. Nakajima M, Matsuyama M, Arai N, Yamada H, Hyodo K, Nonaka M, et al. Identification of whole blood gene expressions correlated with responsiveness to benralizumab. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2020) S0091-6749:31110–6. doi: 10.1016/j.jaci.2020.08.004

**Conflict of Interest:** ID declares having received honoraria for participation in speakers' bureaus or advisory boards from Astra-Zeneca, GSK, and Sanofi.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Elena-Pérez, Heredero-Jung, García-Sánchez, Estravís, Martín, Ramos-González, Triviño, Isidoro-García, Sanz and Dávila. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.