



DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

Catedrático Numerario de Universidad

Departamento de Farmacología

Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Carolina Mora Sánchez, con el título:

**Regulación la Senescencia en Rinosinusitis Crónica con Poliposis Nasal mediante
Activadores Nrf2: Estudio in vitro.**

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

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

En València, Junio de 2025.

Firmado Dr. Julio Cortijo Gimeno



DRA. Dña. PAULA MONTERO MAGALLÓ

Grupo Dr. Julio Cortijo Gimeno

Departamento de Farmacología

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Carolina Mora Sánchez, con el título:

**Regulación la Senescencia en Rinosinusitis Crónica con Poliposis Nasal mediante
Activadores Nrf2: Estudio in vitro.**

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

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

En València, Junio de 2025.

Firmado Dra. Paula Montero Magalló



DR. D. ENRIQUE ZAPATER LATORRE

Profesor Asociado

Departamento de Cirugía

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Carolina Mora Sánchez, con el título:

**Regulación la Senescencia en Rinosinusitis Crónica con Poliposis Nasal mediante
Activadores Nrf2: Estudio in vitro.**

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

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

En València, Junio de 2025.

Firmado Dr. Enrique Zapater Latorre

AGRADECIMIENTOS

Cuando finalicé mis estudios de Medicina y realicé el examen para ingresar en la especialidad de Otorrinolaringología como Médico Interno Residente, no pensé en continuar estudiando aún más, de manera paralela a la especialidad. Sin embargo, en mi camino tuve la oportunidad de encontrar a grandes profesionales y personas, a las que les estoy profundamente agradecida, por devolverme la motivación de involucrarme en este proyecto tan estimulante y de un carácter, en principio, desconocido para mí.

En primer lugar, a mi padre en la Otorrinolaringología, el Prof. Dr. Enrique Zapater Latorre, mi jefe de Servicio durante la residencia. En cuanto aterricé en el Hospital General de València, su recibimiento en el despacho fue con los brazos abiertos, y con una buena charla alentándome a comprar una gran enciclopedia de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, y cómo no, a realizar la tesis. El debate entre salir por la ventana más cercana o zambullirme en todo ello acabó así, y fue gracias a él.

En segundo lugar, debo agradecer al Prof. Dr. Julio Cortijo Gimeno. He de reconocer que la investigación básica quedaba muy lejos, allá por los proyectos de primer año de carrera de Medicina, y sentía muchas inseguridades al respecto. Contar con el apoyo de tan gran profesional y que me tendiera la mano para compartir este proyecto fue un hecho fundamental, y sin su propuesta, esta rama del conocimiento seguiría en el “des-conocimiento” para mí.

En tercer lugar y no menos importante, a la Dra. Paula Montero Magalló. He podido aprender directamente de ella de una manera práctica y cercana el trabajo de laboratorio. Me ha enseñado desde cómo manejar una pipeta (no es tarea fácil rellenar los pocillos para una novata, así que del resto del trabajo ni hablamos), hasta dar formato a una tesis. Mi enlace directo con los experimentos de laboratorio, mi consultora inmediata, siempre disponible y dispuesta a ayudarme con cualquier duda, independientemente del horario o medio de comunicación.

Agradecer además al Ministerio de Ciencia e Innovación: esta tesis se ha realizado con la financiación del proyecto: *Pharmacological modulation of the senescence by Nrf2 activators and protein kinase inhibitors in cultured human epithelial cells from COPD, IPF and Asthma patients. (SENESPHARMA)*. Referencia: PID2020-114871RB-IOO. Modalidad: Proyectos de I+D+i Retos Investigación. MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN. Área/ Subárea: Biomedicina/ Herramientas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas

Por último, a mi familia.

A mi padre, siempre presente en mi vida académica, laboral y personal de una manera próxima, al compartir área de conocimiento (la salud). Inspiradora su trayectoria, ya que continúa formándose, estudiando, sacando cursos y másteres adelante, haciendo favores a pacientes, tratando dolencias aunque no sean de su competencia y, en definitiva, ayudando.

A mi madre, que siempre me habla desde la experiencia, el cariño y el sentido común. Me ha dado los mejores consejos que he seguido en mi vida (a excepción de que me convirtiera en notaria, menos mal que no le hice caso).

A mi hermano, que, aunque parezca que está ausente, siempre nos tenemos presentes el uno al otro y somos capaces de mantener el cariño de toda la vida, a pesar de sus terribles gustos musicales.

A mi compañero de piso y padre de mi hijo, Shiris. Esta tesis la escribo embarazada de mi primer hijo, con mis náuseas, mis cambios de humor, mis mareos y sin fin de síntomas más, que en ocasiones me han desanimado. He encontrado en ti un apoyo y cariños incondicionales, sin los que el camino no hubiese sido el mismo.

ÍNDICE

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	20
Introducción	20
1.1. RINOSINUSITIS CRÓNICA CON PÓLIPOS NAALES	22
CARACTERÍSTICAS DE LA RINOSINUSITIS CRÓNICA EN ADULTOS	22
CLASIFICACIÓN	22
EPIDEMIOLOGÍA DE LA RSCcPN	24
FACTORES DE RIESGO EN LA RSCcPN	24
Enfermedad inflamatoria exacerbada por aspirina (EREA)	24
ETIOPATOGENIA	25
ENDOTIPOS	26
EXPLORACIÓN Y DIAGNÓSTICO	29
CALIDAD DE VIDA Y C OSTES	32
VIA RESPIRATORIA ÚNICA	33
OBJETIVOS DEL TRATAMIENTO, CONTROL Y DEFINICIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	33
TRATAMIENTO MÉDICO DE LA RSCcPN	34
TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LA RSCcPN	36
RESUMEN ESQUEMATIZADO DEL TRATAMIENTO DE LA RSCcPN (tabla 3)	38
1.2. LA BARRERA EPITELIAL EN LA FUNCIÓN Y PATOLOGÍA DE VÍA RESPIRATORIA	
SUPERIOR	40
ANATOMÍA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO	40
EL EPITELIO RESPIRATORIO COMO BARRERA DEFENSIVA	43
EL EPITELIO REGULA LA RESPUESTA INMUNE	47
1.3. SENESCENCIA	50
SENESCENCIA CELULAR	50
RSCcPN Y SENESCENCIA	65
SISTEMA Nrf-2 Y SENESCENCIA	70
ACTIVADORES DE NRF2	71
CAPÍTULO 2	74
Hipótesis y objetivos	74
2.1. HIPÓTESIS	76
2.2. OBJETIVOS	78
CAPÍTULO 3	80
Material y método	80
3.1. REACTIVOS UTILIZADOS (tabla 4)	82
3.2. PROTOCOLO DE LA INVESTIGACIÓN	84
3.3. PACIENTES	85
3.4. Aislamiento y cultivo de células primarias nasales sanas inmortalizadas	86
3.5. Aislamiento y cultivo de células primarias epiteliales de Pólipos NAAles	86
3.6. ESTIMULACIÓN CELULAR	87
3.7. HISTOLOGÍA	87

3.8.	INMUNOHISTOQUÍMICA	88
3.9.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	89
	Extracción de ARN total y cuantificación	89
	Transcripción reversa (RT)	91
	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	91
3.10.	EXTRACCIÓN DE ADN	94
3.11.	LONGITUD DE TELÓMEROS	94
3.12.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	95
3.13.	CUANTIFICACIÓN DE GSH	96
3.14.	PROLIFERACIÓN CELULAR	97
3.15.	INMUNOFLUORESCENCIA H2AX	97
3.16.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	98
CAPÍTULO 4		100
Resultados		100
4.1.	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO (tabla 9)	102
4.2.	ANÁLISIS DE MARCADORES DE SENESCENCIA EN PACIENTES CON POLIPOSIS	103
4.3.	PRUEBAS DE ESTÍMULOS INDUCTORES DE LA SENESCENCIA EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES SANAS: RT-PCR	107
4.4.	MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES SANAS: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.	109
	RT-PCR	109
	ELISA	111
	GSH	112
	PROLIFERACIÓN	113
	HISTONAS	114
4.5.	MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES DE PACIENTES CON RSCcPN SIN EREA: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA	118
	RT-PCR	118
	ELISA	119
	GSH	121
	PROLIFERACIÓN	122
	HISTONAS	122
4.6.	MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES DE PACIENTES CON RSCcPN CON EREA: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.	125
	RT-PCR	125
	ELISA	126
	GSH	128
	PROLIFERACIÓN	128
	HISTONAS	129
CAPÍTULO 5		134
Discusión		134

5.1. ALTERACIONES MOLECULARES	136
Histonas	136
Estrés oxidativo (GSH)	137
Reguladores del ciclo celular	138
Longitud de telómeros	140
IL- 6	141
IL 1	142
Proliferación celular	142
5.2. SISTEMA NRF-2.....	144
Nrf- 2 y RSCcPN	144
Alteraciones en la barrera epitelial y RSCcPN	146
Activadores NRF2	147
EREA vs NO EREA y sistema Nrf2	149
Obacunona y ovameloxolona y RSCcPN	150
CONCLUSIONES.....	153
BIBLIOGRAFÍA	156
ABREVIATURAS.....	172
ANEXOS.....	176

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Clasificación de la RSC primaria.</i>	23
<i>Figura 2. Clasificación de la RSC secundaria.</i>	23
<i>Figura 3. Inflamación de tipo 1 y moléculas implicadas.</i>	27
<i>Figura 4. Inflamación T2 y moléculas implicadas.</i>	28
<i>Figura 5. Inflamación T3 y moléculas implicadas.</i>	29
<i>Figura 6. Escala de Lund-Mackay.</i>	30
<i>Figura 7. Escala SNOT-22 para valoración de sintomatología.</i>	31
<i>Figura 8. Criterios POLINA para el uso de biológicos en RSCcPN.</i>	38
<i>Figura 9. Anatomía del sistema respiratorio.</i>	41
<i>Figura 10. Aclaramiento mucociliar.</i>	45
<i>Figura 11 Localización y señalización de los receptores tipo Toll (TLR).</i>	48
<i>Figura 12. Rutas generales de la senescencia celular.</i>	53
<i>Figura 13. Diversas señales inducen senescencia celular.</i>	56
<i>Figura 14. Sistema Nrf2.</i>	70
<i>Figura 15. Equipo de extracción de ARN.</i>	90
<i>Figura 16. Esquemas de la retrotranscripción.</i>	91
<i>Figura 17. Sistema TaqMan® de cuantificación fluorométrica de la expresión génica.</i>	92
<i>Figura 18. Esquema de la técnica de ELISA cuantitativo por inmuno-detección indirecta de proteínas o sistema “sándwich” en fase sólida.</i>	96
<i>Figura 19. RSCcPN sin EREA y pacientes con RSCcPN con EREA.</i>	104
<i>Figura 20. RT-PCR sistema Nrf2 en sujetos sanos y pacientes con RSCcPN.</i>	105
<i>Figura 21. Expresión inmunohistoquímica de P21.</i>	106
<i>Figura 22. Expresión inmunohistoquímica de P16.</i>	106
<i>Figura 23. Longitud de telómeros.</i>	107
<i>Figura 24. RT-PCR en células epiteliales primarias sanas tras estímulos de senescencia.</i>	108
<i>Figura 25. RT-PCR en células epiteliales primarias sanas, estímulos de senescencia la bleomicina (BLM) 25ug/ml y 40 ug/ml.</i>	109
<i>Figura 26. RT- PCR en células epiteliales primarias sanas, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con obacunona (OBA).</i>	110
<i>Figura 27. senescencia tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA).</i>	110
<i>Figura 28. ELISA en células epiteliales primarias sanas, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia obacunona (OBA)</i>	111
<i>Figura 29. ELISA en células epiteliales primarias sanas, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia con omaveloxona (OMA).</i>	112
<i>Figura 30. Figura 31. Medida de GSH en células epiteliales primarias sanas, expresión de antioxidantes tras el estímulo antisenescencia con omaveloxona (OMA) a con concentraciones 1nM, 10nM y 80nM (A); y obacunona (OBA)</i>	113
<i>Figura 31. Medida de la incorporación de BrdU al ciclo celular en células epiteliales primarias sanas tras el uso de blemocina (BLM) y su intento de reversión con fármacos que aumentan la proliferación celular con omaveloxona (OMA).</i>	114
<i>Figura 32. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia (IF) de H2AX en células primarias sanas.</i>	115
<i>Figura 33. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en células primarias sanas.</i>	115
<i>Figura 34. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia (IF) de H2AX en células primarias sanas.</i>	116
<i>Figura 35. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en células primarias sanas.</i>	117

<i>Figura 36. RT- PCR en células epiteliales de pacientes con RSCcPN sin EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50Mm.</i>	119
<i>Figura 37. RT- PCR en células epiteliales células epiteliales de pacientes con RSCcPN sin EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM.</i>	119
<i>Figura 38. ELISA en células epiteliales de sujetos con RSCcPN y sin EREA, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM.</i>	120
<i>Figura 39. ELISA en células epiteliales primarias de sujetos con RSCcPN y sin EREA, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM.</i>	120
<i>Figura 40. Medida de GSH en células epiteliales de pacientes con RSCcPN sin EREA, expresión de antioxidantes tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM (B); y obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM (A).</i>	121
<i>Figura 41. Medida de la incorporación de BrdU al ciclo celular en células epiteliales de sujetos con RSCcPN sin EREA, tras el uso de blemocina (BLM) y su intento de reversión con fármacos que aumentan la proliferación celular con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM (A); y obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM (B).</i>	122
<i>Figura 42. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA.</i>	123
<i>Figura 43. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA.</i>	123
<i>Figura 44. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA.</i>	124
<i>Figura 45. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA.</i>	124
<i>Figura 46. RT- PCR en células epiteliales de pacientes con RSCcPN con EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM.</i>	126
<i>Figura 47. RT- PCR en células epiteliales células epiteliales de pacientes con RSCcPN con EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM.</i>	126
<i>Figura 48. ELISA en células epiteliales de sujetos con RSCcPN con EREA, expresión de marcadores de inflamación [(A) IL 6; (B) IL 1B] tras el estímulo antisenescencia obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM.</i>	127
<i>Figura 49. ELISA en células epiteliales primarias de sujetos con RSCcPN y con EREA, expresión de marcadores de inflamación [(A) IL 6; (B) IL 1B] tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM.</i>	127
<i>Figura 50. Medida de GSH en células epiteliales de pacientes con RSCcPN con EREA, expresión de antioxidantes tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM (A); y obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50Mm (B).</i>	128
<i>Figura 51 Medida de la incorporación de BrdU al ciclo celular en células epiteliales de sujetos con RSCcPN con EREA, tras el uso de blemocina (BLM) y su intento de reversión con fármacos que aumentan la proliferación celular con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM (B); y obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM (A).</i>	129
<i>Figura 52. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA.</i>	130

<i>Figura 53. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA.....</i>	<i>131</i>
<i>Figura 54. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA.....</i>	<i>131</i>
<i>Figura 55. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA.....</i>	<i>132</i>

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. RINOSINUSITIS CRÓNICA CON PÓLIPOS NASALES

La Rinosinusitis Crónica con Poliposis Nasal (RSCcPN) es una patología caracterizada por una inflamación y cambios histológicos en la región etmoidal (techo y masas laterales), que se manifiesta con la formación de pólipos en ambas fosas nasales. Esta enfermedad es crónica y de carácter benigno. El tratamiento se establece de manera escalonada en función de la calidad de vida del paciente principalmente, y en él, es fundamental el tratamiento médico, complementando con tratamiento quirúrgico en determinadas ocasiones(1).

CARACTERÍSTICAS DE LA RINOSINUSITIS CRÓNICA EN ADULTOS (tabla 1)

Diagnóstico rinosinusitis crónica en adultos
Presencia de dos o más síntomas, uno de los cuales debe ser congestión nasal y/o rinorrea anterior/posterior: • ± dolor/presión facial o • ± reducción/pérdida del olfato, durante ≥ 12 semanas.
Y, además: • Signos endoscópicos de: – pólipos nasales y/o – secreción mucopurulenta y/o – edema en el meato medio; • y/o cambios en la tomografía computarizada (TC) de: – meato medio, – senos paranasales.

Tabla 1. Diagnóstico de la rinosinusitis crónica. Fuente: adaptado de Fokkens et al(2).

CLASIFICACIÓN

La clasificación propuesta por la guía EPOS 2020 (2) divide a la rinosinusitis crónica (RSC) en dos grupos principales: RSC primaria (figura 1) y RSC secundaria (figura 2). La caracterización del endotipo T2 da lugar a subgrupos con distintos fenotipos. La RSCcPN pertenece al grupo de RSC primarias difusas.

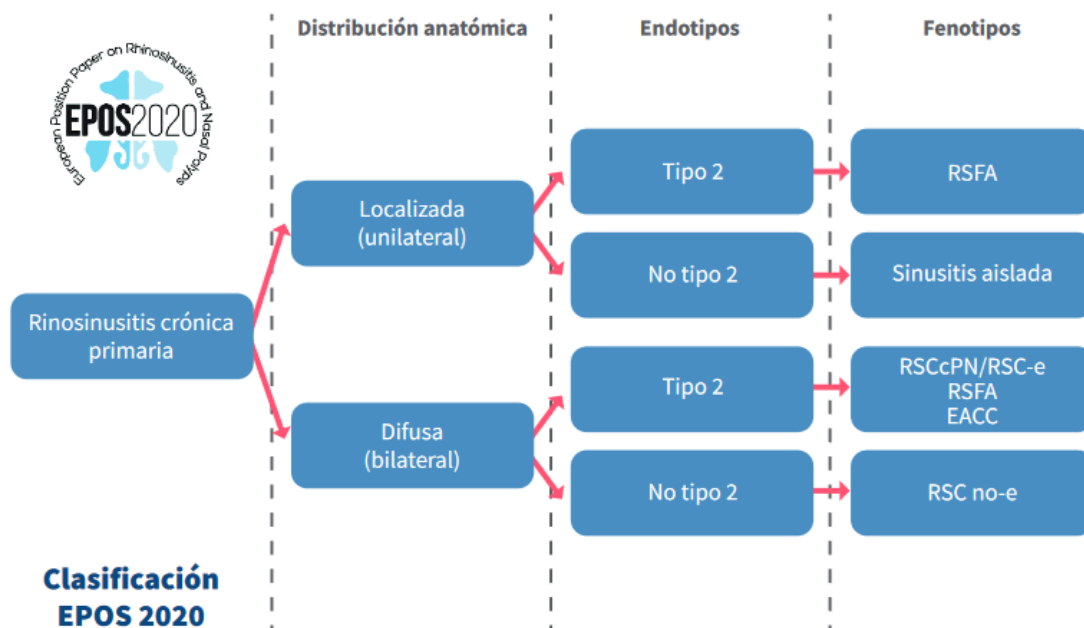


Figura 1. Clasificación de la RSC primaria. Obtenido de EPOS 2020: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020(2). EACC: enfermedad atópica del compartimento central. RSC: rinosinusitis crónica. RSCcPN: rinosinusitis crónica con pólipos nasales. RSC-e: rino-sinusitis crónica eosinofílica. RSC no-e: rinosinusitis crónica no eosinofílica. RSFA: rinosinusitis fúngica alérgica.

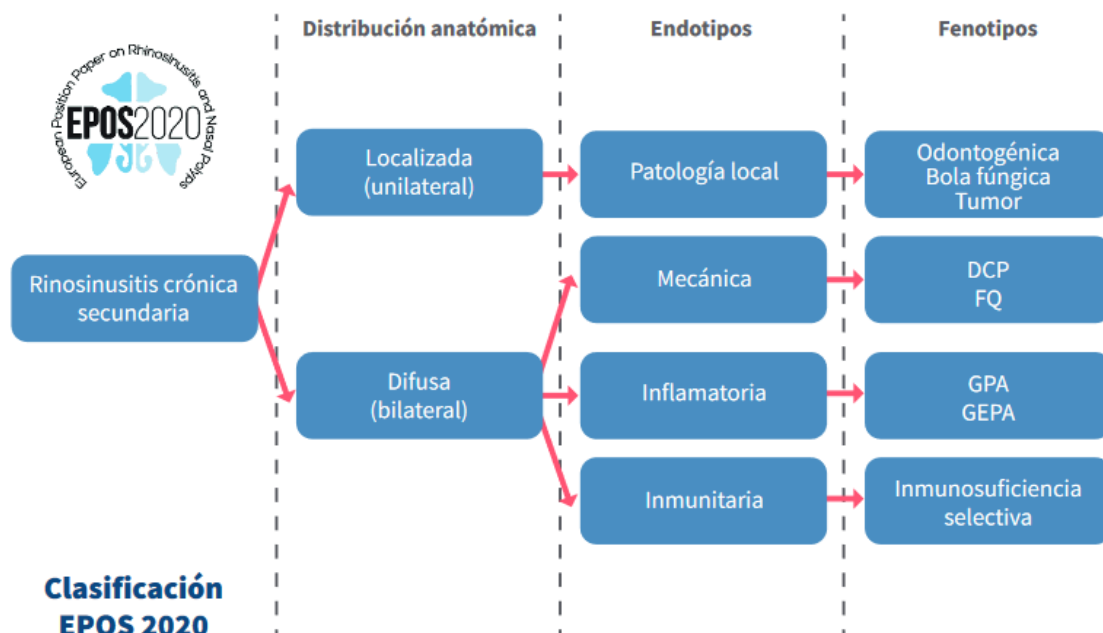


Figura 2. Clasificación de la RSC secundaria. Obtenido de EPOS 2020: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020(2). DCP: discinesia ciliar primaria. FQ: fibrosis quística. GEPA: granulomatosis eosinofílica con poliangitis. GPA: granulomatosis con poliangitis.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA RSCcPN

La prevalencia de la RSC es del 11% en Europa(3). Es más frecuente en hombres que en mujeres, con un diagnóstico entre los 40 y los 60 años de edad(2). La enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina o antiinflamatorios no esteroideos (EREA) se caracteriza por intolerancia a la aspirina o algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y la presencia de asma. En los pacientes en los que está presente, condiciona una mayor gravedad y peor pronóstico de la enfermedad(4,5). La prevalencia de EREA es del 7% en el asma controlada, del 15% en el asma grave(6) y de más del 40% en el asma grave con RSCcPN(7).

FACTORES DE RIESGO EN LA RSCcPN

- Alergia(2).
- Genética: La genética tras la RSCcPN es compleja y no está nada clara, no parece depender de un solo gen o grupo de genes(2). Se han secuenciado algunos polimorfismos de los receptores TAS2R implicados en la respuesta inmune, en relación con la colonización de bacterias gramnegativas, y que pueden condicionar un peor pronóstico(8).
- Variantes anatómicas: No parece que el desarrollo de pólipos responda a obstrucciones del complejo osteomeatal(9).
- Reflujo: asociado a peor control de la patología(10).
- Tabaquismo(11): está asociado a mayor gravedad de la PN(8).
- Polución y factores ambientales (12).
- Déficit de vitamina D (2).

Enfermedad inflamatoria exacerbada por aspirina (EREA)

La EREA es un fenotipo bien identificado de RSCcPN. En estos pacientes coexisten la RSC con PN que son recidivantes, asma de difícil control e hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los pacientes con RSCcPN que presentan EREA se someten al doble de cirugías nasosinusales y son significativamente

más jóvenes en el momento de la primera cirugía respecto a los pacientes con RSCcPN sin EREA (2). La enfermedad respiratoria de vías altas en los pacientes con EREA suele ser RSCcPN. En general, en estos pacientes los síntomas respiratorios son peores, existe un mayor grado de opacificación en la TC y la recurrencia de los pólipos nasales tras la cirugía son más frecuentes respecto a los pacientes con RSCcPN tolerantes a AINEs. La reducción brusca en la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) parece ser el acontecimiento precipitante clave en la sobreproducción de leucotrienos (LT), con la consiguiente reacción en el tracto respiratorio(1). LTE4 y PGD2 son los principales eicosanoides implicados en inflamación, estando típicamente asociado al fenotipo EREA(2,11,13,14). Los eosinófilos juegan un papel muy importante en la RSCcPN. Su reclutamiento, activación y supervivencia están regulados, además de por la IL-5, por las citocinas epiteliales, los eicosanoides y las proteasas exógenas. Los eosinófilos están presentes de forma muy abundante en los tejidos de los pacientes con RSCcPN y se consideran un biomarcador de enfermedad grave y de evolución tórpida en estos pacientes(2,11). Los test de provocación de aspirina (AAS) sólo son necesarios cuando la historia clínica no está clara. El test de provocación con lisina-aspirina intranasal se considera positivo si aparece una disminución del flujo nasal mayor o igual al 25% en la rinometría acústica y mayor al 40% en el caso de la rinomanometría, presentando la primera una mayor sensibilidad. El test intranasal presenta un mejor perfil de seguridad, con menor provocación de una respuesta sistémica o una reacción de vías respiratorias inferiores, en relación al test de provocación oral, aunque este último presenta una mayor sensibilidad y se considera el gold standard para la confirmación del diagnóstico de EREA(2).

ETIOPATOGENIA

La etiopatogenia de la RSCcPN es compleja y multifactorial, en la misma, existen alteraciones ambientales de la microbiota, de la barrera epitelial (ver apartado 2. *La barrera epitelial en la función y patología de vía respiratoria superior*), del sistema inmune innato y del adaptativo(15). Sobre ellos actuarán los factores endógenos y exógenos(1).

El equilibrio microbiano o flora saprófita de las cavidades nasosinusales puede verse

alterada por la presencia de bacterias colonizadoras como el *Staphylococcus aureus* (SA)(2,16). El *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de producir superantígenos, activando la respuesta inmune del sujeto y desencadenando moléculas características de la inflamación de tipo 2(17), así como una mayor producción de IgE específica policlonal(11,18).

Otros microorganismos tales como rinovirus y hongos también pueden verse implicados, irrumpiendo la barrera epitelial produciendo biofilms, disfunción ciliar y sobreproducción de moco.

ENDOTIPOS

- **Endotipo T1 (15)**

Los linfocitos Th1 y las células dendríticas inician el proceso. En este endotipo, la actividad de los neutrófilos se representa como el principal impulsor del daño en la barrera, activando otras moléculas como interferón gamma (IFN- γ) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa). La PN es menos frecuente que en otros endotipos, y es menos común en occidente, siendo más estudiada en población asiática.

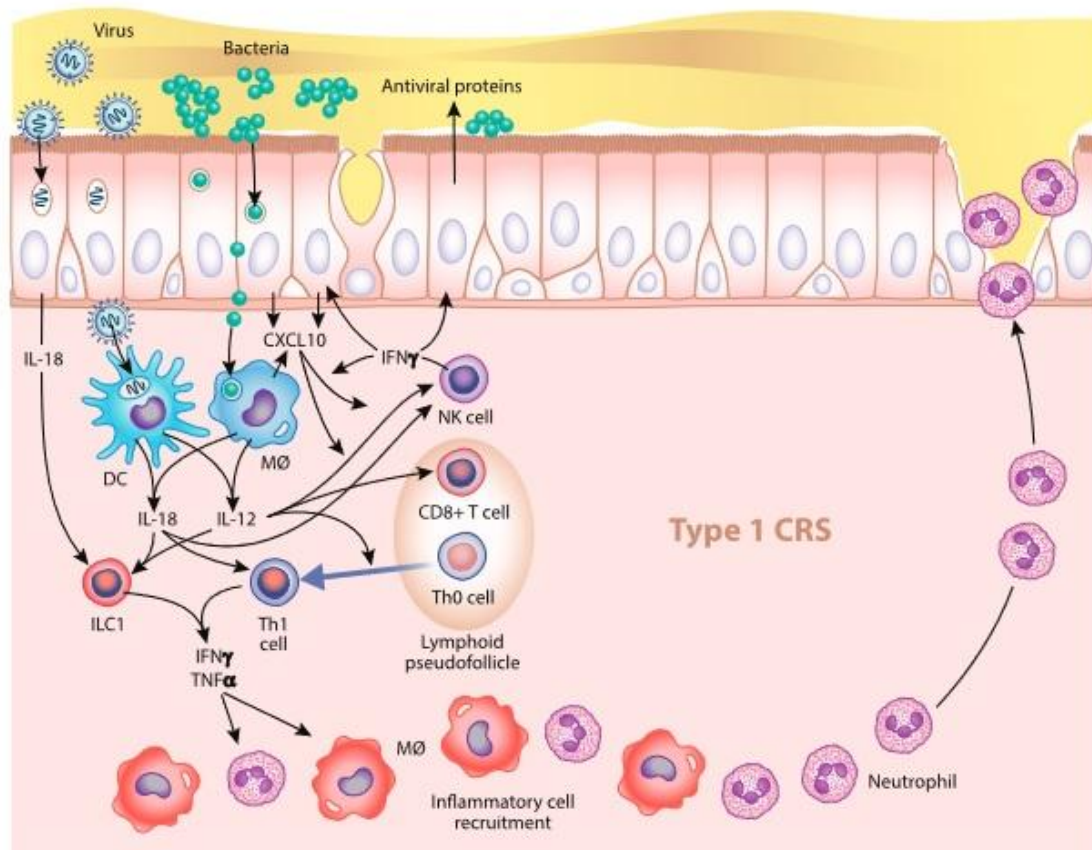


Figura 3. Inflamación de tipo 1 y moléculas implicadas. Obtenido de EPOS 2020: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020(2).

- **Endotipo T2 (15)**

Este endotipo inflamatorio es predominante en la RSCcPN en nuestro entorno(1). Las células inmunes implicadas son:

- Células T linfoides inatas tipo 2 (ILC2)
- Linfocitos Th2 (CD4+)
- Macrófagos M2
- Mastocitos
- Basófilos sensibilizados
- Eosinófilo

El proceso inflamatorio se inicia con la participación de las células ILC2 y las células dendríticas. En el contexto de la rinosinusitis crónica con poliposis nasal (RSCcPN), la integridad de la barrera epitelial se conserva gracias a las uniones intercelulares, como las uniones estrechas y adherentes. Las células epiteliales del epitelio nasosinusal desempeñan un rol clave, no solo manteniendo esta barrera, sino también actuando activamente en la activación y regulación de las respuestas inmunitarias, tanto innatas

como adaptativas, siendo responsables del desencadenamiento de la inflamación de tipo 2 (2,11,19). Cuando la inflamación se vuelve persistente, aparecen signos característicos como edema de tipo polipoideo, acumulación de fibrina, formación de pólipos nasales (PN), fenómenos de remodelación con fibrosis y un deterioro adicional de la barrera epitelial (2,11,20). En respuesta al daño tisular, las células epiteliales liberan mediadores como la linfopoyetina tímica estromal (TSLP), la IL-33 y la IL-25. Entre ellos, la TSLP tiene un papel clave en el inicio de la inflamación tipo 2, al inducir la activación de células ILC2 y linfocitos Th2 (ver Figura 4).

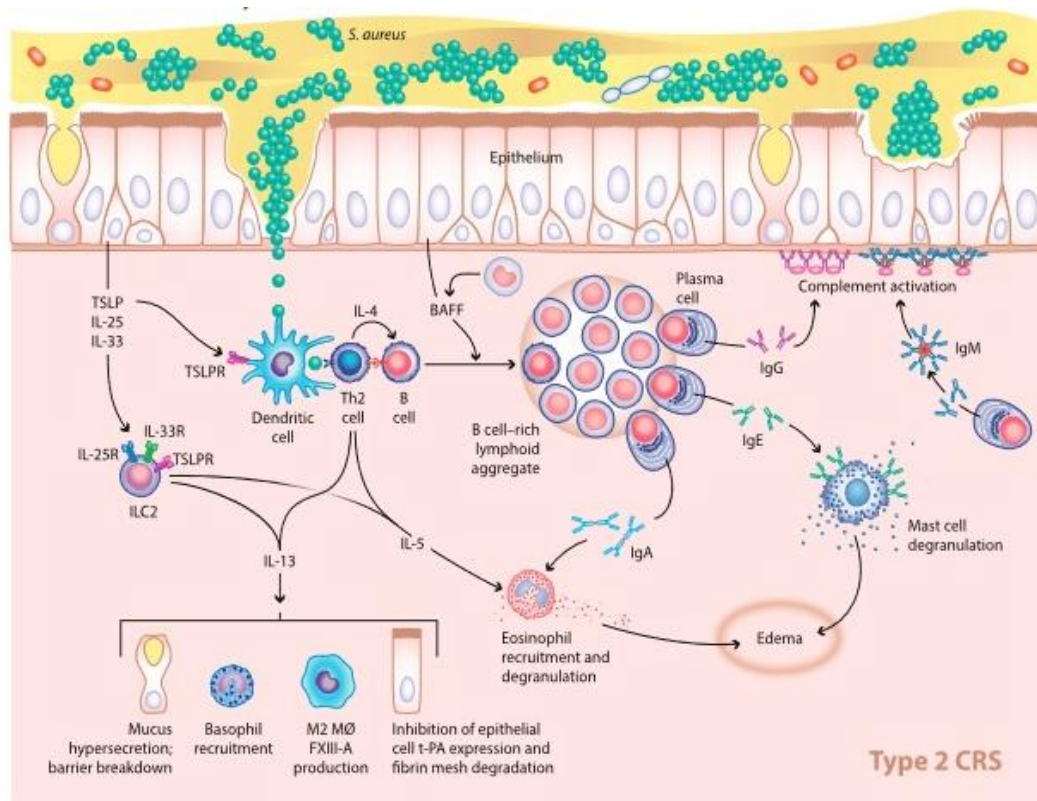


Figura 4. Inflamación T2 y moléculas implicadas. Obtenido de EPOS 2020: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020(2).

- **Endotipo T3(15)**

La inflamación tipo 3 está caracterizada por la presencia de los Th17, así como las citoquinas IL-17, IL-22 e IL-23. En la figura 5, la actividad de los neutrófilos se representa como el principal impulsor del daño en la barrera. Existe depósitos de fibrina y remodelación tisular, pero con menos frecuencia que en el tipo 2.

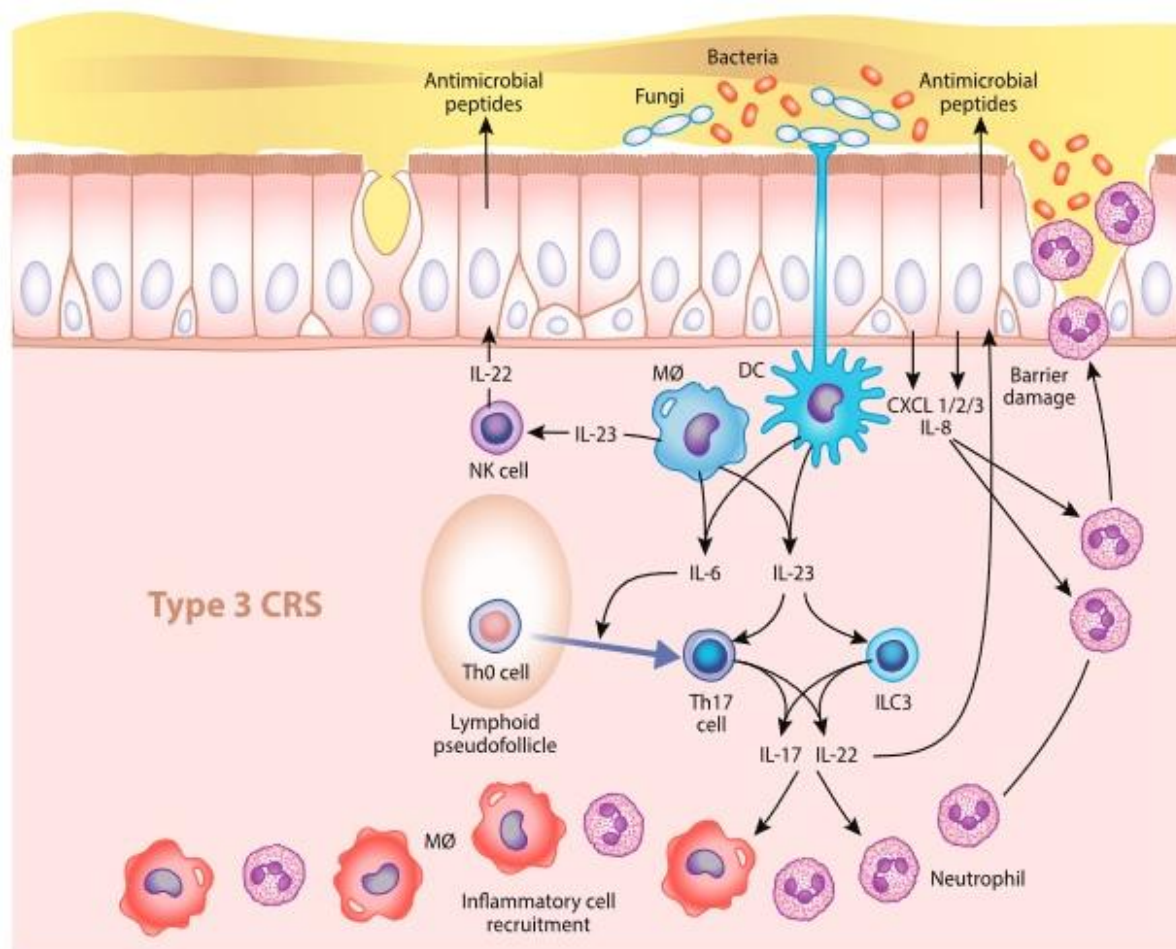


Figura 5. Inflamación T3 y moléculas implicadas. Obtenido de EPOS 2020: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020(2).

EXPLORACIÓN Y DIAGNÓSTICO

- **Exploración en el diagnóstico clínico:** La endoscopia, ya sea flexible o rígida es la mejor herramienta para clasificar los pólipos, estudiar la mucosa y las características de la rinorrea(19–21).
- **Diagnóstico por imagen:** La RSC se valora radiológicamente con la escala de Lund Mackay (de 0-24), (figura 6)(22). Se debe solicitar TC ante la sospecha de complicación, fracaso del tratamiento y cuando hay dudas en el diagnóstico. También resulta de gran interés de cara a la planificación quirúrgica, para conocer la anatomía nasosinusal y la extensión de la patología(11).

No	Variable	Operational Definition	Measurement	Result	Scale
1.	Lund Mackay Score	The sinuses are grouped into: Frontal sinus Anterior ethmoidal cells Posterior ethmoidal cells Maxillary sinus Sphenoid sinus Ostiomeatal complex Each side is graded separately 0 (no abnormality) 1 (partial opacification) 2 (complete opacification) If there is no frontal sinus (aplasia), the score is 0.	Scores were calculated based on the results of a paranasal sinus CT scan 1-3 mm axial slice thickness with coronal and sagittal reconstruction.	Score 0-24	Ordinal

Figura 6. Escala de Lund-Mackay. Fuente: adaptado de Sudiro et al.(23)

- Pruebas para la evaluación de obstrucción nasal:** La obstrucción nasal se puede evaluar, desde la subjetividad del paciente, mediante escala analógica visual (EVA), escala de Likert, la Nasal Obstruction Symptom Evaluation (NOSE)(24) y el Congestion Quantifier Seven-Item Test(1). La prueba de flujo inspiratorio nasal máximo (PNIF, peak nasal inspiratory flow) sirve para cuantificar este síntoma de manera objetiva(25), al igual que la rinomanometría. Sin embargo, no existe correlación entre las pruebas objetivas y subjetivas(25). Entre las pruebas que miden el área y los volúmenes de la región nasosinusal destaca la rinomanometría acústica, que se correlaciona con los volúmenes medidos por TC(1).
- Medidas sobre calidad de vida:** Los principales cuestionarios de calidad de vida son la EVA y el SNOT-22 (ver apartado 5) (2), Figura 7.

1. Considere cuán severas son sus molestias cuándo éstas están presentes y con cuánta frecuencia se presentan, por favor, califique cada ítem a continuación en cuán "malo" o "molesto" es, rodeando con un círculo el número que se corresponda con sus molestias, usando la siguiente escala:
→

	Sin problema	Problema muy leve	Problema leve	Problema moderado	Problema severo	Problema tan malo como puede llegar a ser	5 ítems más importantes
1. Necesidad de sonarse la nariz	0	1	2	3	4	5	☐
2. Estornudos	0	1	2	3	4	5	☐
3. Mucosidad nasal continua	0	1	2	3	4	5	☐
4. Tos	0	1	2	3	4	5	☐
5. Cae secreción por atrás hacia garganta	0	1	2	3	4	5	☐
6. Secreción nasal espesa	0	1	2	3	4	5	☐
7. Sensación de oído tapado	0	1	2	3	4	5	☐
8. Mareos	0	1	2	3	4	5	☐
9. Dolor de oídos	0	1	2	3	4	5	☐
10. Presión o dolor en la cara	0	1	2	3	4	5	☐
11. Dificultad para quedarse dormido	0	1	2	3	4	5	☐
12. Se despierta durante la noche	0	1	2	3	4	5	☐
13. Sensación que durmió mal	0	1	2	3	4	5	☐
14. Despertar cansado (a)	0	1	2	3	4	5	☐
15. Fatiga o cansancio	0	1	2	3	4	5	☐
16. Productividad o rendimiento reducida	0	1	2	3	4	5	☐
17. Menor o poca concentración	0	1	2	3	4	5	☐
18. Frustración/ cansancio/ irritabilidad	0	1	2	3	4	5	☐
19. Triste	0	1	2	3	4	5	☐
20. Sentirse avergonzado (a)	0	1	2	3	4	5	☐
21. Obstrucción nasal	0	1	2	3	4	5	☐
22. Pérdida del sentido del olfato y gusto	0	1	2	3	4	5	☐

Por favor marque los ítems que más afectan su salud (máximo 5) ↑

Figura 7. Escala SNOT-22 para valoración de sintomatología. Fuente: adaptado de Sudiro et al.(26).

- **Pruebas para la evaluación del olfato:** La pérdida de olfato se correlaciona con el nivel de eosinofilia en tejido o sangre, y con las comorbilidades existentes (asma, EREA o cirugías previas)(27).
- **Pruebas séricas:** El estudio en sangre periférica de la eosinofilia, la IgE total y la IgE específica anti enterotoxina del *Staphylococcus aureus* (SE IgE) tienen utilidad para tipificar el endotipo T2(28).

- **Pruebas alérgicas:** El tratamiento de la alergia puede tener un papel para la regulación de la RSCcPN. Debe considerarse también la determinación de IgE total ayudará a tipificar el endotipo T2.
- **Pruebas histopatológicas:** Se ha determinado que una eosinofilia tisular mayor de 55 eosinófilos/campo de gran aumento se asocia con una mayor recurrencia de RSCcPN con una alta sensibilidad y especificidad(29).
- **Pruebas de evaluación nasosinusal:** Existe una reducción paradójica del óxido nítrico nasal debido a la obstrucción del complejo osteomeatal, que bloquea su salida desde los senos paranasales.

CALIDAD DE VIDA Y COSTES

La RSC es una patología con un impacto económico significativo(30), en relación con su importante morbilidad. La calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) se ve condicionada negativamente en los pacientes con RSC(1,2), y su repercusión social es incluso mayor que en otras patologías como la insuficiencia cardiaca o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)(31). El coste anual de la RSC en el Reino Unido alcanzó 4.845 £ (5.720 €) por paciente y año, que supone un suplemento de coste de 3.782 £ (4.465 €) comparado con los controles(32).

La diferencia mínima clínicamente relevante hace referencia al cambio mínimo clínicamente significativo en una medida de resultados que aporta el paciente. Es una forma de medir la CVRS, y en la patología que nos ocupa, utilizamos el SNOT-22(33), estableciéndose esta MCIDD en RSC tratados mediante CENS en 8,9 puntos.

Actualmente se están proponiendo un conjunto de resultados básicos (core outcome set) para valorar la eficacia de los distintos tratamientos en la RSC. Estos incluyen el SNOT-22, la escala endoscópica de Lund-Kennedy y preguntas adicionales para evaluar la necesidad de medicación o cirugía, el cumplimiento y los efectos secundarios del tratamiento, la información adicional sobre la frecuencia de los síntomas y el impacto en la capacidad para realizar actividades normales(34).

VIA RESPIRATORIA ÚNICA

La mucosa respiratoria puede enfermar y sufrir mala regulación a lo largo de toda la vía respiratoria. Las patologías pueden afectar tanto a la vía respiratoria superior como a la inferior, y el control de una repercute en el control de la otra. Esto se resume en la expresión “vía respiratoria única”(35).

El 40% de los adultos con asma grave tienen RSC y el 50% de los que tienen RSCcPN padecen asma. El 30-40% de los individuos con rinitis crónica sufren asma, mientras que el 80% de los asmáticos presenta síntomas nasales crónicos(36).

Es importante tener en cuenta que el inicio tardío de la enfermedad, la EREA y la presencia de RSCcPN se asocian con asma grave(37). Por otra parte, la hipersensibilidad a los AINE en la EREA se relaciona con la gravedad tanto de la RSC como del asma eosinofílica no alérgica(38).

OBJETIVOS DEL TRATAMIENTO, CONTROL Y DEFINICIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

Objetivos de tratamiento

El principal objetivo de tratamiento es mejorar la calidad de vida. Para ello, se fijan objetivos concretos como la reducción de los síntomas (control de la enfermedad) y la reducción de recidivas(39).

El tratamiento médico será de primera elección, y tras este, el tratamiento quirúrgico y/o biológico se empleará en los casos de mal control de la patología(40).

Control de la RSCcPN

Hasta un 40% de los pacientes con RSC presentan un mal control de la patología(41). La Guía POLINA(1) recomienda basar el estado de control de la RSCcPN en los siguientes ítems (tabla 2):

	Controlada (todos los siguientes)	Parcialmente controlada (al menos 1)	No controlada (3 o más)
Gravedad de la enfermedad (0-10 cm)	EVA 0-3	EVA > 3-7	EVA > 7-10
Pérdida del olfato (0-10 cm)	EVA 0-3	EVA > 3-7	EVA > 7-10
Afectación de la calidad de vida (SNOT-22) (0-110)	8-20	> 20-50	> 50
Tamaño de los pólipos nasales por endoscopia (0-8)	Puntuación máxima 1 por fosa	Puntuación total < 5	Puntuación total ≥ 5
Uso de corticoides sistémicos en el último año	No	1-2 ciclos cortos ^a	> 2 ciclos cortos ^a
Necesidad de cirugía ^b	No	No	Sí

Tabla 2. Criterios de enfermedad controlada, parcialmente controlada y no controlada. Fuente: guía POLINA(1). EVA: escala visual analógica. a: Ciclos cortos desde 5 días a dosis 0.5-1mg/Kg/día. b: Cirugía endoscópica nasosinusal con apertura de senos paranasales afectados.

TRATAMIENTO MÉDICO DE LA RSCcPN

A continuación se expone el uso de aquellos fármacos con evidencia científica en el tratamiento de la RSCcPN.

- **Lavados nasales con agua de mar:** Los lavados nasales con solución salina isotónica tienen eficacia en la RSCcPN. La adición de xilitol a la irrigación con solución salina nasal puede tener un efecto positivo(42).
- **Corticoides tópicos intranasales:** Su uso tiene un nivel de evidencia A. Los corticoides intranasales (CIN) son la base del tratamiento. No hay diferencias entre un tipo de CIN u otro, aunque la mometasona está ampliamente extendida en la práctica clínica(1).
- **Corticoides(CC) sistémicos:** Su uso tiene un nivel de evidencia A. Se trata de fármacos muy eficaces, pero con unos efectos adversos nada desdeñables como supresión adrenal transitoria, insomnio e incremento del recambio óseo, particularmente en tratamientos

prolongados. Su coste es bajo, y existe evidencia en cuanto a la calidad de vida en cuanto a síntomas como obstrucción, rinorrea, cefalea y mejoría del olfato. Debido a los riesgos, se recomienda su uso en pauta descendente, habitualmente pautas de 20 días de duración, y no más de 3 ciclos al año(11).

- **Antibióticos orales macrólidos:** Debido a la baja calidad de la evidencia, no se puede afirmar que el uso de un tratamiento largo con antibióticos (más de 4 semanas), tenga un impacto en los resultados de los pacientes con RSC, particularmente teniendo en cuenta el aumento del riesgo de eventos cardiovasculares. Existe la necesidad de ensayos estudios de alta calidad que actualmente se están llevando a cabo en Europa(2).
- **Tratamiento posdesensibilización con AINE (TPDA):** El TPDA con aspirina oral permite una reducción en la recidiva después de cirugía, mejoría de la calidad de vida y reducción de los síntomas de RSC en EREA. Reduce la necesidad de CC sistémicos y el número de intervenciones quirúrgicas, aunque supone permanecer con tratamiento diario con AAS a altas dosis y, cada vez que se suspende, volver a realizar la desensibilización de nuevo. Como riesgos se incluye el sangrado gastrointestinal, el incremento de la morbilidad por enfermedad renal y alteraciones de la coagulación en dosis altas de mantenimiento(43). Las dietas bajas en salicilatos parecen mostrar una mayor mejoría de la puntuación endoscópica nasosinusal (Lund-Kennedy Score) y de los síntomas en pacientes con EREA y RSCcPN que la dieta normal(44).
- **Fármacos biológicos:** Se desarrollará más adelante.

2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA RSCcPN

En RSCcPN, los objetivos quirúrgicos principales son: establecer una vía aérea nasal permeable y mejorar la obstrucción del orificio de drenaje del seno; disminuir la carga inflamatoria global; y abrir los senos para la mejor distribución de la medicación tópica postoperatoria(11). La cirugía endoscópica nasosinusal (CENS) es el tratamiento de elección cuando la terapia médica adecuada no logra un control satisfactorio de la RSCcPN(2). Un SNOT-22 $\geq$ 20, a pesar del uso de CIN durante al menos 8 semanas, y de haber recibido al menos un ciclo corto de corticoides sistémicos, es el umbral mínimo requerido para indicar cirugía(1). La CENS se debe considerar cuando los pacientes precisan más de un ciclo de corticoides orales en 2 años para RSCcPN, 1 ciclo al año para RSCcPN/asma y 2 ciclos al año para EREA(45).

No hay consenso sobre el tipo de cirugía que debiera realizarse en un paciente sin cirugías previas, y aunque algunos estudios apuntan a realizar una cirugía funcional de entrada, otros abogan por terapias más resectivas(2).

TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE LA RSCcPN

Tipos de anticuerpos monoclonales

- Anticuerpos anti-IgE (omalizumab): El omalizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a la IgE libre y disminuye la expresión de los receptores de IgE en los mastocitos, basófilos y células dendríticas, interfiriendo su activación(46).
- Anticuerpos anti-IL-5/IL-5R α (mepolizumab/benralizumab): Se han publicado los resultados de mepolizumab, inhibidores de la IL-5 libre, así como del benralizumab, un inhibidor de la subunidad alfa del receptor de IL-5 (IL-5R α)(47,48).
- Anticuerpos anti-IL-4R α (vías de la IL-4 e IL-13): El dupilumab es un anticuerpo monoclonal que actúa contra la subunidad del receptor IL-4R α , inhibiendo la actividad de IL-4 e IL-13(40).

Resultados comparativos de los fármacos biológicos

Todos ellos presentan mejoría significativa en la calidad de vida, y un perfil de seguridad excelente, en sus respectivos estudios. Actualmente no hay estudios comparativos, solo comparaciones indirectas(1).

Los tres biológicos aprobados para tratamiento de la RSCcPN (dupilumab, mepolizumab y omalizumab) demostraron una mejoría de la pérdida del olfato comparados con placebo. Además, el dupilumab se asoció a una mejoría del olfato temprana y mantenida(1).

Tratamientos con biológicos en la práctica clínica habitual

No existe ningún consenso sobre el perfil de paciente que podría dirigirse a un biológico u otro, sin embargo, existen estudios que dibujan algunas características específicas en cada uno de ellos. Un estudio realizado en pacientes con asma grave y RSCcPN tratados con omalizumab observó una mejora en síntomas, gravedad, exacerbaciones y ocupación nasosinusal(49). Otro estudio efectuado en pacientes con asma grave y RSCcPN tratados con mepolizumab demostró mejoría en la calidad de vida y una reducción del porcentaje de eosinófilos en sangre y en citología nasal(50). Un estudio realizado en pacientes con asma grave y RSCcPN tratados con benralizumab encontró una mejoría en la calidad de vida y la anosmia desapareció en el 31% de los pacientes(51). Un estudio realizado en pacientes con RSCcPN tratados con dupilumab obtuvo una respuesta completa basada en la impresión del médico según mejoría de síntomas nasales, incluida la anosmia y ageusia; solo en dos pacientes la anosmia persistió(52).

Indicaciones de los fármacos biológicos

Actualmente, los biológicos se consideran en un tercer/ cuarto escalón de tratamiento, tras los CIN (con o sin ciclos de corticoides orales) y la cirugía. La figura 8 propone criterios para la indicación de los mismos(1).

Criterios POLINA para el uso de biológicos

Rinosinusitis crónica con pólipos nasales **bilateral grave^a**
intervenida previamente mediante CENS^b



+ como mínimo **1** criterio adicional

Criterios adicionales	Valores
Inflamación tipo 2	Eosinófilos en sangre ≥ 300 células/ μ l, y/o eosinófilos tisulares ≥ 10 células/campo, y/o IgE total sérica > 100 UI/ml
Pérdida importante del olfato	EVA > 7 cm o hiposmia grave/anosmia (olfatometría)
Necesidad de corticoides orales o contraindicación	≥ 2 ciclos en el último año ^c
Asma y/o EREA concomitante	Corticoides inhalados de forma continuada

Figura 8. Criterios POLINA para el uso de biológicos en RSCcPN. Fuente: adaptado de Guía POLINA(1).
aEva > 7 cm y/o SNOT-22 >50 . bCirugía endoscópica nasosinusal con apertura de senos paranasales >6 meses. cCiclos cortos desde 5 días a dosis 0,5-1mg/Kg/día. EVA: escala visual analógica. EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina. IgE: inmunoglobulina E.

RESUMEN ESQUEMATIZADO DEL TRATAMIENTO DE LA RSCcPN (tabla 3)



Tabla 3. Escalones terapéuticos para el tratamiento de la RSCcPN. Fuente: adaptado de Guía POLINA(1).
AINE: antiinflamatorios no esteroideos. EREA: enfermedad despiratoria exacerbada por aspirina. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. EVA: escala visual analógica. RSCcPN: rinosinusitis crónica con pólipos nasales. aEn spray gotas o lavados. bLavados con solución salina isotónica o lactato de Ringer. cVer criterios polina para el control de RSCcPN (Figura 8). cCiclos cortos desde 5 días a dosis 0,5-1mg/Kg/día.

eAperura de senos paranasales afectados. fPosible elección según endotipo. gValorar cirugías más radicales/extendidas según consenso entre médico y paciente.

1.2. LA BARRERA EPITELIAL EN LA FUNCIÓN Y PATOLOGÍA DE VÍA RESPIRATORIA SUPERIOR

ANATOMÍA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA RESPIRATORIO

El sistema respiratorio del ser humano tiene como principal función el intercambio gaseoso en la sangre, liberando dióxido de carbono (CO_2) y recuperando oxígeno (O_2) del medio; este intercambio es esencial para la respiración celular(53). Las vías aéreas son un sistema de transporte y metabolismo que conduce y acondiciona el aire inspirado hasta los alveolos pulmonares(53) (Figura 9). Este aire está provisto de numerosas partículas, alérgenos y microorganismos, siendo el sistema del cuerpo humano que presenta la mayor tasa de infecciones(54). Por estos motivos, la barrera epitelial es fundamental en el sistema respiratorio, sobre todo en las funciones de defensa.

A nivel anatómico macroscópico, hay una división en este sistema respiratorio: la vía respiratoria superior y la vía respiratoria inferior o tracto broncoalveolar. La principal función de la primera es la de filtración, humidificación y modificación de la temperatura del aire(55). En el tracto broncoalveolar la función es el intercambio gaseoso con las células transportadoras de gases de la sangre(53).

La primera región anatómica que entra en contacto con el aire son las fosas nasales y senos paranasales, que poseen un conjunto de funciones de índole muy variada, siendo estas: función respiratoria, fonatoria (o de resonancia), olfatoria y defensiva(56).

Función respiratoria: el paso del aire por las fosas nasales es de 15000 litros al día, con un flujo medio de 150ml/s. La mayor parte del aire pasa a través del meato medio e inferior, y este flujo puede ser de tipo laminar (igual o menor a 150ml/s), o turbulento (superior a la cifra dada)(57). La resistencia nasal es el sumatorio de las resistencias anatómicas de la válvula nasal, narinas y cornetes, y es necesaria para la mecánica ventilatoria, pues genera una alta presión negativa intratorácica inspiratoria que favorece la entrada de aire y la ventilación de todos los campos y alveolos pulmonares.

Para la función de resonancia es necesaria la participación de fosas y senos paranasales, así como de la cavidad oral, farínge y laringe, con unas complejas propiedades de proyección y flujo del sonido(56).

El nervio olfatorio es un conjunto de axones que atraviesan en forma de fibras nerviosas la región de la lámina cribosa etmoidal y penetra en las fosas nasales, proyectando sus terminaciones a nivel de la región olfatoria de las fosas. Esta región va a poseer un neuroepitelio con abundantes células caliciformes que facilitan el contacto de los odorivectores con las neuronas sensoriales a través del moco(58).

La función defensiva será desarrollada en los próximos puntos.

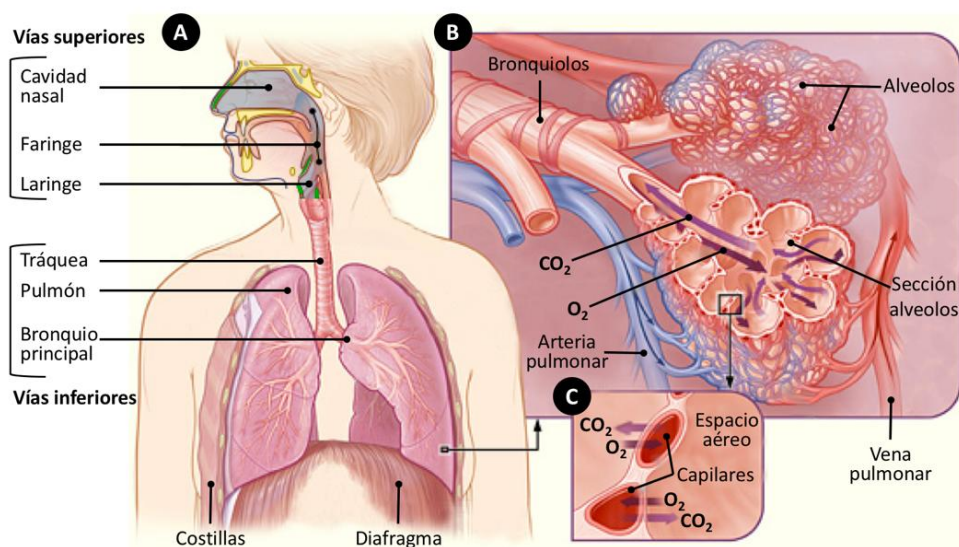


Figura 9. Anatomía del sistema respiratorio. Fuente: adaptado de National Heart, lung and blood Institute(59). A, La porción conductora se divide consecutivamente en vías aéreas superiores (cavidades nasales, faringe, laringe) y vías aéreas inferiores (tráquea, bronquios y bronquiolos). B, la porción respiratoria incluye los bronquiolos respiratorios, los ductos alveolares y los alveolos. C, la fina pared que separa la luz alveolar de los capilares sanguíneos adyacentes permite el intercambio gaseoso. Imagen modificada de referencia.

A nivel histológico, El epitelio de las vías respiratorias va variando en distribución, cantidad y tipo celular, de la misma manera que varía su función. Las fosas nasales y senos paranasales están formadas por epitelio respiratorio, un tipo de epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado que posee ciertas particularidades, formado por los siguientes tipos de células(53):

- **Células ciliadas:** Tienen forma columnar con el núcleo en la base y poseen de 100 a 200 cilios en su membrana celular apical, de 4-10µm de altura; el movimiento coordinado de estos cilios se conoce como batida ciliar y es de gran relevancia, como veremos más adelante. Poseen además entre 300 y 400 microvellosidades de 2µm de altura, que son inmóviles, y poseen gran cantidad de canales iónicos, responsables del intercambio de electrolitos y agua entre la célula y la capa de moco que recubre la mucosa.
- **Células mucosas (caliciformes).** Se encuentran formando parte de las glándulas exocrinas, que son invaginaciones en la superficie mucosa y están formadas por estas células y también las células serosas. Los gránulos presentes en la región apical liberan mucinas (un tipo de glicoproteínas de alto peso molecular) e inmunoglobulinas (Ig) al exterior.
- **Células serosas:** también forman parte de las glándulas exocrinas. Poseen la misma estructura que las caliciformes, aunque sus gránulos están compuestos por otras glicoproteínas, lactoferrinas, lisozimas, transferrinas y antileucoproteasas, que se secretan formando un fluido electrodenso que forma parte del moco. Para la excreción de estos gránulos es necesaria la participación de células mioepiteliales situadas alrededor de los acinos glandulares.
- **Células basales:** de sostén, situadas sobre la lámina basal y con capacidad pluripotencial para diferenciarse a cualquier tipo de célula del epitelio del que forman parte.
- **Células neuroendocrinas:** se ha identificado hasta cinco tipos diferentes de fibras nerviosas conectadas de forma estrecha con estas células, y se especula que su papel sea de receptores fisicoquímicos sensibles a las modificaciones del medio aéreo. Por el momento, no se ha podido establecer correlación entre la densidad o número de estas células con la presencia de síntomas rinosinuales.

A medida que se llega a los bronquiolos, el epitelio cambia gradualmente a cuboidal simple y predominan las también secretoras células de Clara, que liberan proteínas surfactantes y antiproteinasa que protegen el epitelio bronquiolar (60).

Finalmente, en la porción respiratoria los bronquiolos y posteriormente los ductos alveolares formarán invaginaciones denominadas alveolos. Estos poseen epitelio escamoso simple con dos tipos células principales: los neumocitos tipo I, que realizan el intercambio gaseoso gracias al contacto estrecho con las células endoteliales de los capilares pulmonares, y los neumocitos tipo II, que facilitan la función de los anteriores mediante la producción de surfactante (que tiene propiedades tensoactivas).

EL EPITELIO RESPIRATORIO COMO BARRERA DEFENSIVA

La principal función que nos ocupa este trabajo. Existen varios componentes de la función defensiva, pero los podemos esquematizar en tres pilares principales: las uniones intercelulares estrechas y adherentes, que regulan la permeabilidad intercelular epitelial(61); la secreción de productos antimicrobianos para los patógenos inhalados(62) y el aclaramiento mucociliar, que atrapa y elimina las partículas nocivas inhaladas(63).

a) Complejos de unión intercelular

Las partículas de aire inhaladas pueden alterar la integridad de la barrera, lo que podría representar un factor de riesgo para la sensibilización a alérgenos e infecciones(64). En los bordes apicolaterales disponemos de estructuras proteicas que proporcionan uniones intercelulares. Las principales son de dos tipos: las uniones estrechas (TJs por sus siglas en inglés) y las uniones adherentes (AJs por sus siglas en inglés). Las uniones estrechas están compuestas por claudinas y ocludinas y evitan el flujo de solutos y agua a través del espacio paracelular, estableciendo así la polaridad celular. Se conectan al citoesqueleto de actina. La proteína de la membrana epitelial 1 (EMP1) es una proteína de unión estrecha implicada como mediador de la proliferación y diferenciación celular(65). Los niveles de EMP1 están disminuídos en el epitelio de los pacientes con RSCcPN en comparación con la mucosa nasal de control, y se ha observado una reversión

de esta situación tras el tratamiento con corticoides orales(65). *Soyka et al.* detectaron una disminución de la resistencia transepitelial en muestras de biopsia de pacientes con RSCcPN junto con una disminución de la expresión de las proteínas de unión estrecha(66).

Las uniones adherentes son especialmente importantes para el mantenimiento de la adhesión célula-célula y están compuestas por las familias de cadherinas y nectinas. En las células epiteliales, la E-cadherina se une a las cateninas intracelulares, conectando así las AJs con el sistema de señalización desde el exterior hacia el interior de la célula y regulando la expresión génica, proliferación y diferenciación celular. Esta vía conservada evolutivamente regula la expresión génica y la estructura de la cromatina implicada en las respuestas de reparación de heridas epiteliales y diferenciación.

Factores tales como los interferones (IF) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) expresados en respuesta a la infección pueden prolongar la interrupción de las uniones estrechas mucho después de que la infección se haya resuelto, dando paso a alérgenos inhalados y contaminantes(67).

b) Productos antimicrobianos

La defensa antimicrobiana está basada en el componente físico inherente y también una gran variedad de moléculas secretadas por el mismo epitelio con acción antimicrobiana. La lisozima se dirige a los enlaces glucosídicos en la pared celular de peptidoglicano de las bacterias, provocando una lisis enzimática, altamente eficaz contra bacterias como los estreptococos (68). La lactoferrina actúa como un quelante de hierro, que es esencial para la respiración bacteriana, de manera que ejerce un efecto bactericida(69). El inhibidor de la leucoproteasa secretada (SLPI) elimina tanto bacterias grampositivas como gramnegativas. Las defensinas son pequeñas proteínas catiónicas ricas en cisteína que son directamente tóxicas para muchas bacterias, hongos y virus. Forman estructuras similares a poros en las membranas microbianas, lo que lleva a la salida de iones y nutrientes esenciales(70). Las proteínas S100 comprenden una familia multigénica que consiste en más de 20 proteínas de bajo peso molecular que tienen numerosos efectos, incluyendo influencias en la diferenciación y transformación celular,

la función de barrera y acciones antimicrobianas directas. La S100A7 es activa principalmente frente a *Escherichia coli* y está reducida en las secreciones nasales de pacientes con rinitis alérgica(70). La S100A7 y la S100A8/S100A9 están reducidas en pacientes con RSCcPN(70).

Con la formación de pólipos en los pacientes con RSCcPN se puede observar una disminución de glándulas, con el consecuente déficit de lactoferrina, lisozima y proteínas de la familia PLUNC(71). *Wei et al.* demostraron una expresión reducida de SPLUNC1 antimicrobiano y un menor número de glándulas submucosas en el subconjunto eosinofílico de pacientes con PN en comparación con el subconjunto no eosinofílico. Además, la expresión de SPLUNC1 en células epiteliales de pólipos fue significativamente inhibida por la estimulación con IL-4 e IL-13 in vitro, pero fue significativamente aumentada después de la estimulación con agonistas del receptor tipo toll y glucocorticoides(72). La expresión del receptor epitelial de Ig polimérica está disminuida en pacientes con RSCcPN y rinitis alérgica, lo que resulta en una disminución del componente secretor y los anticuerpos IgA en las secreciones nasales, y además a una acumulación subepitelial de IgA. Este defecto en la inmunidad mucosa se asocia a inflamación eosinofílica e inflamación relacionada con linfocitos T Helper 2 (Th2)(73).

c) Aclaramiento mucociliar (figura 10)

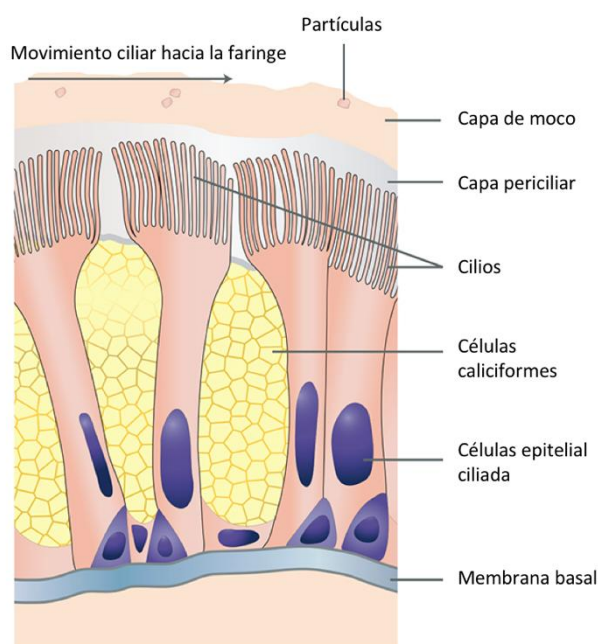


Figura 10. Aclaramiento mucociliar. Fuente: adaptado de National Heart, lung and blood Institute(59).

Los cilios son estructuras tubulares en la región apical de las células del epitelio respiratorio con una implicación altamente importante en el aclaramiento de moco y por tanto, de la defensa de las vías respiratorias. El déficit de batida de estos cilios se ha visto implicado en múltiples enfermedades, agrupadas bajo el nombre de ciliopatías(68). La discinesia ciliar primaria (DCP) es una patología congénita de base genética en la que existen alteraciones de la motilidad ciliar y la ciliogénesis, como enzimas modificadoras de tubulina(74). Los pacientes que sufren de DCP suelen tener infecciones bacterianas recurrentes y prolongadas en las vías respiratorias, RSCcPN y alteraciones crónicas en el oído medio y las vías respiratorias inferiores(74). La frecuencia de batida ciliar se ve modificada por la colonización de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* tanto en las vías respiratorias inferiores, la región nasofaríngea y cavidad nasal y los senos paranasales. El polimorfismo del receptor de sabor T2R38 (expresado en el epitelio de vías respiratorias superiores) está asociado con la susceptibilidad a la infección bacteriana gramnegativa en los senos paranasales humanos(75). *Li et al.* encontraron una asociación significativa de ciliogénesis aberrante con la alteración de cilios móviles primarios, que es más frecuente en pacientes con RSCcPN de lo que se pensaba anteriormente(76). Se ha demostrado que la prostaglandina E2 (PGE2) es importante para la función mucociliar normal in vitro y en modelos animales(68). Los ratones con deficiencia de sintasa de prostaglandina E2 presentan una deficiencia de prostaglandina E2, lo que lleva a un fenotipo de sensibilidad a la aspirina(68).

La exposición al humo del tabaco altera la mucosa sinonasal. *Xie et al.* detectaron mediante análisis microscópico y ELISA, en pólipos obtenidos de 28 pacientes con RSCcPN no fumadores y 21 fumadores, que la exposición al humo de cigarrillos estimula la producción de prostaglandina E2, IL-8 y TNF- α (77).

d) Canales iónicos y moco

Los cilios están recubiertos por mucinas que atraviesan la membrana y mucopolisacáridos que excluyen el moco del espacio periciliar y promueven la formación de una capa de moco distinta, un gel sobre el que se puede deslizar el verdadero moco para su aclaramiento(78). Las dos principales mucinas formadoras de gel en las vías respiratorias son MUC5AC (producida principalmente por las células caliciformes) y MUC5B (producidas por las glándulas submucosas). Las mucinas formadoras de gel se secretan en el lumen de las vías respiratorias y son responsables de las propiedades viscoelásticas características de la capa de gel de moco(68). La fibrosis quística (FQ) es un trastorno autosómico recesivo con mutaciones del gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística, que codifica un canal de cloruro regulado por ATP y está presente en la superficie apical de las células epiteliales(79). En esta patología existe disminución del volumen de líquido en la superficie de las vías respiratorias, aumento de la viscosidad del moco, colonización por patógenos, desequilibrio entre proteasas y antiproteasas, inflamación pulmonar y RSCcPN, aunque los mecanismos fisiopatológicos aún están estudiándose(79).

EL EPITELIO REGULA LA RESPUESTA INMUNE

Además del sistema de defensa innata proporcionado por el aclaramiento mucociliar, las células epiteliales reconocen patógenos e inician la señalización que desencadenará la respuesta inmune de mucosas(80). Las superficies de las células epiteliales se activan para responder a los patrones asociados a patógenos (PAMP) y los patrones moleculares asociados al peligro (DAMP). Esto lo realizan mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluyendo receptores tipo Toll (TLR) y receptores tipo Nod (NLR)(81) (figura 11). Las células epiteliales ciliadas expresan múltiples TLR(81,82). *Tengroth et al.* Estudiaron la mucosa etmoidal de un grupo control y los pólipos de pacientes con RSCcPN. TLR9 estaba ausente en los cornetes de pacientes con RSCcPN. La estimulación con agonistas de TLR9 resultó en una regulación positiva de TLR9 y modulación de citocinas en el tejido de cornete de los pacientes, sugiriendo que los defectos en la

defensa microbiana mediada por TLR9 en el cornete podrían explicar el crecimiento de pólipos inducido por virus(83). Los PAMP y los DAMP son reconocidos por los TLR de manera específica: lipoproteínas (TLR1, -2 y -6), LPS (TLR4), flagelina (TLR5), ADN (TLR9) y ARN (TLR3, -7, y -8). Este reconocimiento inicia la transducción de señales a través del adaptador MyD88 y otros mecanismos independientes. MyD88 provoca la fosforilación de quinasas como p38, JNK o ERK1/2 que a su vez activan factores de transcripción como NF- κ B y/o IRF3, induciendo la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en las células epiteliales (Figura 1.5). Estas citoquinas y quimiocinas inducen el reclutamiento y activación de células profesionales del sistema inmunológico para modular las respuestas inflamatorias. De este modo, el resultado de la señalización vía PAMPs o DAMPs, influenciado por la naturaleza tanto del patógeno como del entorno inflamatorio en las vías respiratorias, puede desencadenar tanto efectos protectores como patológicos sobre las funciones de barrera de las vías respiratorias(62,80,84).

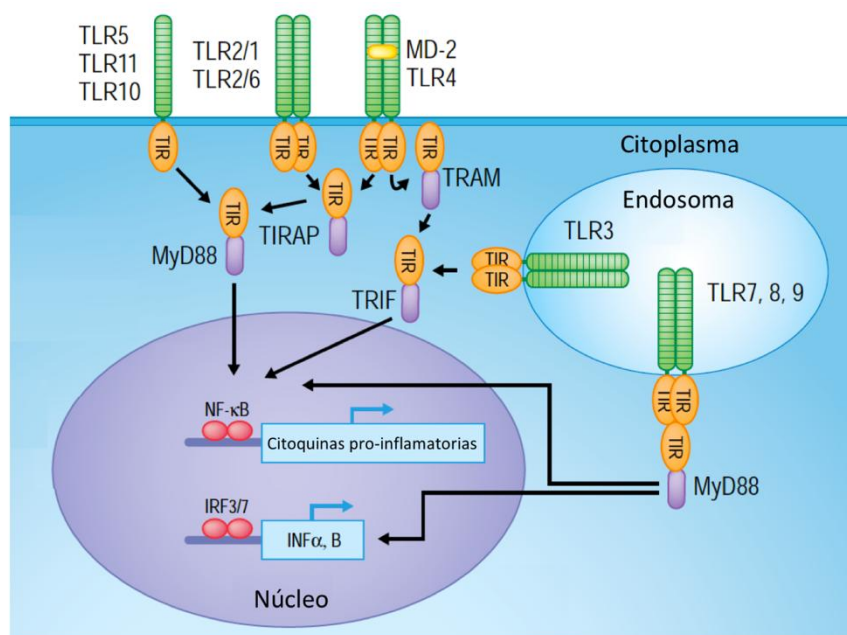


Figura 11 Localización y señalización de los receptores tipo Toll (TLR). Fuente: adaptada de Rich et al(85). Los TLR se localizan en la membrana celular y endosomal. La unión del correspondiente ligando a cada TLR activa una cascada de señalización a través de sus dominios Toll/IL-1R (TIR), que mediante las moléculas adaptadoras MyD88 y/o TRIF inducen la transcripción de genes pro-inflamatorios.

La producción de TSLP (citocina de señalización) por las células epiteliales nasales humanas in vitro fue estimulada por un ligando de TLR2 así como por IL-1 β y TNF α . Se ha detectado tanto una expresión reducida como aumentada del gen o la proteína IL-33

en el epitelio nasal de pacientes con rinitis alérgica. Las citocinas IFN- γ y IL-13 impiden la correcta diferenciación de las células epiteliales, con la consecuente reducción de la batida ciliar(2).

Hupin et al. mostraron una reducción de E-cadherina, CKs de alto peso molecular y CK5 en RSCcPN. Esta reprogramación epitelial se correlaciona con fibrosis subepitelial y con la gravedad de la enfermedad(86). Se necesita más evidencia para establecer el papel de la respuesta autoinmune en la patogénesis de la RSC(68).

1.3. SENESCENCIA

SENESCENCIA CELULAR

INTRODUCCIÓN

La senescencia celular es el proceso por el cual la división celular normal se detiene por diversas señales. Fue descrita por primera vez por Hayflick y Moorhead (1961)(87). Esta detención del ciclo celular se produce como respuesta a estímulos conocidos como estrés celular, y lleva asociados cambios entre los que destacan: respuesta proinflamatoria, disfunción mitocondrial y acortamiento de los telómeros(88). La célula senescente está en constante comunicación con el resto de células y moléculas de la respuesta inmune, lo que hace que este íntimamente ligada y que pueda regular la respuesta inmunitaria(89).

La senescencia celular es compleja y se relaciona con la patogenia de numerosas enfermedades. Entre los procesos oncológicos, cabe destacar su papel en la proliferación e invasión de células tumorales, se asocia a enfermedades crónicas como la hipertensión arterial o la diabetes, y algunas neurodegenerativas, entre otras(90). A pesar de los numerosos esfuerzos, los mecanismos implicados no se conocen exactamente, ya las vías de senescencia son complejas y en muchas ocasiones relacionadas entre sí. Genes oncogénicos y otros factores que provocan daño en el ADN genómico y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como RAS, el alcohol, el lipopolisacárido bacteriano y el butirato de sodio contribuyen a este proceso(90).

Además, numerosas vías de señalización están involucradas en este proceso, como las rutas de p53, la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK), el factor nuclear kappa B (NF- κ B), la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), EphA2/efrina-A1 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)(91).

Asimismo, la senescencia celular se acompaña de inflamación crónica derivada de la producción de factores inflamatorios, como la interleucina-1 α (IL-1 α), IL-6, TNF α e IL-10. Otra complejidad añadida a la investigación son los mecanismos de regulación epigenética, que aportan un sinnúmero de variantes y procesos relacionados entre sí(92).

Dado que la senescencia celular está vinculada a múltiples enfermedades, aportar estudios para conocer cómo regularla es una prioridad. La inhibición de la producción de ROS, la supresión de señales asociadas a la senescencia y el ejercicio físico pueden retrasar este proceso. Además, es posible inducir la apoptosis de células senescentes mediante fármacos que inhiban proteínas antiapoptóticas o activen la vía de p53.

MÉTODOS PARA DETECTAR SENESCENCIA CELULAR

Los fenotipos senescentes no son estables y pueden variar en diferentes momentos tras la inducción de la senescencia(93). Algunas características, como la formación de fenotipo asociado a senescencia (SASP), pueden no observarse en ciertas condiciones o incluso estar ausentes en determinados tipos celulares, a pesar de la presencia de otros fenotipos de senescencia. Por lo tanto, es necesario evaluar una combinación de varios fenotipos diferentes para confirmar la existencia de senescencia celular. Se han utilizado múltiples técnicas para identificar células senescentes. Dada la heterogeneidad de las células senescentes y la falta de especificidad de los marcadores, a menudo se utiliza una combinación de diferentes técnicas para la detección de células senescentes(93).

- **Respuesta del ADN al daño (DDR):** La presencia de focos de la histona g-H2AX medidos por inmunotinción demuestra daño continuo y no reparado del ADN(94). También se puede medir el nivel de p53 fosforilado, un jugador clave en la señalización de DDR(91).
- **Arresto del ciclo celular:** Se utilizan dos tipos de ensayos para mostrar que las células han salido del ciclo celular. El primero incluye la medida directa del potencial de proliferación de las células mediante la medición de su potencial de formación de colonias o de la tasa de síntesis de ADN mediante ensayos de incorporación de BrdU/EdU. El segundo incluye medir el nivel de expresión de p16 y p21(94).
- **Fenotipo secretor:** Las citoquinas (por ejemplo, IL-1a, IL-6 e IL-8), las quimiocinas y las metaloproteinasas se utilizan como marcadores(94). También es común

usar inmunotinción o ELISA para medir la expresión y secreción de proteínas de algunos de estos factores, particularmente IL-6(95).

- **Resistencia a la apoptosis:** La regulación al alza de las proteínas BCL (Bcl-2, Bcl-w o Bcl-xL) se ha utilizado como un marcador de senescencia(96)
- **Tamaño de la célula:** In vitro, el cuerpo celular agrandado y la forma irregular de las células senescentes se evalúan fácilmente mediante microscopía de campo claro(94). La inmunofluorescencia dirigida a vimentina, actina u otras proteínas citoplasmáticas se puede usar para medir los cambios en la forma de la célula(93).
- **Composición de la membrana plasmática:** Rara vez se mide en células senescentes y no se utiliza como un marcador regular de senescencia. Recientemente, una forma oxidada de vimentina presente en la membrana plasmática y otras proteínas de membrana, como DEP1 y DPP4, se han propuesto como marcadores(93).
- **Aumento del contenido lisosomal por aumento de actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal):** SA-b-gal es el marcador más común de la actividad lisosomal y una de las primeras pruebas utilizadas para evaluar la senescencia(93).
- **Acumulación de mitocondrias:** Se ha medido el potencial de membrana de las mitocondrias y usado microscopía electrónica para evaluar su forma celular en algunos estudios(97).
- **Cambios nucleares:** Los niveles reducidos de LaminaB1 (LMNB1) se han convertido en un marcador común. La regulación a la baja de LaminaB1 depende de p53 y p16(93).

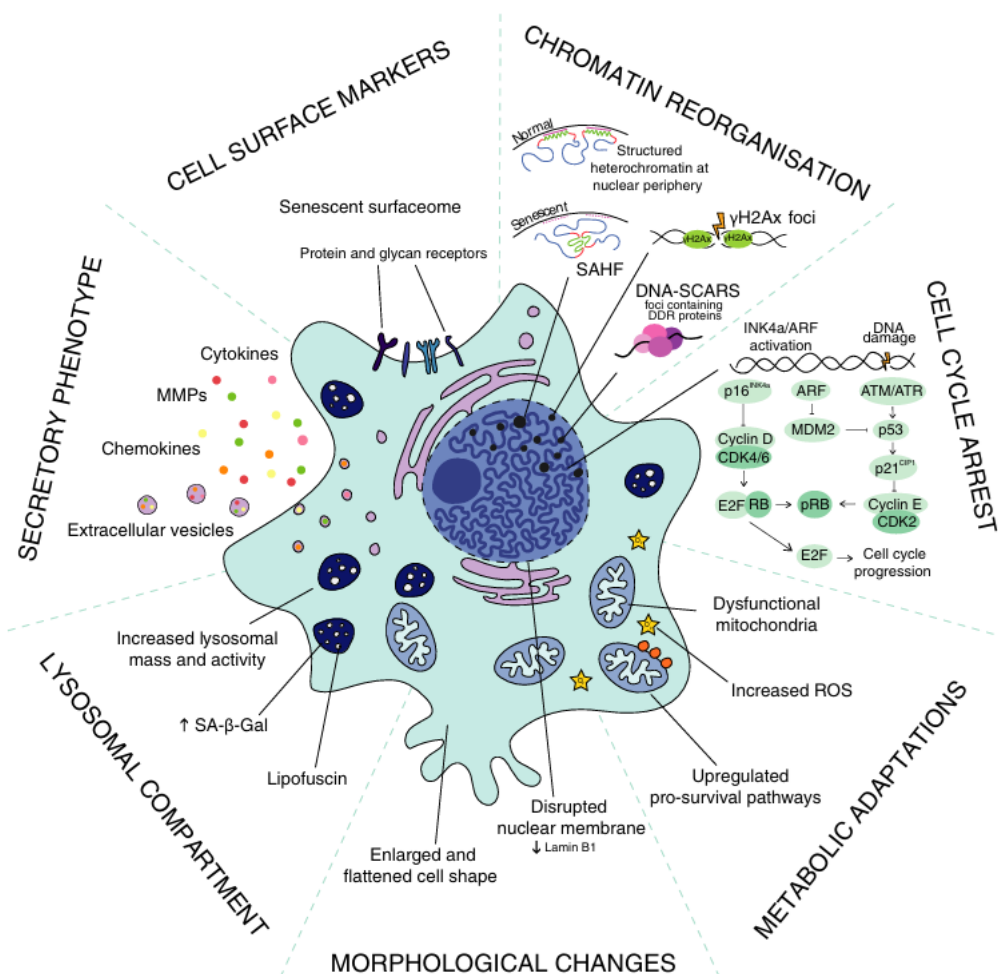


Figura 12. Rutas generales de la senescencia celular. Obtenido de Rich et al(100). Varios mecanismos y alteraciones celulares constituyen las llamadas marcas de la senescencia celular. Estas incluyen un arresto estable del ciclo celular, impulsado por la acción y cooperación de varias proteínas implicadas en las vías p16INK4a/Rb y p21CIP1/p53, dependiendo del inductor de la senescencia; Alteraciones y reorganización de la cromatina, que incluyen marcas como SAHFs y DNA-SCARS, además de provocar la ruptura de la envoltura nuclear; Daño macromolecular y cambios metabólicos, como el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mitocondrias disfuncionales; Resistencia a la apoptosis, resultado de la sobreexpresión de vías pro-supervivencia; Aumento del compartimento lisosomal, caracterizado por la conocida sobreexpresión de SA-β-gal, y la implementación de una secreción paracrina intensa, denominada SASP (fenotipo secretor asociado a senescencia). In vitro, las células senescentes suelen presentar una morfología característica, aplanada y agrandada. Además, se han descrito otras características, como la presencia de más de un núcleo (multinucleación), ADN citoplasmático, la expresión de lo que ahora surge como “senescent surfaceome” (proteínas de superficie celular asociadas a senescencia). Abreviaciones: CDK: quinasa dependiente de ciclina; DDR: respuesta al daño del ADN; DSB: rupturas de doble cadena; SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia; UPR: respuesta a proteínas mal plegadas.

SEÑALES INDUCTORAS DE SENESCENCIA

- Daño en el ADN

Cada vez hay más evidencia acerca de que el estrés celular, el estrés ambiental y la inflamación crónica pueden inducir senescencia celular mediante respuestas proinflamatorias(98). En particular, el estrés oxidativo contribuye al daño en el ADN y al acortamiento de los telómeros(91).

Se ha descubierto que el daño en el ADN activa el sistema de interferón tipo I y la inflamación a través de sensores de ADN (como la GMP-AMP ciclasa (cGAS), la proteína AIM2 (absent in melanoma 2) y la proteína 16 inducible por interferón (IFI16)) Este daño además desencadena senescencia celular(99) y provoca la acumulación de fragmentos de ADN en el citoplasma, aunque los sensores específicos que lo reconocen e inician la senescencia aún se desconocen.

Estudios recientes demuestran que cGAS es esencial para la senescencia inducida por inmortalización espontánea o agentes genotóxicos(100). La activación de la vía cGAS-STING promueve el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) (Figura 2). La composición del SASP cambia según el tipo de célula, órgano, especie y otros factores. El SASP no solo afecta a la célula que lo secreta (función autocrina), sino que también induce cambios en las células cercanas (función paracrina), liberando una serie de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas de remodelación de la matriz. La complejidad y diversidad de este fenotipo es una de las limitaciones para identificar células senescentes, ya que no poseen un marcador específico(101).

Los factores SASP, como IL-1 e IL-6, pueden desempeñar funciones autónomas de la célula y reforzar el estado de senescencia(102). Sin embargo, muchos factores SASP ejercen una función no autónoma y pueden alterar el comportamiento de las células vecinas(93). Se ha demostrado que los factores SASP promueven la reorganización de estructuras embrionarias, participan en la remodelación y reparación de tejidos, y mejoran la inmunovigilancia(103). Por el contrario, la presencia crónica de algunos factores proinflamatorios y de remodelación de tejidos, como las interleucinas se ha asociado con estados de enfermedad y fenotipos de envejecimiento(104). Muchos factores del SASP se producen como proteínas solubles que pueden ser transportadas directamente al ambiente extracelular, pero algunos se secretan a través de pequeñas vesículas extracelulares (similares a exosomas) que, una vez liberadas por las células senescentes, pueden ejercer una función más distal, por ejemplo, aumentando la

proliferación de células cancerosas y su regulación depende de p53(93). Se proporcionarán otros detalles sobre el SASP en los siguientes apartados.

- El papel del ARN no codificante largo (lncRNA)

Los lncRNA también regulan la senescencia mediante la respuesta al daño del ADN (DDR). Por ejemplo, HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) induce senescencia y modula la resistencia al platino en tumores ováricos; en tumores recurrentes resistentes al platino, HOTAIR está sobreexpresado y activa la señalización de NF- κ B al reducir la inhibidora I κ -B α (105).

- Genes oncogénicos y reguladores del daño en el ADN:

- GATA4(106):

Activa el factor de transcripción NF- κ B para iniciar el SASP. Su estabilización durante la senescencia depende de las quinasas ATM y ATR (figura 13). En condiciones normales, es degradado por autofagia mediada por p62, pero este proceso se inhibe en células senescentes.

- p21(107):

Mantiene la viabilidad de células senescentes inducidas por daño en el ADN.

Su inhibición provoca apoptosis al activar ATM y la quinasa de NF- κ B.

Hace dos décadas, se descubrió que el gen oncogénico Ras puede inducir senescencia celular al activar la acumulación de p53 y p16 (Figura 2). Posteriormente, *Zhu et al.* (1998) demostraron que otro gen oncogénico, Raf, también regula la senescencia a través de la señalización de MAPK (figura 13).

NORE1A, un miembro de la familia de dominios asociados a Ras, también contribuye a este proceso mediante(109) interacción con p53 y Rb, y la formación de un complejo con HIPK2, que potencia la interacción entre HIPK2 y p53 (Figura 13). También induce la acetilación de p53 (acción pro-senescencia) e inhibe de su fosforilación proapoptótica.

CAMBIOS EN LA MAQUINARIA CELULAR DURANTE LA SENESCENCIA

- **Lámina nuclear**

Está bien establecido que el acortamiento de los telómeros debido a la proliferación celular induce senescencia(90). Estudios previos demuestran que, en células senescentes, los centrómeros y telómeros se localizan cerca de la lámina nuclear, y los telómeros se agregan progresivamente durante este proceso. De hecho, esta agregación telomérica está asociada a cambios en la organización espacial de la lámina nuclear. Además, se ha observado que la morfología de la lámina nuclear difiere entre células sanas y senescentes, lo que la convierte en un marcador fenotípico útil para identificar senescencia. Esto ha permitido desarrollar métodos para cuantificar la intensidad y curvatura de la lámina nuclear y clasificar poblaciones celulares(110).

Tanto la laminina B1 como su receptor se reducen significativamente en células senescentes, lo que sugiere su papel crítico en la disfunción nuclear asociada a la senescencia. Se ha observado que tanto la laminina B1 como su receptor disminuyen durante la transición a senescencia en células tumorales tras irradiación gamma. Esta reducción provoca la liberación de heterocromatina desde la lámina nuclear, alterando la arquitectura de la cromatina y la expresión génica(111).

Se ha observado cierta controversia sobre laminina B1(90):

1. Por una parte, el silenciamiento de laminina B1 induce senescencia dependiente de p53 y pRb.
2. Sin embargo, la sobreexpresión de laminina B1 también induce senescencia, pero este efecto se bloquea al inactivar p53 o expresar telomerasa. Estudios previos

vinculan este mecanismo con la activación de la vía p38 MAPK por estrés oxidativo.

Aunque los mecanismos exactos siguen sin esclarecerse, *Hutchison et al.*(112) propone que el desequilibrio en la relación laminina B1/laminina A altera la estructura de la lámina nuclear, desencadenando senescencia.

- **Disfunción mitocondrial**

Cada vez más trabajos demuestran que las mitocondrias desempeñan un papel clave en la senescencia celular. El daño en el ADN mitocondrial provoca disfunción mitocondrial y un aumento en la producción de ROS. Estas ROS pueden inducir senescencia al causar disfunción telomérica, como se ha comentado anteriormente. Los factores estudiados que inducen senescencia por daño mitocondrial son:

- **Humo del cigarrillo:** Induce senescencia en fibroblastos pulmonares y células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas al alterar la mitofagia (eliminación de mitocondrias dañadas) y aumentar el número de mitocondrias disfuncionales. El mecanismo subyacente es la acumulación de p53 citoplasmático, que interfiere con la translocación de Parkin (proteína clave en la mitofagia) hacia las mitocondrias(113). Estudios demuestran que antioxidantes mitocondriales específicos pueden retrasar este proceso(113).
- **Deficiencia de hFis1:** La ausencia de hFis1 (proteína de fisión mitocondrial) causa alargamiento mitocondrial sostenido, baja tasa de proliferación celular y aumento de la actividad de SA- β -gal (marcador de senescencia, como hemos visto anteriormente)(75).
- **Deficiencia de PGC-1 α :** La falta del coactivador 1 α del receptor proliferador de peroxisomas gamma (PGC-1 α) acelera la senescencia vascular debido a mayor estrés oxidativo, reducción de la actividad de la telomerasa, disfunción mitocondrial(114).
- **Reducción de Drp1:** La disminución de la proteína 1 relacionada con la dinamina (proteína de fisión mitocondrial) en células endoteliales senescentes empeora su función al alterar el flujo autofágico(115).

- **Senescencia asociada a disfunción mitocondrial (MiDAS):** MiDAS desencadena el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), caracterizado por la producción de $\text{TNF}\alpha$, IL-10 y CCL27. Además, MiDAS reduce la relación NAD^+/NADH , lo que activa vías proinflamatorias y acelera el envejecimiento celular. MiDAS se caracteriza por(90):
 1. Activación de la vía AMPK-p53, que reduce la relación NAD^+/NADH y promueve el SASP.
 2. Deficiencia de caveolina-1 (Cav-1), que induce senescencia prematura al causar disminución de la respiración mitocondrial y actividad de los complejos de fosforilación oxidativa, inactivación de Sirtuina 2 (Sirt2), este proceso depende de la vía p53-p21.

En condiciones de estrés oxidativo la caveolina-1 se une a Sirt1 en la membrana de caveolas, inhibiendo su actividad, esto aumenta la acetilación de p53 y la producción de IL-6, desencadenando senescencia(116). Las implicaciones terapéuticas pasan por pensar que antioxidantes mitocondriales y moduladores de NAD^+ podrían atenuar MiDAS, y además la restauración de caveolina-1 o activación de Sirt1/Sirt2 emergen como estrategias para retrasar la senescencia patológica.

MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN EN LA SENESCENCIA CELULAR

- **Señalización de p53**

El papel de la vía de p53 en la senescencia celular ha sido ampliamente investigado. Estudios han identificado proteínas que modulan este proceso (117), como la aurora B quinasa, la fosfolipasa A2 secretora o el interferón- γ . Algunos inhibidores de la senescencia mediada por p53 (90) son sirtuina 2 (Sirt2), proteína de choque térmico 27 (Hsp27) o MAD2. P53 regula la senescencia prematura inducida por IGF-1(118): la exposición breve a IGF-1 estimula la proliferación, mientras que la exposición prolongada induce senescencia mediante inhibición de Sirt1 y aumento de acetilación de p53. La senescencia dependiente de p53 requiere Akt y p21(119), y Foxp3 acelera la senescencia en fibroblastos y células epiteliales cancerosas aumentando p21 y ROS(119).

- **Señalización de p38 MAPK**

La activación de p38 MAPK, mediada por AMPK y la proteína de unión TAK1, promueve senescencia en linfocitos T humanos mediante(120) la inhibición de la actividad telomerasa, la supresión de la proliferación de células T y la reducción de moléculas del señalosoma del TCR.

Hallazgos relevantes a este respecto (90):

- Los linfocitos T CD8+ CD45RA+ muestran niveles elevados de ROS y p38 MAPK
- La Inhibición de p38 MAPK induce autofagia independiente de mTOR y aumenta telomerasa en células T senescentes
- La activación de p38 MAPK desencadena el SASP independientemente de la respuesta a daño del ADN
- El bloqueo combinado de p38 y PD-1 mejora la proliferación celular

Las diferencias observadas en los estudios podrían ser explicadas por la variabilidad en los tipos celulares utilizados o a los diferentes mecanismos de acción entre las vías AMPK y p38 MAPK.

- **La señalización NF- κ B inducen senescencia celular(98) mediante tres mecanismos principales:**

Inducción por estrés oxidativo (los ROS activan NF- κ B a través de la fosforilación de IKK (inhibidor de κ B cinasa)); daño del ADN (fragmentos de ADN citoplasmáticos activan NF- κ B, promoviendo el SASP); interacción con p53 (NF- κ B y p53 regulan negativamente entre sí, creando un equilibrio entre senescencia e inflamación). El efecto en la senescencia es la promoción del SASP mediante la regulación de la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, TNF α) en células senescentes.

Las implicaciones terapéuticas implican a los inhibidores de NF- κ B, que reducen la inflamación crónica asociada al envejecimiento. Un ejemplo como el compuesto PS-341 (bortezomib) bloquea NF- κ B y mejora patologías relacionadas con senescencia.

- **La señalización vía mTOR**

El inhibidor de mTOR, rapamicina, regula la senescencia celular mediante(121) la supresión de IL-1 α unida a membrana(122). Esta reduce la actividad transcripcional de NF- κ y se ha propuesto como terapia para enfermedades relacionadas con el envejecimiento al inhibir la inflamación asociada a senescencia. Los principales mecanismos son el aumento de la expresión de Nrf2 y la restauración de la autofagia, mejorando la función mitocondrial y la actividad lisosomal.

- **Señalización TGF- β**

Los estudio de esta vía van dirigidos a aplicaciones y desafíos en células madre pluripotentes(90), con potencial terapéutico en reparación de tejido isquémico y enfermedades vasculares. La principal limitación es que la senescencia se ve acelerada en condiciones *in vitro* sin suero, afectando la formación vascular, que difiere de los procesos *in vivo*.

Los mecanismos moleculares implicados son:

1. Complejos NF1/Smad: Reprimen la expresión de ANT2 (transportador de nucleótidos). Esta inhibición aumenta los ROS y el daño en el ADN
2. Regulación por integrina beta3 y CBX7:
 - Integrina β 3: Activa TGF- β de forma paracrina/autocrina
 - CBX7 (proteína Polycomb): Regula ITGB3 durante la senescencia inducida por oncogenes
3. Interacción con Notch1: media la senescencia asociada a TGF- β

- **Señalización Wnt en la Senescencia Celular**

La función de la vía Wnt en senescencia sigue sin estar clara. En el caso particular del melanoma, se ha observado que células con una elevada expresión de Wnt5A muestran características de senescencia como una elevación de la expresión de p21 y otros marcadores, especialmente bajo estrés terapéutico (por ejemplo, la radiación). Sin embargo, estas células conservan capacidad de migración e invasión, lo que sugiere que no son verdaderamente senescentes, sino que se trata de una respuesta adaptativa al estrés.

SENESCENCIA E INFLAMACIÓN CRÓNICA

En condiciones normales, el sistema inmunológico reconoce y elimina células senescentes. Con el envejecimiento, estas células se acumulan, contribuyendo a enfermedades asociadas a la edad(123). El SASP es crucial para que el sistema inmunológico identifique células senescentes (89). Sin embargo, el SASP también promueve inflamación crónica y enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

Equilibrio entre p53 y NF- κ B(98): p53 (disminuye con la edad) y NF- κ B (aumenta con la edad) se regulan negativamente entre sí. P53 inicia la senescencia, mientras que NF- κ B induce el SASP. El daño del ADN está vinculado a la producción de citocinas inflamatorias en células senescentes(106). Algunos sensores de ADN como AIM2 y NLRP3 reconocen ADN citoplasmático y promueven la inflamación, aunque su papel en senescencia requiere más estudios.

La variante de histona H2AJ se acumula en células senescentes y potencia la expresión de genes inflamatorios, genes de respuesta inmune y genes asociados al SASP(89).

TERAPEÚTICA: ELIMINACIÓN DE CÉLULAS SENESCENTES

- **Inducción de apoptosis en células senescentes**

Se han desarrollado diversas estrategias para eliminar selectivamente células senescentes entre las que destacan:

Péptidos y moléculas pequeñas(124,125):

- FOXO4-p53: Un péptido que interrumpe esta interacción induce apoptosis en células senescentes y restaura la homeostasis tisular.
- Agmatina: Activa p53 e inhibe p21. Además, reduce la actividad de SA- β -gal y la expresión de IL-6, TNF α y CCL2 en neuronas en condiciones de niveles elevados de glucosa.

Inhibición de proteínas anti-apoptóticas(107,123):

- ABT-737 (inhibidor de BCL-W/BCL-XL) induce apoptosis en células senescentes dérmicas y promueve proliferación de células madre del folículo piloso.
- ABT263 (inhibidor de BCL-2/BCL-xL) es capaz de eliminar selectivamente células madre senescentes favoreciendo el rejuvenecimiento de tejidos envejecidos.

- **Inhibición de la senescencia mediante supresión del estrés oxidativo(90)**

Se han estudiado algunos compuestos naturales con actividad antioxidante, como la curcumina, que es un polifenol natural con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Atenúa la senescencia prematura en células endoteliales inducida por H₂O₂ mediante la activación de Sirt1. La nicotinamida (derivado de la vitamina B3) reduce los niveles de ROS, retrasando la aparición de senescencia. 27-hidroxicolesterol promueve acumulación de ROS, y el antioxidante N-acetilcisteína puede contrarrestar este efecto.

- **Inhibición de vías asociadas a la senescencia celular**

1. Terapia inducida por senescencia en células tumorales(126): podría tener un papel, mediante el aumento de Bag3 (gen asociado a Bcl2) durante la senescencia inducida por terapia. Bag3 interacciona con MVP (proteína mayor de

la bóveda celular) cuya función es activar la vía ERK1/2, promoviendo la resistencia a quimioterapia. Su silenciamiento debilita ERK1/2 y promueve la apoptosis en células senescentes.

2. Inhibición de la vía MEK/ERK(127): Elimina células senescentes transformadas por Ras al bloquear la formación de autofagosomas e impedir así la eliminación de mitocondrias dañadas.

- **Regulación inmunitaria de la senescencia celular**

Existe una implicación directa de algunas células del sistema inmune en el fenotipo SASP(90). Los macrófagos (F4/80+) eliminan células senescentes en el útero, mejorando el éxito del embarazo. Las células NK eliminan células tumorales senescentes mediante NKG2D. La restauración de p53 recluta células NK mediante quimiocinas. Los interferones tipo I amplifican la respuesta a daño del ADN y promueven la senescencia, y también inducen ligandos (MIC-A/ULBP2) en células NK para reconocer células senescentes.

- **Uso de virus oncolíticos contra células senescentes**

Se han propuesto algunas estrategias, como el empleo del virus del sarampión(128) para la lisis de células tumorales senescentes, o el adenovirus oncolítico(129), que en combinación con doxorrubicina e ifosfamida, elimina células de sarcomas de tejidos blandos.

- **Ejercicio Físico y Senescencia Celular(130)**

El exceso nutricional aumenta la expresión de proteínas asociadas a senescencia (p16, p53, p21) y la actividad de SA-β-gal. En este sentido, el ejercicio físico reduce la expresión de genes asociados al SASP y previene la acumulación de células senescentes inducida por dietas hipercalóricas. Los mecanismos propuestos pasan por una disminución del estrés metabólico y replicativo en tejido adiposo, activación de respuestas protectoras

contra la senescencia y promoción de la eliminación de células senescentes por el sistema inmunológico.

NUEVOS HORIZONTES EN EL ENVEJECIMIENTO CELULAR

Existen varios desafíos que se deben tener en cuenta para implementar estas terapéuticas (90), el primero de ellos, la dualidad de la senescencia celular, que juega un papel crucial en fisiología normal, pero también en enfermedades asociadas al envejecimiento. Esto abre las puertas a algunas preguntas aún sin resolver como: ¿participa en la selección de clones de células B durante el desarrollo embrionario? ¿cuál es su papel en la regulación de la inflamación inducida por patógenos (por ejemplo, inducir senescencia en macrófagos para controlar infecciones bacterianas o virales)?. También se deben identificar nuevas vías de señalización que permitan alcanzar mayor profundidad en el entendimiento de las actuales y futuras. Las nuevas direcciones pueden pasar por la exploración de terapias combinadas (por ejemplo, el empleo conjunto de fármacos senolíticos y ejercicio físico) y estudios traslacionales para aplicar hallazgos en modelos clínicos.

RSCcPN Y SENESCENCIA

HISTONAS

Las histonas son subunidades proteicas básicas que forman parte del nucleosoma del núcleo celular. Participan de manera activa en la modificación epigenética postraduccional del código genético, por lo que sus alteraciones van a repercutir de manera activa en la regulación genética(131). Las principales modificaciones de histonas se van a producir a través de la ubiquitinación, la metilación, la fosforilación y la acetilación(131,132).

La modificación de histonas involucra células inflamatorias como los linfocitos T y macrófagos, que contribuyen a la remodelación de las vías respiratorias. Además de alterar la función nuclear, las histonas también pueden actuar como moléculas de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) cuando se liberan en el espacio

extracelular. Se han detectado histonas en la superficie celular o en el citoplasma de las células inmunes, y se ha demostrado que los niveles de histonas circulantes en animales o pacientes con cáncer, inflamación e infección aumentan(133). Como componentes de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), las histonas juegan un papel en la inmunidad innata capturando y degradando microorganismos invasores(134).

Histológicamente, los pólipos nasales consisten en tejido conectivo laxo, estroma mixoide edematoso y células inflamatorias. Están cubiertos por diferentes tipos de epitelio respiratorio, que se caracterizan por hiperplasia y metaplasia escamosa. Por lo tanto, el desequilibrio entre la apoptosis y la proliferación podría proporcionar información vital para entender su patogénesis. Varios estudios han demostrado que los mecanismos apoptóticos son vitales para el desarrollo y progresión del pólipo nasal(135). Se ha demostrado que la expresión de la histona H2BK estaba disminuida en pacientes con pólipos nasales en comparación con los controles(136).

Cho et al. (2013) han observado que la trichostatina A puede suprimir la diferenciación de miofibroblastos inducida por TGF- β 1 y la producción de matriz extracelular mediante la acetilación de histonas en los pólipos nasales (137). Hay evidencia de que la metilación de la histona H3 promueve la formación de pólipos(138), y fármacos como la desmetilasa de histonas KDM2B han demostrado frenar el desarrollo de la inflamación del epitelio de la mucosa nasal en pacientes con RSCcPN(139,140).

ESTRÉS OXIDATIVO (GSH)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son un grupo de compuestos que contiene oxígeno, y que incluyen superóxidos, radicales, grupos hidroxilo y peroxilo y peróxido de hidrógeno(92). Las ROS se generan a través de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias y funcionan como factores de señalización que regulan la proliferación celular, migración, diferenciación y apoptosis. Por lo tanto, se considera que la acumulación de ROS es crítica para el desarrollo de la inflamación(141). El equilibrio de las ROS se mantiene mediante un sistema antioxidante que puede ser modulado por fármacos como el glutatión (GSH), droga antioxidante, o la bleomicina (BLE), sustancia

inductora de fibrosis. BLE puede inducir apoptosis al aumentar los niveles de ROS generadas por las mitocondrias. Se ha documentado que en pacientes con RSCcPN, los niveles de ROS aumentan en sus pólipos nasales(142), y la BLE ha demostrado que induce una apoptosis celular que puede verse revertida por GSH(143).

Reguladores del ciclo celular

Algunos estudios se han dirigido a examinar la apoptosis a nivel de genes y proteínas reguladoras del ciclo celular. Relacionando la colonización por *Staphylococcus aureus* con la apoptosis inducida por bacterias en las células olfativas(144). Ya se documentó que la exposición del tracto respiratorio a alérgenos ambientales o toxinas puede causar daño a la membrana mucosa, seguido de una respuesta inflamatoria y una menor expresión de BCL-2 (gen antiapoptótico)(145). Esto también se ha demostrado en pacientes con RSCcPN(146).

La proteína supresora de tumores P53, regula la transcripción de genes responsables de la reparación del ADN, el ciclo celular, el envejecimiento y los procesos de proliferación. Existen niveles más elevados de P53 en pacientes con RSCcPN, lo que con la consecuente mayor proliferación de las células epiteliales(146), aunque otros estudios muestran una disminución de las mismas(147).

Los estudios de la proteína P21 parecen ser más concordantes. P21 es una proteína multifuncional que regula el ciclo celular y asegura la estabilidad del genoma en respuesta a varios estímulos, incluido el daño al ADN(148). Algunos estudios observan aumento de expresión de P53 y P21 en pacientes con RSCcPN(146). En este mismo estudio, se estudiaron otros genes implicados en la apoptosis por diferentes rutas celulares, y concluyeron que existía mayor apoptosis en pacientes con RSCcPN y que además existían varias rutas que desembocan en este fenómeno(146). En este mismo estudio(146), se analizaron las vesículas extracelulares, que contienen ARN y micro ARN (pequeños fragmentos de ARN no codificante con funciones reguladoras de genes), objetivando que la expresión de los micro ARN en vesículas extracelulares difería según el fenotipo crónico de la rinosinusitis crónica sin pólipos nasales (RSCsPN) y la RSCcPN.

Al transferir un miRNA de una célula a otra, las vesículas extracelulares pueden desempeñar un papel funcional en el desarrollo de RSC. Por lo tanto, la creciente evidencia indica que las moléculas también pueden servir como biomarcadores valiosos en el diagnóstico de enfermedades con apoptosis excesiva. *Liu et al.* presentan una asociación entre algunos microARN y el riesgo de exacerbación aguda, la inflamación y la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Además, observaron una correlación positiva de esas moléculas con los niveles de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 y IL-23)(149).

IL 6

La interleucina-6 (IL-6) es una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel crítico en la patogénesis de la RSC. IL-6 induce la diferenciación de células T naïve en células T helper tipo 17 (Th17) y mantiene la producción de IL-17 en pacientes con RSCcPN(150). Además, IL-6 exagera la respuesta epitelial a factores externos y promueve la formación de pólipos(151).

IL 1

La interleucina-1 (IL-1) es una de las citoquinas proinflamatorias más importantes y un potente transmisor entre células, modulando las primeras etapas de la cascada de respuesta inflamatoria en RSCcPN(152). IL-1 juega un papel en la activación de linfocitos T y monocitos, y también en la regulación al alza de la expresión de moléculas de adhesión. Existen tres formas de IL-1: IL-1A, IL-1B y el antagonista del receptor de IL-1, que se encuentran en el brazo largo del cromosoma 2(153). Un estudio turco reportó con éxito la asociación de los polimorfismos de IL-1A (+4845G, +4845T) y IL-1B (-511C, -511T) con pacientes con RSCcPN(154). También se ha evidenciado que la IL-1B puede ser uno de los actores clave en la cascada inflamatoria de RSCcPN y RSCsPN(155).

PROLIFERACIÓN CELULAR

En los pólipos nasales, los cambios en la morfología epitelial (metaplasia escamosa, hiperplasia secretora) ocurren con frecuencia, y muchos estudios han sugerido una

desregulación de la proliferación de células epiteliales(156). Se supone que la función de barrera anormal y la remodelación de las células epiteliales nasales también contribuyen a la inflamación crónica y a los procesos de transformación tisular característicos de la RSC 25. Según hallazgos recientes, se observó un aumento de células basales con una proliferación anormal (p63+/Ki67+) en el epitelio de los pólipos nasales, lo que resultó en un epitelio remodelado aberrante que carece de una función de barrera adecuada(157). Estos cambios morfológicos y funcionales en las células epiteliales nasales pueden alterar el ambiente inflamatorio local, ya que las citoquinas derivadas de las células epiteliales, como IL-33 y la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), están asociadas y contribuyen directamente a la fisiopatología de RSCcPN (ver apartado *1.1 de Introducción*).

Ki 67 es un marcador de proliferación, y sus valores se elevan en el proceso de remodelado tisular. Tiene un papel en la interfase y durante la mitosis: ayuda a formar la capa pericromosomal, un recubrimiento para los cromosomas condensados. Debido a la actividad de Ki 67 durante la mitosis y su inactividad durante los períodos de reposo celular, ha sido una herramienta útil para clasificar la proliferación en varios tipos de neoplasias y en tejidos con inflamación importante(158). Existen estudios en los que se observaron niveles más altos de Ki 67 en los pólipos nasales, y además este marcador presenta correlación positiva con niveles elevados de IL-4, IL-7, IL-10 e IL-12, implicadas en la proliferación celular(159,160).

Se ha demostrado que genes que codifican citoquinas inflamatorias y receptores nucleares de hormonas están aumentados en pacientes con PN (ver apartado *Fisiopatología y endotipos de la RSCcPN*). Estos genes actúan como mediadores clave de la activación de las células residentes en los tejidos. En particular, TGFβ1 induce la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, caracterizados por la expresión de actina de músculo liso α y la producción de proteínas de la matriz extracelular. Además, induce procesos de remodelación tisular que hace que las células epiteliales pierdan su polaridad y adquieran una forma similar a la de los fibroblastos. Estos cambios contribuyen a la fibrosis tisular(161). Además, el incremento de fibroblastos sinonasales

en pacientes con RSCcPN se correlaciona con la gravedad subjetiva de la enfermedad(162).

SISTEMA Nrf-2 Y SENESENCIA

Como se mencionó anteriormente, se cree que el estrés oxidativo juega un gran papel tanto en la senescencia como en la RSCcPN. El Factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es una proteína sensible a ROS involucrada en la transducción de señales celulares. Está localizada en el citoplasma anclada a una proteína supresora llamada Keap1. Cuando se activa, generalmente en respuesta a una señal de estrés, se libera de Keap1 y se traslada al núcleo, comenzando a regular la expresión de muchos genes antioxidantes, antiinflamatorios y antifibróticos(163) (Figura 14).

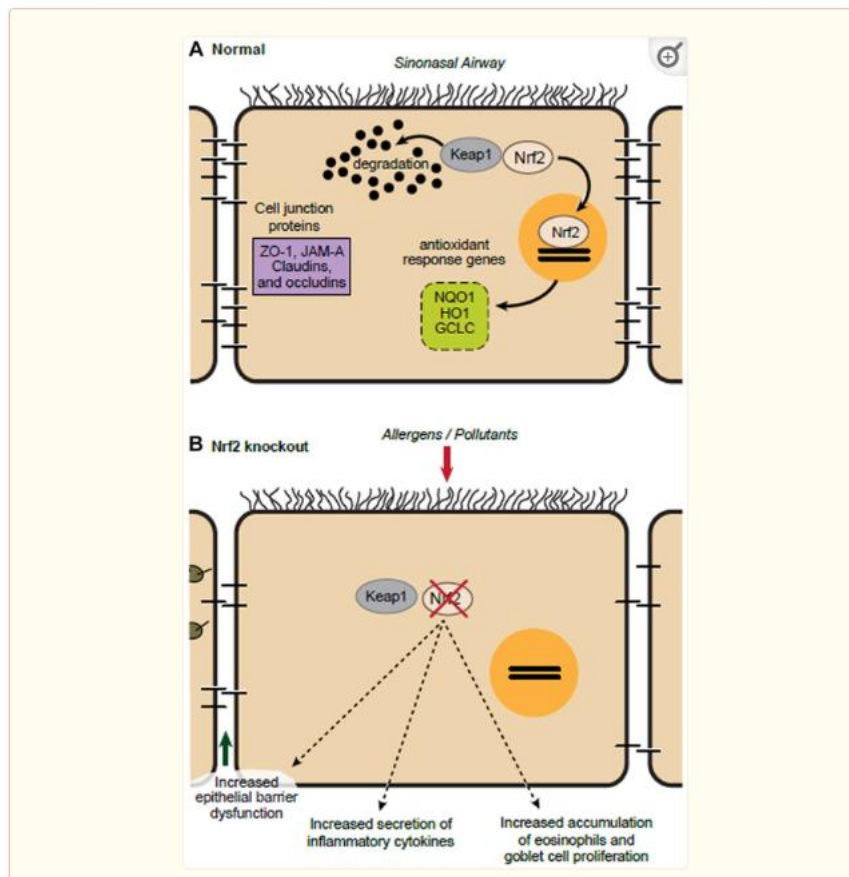


Figura 14. Sistema Nrf2. Adaptado de Loboda et Al(164) . (A) En condiciones normales, Keap 1 secuestra a Nrf2 en el citoplasma, y esta se libera para promover una respuesta antioxidante. (B) Cuando Nrf2 está suprimida, la exposición a alérgenos tiende a multiplicar los efectos, incluyendo un exceso de

permeabilidad de la barrera epitelial sinonasal, liberación de citocinas inflamatorias epiteliales, acúmulo de células inflamatorias sinonasaes, e hiperplasia de las células caliciformes.

Los agonistas de Nrf2 han mostrado efectos protectores contra el estrés oxidativo generado por el humo del tabaco en células epiteliales, tanto del tracto respiratorio inferior como superior (163,165,166).

El sistema Nrf2 está implicado en la protección de la barrera epitelial, aunque los mecanismos implicados aún no están demostrados. Una posibilidad, dado el papel conocido de Nrf2 en generar una respuesta antioxidante, es que un aumento en especies reactivas de oxígeno pueda debilitar las uniones estrechas o llevar a una alteración en la dinámica de las proteínas de las uniones estrechas epiteliales. Otra alternativa es que los niveles aumentados de citoquinas inflamatorias reportados aquí pueden actuar directamente para interrumpir la función de la barrera(166). Son necesarios estudios que aclaren estas cuestiones.

Otros grupos han demostrado el uso de alimentos antioxidantes para potenciar el efecto y activación de Nrf2, sugiriendo su posible futura aplicación en RSCcPN(167).

ACTIVADORES DE NRF2

- ***Omaveloxolona (OMA)***

Omaveloxolona es un triterpenoide oleanano semisintético con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Este compuesto es un fuerte activador de la vía Nrf2 y también un inhibidor del factor nuclear kappa B (NF-κB), un regulador del estrés oxidativo y la inflamación. Muchos estudios demostraron su eficacia in vivo e in vitro para el tratamiento de varios trastornos de estrés oxidativo. Un estudio en particular mostró que OMA tenía efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos(168).

- ***Obacunona (OBA)***

Obacunona es un limonoide extraído de frutas cítricas con muchas propiedades farmacológicas. Actúa reduciendo la ubiquitinación de Nrf2, lo que lleva a una mayor concentración de Nrf2 en el citosol y, en consecuencia, parte de él permanece libre de Keap1 y puede translocarse al núcleo. Este mecanismo está detrás de las actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas de este fármaco, como lo demuestra un estudio(169).

La vía de Nrf-2 parece tener un papel importante en el desarrollo RSCcPN como se mencionó anteriormente. Sin embargo, no se han realizado muchos estudios utilizando estos agentes. Por esa razón, elegimos incluir omavexolone y obacunona.

CAPÍTULO 2

Hipótesis y objetivos

2.1. HIPÓTESIS

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

- a) La RSCcPN es una patología crónica, en la que el objetivo es el control de la enfermedad para aportar al paciente calidad de vida (39).
- b) El cuestionario Sino-nasal Outcome Test-22 (SNOT-22) es una herramienta muy útil y ha sido validado para evaluar la calidad de vida en pacientes con RSCcPN (26).
- c) El principal tratamiento de la RSCcPN son los CC tópicos. Sin embargo, existe un porcentaje no desdeñable de pacientes (entre el 20 y el 45%) en los que la enfermedad no está totalmente controlada con ellos (170).
- d) Los CC sistémicos están indicados como tratamiento de rescate en ciclos cortos en pacientes en los que los CC tópicos no son suficientes para controlar la enfermedad, aunque, como en el primer caso, existe un porcentaje de pacientes no respondedores que serían tributarios a la cirugía nasosinusal(2).
- e) Existen terapias dirigidas a dianas moleculares específicas (omalizumab, mepolizumab o dupilumab) indicadas ante refractariedad de la enfermedad tras cirugía o cuando esta está contraindicada. Se utilizan en pacientes con inflamación Th2. Sin embargo, no existen tratamientos específicos para aquellos pacientes con una inflamación diferente a Th2 validados(171).
- f) La EREA es una condición ligada a mayor agresividad de la RSCcPN, con peores respuestas al tratamiento, peor calidad de vida y mayor tasa de recurrencia(11).
- g) El envejecimiento celular se ha estudiado en la RSCcPN y se han descubierto algunas moléculas implicadas como TNF α , IL-1b, IL-6 e IL-8(62). La molécula Nrf2 está relacionada con el envejecimiento mediado por ROS, y este está presente en la PN(142).

h) Para aquellos pacientes sin inflamación Th2 y aquellos en los que no existe respuesta a los tratamientos vigentes, se podrían estudiar terapias dirigidas contra el envejecimiento celular(1).

HIPÓTESIS:

Atendiendo a los antecedentes anteriores, nuestra hipótesis es que existe mayor envejecimiento celular mediado por Nrf2 en los pacientes con RSCcPN y que este podría ser más frecuente o más intenso en los pacientes con EREA. Los pacientes con RSCcPN y en especial, aquellos con EREA, podrían beneficiarse de terapias antisenescencia.

2.2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Evaluar el potencial terapéutico del uso de antioxidantes (obacunona y omaveloxolona) en la senescencia en pacientes con RSCcPN.

Objetivos secundarios:

- a) Analizar la expresión y distribución de marcadores de senescencia en sujetos sanos, en pacientes con RSCcPN sin EREA y en pacientes con RSCcPN con EREA.
- b) Investigar los efectos de la bleomicina y los activadores de Nrf2 en la senescencia de células epiteliales humanas.

CAPÍTULO 3

Material y método

3.1. REACTIVOS UTILIZADOS (tabla 4)

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ácido acético glacial	Panreac	361008
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	131020
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich	A7906
Anfotericina B	Lonza Group LTD	17-836E
ARN interferente control negativo	Ambion	AM4611
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	P8340
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	L3771
PBS	Thermo Fisger Scientific	17-513F
DPX	Panreac	255254
GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	Thermo Fisher Scientific	10308449
EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)	Sigma	E3889
Etanol absoluto	Panreac	361086
Formaldehido 3.7-4%	Panreac	143091
Kit Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific	23225
Marcador de peso molecular Amersham High-Range Rainbow	GE Healthcare	RPN756E
Opti-MEM	Thermo Scientific	11058021
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma	RP7626
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	4369016
Tween20	Sigma-Aldrich	P1379
Xileno	Merck	481769
Kit de deteccion de la apoptosis celular Annexin V-FITC	Abcam	ab14085
Medio Keratinocyte Growth Medium (KGM-2)	PromoCell	C-20111

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	88417-1G
Dimetilsulfoxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	D8418
CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay	Invitrogen	C20300
Isopropanol	Panreac, Applichem	131090
20,70- diclorodihidrofluoresceína Diacetato (CM-H2DCFDA)	Invitrogen	C6827
Accutasa	PromoCell	C-41310
Staining Buffer Tampón para citometría	Invitrogen	00-4222-26
Tripsina	Biowest	X0930-100
Human IL-6 DuoSet ELISA	R&D	DY206-05
Human IL-8 DuoSet ELISA	R&D	DY208
Human IL1-a DuoSet ELISA	R&D	DY200
Human Total MMP-1 DuoSet ELISA (nº Cat., R&D)	R&D	DY901B
Human Total MMP-9 DuoSet ELISA	R&D	DY911
Kit MagMAX™-96 Total RNA isolation	Thermo Fisher Scientific	AM1830
Kit Total RNA purification	Norgen Biotek	17250
Kit taqman para transcripción inversa	Thermo Fisher Scientific	N8080234
Geles de poliacrilamida Mini-PROTEAN® TGX™	Bio-Rad	4568024
Membranas de nitrocelulosa Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack	Bio-Rad	1704156EDU
2x Laemmli Sample Buffer	BIO-RAD	1610737
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma - Aldrich	ED2SC
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1- piperazino etanosulfónico (HEPES)	Sigma - Aldrich	H4034
Agua tratada con DEPC	Thermo Fisher Scientific	AM9906
Carbonato de litio	Sigma - Aldrich	101752913

Citrato	PanReac AppliChem	141808.1210
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma - Aldrich	P8340
Eosina	Sigma - Aldrich	HT110216
Hematoxilina	Sigma - Aldrich	GHS332
Lipofectamina™ 2000	Thermo Fisher Scientific	11668030
Master polymer plus detection system (peroxidase) (incl. dab chromogen)	Master diagnóstica	MAD-000237QK
Nonidet™ P 40 Substitute	Sigma - Aldrich	74385
Obacunona	selleckchem	S3784
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, No Phenol Red	Thermo Fisher Scientific	11520386
Parafina	Sigma - Aldrich	P3683
Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose w/l- glutamine w/o sodium pyruvate (DMEM)	Biowest	L0102-500
Fetal Calf Serum (FCS)	Amimed	2-01F00-I
Intracell Fixation and permeabilization kit for Flow Cytometry	Immunostep	INTRA-100

Tabla 4. Reactivos utilizados.

3.2. PROTOCOLO DE LA INVESTIGACIÓN

1. MARCADORES DE SENESCENCIA EN PACIENTES CON POLIPOSIS
 - a. RT-PCR EN PACIENTES EREA Y NO EREA
 - b. INMUNOHISTOQUIMIA EN EREA Y NO EREA
 - c. LONGITUD DE TELÓMEROS
2. PRUEBAS DE ESTÍMULOS INDUCTORES DE LA SENESCENCIA EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES SANAS
3. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES SANAS: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.

4.1. RT-PCR

- 4.2. ELISA
- 4.3. GSH
- 4.4. PROLIFERACIÓN
- 4.5. Histonas
- 5. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES DE PACIENTES CON RSCcPN SIN EREA: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.
 - 5.1. RT-PCR
 - 5.2. ELISA
 - 5.3. GSH
 - 5.4. PROLIFERACIÓN
 - 5.5. Histonas
- 6. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES DE PACIENTES CON RSCcPN CON EREA: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.
 - 6.1. RT-PCR
 - 6.2. ELISA
 - 6.3. GSH
 - 6.4. PROLIFERACIÓN
 - 6.5. Histonas

3.3. PACIENTES

Los criterios de inclusión fueron: pacientes del servicio de Otorrinolaringología del Hospital General Universitario de Valencia con RSCcPN que prestaron su consentimiento verbal y por escrito para participar en este estudio. Se clasificaron en dos grupos, en función de si dentro de sus comorbilidades existía la EREA o no. También se incluyeron voluntarios sanos que prestaron su consentimiento verbal y por escrito para participar en este estudio.

Las muestras se recogieron bajo anestesia local tópica y vasoconstrictor tópico (*lidocaína 20mg/ml + adrenalina 0.0125mg/ml solución inyectable EFG*). En el caso de los pacientes con RSCcPN se obtuvieron muestras de los pólipos con pinza Well-Blakesley y se almacenaron con suero salino fisiológico (NaCl 0.9%) para su posterior análisis. En el caso de los voluntarios sanos, las muestras se obtuvieron de la mucosa nasal de la porción

lateral de la cabeza del cornete medio, bajo anestesia local tópica y vasoconstrictor tópico (*lidocaína 20mg/ml + adrenalina 0.0125mg/ml solución inyectable EFG*).

3.4. Aislamiento y cultivo de células primarias nasales sanas inmortalizadas

Para la experimentación con células epiteliales se empleó la línea celular primaria comercial Human Nasal Epithelial Cells, HNEpC (Cat.No. C-12620; PromoCell, Heidelberg, Alemania). Fueron cultivadas en placa colagenizada (10 µg/cm² de colágeno tipo I de rata; Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) con medio Airway Epithelial Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Alemania) suplementado con 1% de Penicilina/Estreptomicina (Lonza Group, Basilea, Suiza) y 1% de Anfotericina B (Cytiva; Washington DC, EEUU) a 37°C con 5% CO₂. El medio fue reemplazado cada 48 horas.

El medio Airway Epithelial Cell Growth Medium contiene medio basal para células epiteliales suplementado con: extracto de pituitaria bovina (0,004 ml/mL), hidrocortisona (0,5 µg/mL), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (10 ng/mL), epinefrina (0,5 µg/mL), transferrina (10 µg/mL), insulina (5 µg/mL), triyodo-L-trionina (6,7 ng/mL) y ácido retinoico (0,1ng/ml).

3.5. Aislamiento y cultivo de células primarias epiteliales de Pólipos Nasales

Los fragmentos de Pólipo Nasal (~5x5 mm) se lavaron con suero fisiológico estéril y se incubaron en placas de cultivo previamente colagenizadas (10 µg/cm² de colágeno tipo I de rata, Sigma) con medio de crecimiento para epitelio de vía respiratoria (ver apartado anterior).

Los PN se orientaron de manera que la capa epitelial estuviera en contacto con la placa de cultivo. Los cultivos se guardaron en un incubador humidificado con 5% de CO₂ a 37°C. Después de un período aproximado de 1-2 semanas pudieron observarse células epiteliales en torno a los fragmentos de pólipo y se aislaron para los experimentos.

La identificación de la monocapa celular como células epiteliales nasales se realizó mediante criterios morfológicos y la expresión de citoqueratina 18 (KRT18) por inmunofluorescencia. La viabilidad celular se determinó por análisis de exclusión con Azul de Tripano mediante el contador celular automático Countness® (life technologies). La viabilidad celular fue >98% en todos los cultivos celulares empleados en este trabajo.

3.6. ESTIMULACIÓN CELULAR

Para los experimentos, los diferentes tipos celulares fueron estimulados con obacunona 12,5µM, 25µM y 50µM y metformina 2mM. Las concentraciones de obacunona fueron más altas que el resto de los estímulos al tratarse de un fármaco natural. También se estimularon con omaveloxolona a tres concentraciones diferentes: 1nM, 10nM y 80nM. Tras media hora de incubación se añadió el estímulo de senescencia bleomicina a 30 ug/ml. Tras 72 horas de incubación se procedió a la determinación de resultados. La metformina a concentración 2nM se empleó como control de reversión de senescencia, pues es más que conocido su potente poder antienvjecimiento celular. Las condiciones llamadas como control o estímulo fueron tratadas con la misma proporción de vehículo que las condiciones tratadas con fármaco, DMSO o agua. En la totalidad de los casos el porcentaje de DMSO máximo fue de menos del 0,003%, excepto en el caso de los ensayos en los que se trabajaba con obacunona, donde el porcentaje máximo fue de un 0,2% DMSO, porcentaje aceptable como se ha observado previamente con este fármaco.

3.7. HISTOLOGÍA

Para técnicas histológicas todos los tejidos empleados en este trabajo fueron fijados con Formaldehído 3,7-4,0% (pH=7) durante 48 horas. Seguidamente los tejidos se incluyeron en cassettes de inclusión, se rotularon con lápiz y se deshidrataron mediante los siguientes tratamientos (tabla 5):

Tratamiento	Tiempo	Repeticiones
Etanol 70%	60 minutos	x1

Etanol 95%	60 minutos	x2
Etanol 100%	60 minutos	x3
Xileno	60 minutos	x2
Parafina	60 minutos	x1

Tabla 5. Protocolo de deshidratación de tejidos.

Tras esto, se incluyó en bloques de parafina con un inclusor EC350-1 Myr (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza). Estos mismos bloques se cortaron en secciones de 4-6 μm de espesor con un micrótopo HM 340 E (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza). Tras ello se procedió a la adhesión en portaobjetos, y su secado a temperatura ambiente durante 48 horas.

3.8. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el análisis inmunohistoquímico se empleó el kit comercial *Master polymer plus detection system*. Las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron siguiendo la secuencia de la Tabla 6.

Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Estufa 60°C	15 min	X1
Xileno	10 min	X2
Etanol 100%	5 min	X1
Etanol 95%	5min	X1
Etanol 70%	5 min	X1
Etanol 50%	5 min	X1
Agua	5 min	X1

Tabla 6. Protocolo de desparafinado e hidratación del ensayo inmunohistoquímico.

Posteriormente, los portaobjetos fueron introducidos en una cubeta que contenía una solución de citrato a 10 mM y se sometieron a calentamiento en baño maría durante 15 minutos con el fin de llevar a cabo el desenmascaramiento de los antígenos. A continuación, se dejaron enfriar las muestras y se enjuagaron durante 5 minutos en agua

mili-Q. Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, se utilizó la solución incluida en el kit comercial, y la membrana celular fue permeabilizada con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos. Con el propósito de bloquear uniones inespecíficas, se aplicó una solución de BSA al 5%, incubando durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. El anticuerpo primario se preparó en una dilución de BSA al 0,1% en PBS y se incubó con las muestras durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron P16INK4 (Hs00923894_m1, Thermo Fisher Scientific) y p21 (RAC1) (Hs01040810_m1, Thermo Fisher Scientific). Al día siguiente, se añadió el anticuerpo secundario proporcionado por el kit, dejándolo actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Dicho anticuerpo secundario estaba conjugado con peroxidasa, la cual, al reaccionar con el sustrato DAB Chromogen concentrate, generó un precipitado marrón visible en las áreas donde se localizaba el anticuerpo primario. Una vez revelada la señal, se realizó una contratinción con hematoxilina diluida 1:2 durante 2 minutos, seguida de la deshidratación de los tejidos conforme a los pasos detallados en la tabla 7. Finalmente, se montaron las muestras añadiendo medio de montaje DPX y colocando el cubreobjetos. Las secciones teñidas fueron examinadas mediante un microscopio Nikon Eclipse TE200.

<i>Tratamiento</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de repeticiones</i>
<i>Etanol 90%</i>	5 min	X2
<i>Etanol 100%</i>	5min	X2
<i>Xileno</i>	10 min	X2

Tabla 7. Protocolo de deshidratación del ensayo inmunohistoquímico.

3.9. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Extracción de ARN total y cuantificación

Esta técnica se empleó para determinar las diferencias de expresión a nivel de ARN. El ARN total de las células primarias comerciales Human Nasal Epithelial Cells, HNEpC (Cat.No. C-12620; PromoCell, Heidelberg, Alemania) y las células primarias de paciente

se purificó utilizando el extractor automático KingFisher Duo Prime (Thermo Fisher Scientific) (Figura 15B) con el kit de extracción MagMAX™ 96 Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El extractor automático empleó una solución de lisado de muestras a base de tiocianato de guanidinio que solubiliza rápidamente las membranas celulares y simultáneamente inactiva las nucleasas. Tras la homogeneización, las muestras se mezclaron con perlas magnéticas que tienen una superficie de unión a ácidos nucleicos. A continuación, las perlas y los ácidos nucleicos unidos se capturaron magnéticamente y se lavaron para eliminar los restos celulares, las proteínas y otros contaminantes. Finalmente, el ácido nucleico se trató con DNasa y se purificó de la mezcla de reacción, para eluirlo en 50 µL de tampón bajo en sal. Para realizar dicho protocolo, se preparó una placa de 96 de pocillos profundos (Figura 15A) con los reactivos requeridos por el extractor, así como las muestras lisadas con la solución proporcionada por el kit, y se colocó la placa en el equipo (Figura 15B), que realizó la extracción de manera automática.

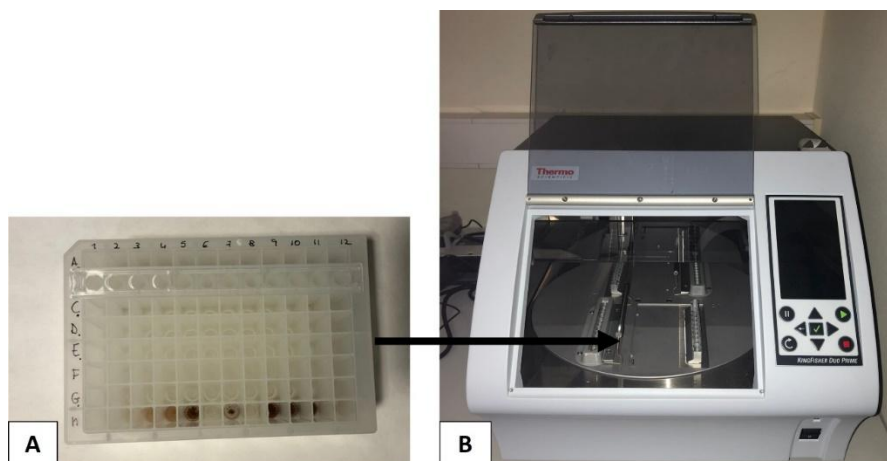


Figura 15. Equipo de extracción de ARN. (A) Placa de 96 de pocillos profundos cargada con las muestras y los reactivos del kit MagMAX™ 96 Total RNA Isolation Kit. (B) Extractor de ARN automático KingFisher Duo Prime.

En el caso de la extracción de ARN de los tejidos de células epiteliales sanas y de pólipos de pacientes, se empleó el kit de extracción por columnas *Total RNA purification* (Norgen Biotek), basado en la purificación de ARN mediante cromatografía en columna de centrifugación utilizando una resina como matriz de separación. Para ello se disgregaron los tejidos con el tampón RL proporcionado por el kit, en el sistema de homogenización tisular TissueLyser II (Qiagen) con bolas de hierro a una frecuencia de 30 Hz durante 3

minutos. Seguidamente se añadió etanol y se cargaron las muestras en una columna de centrifugación a la que el ARN queda adherido. Se realizaron lavados seriados para eliminar impurezas restantes, y el ARN total purificado se eluyó en la solución de elución proporcionada por el kit.

En todos los casos la pureza del ARN extraído y la concentración se confirmaron con un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific.).

Transcripción reversa (RT)

En la reacción de transcripción reversa o retrotranscripción (RT), la enzima transcriptasa inversa sintetiza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero molde. Este paso fue necesario para realizar la cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real. Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit TaqMan® para la transcripción inversa. Se realizó este proceso en un termociclador Veriti 96 well thermal cycler (Applied Biosystems) con los siguientes pasos (Figura 16): incubación durante 10 minutos a 25°C, ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C. El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

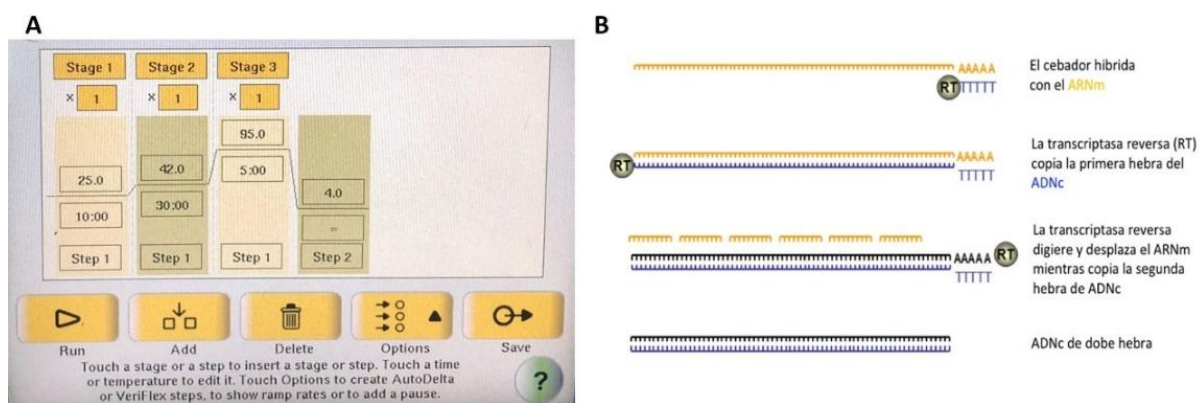


Figura 16. Esquemas de la retrotranscripción. Fuente: adaptada de Montero et al (172). (A) Esquema de los pasos de la transcripción reversa en un termociclador Veriti 96 well thermal cycler (Applied Biosystems). (B) Etapas de la reacción de transcripción reversa.

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

Tras la transcripción reversa, esta técnica se empleó para determinar las diferencias de expresión a nivel de ARN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica selectivamente una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Estos cebadores flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo de tres etapas a diferentes temperaturas. Cada repetición del ciclo produce un aumento exponencial en el número de copias de ADN de la región de interés. La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la reacción empleando lectores de fluorescencia. Para ello se utilizaron Ensayos de Expresión Génica TaqMan®, que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan® utilizan una sonda fluorogénica y la actividad de la Taq Polimerasa para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la Figura 17.

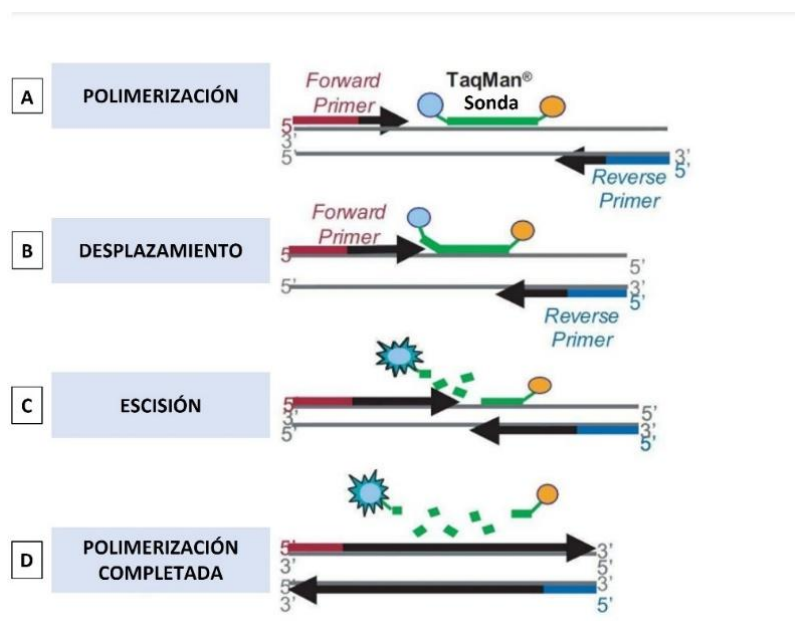


Figura 17. Sistema TaqMan® de cuantificación fluorométrica de la expresión génica. Fuente: adaptada de Montero et al (172). (A) Etapa de polimerización. (B) Etapa de desplazamiento. (C) Etapa de escisión. (D) Fin de polimerización.

La sonda contiene un fluoróforo en el extremo 5' y un inhibidor de fluorescencia (quencher) en el extremo 3'. Este último absorbe la fluorescencia emitida por el

fluoróforo mientras ambos permanecen unidos a la sonda próximos entre sí (Figura 17A). Durante los ciclos de la PCR, la sonda se hibrida con los productos de la PCR específicos para ella, y a medida que la polimerasa copia la cadena complementaria, el fluoróforo se escinde de la sonda (Figura 17B, C). La separación entre el fluoróforo y el quencher debido a la escisión de la sonda, provoca un aumento de la señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de productos de amplificación que se genera en la mezcla de reacción (Figura 17D).

El uso de sondas fluorogénicas posibilita la monitorización en tiempo real de los productos de amplificación específicos, excluyendo aquellos inespecíficos. En la Tabla 8 se detallan las sondas TaqMan® empleadas para analizar la expresión de los genes seleccionados en el presente estudio.

<i>GEN</i>	<i>REFERENCIA</i>
<i>IL 1β</i>	Hs01555410_m1
<i>IL 5</i>	Hs01548712_g1
<i>IL 6</i>	Hs01075664_m1
<i>IL 13</i>	Hs00609812_m1
<i>LMNB1</i>	Hs01059205_m1
<i>NRF2</i>	Hs00975961_g1
<i>P16</i>	Hs04332240_s1
<i>P21</i>	Hs01040810_m1
<i>P53</i>	Hs01034249_m1
<i>TSLP</i>	Hs00263639_m1

Tabla 8. Sondas de Expresión Génica TaqMan® utilizados en la PCR a tiempo real. *IL- 1β: interleucina 1 beta; IL 6: interleucina 6; IL 13: interleucina 13; LMNB1: laminina beta 1; TSLP: linfopoyetina estromal tímica; NRF2: Factor nuclear eritroide 2; P21: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1.; P53: proteína supresora de tumores p53.*

El proceso de PCR-RT se desarrolló en un termociclador *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) usando TaqMan® Gene Expression Master Mix con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C seguido de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.

A partir de los valores de fluorescencia registrados se generaron curvas de amplificación que representan el logaritmo de la señal de fluorescencia en función del número de ciclos de PCR. La expresión de cada gen se evaluó mediante el valor de ciclo umbral (Ct), definido como el ciclo en el que la fluorescencia supera un valor umbral o *threshold*. Este umbral marca el inicio de la fase exponencial de la reacción, y cualquier señal que lo supere se considera significativamente por encima del ruido de fondo. Cuanto mayor sea la cantidad inicial de ARNm del gen analizado, mayor será la cantidad de ADNc sintetizado en la retrotranscripción y, por lo tanto, la amplificación alcanzará antes la fase exponencial. Para la cuantificación relativa de los genes, se compararon los valores de Ct de cada uno con el correspondiente al gen de referencia endógeno GAPDH. El nivel de expresión se determinó calculando la diferencia (ΔCt) entre el Ct del gen de interés y el Ct del gen de referencia. Finalmente, las variaciones en la expresión génica se expresaron mediante la fórmula $2^{(-\Delta Ct)}$.

3.10. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN se extrajo utilizando el reactivo TRIzol™. En primer lugar, los tejidos se homogeneizaron en el TissueLyser II (Qiagen®) y se dejaron en trizol. El trizol pudo precipitar el ADN. Después de agregar cloroformo se forman 2 fases: una capa acuosa superior transparente que contiene ARN y una capa inferior que contiene ADN y proteínas. De manera similar a la extracción de ARN explicada anteriormente, en este caso se eliminó la fase superior y se añadió etanol seguido de varios pasos de centrifugación. El ADN purificado se resuspendió y se cuantificó utilizando NanoDrop 2000C (ThermoFisher Scientific).

3.11. LONGITUD DE TELÓMEROS

Cada reacción de PCR contenía una muestra de ADN genómico (5 ng/ μ L), cebador de telómero, mezcla maestra 2x de qPCR y agua libre de nucleasas. La PCR en tiempo real con sonda-cebador se realizó utilizando el sistema CFX96 Real-Time de BioRad (BioRad, Hercules, CA). Se utilizó un ADN genómico de referencia como control interno. Todas las

reacciones se realizaron por duplicado y se incluyeron controles de plantilla en cada corrida. Los pasos fueron:

- Desnaturalización inicial: 10 minutos a 95°C
- 32 ciclos de:
 - Desnaturalización: 20 segundos a 95°C
 - Alineamiento: 20 segundos a 52°C
 - Extensión: 45 segundos a 72°C

3.12. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA se empleó para cuantificar la liberación de citoquinas, analizándose la liberación de IL 6 e IL 1 β en sobrenadante según ficha técnica mediante kits ELISA comerciales: Human GM-CSF Immunoassay Quantikine® ELISA kit (nº Cat. DGM00, R&D); Human CXCL15/IL-8 Immunoassay Quantikine® ELISA kit (nº Cat. DY208, R&D); Human MMP-9 Immunoassay Quantikine® ELISA kit (nº Cat. DY911, R&D).

Los kits empleados utilizan la técnica de ELISA cuantitativo por inmuno-detección indirecta de proteínas o sistema “sándwich” en fase sólida. En este sistema los pocillos tienen adheridos a su base anticuerpos específicos contra nuestra proteína de interés (Figura 18). A los pocillos necesarios se añadieron 50 μ L de diluyente y posteriormente 50 μ L del estándar (en concentraciones seriadas para la recta patrón), las muestras por duplicado (Figura 18.1) y el blanco (diluyente solo). Se incubó la placa durante 2 horas, durante las cuales la proteína de interés presente se unió al anticuerpo inmovilizado (Figura 18.2). Se realizaron lavados, para eliminar uniones inespecíficas, y se añadieron 100 μ L del anticuerpo específico conjugado a una enzima, y se incubó durante 30 minutos más (Figura 18.3). Se realizaron lavados, se añadieron 100 μ L de una solución de sustrato y se incubó 30 minutos en oscuridad. La enzima asociada al segundo anticuerpo modifica el sustrato produciendo un producto coloreado (Figura 18.4), cuya intensidad será proporcional a la concentración de anticuerpo unido en el paso inicial. Se detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro Victor 1420

Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los datos de concentración de la proteína se extrapolaron de la recta patrón del estándar y se relativizaron respecto al grupo control.

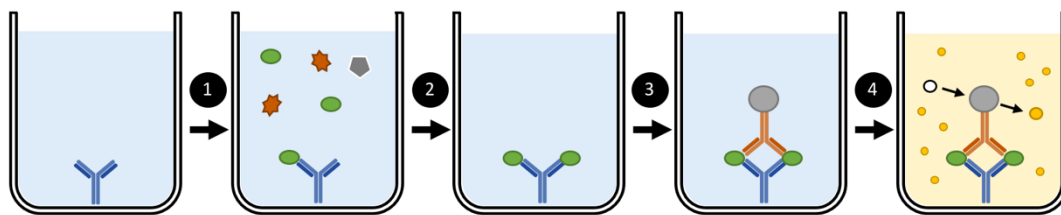


Figura 18. Esquema de la técnica de ELISA cuantitativo por inmuno-detección indirecta de proteínas o sistema "sándwich" en fase sólida. Fuente: adaptada de Montero et al (172).

3.13. CUANTIFICACIÓN DE GSH

Para este proyecto, se siguió el ensayo de glutatión GSH-Glo™ (Promega; Madison,WI, EEUU). El ensayo se basa en la conversión de un precursor de luciferina a luciferina en presencia de glutatión (GSH), catalizado por la transferasa de glutatión (GST). La luciferina por acción de la luciferasa emite una señal luminiscente. Esta señal es directamente proporcional al GSH presente en la muestra. Para este ensayo las células fueron incubadas a 37o C y 5% de CO2 hasta alcanzar una buena confluencia (70%). Después se agregaron los diferentes fármacos a las células y se incubaron durante 30 minutos. Después de eso, se añadió bleomicina (40 µg/ml) a los pocillos, se incubaron durante 24 horas y luego se retiró el sobrenadante, y las células fueron lisadas para medir los niveles de GSH con el kit de luminiscencia (Promega®, GSH-Glo™ Glutathione Assay) según las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el GSH, se preparó una curva estándar según las especificaciones del kit. A partir de una solución madre de 5mM se efectuaron diferentes diluciones hasta obtener concentraciones finales que pasaron de 0µM a 5µM. Se añadieron 10 µl de cada disolución a cada pocillo. Se hicieron dos duplicados. En cuanto a las células después de eliminar cualquier exceso de sobrenadante, se añadió el reactivo GSH-Glo™. Este reactivo contenía los sustratos de luciferina y GST diluidos en el tampón de reacción. Después de incubarlos durante 30 minutos a 37oC, se agregaron 100 µl de reactivo de detección que contenía luciferina y se incubaron durante otros 15 min a 37oC. Por último, las placas se introdujeron en el

lector de microplacas LUMIstar OMEGA (BMG Labtech; Ortenberg, Alemania). Los resultados obtenidos se extrapolaron utilizando la curva estándar para convertir la luminiscencia a una concentración de GSH.

3.14. PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación de células epiteliales primarias sanas y de pacientes se midió mediante un inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN utilizando un kit inmuno-absorbente enzimático para la proliferación celular (Roche, Mannheim, Alemania) según el protocolo del fabricante. Las células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos y los diferentes fármacos (omaveloxolona, obacunona y metformina) se agregaron a los pozos correspondientes. Algunos pozos se dejaron sin tocar para los datos de control y bleomicina. Después de 30 minutos, todos los pozos, excepto el control, fueron estimulados con bleomicina (25 µg/ml) e incubados durante 72 horas. Posteriormente, se añadió BrdU a las células y se incubaron. Durante este tiempo, el análogo de 14 pirimidina BrdU se incorpora en lugar de la timidina en el ADN de las células proliferantes. Después de ello, las células se fijaron y el ADN se desnaturalizó mediante la adición de FixDenat del kit, las células se incubaron con anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y finalmente se utilizó tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato de reacción. La absorbencia se midió a 490 nm utilizando el espectrofotómetro de microplacas Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer).

3.15. INMUNOFLUORESCENCIA H2AX

Las células epiteliales fueron fijadas con metanol durante 5 minutos a -20°C y permeabilizadas con 0,1 % Triton X 100/PBS durante 8 minutos y bloqueadas (3% BSA/PBS) durante 1 hora. Las células fueron incubadas con H2AX (N Cat. #7631 Cell signaling) durante la noche a 4°C. Después de varias etapas de lavado de PBS, se agregaron los anticuerpos anti-conejo Alexa Fluor 555 (ThermoFisher), las células fueron incubadas durante 2 horas a 40°C y luego lavadas varias veces con PBS. Después, se utilizó

2µg/ml 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihidrocloruro (DAPI) para marcar los núcleos durante 3 minutos. Por último, se montaron preparaciones celulares con medio de montaje de inmunofluorescencia. Las muestras se observaron con un microscopio LEICA DMI8 con una magnificación de 40 x. Se utilizaron láseres rojos (555 nm) y azules (Ar 351 nm, 364 nm).

3.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante análisis paramétrico y las comparaciones múltiples se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) unidireccional seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas empleando una la prueba t-test no apareado para muestras independientes. Cuando las comparaciones concernían a varios grupos los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (SD).

CAPÍTULO 4

Resultados

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO (tabla 9)

Cohortes	Sanos	Sin EREA	CON EREA
Número de pacientes	2	24	9
Sexo (hombre:mujer)	1:1	17:7	5:4
Nº individuos endotipo T2	-	11/24 (46%)	5/9 (56%)
Enfermedad controlada (SNOT 22 ≤20) (%)	0	7/24 (29%)	4/9 (44%)
• Sin adherencia al tto • Sólo CT tópico • CT oral + cirugía • Biológico	- - - -	1/7 (14%) 4/7 (57%) 2/7 (29%) 0	0 0 1/4 (25%) 3/4 (75%)
Enfermedad NO controlada (SNOT 22 >20) (%)	0	17/24 (71%)	5/9 (56%)
• Sin adherencia al tto • Sólo CT tópico • CT oral + cirugía • Biológico	- - - -	6/17 (35%) 7/17 (41%) 4/17 (24%) 0	1/5 (20%) 1/5 (20%) 2/5 (40%) 1/5 (20%)
Nº individuos endotipo T2		9/17 (53%)	4/9 (44%)*

Tabla 9. Clasificación de los sujetos donantes y datos clínicos de los pacientes con rinosinusitis crónica con poliposis nasal. Los pacientes se han distribuido en sus respectivas cohortes y los datos se expresan en fracción o porcentaje de sujetos sobre el total del grupo al que pertenecen. (*) 2 de estos 4 pacientes ya estaban en tratamiento con biológico. EREA= Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina; CT = corticoides; tto= tratamiento; G1= grado 1.

Los sujetos donantes de pólipo/ mucosa de cornete medio para el aislamiento de células epiteliales se dividieron según los datos clínicos presentes en la Tabla 9. Los pacientes con RSCcPN se clasificaron en dos grupos, sin EREA y con EREA. Dentro de estos, se crearon dos subgrupos en función de si se consideraba que la enfermedad estaba controlada mediante la medida del test subjetivo SNOT 22, y en qué escalón de tratamiento se hallaban.

24 pacientes fueron clasificados como no EREA y 9 como RSCcPN fenotipo EREA. De los primeros, el 71% tenía una enfermedad no controlada clínicamente, y de este subgrupo

la mayoría no tenían adherencia al tratamiento o únicamente se les indicó tratamiento con corticoides tópicos; además, ninguno de estos pacientes utilizaba tratamiento biológico y solo el 24% había sido sometido a cirugía. El 46% de todos los pacientes sin EREA presentaban endotipo T2, con lo cual solo este porcentaje de pacientes pudiera ser candidato a los fármacos biológicos.

De los pacientes con fenotipo EREA, el 56% presentaba una enfermedad no controlada. De estos pacientes, 40% habían sido sometidos a cirugía y el 20% se encontraban en el escalón de fármacos biológicos. El 75% de los pacientes con EREA y enfermedad controlada estaban en tratamiento con fármacos biológicos. De todo el grupo de pacientes EREA, el 56% presentaban inflamación T2, por lo que solo ellos eran candidatos a fármacos biológicos.

4.2. ANÁLISIS DE MARCADORES DE SENESCENCIA EN PACIENTES CON POLIPOSIS

RT-PCR EN SUJETOS SANOS, PACIENTES SIN EREA Y PACIENTES CON EREA.

Se realizaron experimentos iniciales con distintas moléculas clave en la senescencia de manera aislada, obteniendo resultados variados que más adelante tratan de explicarse. Se midió la expresión de los genes de laminina B1 (LMNB1), p16, p21, Il 13, Il 5, Il 6 y T3LP, para estudiar la diferencia en la expresión genética entre los controles sanos (n=2), los pacientes con RSCcPN sin EREA (n=24), y pacientes con RSCcPN con EREA (n=9).

La hipótesis era la sobreexpresión de estos genes en los pacientes con RSCcPN, que además se vería aumentada en los sujetos con EREA, al formar parte de un espectro de mayor agresividad clínica de la enfermedad. La tendencia a este aumento se declara en los pacientes sin EREA y es estadísticamente significativa en los pacientes EREA (figura 19).

LMNB1 se espera encontrar que sus niveles estuvieran disminuídos en los pacientes con RSCcPN, especialmente en el fenotipo EREA, comparado con los sujetos sanos (figura 19). En este caso existe un aumento de la misma, lo que no concuerda con la hipótesis inicial.

IL 13, IL 5, IL 6 y TSLP: se esperaba un aumento en su expresión en pacientes con RSCcPN y especialmente elevada en pacientes EREA. La figura 19 muestra aumento de la expresión genética de IL 13, IL 5, IL 6 y TSLP en los pacientes con PN con respecto a los sanos, pero existe disminución de las mismas en los pacientes EREA (excepto TSLP, que aumenta). La figura 20 muestra un aumento del sistema Nrf2 en los sujetos sanos con respecto a los pacientes con PN (tanto EREA como no EREA), y esto es estadísticamente significativo (figura 20).

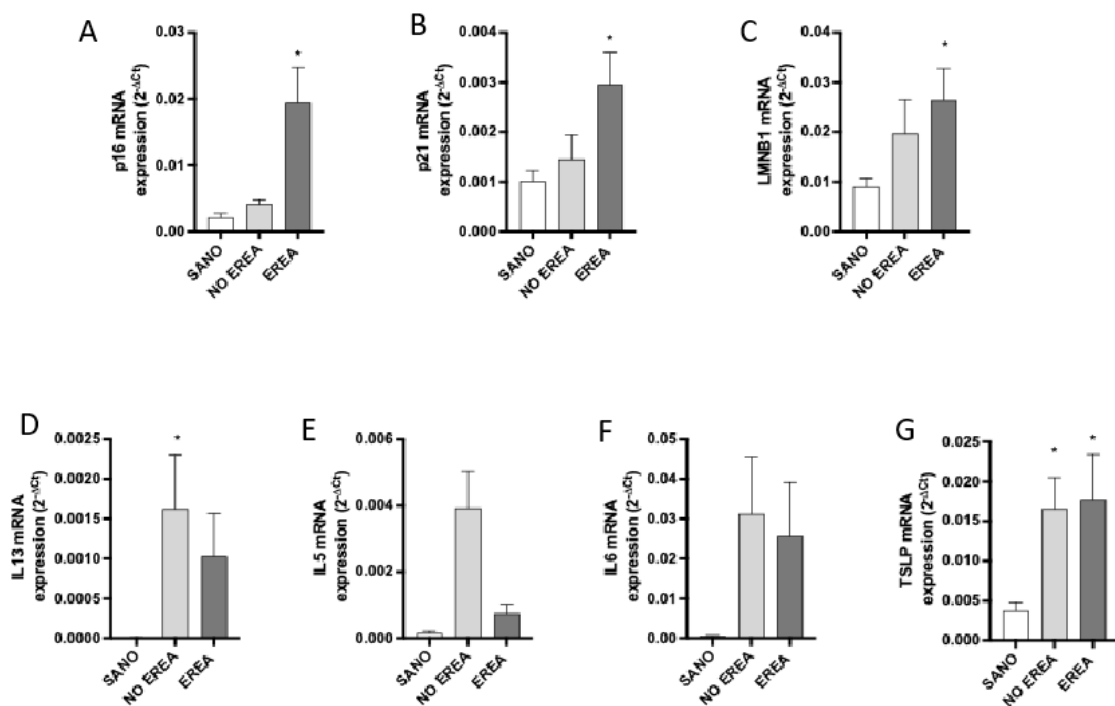


Figura 19. RSCcPN sin EREA y pacientes con RSCcPN con EREA. (A) mediciones de mRNA de p16. (B) mediciones de mRNA de P21. (C) mediciones de mRNA de LMNB1. (D) mediciones de mRNA de IL 13. (E) mediciones de mRNA de IL 5. (F) mediciones de mRNA de IL 6. (G) mediciones de mRNA de TSLP. Todos los resultados están expresados como media $\pm$ SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

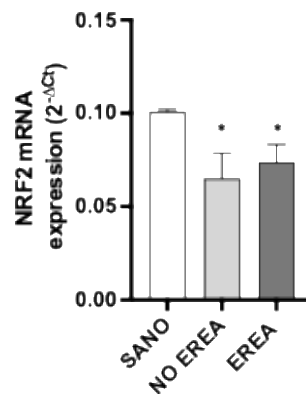


Figura 20. RT-PCR sistema *Nrf2* en sujetos sanos y pacientes con RSCcPN. Nótese la disminución del sistema *Nrf2* en los pacientes con respecto a los sanos, siendo estadísticamente significativa (*) $p < 0.05$.

INMUNOHISTOQUIMIA

Como se explicó anteriormente, el pólipo se divide en dos regiones principales: el epitelio, donde hemos centrado el estudio, y el estroma, rico en contenido acuoso y fibroblastos. El tejido se seccionó y se orientó cuidadosamente la región epitelial. Las muestras del tejido de los sujetos sanos fueron de pequeño tamaño, siendo indistinguible el epitelio del resto del tejido. Después de seccionar, deshidratar, parafinar y rehidratar las muestras de tejido seleccionadas, procedimos a realizar un análisis inmunohistoquímico tanto en pacientes sanos como en pacientes con RSCcPN tanto EREA como no EREA. La expresión proteica de p21 y p16 en la inmunohistoquímica de las muestras de sujetos sanos y pacientes con PN se muestra en la figura 21 y 22 respectivamente. La tinción púrpura representa los núcleos del tejido. La tinción parduzca indica los niveles de proteína del gen indicado. Un sombreado más oscuro indica niveles más altos de proteína. Como se puede observar en la figura, la expresión de ambos genes es mayor en el tejido de pacientes con RSCcPN fenotipo EREA, en comparación con el tejido de pacientes con RSCcPN sin EREA.

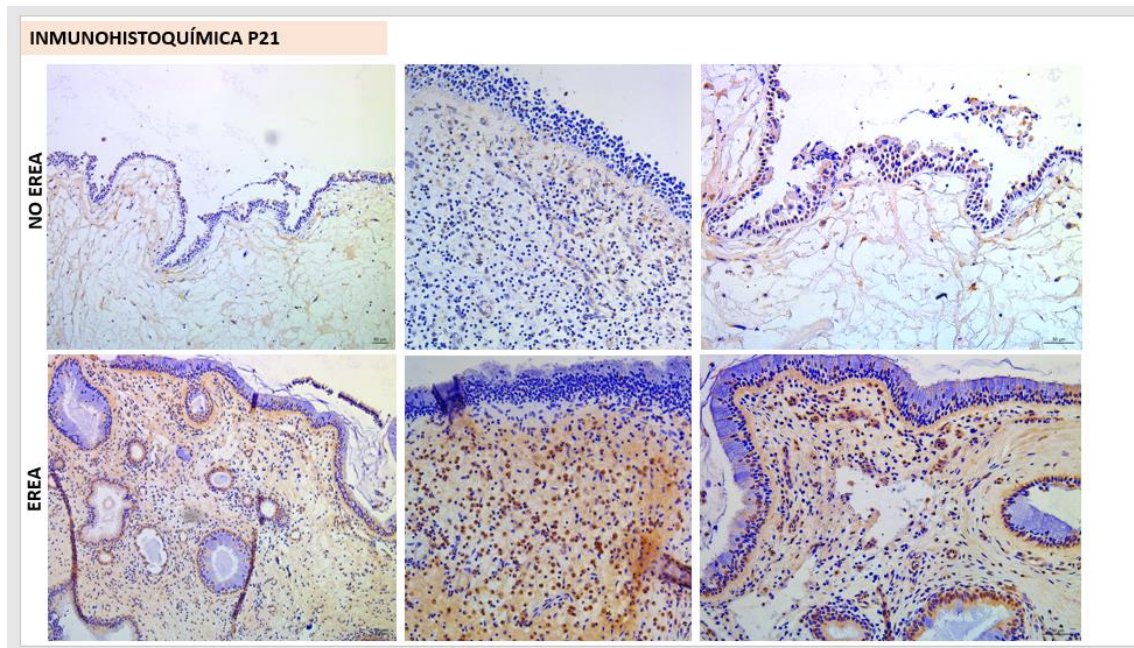


Figura 21. Expresión inmunohistoquímica de P21. La tinción púrpura representa los núcleos del tejido. La tinción parduzca indica los niveles de proteína del gen indicado. Un sombreado más oscuro indica niveles más altos de proteína. Como se puede observar en la figura, la expresión de P21 es mayor en el tejido de pacientes con RSCcPN fenotipo EREA, en comparación con el tejido de pacientes con RSCcPN sin EREA. Escala 100 μ m.

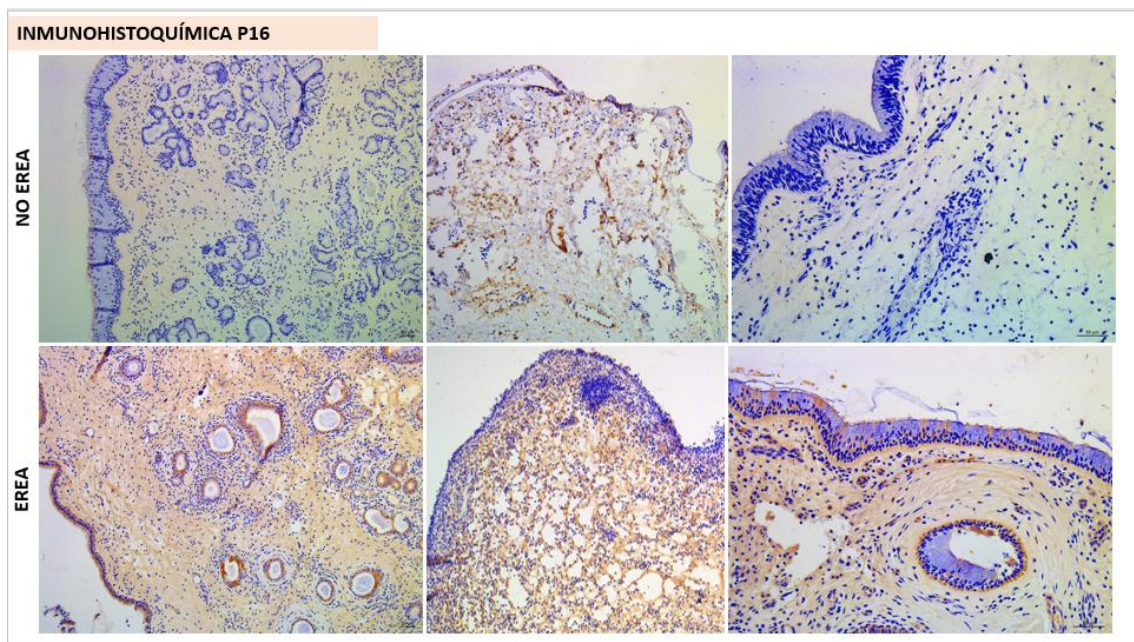


Figura 22. Expresión inmunohistoquímica de P16. La tinción púrpura representa los núcleos del tejido. La tinción parduzca indica los niveles de proteína del gen indicado. Un sombreado más oscuro indica niveles más altos de proteína. Como se puede observar en la figura, la expresión de P16 es mayor en el tejido de pacientes con RSCcPN fenotipo EREA, en comparación con el tejido de pacientes con RSCcPN sin EREA. Escala 100 μ m.

LONGITUD DE TELÓMEROS

Se observa una clara disminución en la longitud de telómeros con respecto a los sanos (longitud de más de 100 kilobases) tanto en los no EREA como en los EREA (por debajo de 4 Kb de media). Figura 23.

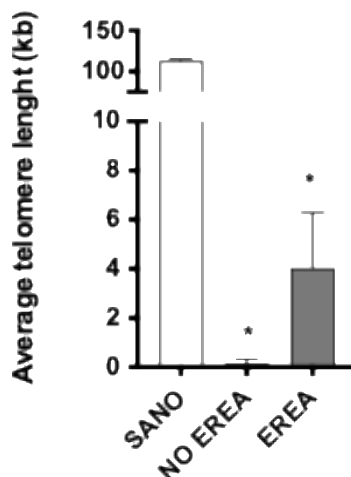


Figura 23. Longitud de telómeros. Expresión en Kilobase (Kb). Nótese la importante disminución de ambos grupos (EREA y no EREA) con respecto al sujeto sano.

4.3. PRUEBAS DE ESTÍMULOS INDUCTORES DE LA SENESCENCIA EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES SANAS: RT-PCR

Se midió la expresión de los genes de laminina B1 (LMNB1), p16 Y p21 utilizando como estímulo de senescencia IL-13 10ng/ml, IL-5 10 ng/ml, TSLP 10ng/ml, con un tiempo de actuación de 72 horas. La figura 24 muestra la expresión genética de LMNB1, p16, p21, IL 13, IL 5, IL 6 y T3LP en células epiteliales primarias sanas. Pudimos observar que estos estímulos producen una senescencia muy leve sin que haya diferencias significativas respecto al control, por lo que se desecharon como estímulos inductores de senescencia. Se repitió el experimento, en este caso utilizando el estímulo de senescencia por excelencia, la bleomicina (figura 25) a concentraciones 25ug/ml y 40 ug/ml, los resultados se midieron 72 horas después, obteniendo en este caso resultados estadísticamente significativos a

concentraciones 40 ug/ml. Por ello, se decidió que el estímulo para las muestras sería blemocimina 30 ug/ml.

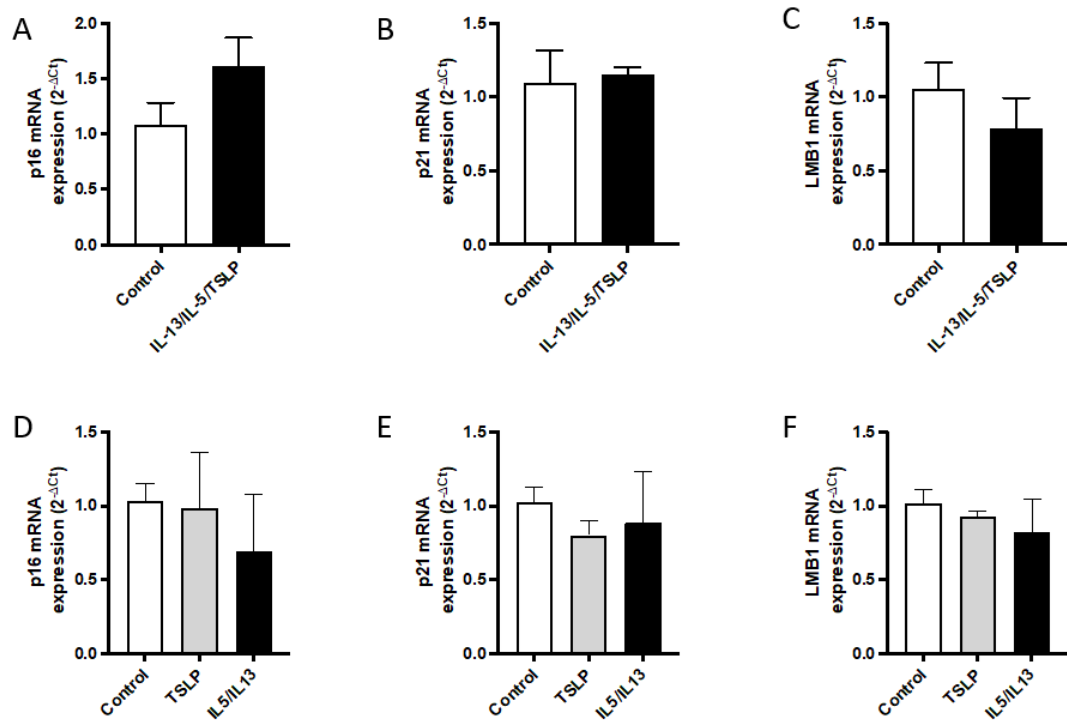


Figura 24. RT-PCR en células epiteliales primarias sanas tras estímulos de senescencia. (A): medición de mRNA de p16 tras estímulo con IL-13 10ng/ml, IL-5 10 ng/ml, TSLP 10ng/ml de manera conjunta. (B): medición de mRNA de p21 tras estímulo con IL-13 10ng/ml, IL-5 10 ng/ml, TSLP 10ng/ml de manera conjunta. (C): medición de mRNA de LMB1 tras estímulo con IL-13 10ng/ml, IL-5 10 ng/ml, TSLP 10ng/ml de manera conjunta. (D): medición de mRNA de p16 tras estímulo con TSLP 10ng/ml por separado, e IL-13 10ng/ml e IL-5 10 ng/ml. (E): medición de mRNA de p21 tras estímulo con TSLP 10ng/ml por separado, e IL-13 10ng/ml e IL-5 10 ng/ml. (F): medición de mRNA de LMB1 tras estímulo con TSLP 10ng/ml por separado, e IL-13 10ng/ml e IL-5 10 ng/ml. Obsérvese la tendencia al aumento de expresión de p16 y p21, y disminución de la expresión de LMB1, sin que estos resultados sean estadísticamente significativos.

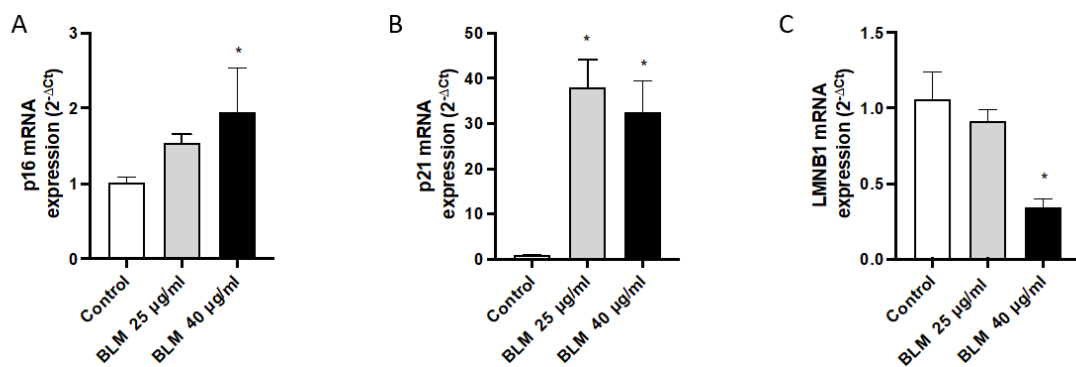


Figura 25. RT-PCR en células epiteliales primarias sanas, estímulos de senescencia la bleomicina (BLM) 25ug/ml y 40 ug/ml. (A) medición de mRNA de p16; (B) medición de mRNA de p21; (C) medición de mRNA de LMB1. Todos los resultados están expresados como media $\pm$ SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a control.

4.4. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES SANAS: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.

RT-PCR

Con el objetivo de analizar más en profundidad el potencial antioxidante de los fármacos activadores de NRF2 en la RSCcPN se analizaron los niveles de expresión de distintos genes antioxidantes. Se sembraron y trataron las células epiteliales primarias con los diferentes fármacos y después de una hora se estimularon con obacunona 12,5 μ M, 25 μ M y 50 μ M (figura 26) y omaveloxolona 1nM, 10nM y 80nM (figura 27). Tras 72 horas de incubación se procedió a la determinación de la expresión génica mediante RT-PCR. La metformina a concentración 2nM se empleó como control de reversión de senescencia, pues es más que conocido su potente poder antienvjecimiento celular.

Los resultados con obacunona son estadísticamente significativos en la reducción de la expresión p16 y p21 a concentraciones de 12,5 μ M en adelante y 25 μ M en adelante respectivamente. No se obtuvo significación estadística al respecto de aumento de los niveles de LMNB1, aunque se observa la tendencia (figura 27).

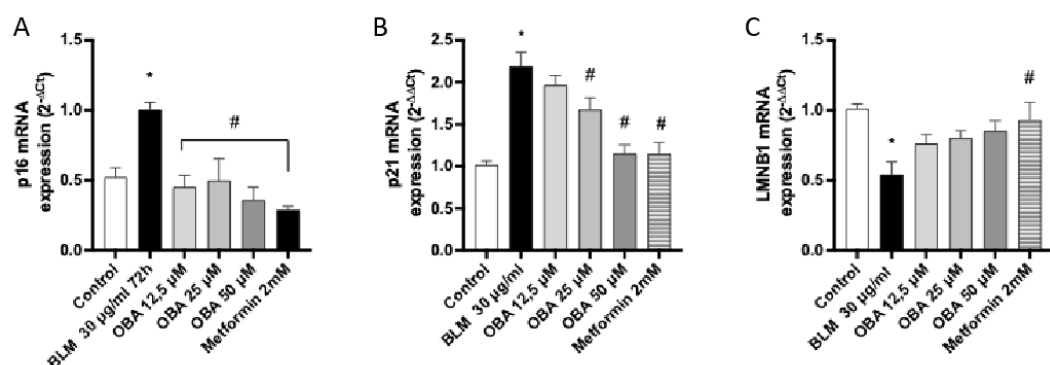


Figura 26. RT-PCR en células epiteliales primarias sanas, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM. (A) medición de mRNA de p16; (B) medición de mRNA de p21; (C) medición de mRNA de LMNB1. Todos los resultados están expresados como la media $\pm$ SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución en la expresión de los genes p16 y p21 con resultados estadísticamente significativos con respecto al inductor de senescencia bleomicina. El estímulo con metformina (metformin) es estadísticamente significativo con respecto a la bleomicina también en la expresión de LMNB1.

Los resultados con omaveloxona fueron estadísticamente significativos en la reducción de la expresión de p16 a cualquiera de las concentraciones estudiadas y con concentraciones de 80nM para la regulación de p21 (reducción de la expresión) y LMNB1 (aumento de la expresión), tal como se observa en la figura 27.

Se comprueba que ambos fármacos tienen potencial antisenescencia con respecto a la expresión de las moléculas estudiadas (a excepción de la expresión génica de LMNB1 con obacunona, aunque se observa la tendencia). Los mejores resultados se observan con omaveloxolona a concentraciones 80nM.

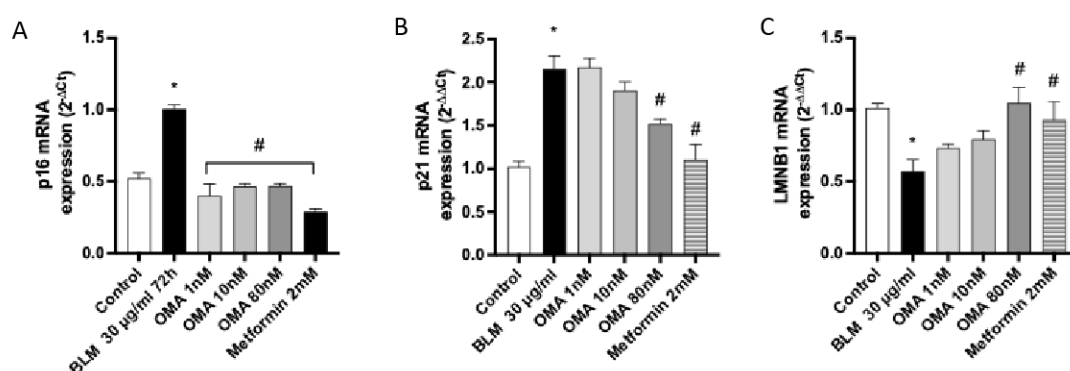


Figura 27. senescencia tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM. (A) medición de mRNA de p16; (B) medición de mRNA de p21; (C) medición de mRNA de LMNB1. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución en la expresión de los genes de p16, p21 y LMNB1 con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM).

ELISA

Para poder determinar el potencial antiinflamatorio de los fármacos activadores de NRF2, se analizó la liberación de IL-6 e IL-1 β . Las células epiteliales sanas primarias fueron sembradas, tratadas con los diferentes fármacos y finalmente estimuladas con obacunona 12,5 μ M, 25 μ M y 50 μ M y omaveloxolona 1nM, 10nM y 80nM. Se utilizó también metformina 2mM como control antisenescencia. Tras 72 horas de incubación se recogió el sobrenadante para cuantificar los niveles de IL-6 e IL-1 β mediante la técnica de ELISA.

Se observó una importante y estadísticamente significativa remisión en la expresión de los niveles de IL-6 e IL-1 β tras el empleo de obacunona, más llamativa a mayor concentración (figura 28). La omaveloxolona también producía este efecto (figura 30), pero era más discreto y se necesitaban concentraciones más elevadas. Por desgracia, nuestro fármaco control metformina, no es capaz de demostrar efectos antiinflamatorios tras el uso de bleomicina (figuras 28 y 29).

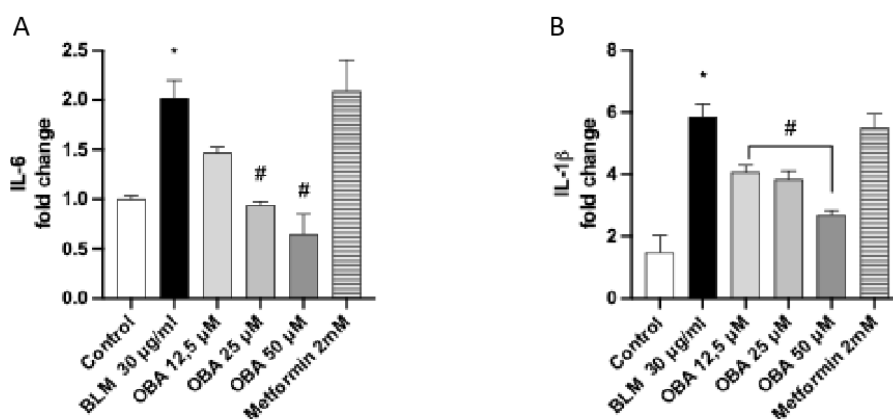


Figura 28. ELISA en células epiteliales primarias sanas, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia obacunona (OBA) 12,5 μ M, 25 μ M y 50 μ M. (A)ELSA de IL- 6; (B)ELISA de IL-1 β . Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * p <0.05 respecto al grupo control. # p <0.05 respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución de IL- 6 e IL-1 β con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM).

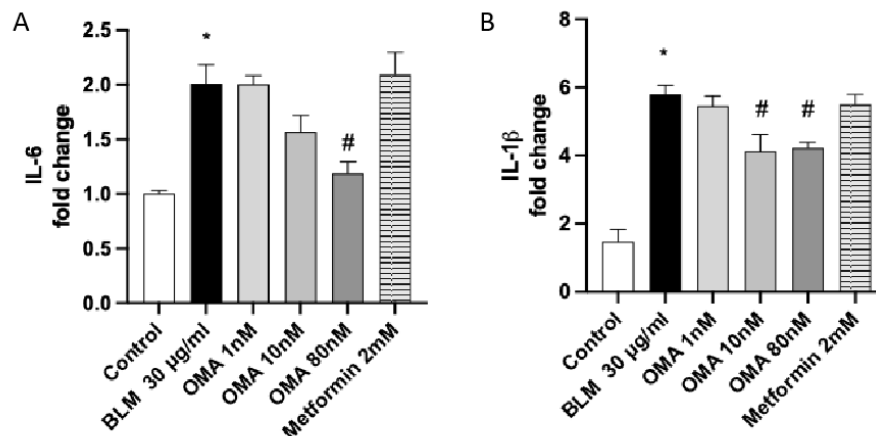


Figura 29. ELISA en células epiteliales primarias sanas, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia con omaveloxona (OMA) a concentraciones 1nM, 10nM y 80nM. (A)ELSA de IL-6; (B)ELISA de IL-1β. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución de IL-6 e IL-1β con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM) a concentraciones elevadas.

GSH

Para conocer la respuesta antioxidante de los fármacos seleccionados en células epiteliales sanas, primero se indujo la oxidación con bleomicina 25µg/ml y después se probó el efecto antioxidante de obacuna 12,5µM, 25µM y 50µM y omaveloxolona 1nM, 10nM y 80nM (figura 30) mediante la determinación de los niveles de GSH, tras el tratamiento con los diferentes fármacos.

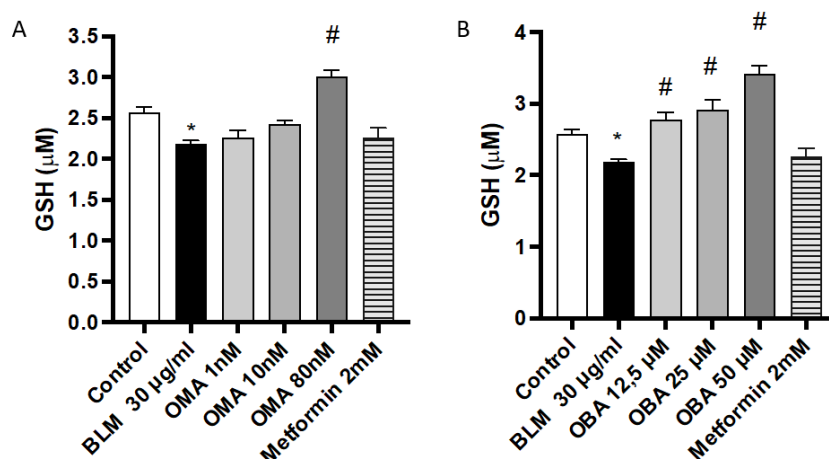


Figura 30. Medida de GSH en células epiteliales primarias sanas, expresión de antioxidantes tras el estímulo antisenescencia con omaveloxona (OMA) a concentraciones 1nM, 10nM y 80nM (A); y obacunona (OBA) 12,5μM, 25μM y 50Mm (B). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una elevación de GSH con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM) a concentraciones

Se confirmó que los niveles de GSH disminuían tras la estimulación con bleomicina. Además, se observó que todos los fármacos utilizados eran capaces de prevenir la disminución de GSH provocada por la bleomicina (siendo más significativa con obacunona) y que los niveles de GSH aumentaban con la concentración de fármacos. Es llamativo el hecho de que los efectos máximos observados superaban a la condición control (figura 31).

PROLIFERACIÓN

Se realizó un ensayo de proliferación utilizando la incorporación de BrdU para observar la proliferación celular en células tratadas con los diferentes fármacos ensayados y estimuladas con bleomicina 2.5 μg/ml, los resultados se compararon con el control. Se testaron concentraciones decrecientes de bleomicina (30, 20, 10, 5 y 2.5 μg/ml). El resultado esperado era una falta de incorporación de BrdU en células estimuladas con bleomicina, ya que las células senescentes provocan la detención del ciclo celular y por tanto detienen la proliferación celular. La Figura 31 representa la incorporación de BrdU en células tratadas con cada fármaco (omaveloxolona, obacunona y metformina) en comparación con las células control y estimuladas con bleomicina. Como podemos ver, como se esperaba, hay una disminución significativa en la incorporación de BrdU en las células estimuladas con bleomicina en comparación con el control. Los resultados obtenidos con bleomicina son llamativos a muy bajas concentraciones. Desgraciadamente, ninguno de los tres fármacos consigue la reversión de los efectos de la bleomicina en el arresto del ciclo celular.

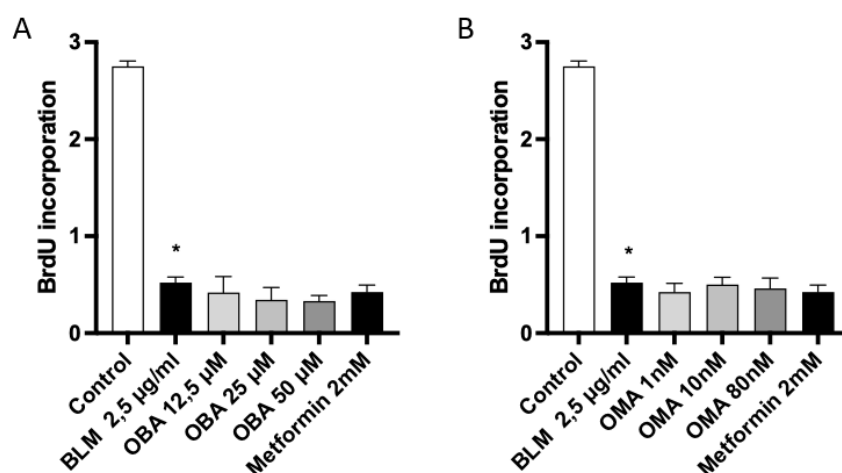


Figura 31. Medida de la incorporación de BrdU al ciclo celular en células epiteliales primarias sanas tras el uso de bleomicina (BLM) y su intento de reversión con fármacos que aumentan la proliferación celular con omaveloxona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM (A), y obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50Mm (B). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. La falta de incorporación de BrdU al ciclo celular es estadísticamente significativa (*) con bleomicina y ningún fármaco es capaz de revertir este hecho.

HISTONAS

Se utilizó bleomicina 30 µg/ml para aumentar el daño al DNA mediante un incremento en la histona H2AX. Tras esto se probó obacunona 50µM (figura 32 y 33) y omaveloxolona 80nM (figura 33 y 35), previniendo el daño mediante la disminución del daño de esta histona, siendo los resultados estadísticamente significativos.

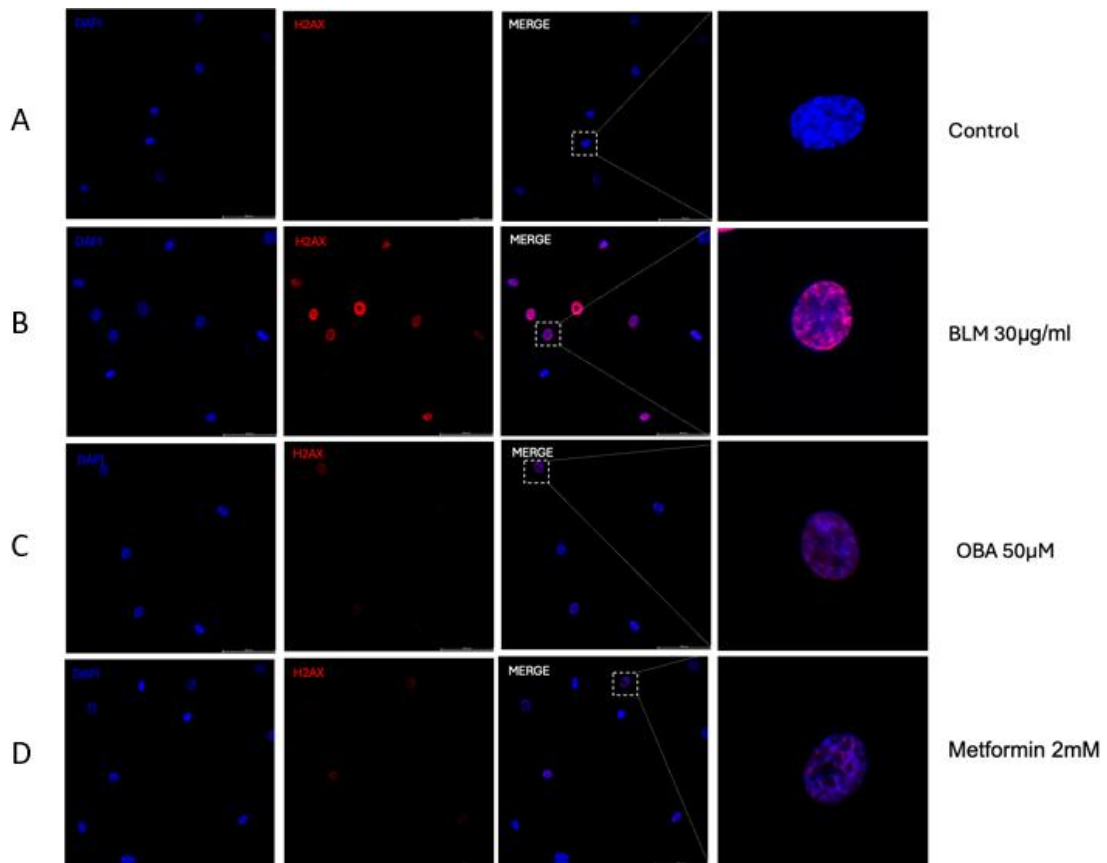


Figura 32. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia (IF) de H2AX en células primarias sanas. (A) IF de grupo control; (B) IF de bleomicina; (C) IF de obacunona; (D) IF de metformina. Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona, mientras que la obacunona (OBA) y metformina lo revierten.

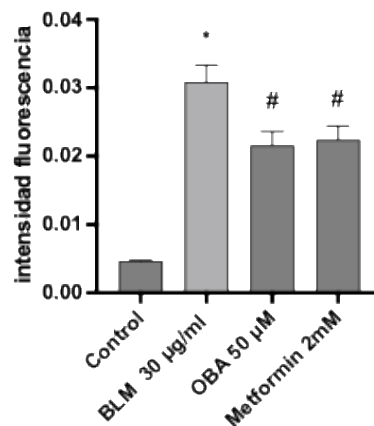


Figura 33. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en células primarias sanas. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona y es significativamente estadístico (*), mientras que la obacunona (OBA) y metformina lo revierten (#).

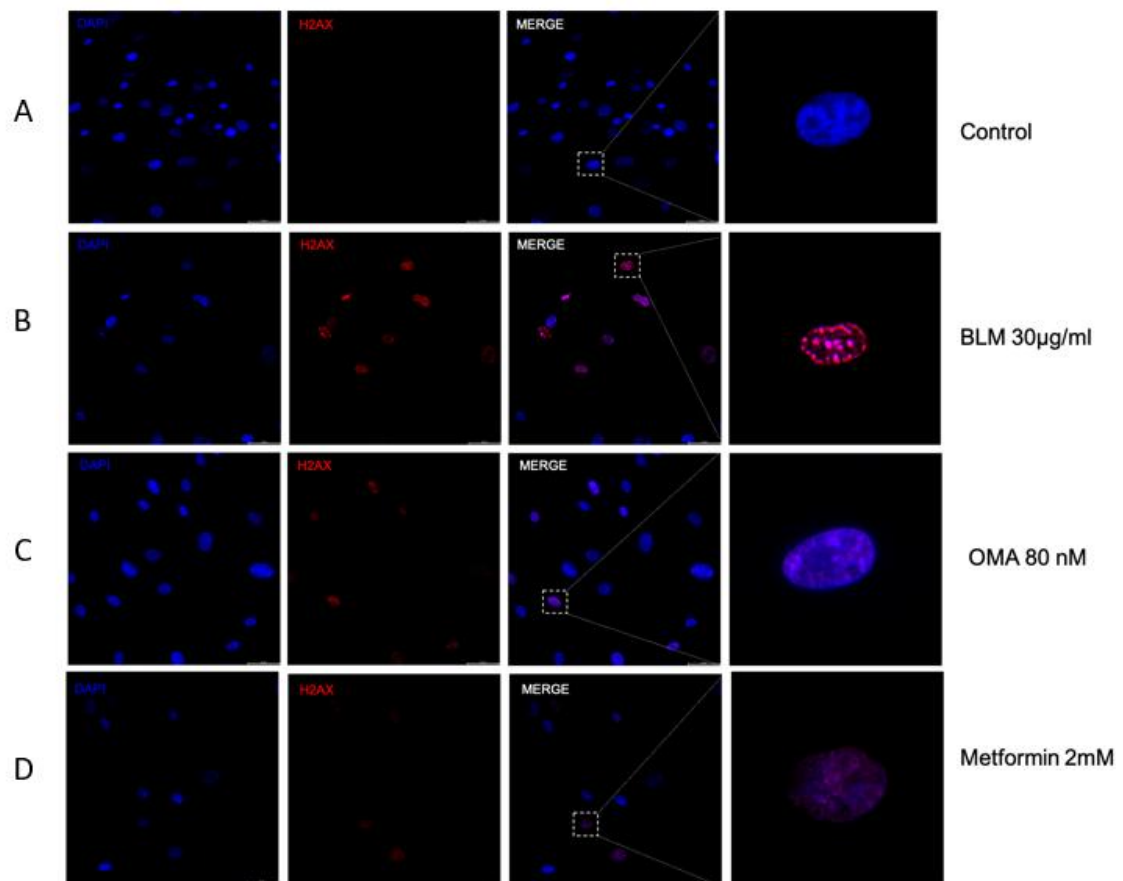


Figura 34. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia (IF) de H2AX en células primarias sanas. (A) IF en grupo control; (B) IF tras estímulo con bleomicina; (C) IF tras reversión con omaveloxolona (OMA); (D) IF tras reversión con metformina. Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona, mientras que la obacunona (OBA) y metformina lo revierten. Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona, mientras que la omaveloxolona (OMA) y metformina lo revierten.

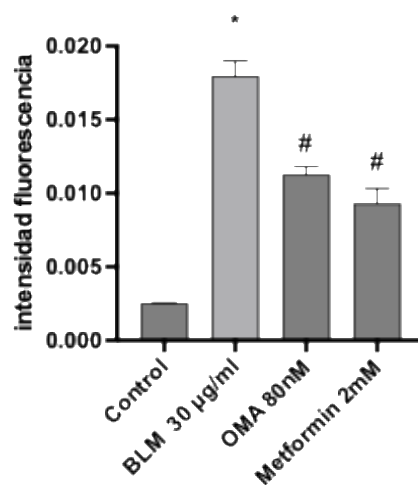


Figura 35. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en células primarias sanas. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona y es significativamente estadístico (*), mientras que la omaveloxona (OMA) y metformina lo revierten (#).

4.5. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NAALES DE PACIENTES CON RSCcPN SIN EREA: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.

RT-PCR

Una vez determinado el efecto antioxidante de los fármacos obacunona y omaveloxolona en la expresión génica en células epiteliales de línea, se pasó a estudiar el efecto en la expresión en células epiteliales de mucosa de pólipo/cornete medio nasal humano de pacientes con RSCcPN sin EREA y de sujetos sanos respectivamente. El primer objetivo fue confirmar el efecto de envejecimiento celular de la bleomicina, esta vez en los pacientes, y se confirmó con significación estadística (figuras 24 y 25). El siguiente objetivo era conocer si existía reversión del envejecimiento celular con los fármacos antioxidantes.

Las células fueron sembradas y tratadas con los diferentes fármacos y después de una 1h fueron estimuladas con obacunona 12,5µM, 25µM y 50µM y metformina 2mM. También se estimularon con omaveloxolona a tres diferentes concentraciones: 1nM, 10nM y 80nM. Tras 72 horas de incubación se procedió a la determinación de la expresión génica mediante RT-PCR.

Tal como ocurría en las células epiteliales nasales sanas, en las procedentes de pacientes con RSCcPN sin EREA existe una disminución de la expresión de p21 y p16 y un aumento de LMNB1 significativa que se incrementa a mayores concentraciones del fármaco. Ambos fármacos (obacunona y omaveloxolona) son eficaces antioxidantes, necesitando mayor concentración de obacunona para conseguir este efecto (figuras 36 y 37).

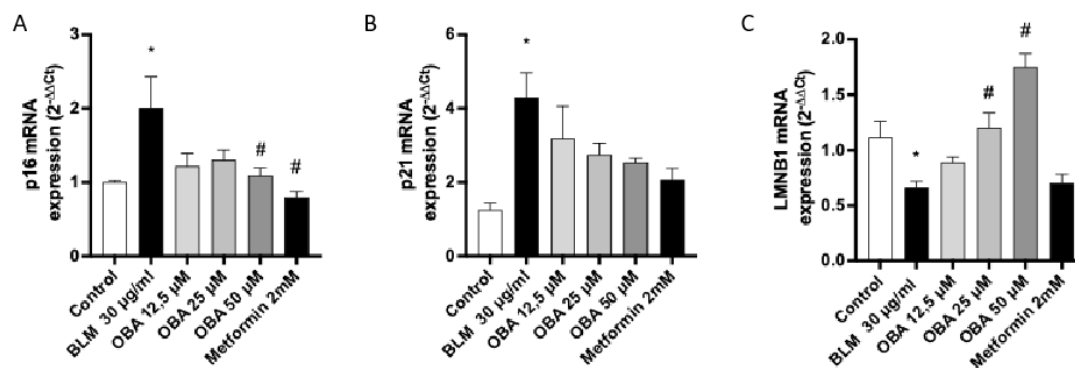


Figura 36. RT- PCR en células epiteliales de pacientes con RSCcPN sin EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM. Los marcadores analizados son p16 (A); p21 (B) y LMNB1 (C). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. *p<0.05 respecto al grupo control. # p<0.05 respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución en la expresión de los genes p16 y p21 con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM). El estímulo con metformina (metformin) es estadísticamente significativo con respecto a la bleomicina en la expresión de p16.

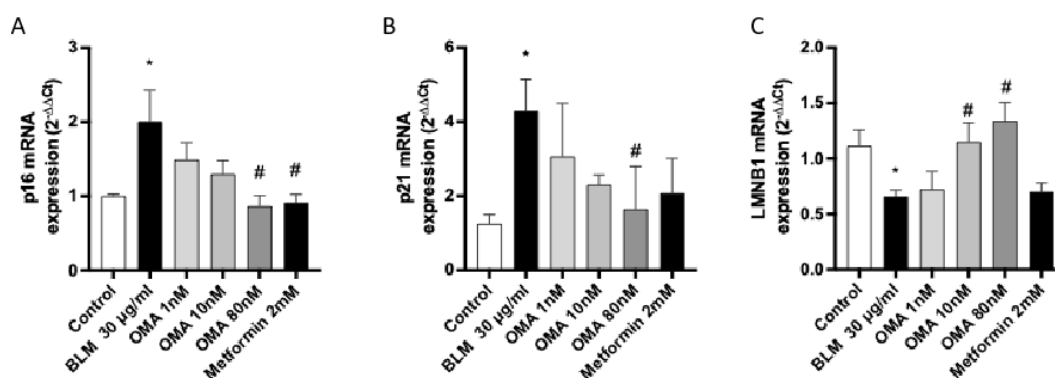


Figura 37. RT- PCR en células epiteliales de pacientes con RSCcPN sin EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a concentraciones 1nM, 10nM y 80nM. Los marcadores analizados son p16 (A); p21 (B) y LMNB1 (C). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. *p<0.05 respecto al grupo control. # p<0.05 respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución en la expresión de los genes de p16, p21 y aumento de LMNB1 con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM) a concentraciones elevadas.

ELISA

Una vez aisladas, las células epiteliales fueron sembradas, tratados con los diferentes fármacos y finalmente estimulados con obacunona 12,5µM, 25µM y 50µM y metformina 2mM. Tras 72h de incubación se recogió el sobrenadante para analizar los niveles de IL-6 e IL-1β mediante la técnica de ELISA.

Se observó una estadísticamente significativa remisión en la expresión de los niveles de IL-6 e IL-1 β tras el empleo de obacunona, más llamativa a mayor concentración (figura 38), incluso más importante que con nuestro fármaco antienvejecimiento por excelencia, la metformina. Pero, sin duda, la reversión antisenescencia más llamativa la obtenemos con la omaveloxolona a concentraciones elevadas, sobre todo de la molécula implicada en la mayor parte de la población con RSCcPN, la IL- 6 (figura 39). Los efectos son mucho más llamativos que con la metformina, aunque con ambos son estadísticamente significativos.

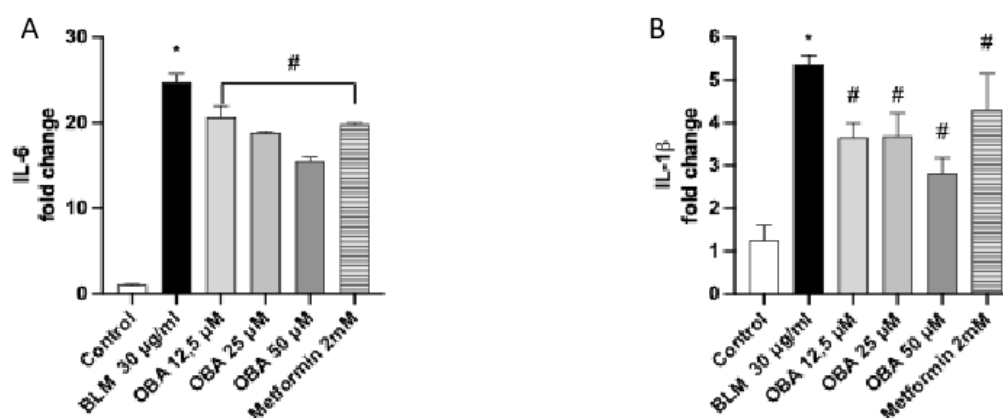


Figura 38. ELISA en células epiteliales de sujetos con RSCcPN y sin EREA, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia obacunona (OBA) 12,5 μ M, 25 μ M y 50 μ M. Los marcadores analizados son IL 6 (A); IL 1 β (B). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución de IL- 6 e IL-1 β con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM).

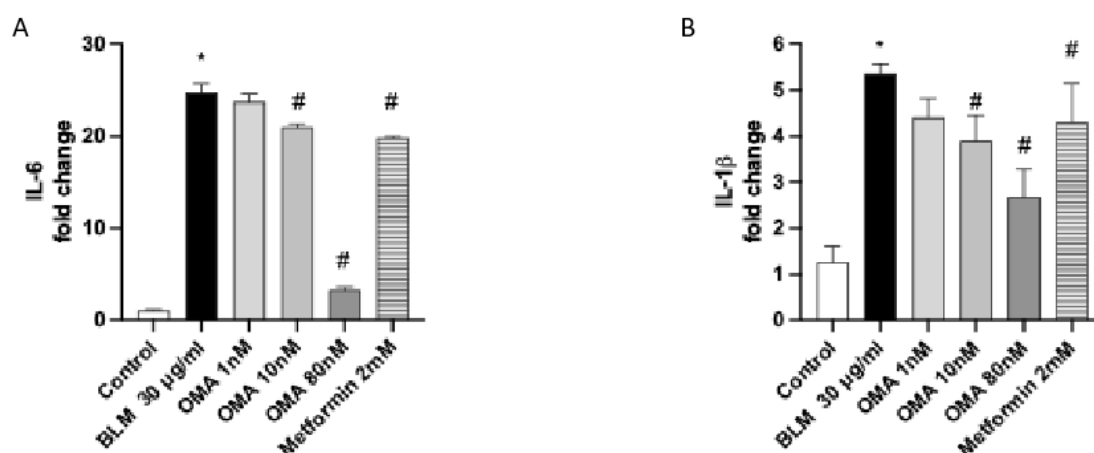


Figura 39. ELISA en células epiteliales primarias de sujetos con RSCcPN y sin EREA, expresión de marcadores de inflamación tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a concentraciones 1nM, 10nM y 80nM. Los marcadores analizados son IL 6 (A); IL 1 β (B). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al

grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución de Il-6 e Il-18 con resultados estadísticamente significativos muy llamativa (5 veces reducida con respecto al inductor de senescencia bleomicina [BLM]).

GSH

Determinación del glutatión

Para conocer la respuesta antioxidante de los fármacos seleccionados en células epiteliales de pacientes con RSCcPN y sin EREA, primero se indujo la oxidación con bleomicina 30µg/ml (figura 40) y después se probó el efecto antioxidante de obacuna 12,5µM, 25µM y 50µM y omaveloxolona 1nM, 10nM y 80nM mediante la determinación de los niveles de GSH, tras el tratamiento con los diferentes fármacos.

Se confirmó que los niveles de GSH disminuían tras la estimulación con bleomicina. Además, se observó que todos los fármacos utilizados eran capaces de prevenir la disminución de GSH provocada por la bleomicina a concentraciones elevadas (figura 40).

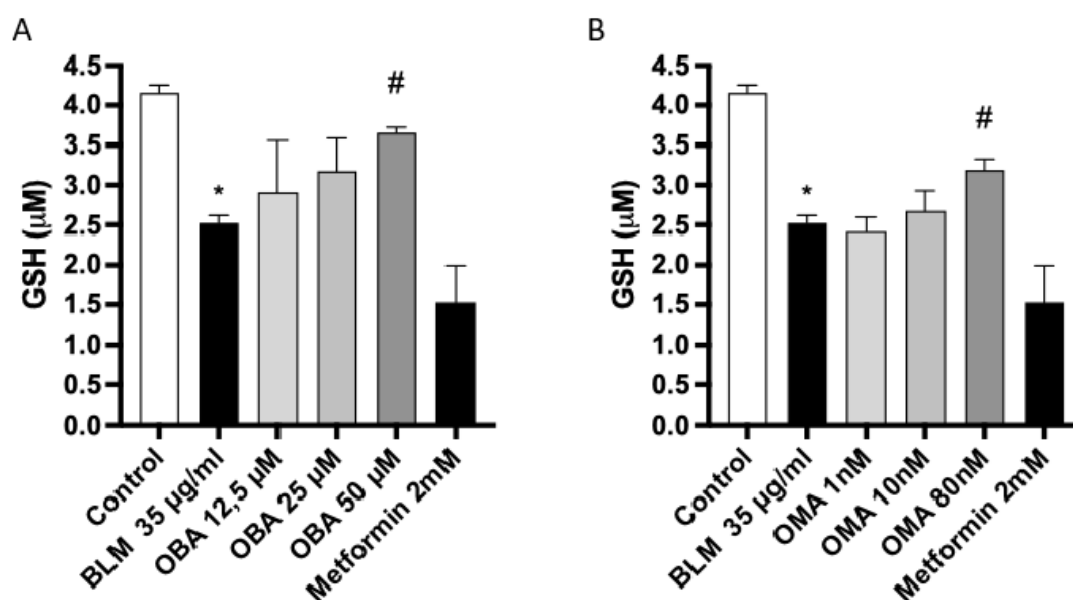


Figura 40. Medida de GSH en células epiteliales de pacientes con RSCcPN sin EREA, expresión de antioxidantes tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM (B); y obacuna (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM (A). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia un aumento de GSH con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM) a concentraciones elevadas.

PROLIFERACIÓN

Se testaron concentraciones decrecientes de bleomicina (30, 20, 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$), tal y como se intentó con células nasales sanas. Los resultados esperados eran una falta de incorporación de BrdU en células estimuladas con bleomicina, ya que las células senescentes provocan la detención del ciclo celular y por tanto detienen la proliferación celular. La Figura 42 representa la incorporación de BrdU en células tratadas con cada fármaco (omaveloxolona, obacunona y metformina) en comparación con las células control y estimuladas con bleomicina. La dosis más baja de bleomicina es muy agresiva y elimina la proliferación celular a niveles tan mínimos que la reversión con los fármacos es imposible.

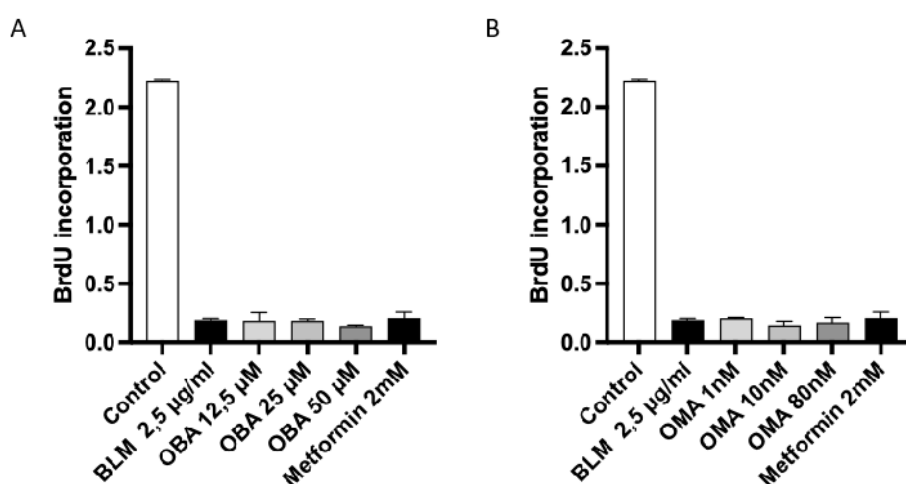


Figura 41. Medida de la incorporación de BrdU al ciclo celular en células epiteliales de sujetos con RSCcPN sin EREA, tras el uso de bleomicina (BLM) y su intento de reversión con fármacos que aumentan la proliferación celular con omaveloxolona (OMA) a con concentraciones 1nM, 10nM y 80nM (A); y obacunona (OBA) 12,5 μM , 25 μM y 50 μM (B). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. La falta de incorporación de BrdU al ciclo celular es muy llamativa con bleomicina y ningún fármaco es capaz de revertir este hecho, tal como sucedía en las células de línea.

HISTONAS

Se utilizó bleomicina 30 $\mu\text{g/ml}$ para aumentar el daño al DNA mediante un incremento en la histona H2AX. Tras esto se probó obacunona 50 μM (figura 42 y 43) y omaveloxona 80nM (figura 44 y 45), revirtiendo este daño mediante la silenciación de esta histona, siendo los resultados estadísticamente significativos.

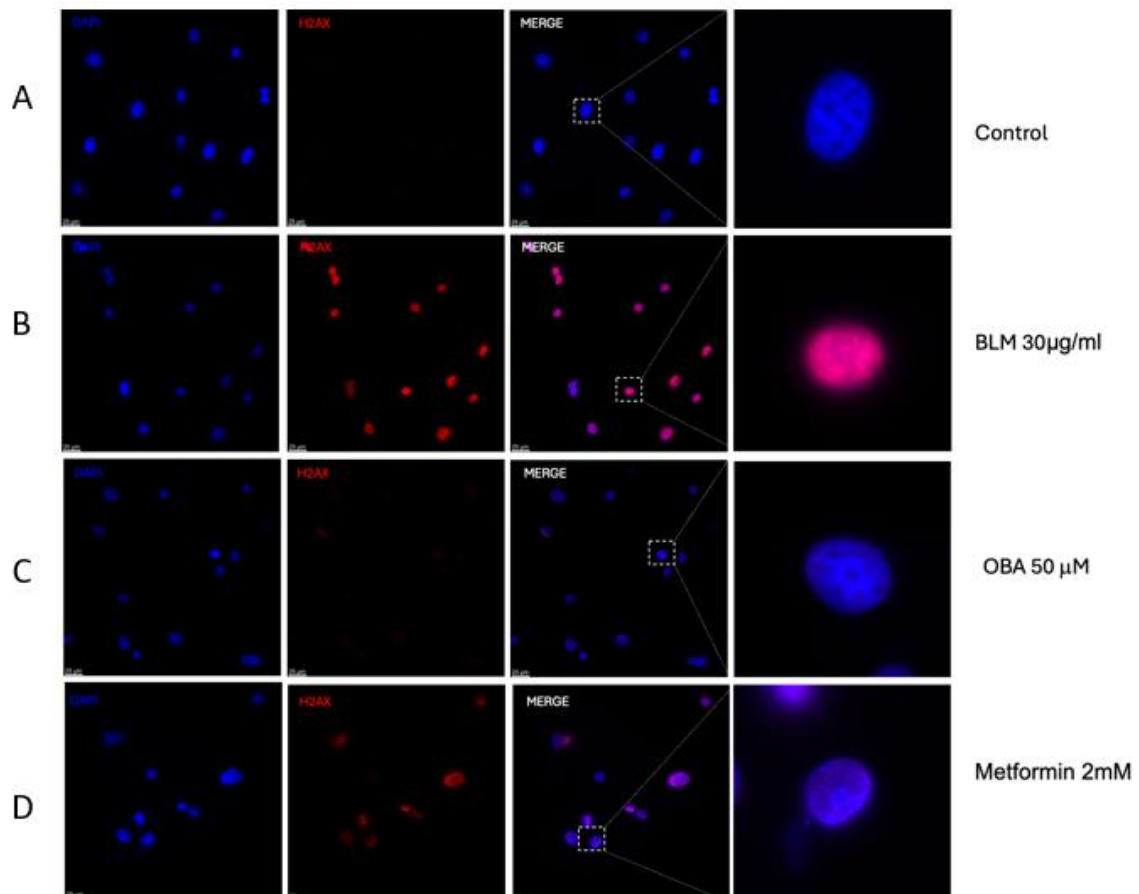


Figura 42. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA. (A) IF en grupo control; (B) IF tras estímulo con bleomicina; (C) IF tras reversión con obacunona (OBA); (D) IF tras reversión con metformina. Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona, mientras que la obacunona (OBA) y metformina lo revierten.

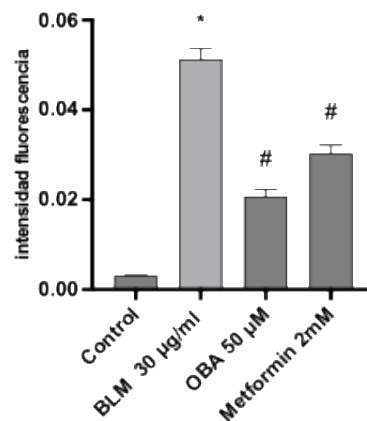


Figura 43. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona y es significativamente estadístico (*), mientras que la omaveloxona (OMA) y metformina lo revierten (#).

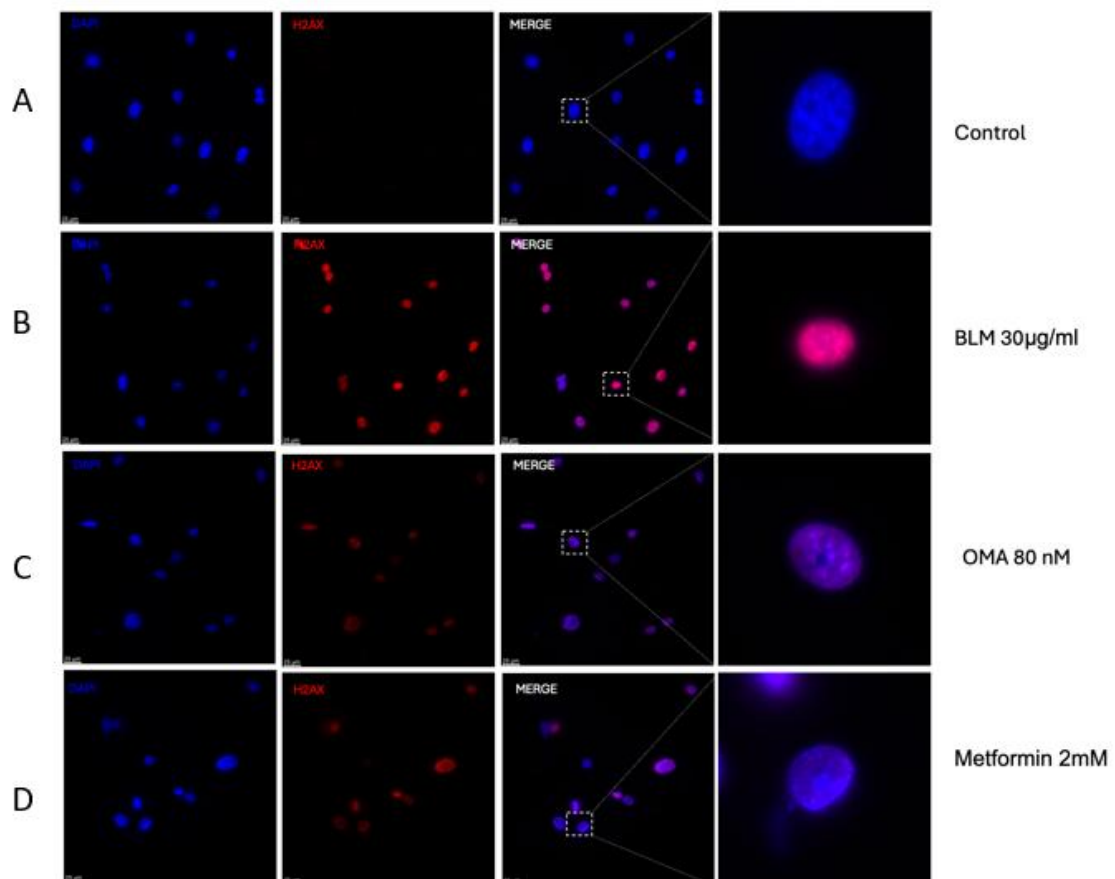


Figura 44. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA. (A) IF en grupo control; (B) IF tras estímulo con bleomicina; (C) IF tras reversión con omaveloxolona (OMA); (D) IF tras reversión con metformina. Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona, mientras que la omaveloxolona (OMA) y metformina lo revierten

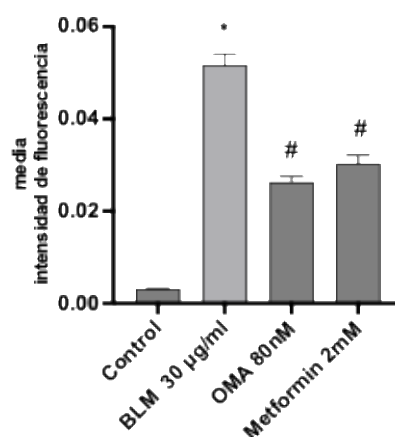


Figura 45. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN sin EREA. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona y es significativamente estadístico (*), mientras que la omaveloxolona (OMA) y metformina lo revierten (#).

4.6. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA POR ACTIVADORES DE NRF2 EN CÉLULAS PRIMARIAS NASALES DE PACIENTES CON RSCcPN CON EREA: OBACUNONA Y OMAVELOXOLONA.

RT-PCR

Al igual que en los pacientes sin EREA, se pasó a estudiar el efecto en la expresión en células epiteliales de mucosa de pólipos/cornete medio nasal humano de pacientes con RSCcPN con EREA y de sujetos sanos respectivamente. El primer objetivo fue confirmar el efecto de envejecimiento celular de la bleomicina, esta vez en los pacientes, y se confirmó con significación estadística para p21 y LMB1, no así para p16 (figuras 46 y 47). El efecto sobre LMNB1 fue importantísimo, reduciendo su expresión más de un 80%. El siguiente objetivo era conocer si existía reversión del envejecimiento celular con los fármacos antioxidantes.

Las células fueron sembradas y tratadas con los diferentes fármacos y después de una 1h fueron estimuladas con obacuna 12,5µM, 25µM y 50µM y metformina 2mM. También se estimularon con omaveloxona a tres diferentes concentraciones: 1nM, 10nM y 80nM. Tras 72 horas de incubación se procedió a la determinación de la expresión génica mediante RT-PCR.

En las células procedentes de pacientes con RSCcPN con EREA existe una disminución de la expresión de p21 significativa que se incrementa a mayores concentraciones del fármaco. Ambos fármacos (obacunona y omaveloxolona) son eficaces antioxidantes, necesitando mayor concentración de obacunona para conseguir este efecto. El efecto con p16 no es estadísticamente significativo, pero se declara la tendencia de reversión de su expresión. Con respecto a LMNB1, el efecto de la bleomicina es tan importante que es imposible su reversión con los fármacos antioxidantes (figuras 46 y 47).

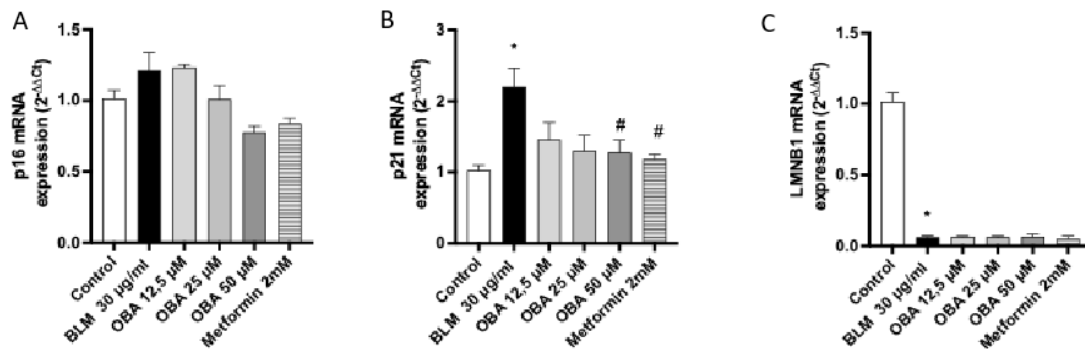


Figura 46. RT-PCR en células epiteliales de pacientes con RSCcPN con EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con obacunona (OBA) 12,5μM, 25μM y 50μM. Los marcadores medidos fueron p16 (A); p21 (B) y LMNB1 (C). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución en la expresión de los genes p16 y p21 con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM). Nótese el llamativo efecto de la bleomicina sobre LMNB1, que los fármacos no son capaces de revertir.

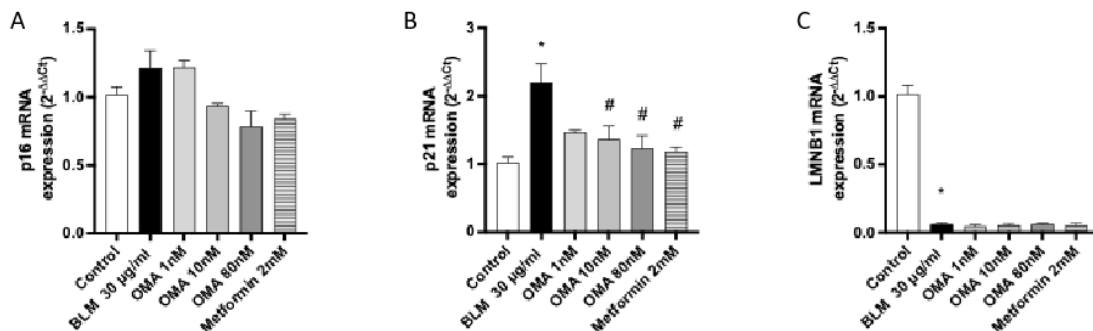


Figura 47. RT-PCR en células epiteliales de pacientes con RSCcPN con EREA, expresión génica de marcadores de senescencia tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a concentraciones 1nM, 10nM y 80nM. Los marcadores medidos fueron p16 (A); p21 (B) y LMNB1 (C). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Los efectos son similares a los obtenidos con obacunona.

ELISA

Se analizó la liberación de IL-6 e IL-1β en mucosa de cornete medio de sujetos sanos y en pólipos de pacientes con endotipo EREA. Una vez aislados, las células epiteliales fueron sembradas, tratados con los diferentes fármacos y finalmente estimulados con obacunona 12,5μM, 25μM y 50μM y metformina 2mM. Tras 72 horas de incubación se recogió el sobrenadante para analizar los niveles de IL-6 e IL-1β mediante la técnica de ELISA.

Se observó una estadísticamente significativa remisión en la expresión de los niveles de IL-6 e IL-1β tras el empleo de obacunona y omaveloxolona, más llamativa a mayor

concentración (figura 48 y 49). Nuestro fármaco antisenescencia de referencia, metformina, no tiene efecto antiinflamatorio en este grupo de pacientes, y sí nuestros fármacos.

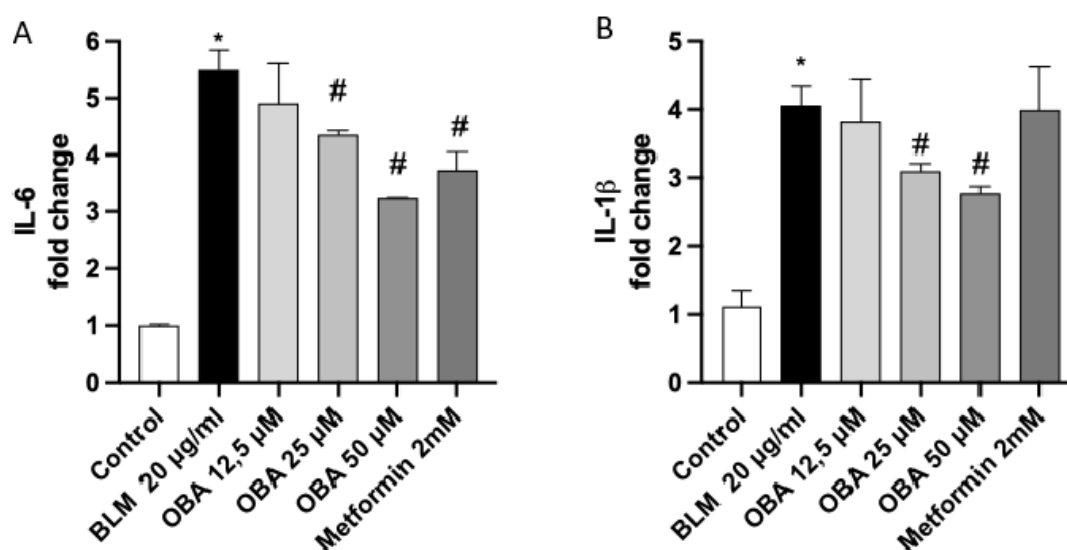


Figura 48. ELISA en células epiteliales de sujetos con RSCcPN con EREA, expresión de marcadores de inflamación [(A) IL 6; (B) IL 1β] tras el estímulo antisenescencia obacunona (OBA) 12,5µM, 25µM y 50µM. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. *p<0.05 respecto al grupo control. # p<0.05 respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución de IL- 6 e IL-1β con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM).

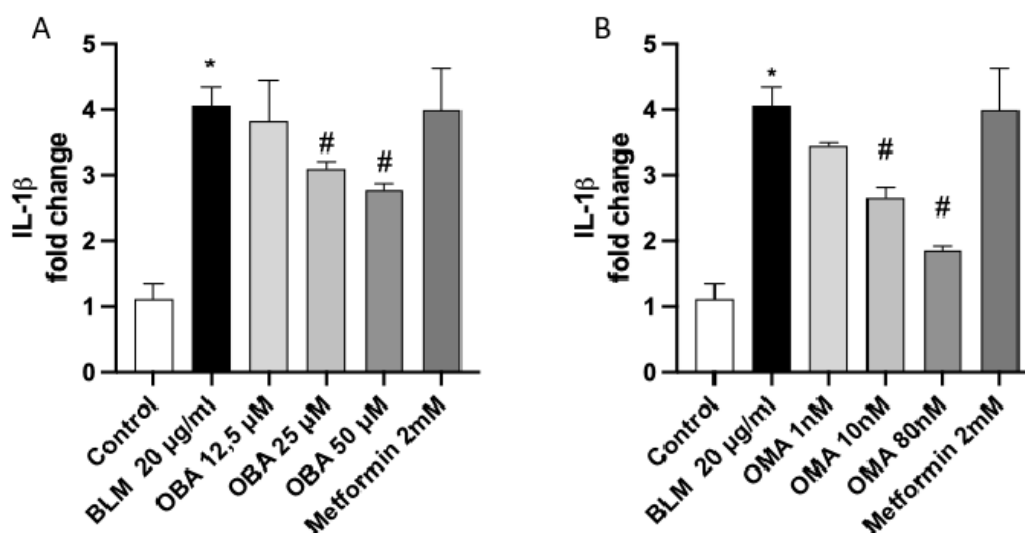


Figura 49. ELISA en células epiteliales primarias de sujetos con RSCcPN y con EREA, expresión de marcadores de inflamación [(A) IL 6; (B) IL 1β] tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con concentraciones 1nM, 10nM y 80nM. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. *p<0.05 respecto al grupo control. # p<0.05 respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia una disminución de IL- 6 e IL-1β con resultados estadísticamente significativos muy llamativa (5 veces reducida con respecto al inductor de senescencia bleomicina [BLM]).

GSH

Determinación del glutatión

Para conocer la respuesta antioxidante de los fármacos seleccionados en células epiteliales de pacientes con RSCcPN con EREA, primero se indujo la oxidación con bleomicina 25ug/ml y después se probó el efecto antioxidante de obacunona 12,5μM, 25μM y 50μM y omaveloxolona 1nM, 10nM y 80nM mediante la determinación de los niveles de GSH, tras el tratamiento con los diferentes fármacos.

Se confirmó que los niveles de GSH disminuían tras la estimulación con bleomicina. Además, se observó que todos los fármacos utilizados eran capaces de prevenir la disminución de GSH provocada por la bleomicina, generando aún más glutatión que el control (figura 50).

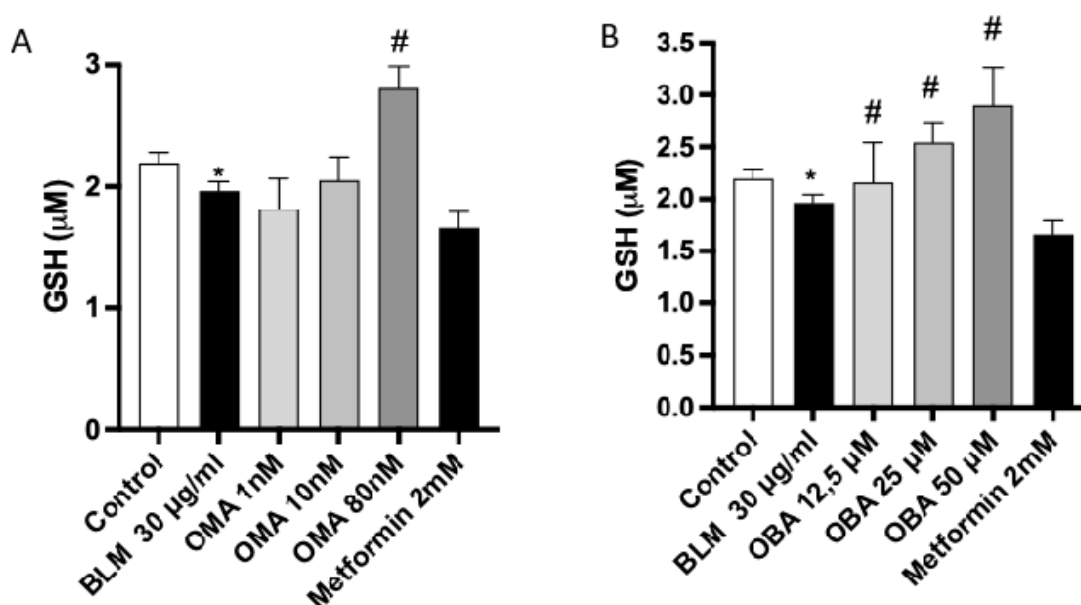


Figura 50. Medida de GSH en células epiteliales de pacientes con RSCcPN con EREA, expresión de antioxidantes tras el estímulo antisenescencia con omaveloxolona (OMA) a con concentraciones 1nM, 10nM y 80nM (A); y obacunona (OBA) 12,5μM, 25μM y 50Mm (B). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Se aprecia un aumento espectacular de GSH con resultados estadísticamente significativos (#) con respecto al inductor de senescencia bleomicina (BLM) que superan a las del control.

PROLIFERACIÓN

Se testaron concentraciones decrecientes de bleomicina (30, 20, 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$), tal y como se intentó con las células epiteliales nasales sanas. Los resultados esperados eran una falta de incorporación de BrdU en células estimuladas con bleomicina, incluso más llamativo que en los pacientes sin EREA. La Figura 51 representa la incorporación de BrdU en células tratadas con cada fármaco (omaveloxolona, obacunona y metformina) en comparación con las células control y estimuladas con bleomicina. La dosis más baja de bleomicina es muy agresiva y elimina la proliferación celular a niveles tan mínimos que la reversión con los fármacos es imposible.

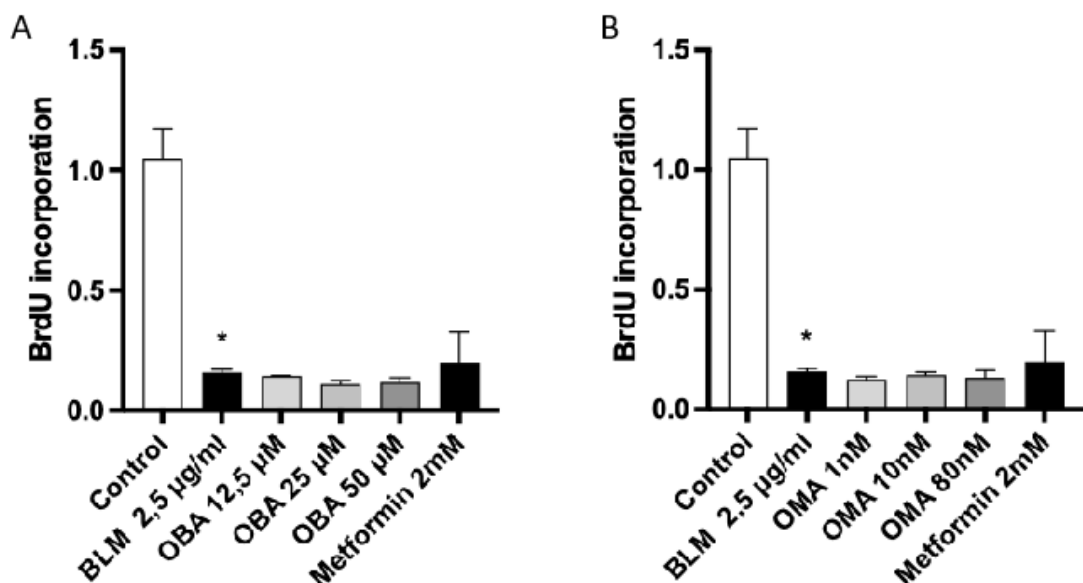


Figura 51 Medida de la incorporación de BrdU al ciclo celular en células epiteliales de sujetos con RSCcPN con EREA, tras el uso de bleomicina (BLM) y su intento de reversión con fármacos que aumentan la proliferación celular con omaveloxolona (OMA) a con centraciones 1nM, 10nM y 80nM (B); y obacunona (OBA) 12,5 μM , 25 μM y 50 μM (A). Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). La falta de incorporación de BrdU al ciclo celular es muy llamativa con bleomicina y ningún fármaco es capaz de revertir este hecho, tal como sucedía en el resto de grupos del estudio.

HISTONAS

Se utilizó bleomicina 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para aumentar el daño al DNA mediante un incremento en la histona H2AX. Tras esto se probó obacunona 50 μM (figura 52 y 53) y omaveloxolona 80nM (figura 54 y 55), revirtiendo este daño mediante la silenciación de esta histona, siendo los resultados estadísticamente significativos.

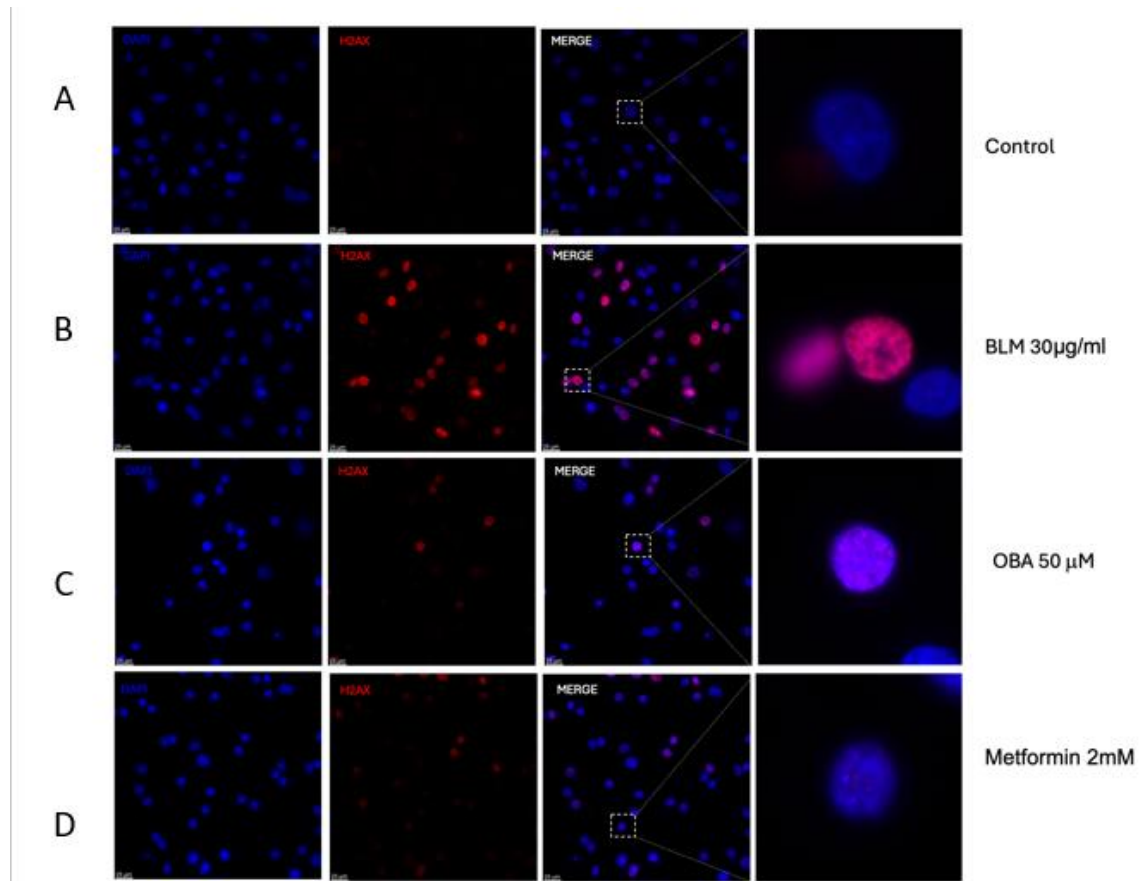


Figura 52. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA. (A) IF en grupo control; (B) IF tras estímulo con bleomicina; (C) IF tras reversión con omaveloxolona (OMA); (D) IF tras reversión con metformina Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona, mientras que la obacunona (OBA) y metformina lo revierten.

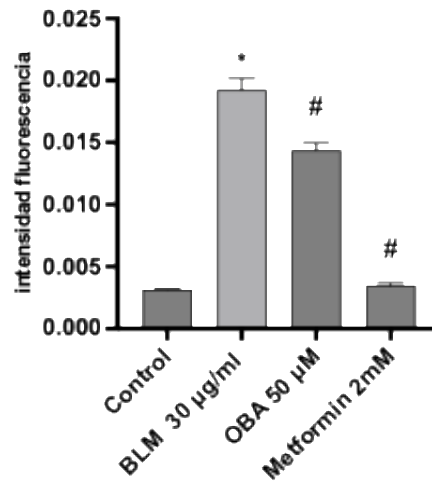


Figura 53. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA. Las comparaciones fueron analizadas mediante t test de dos vías. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. # $p < 0.05$ respecto al grupo grupo estimulado con bleomicina (BLM). Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona y es significativamente estadístico (*), mientras que la omaveloxona (OMA) y metformina lo revierten (#).

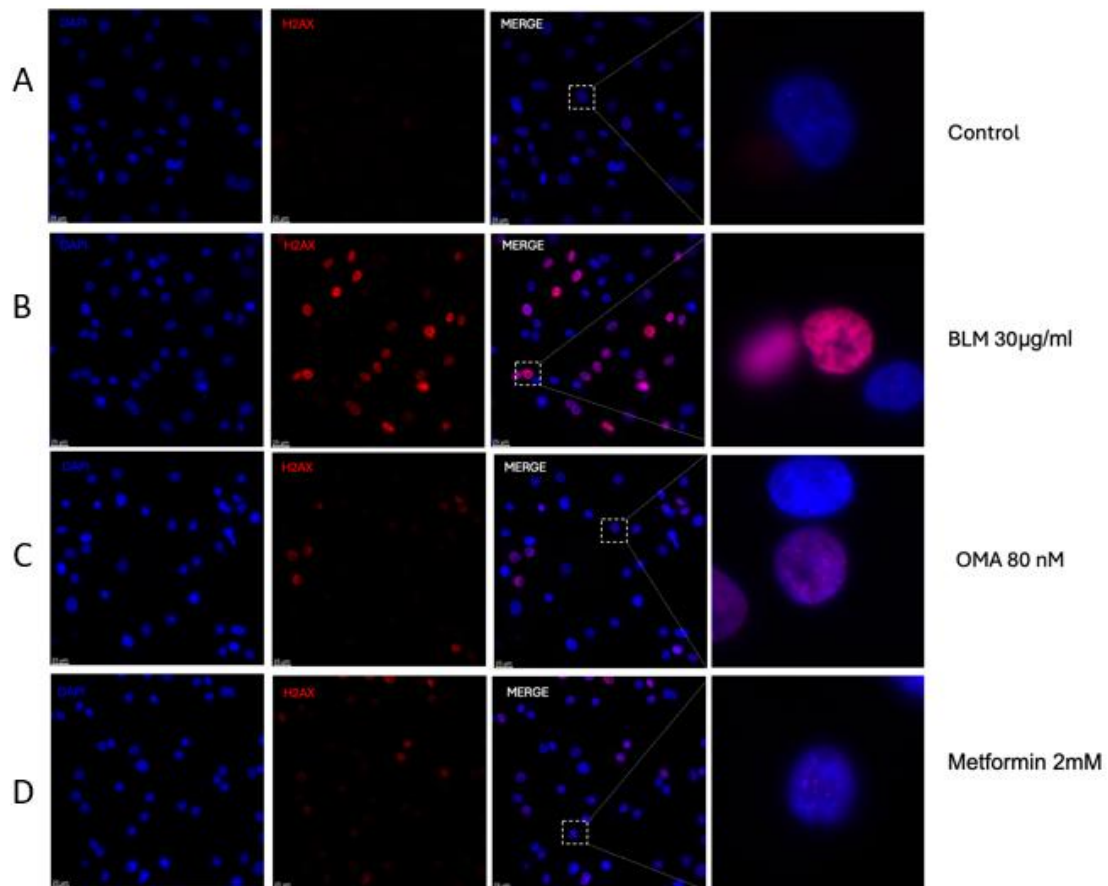


Figura 54. Marcadores de daño celular, inmunofluorescencia de H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA. Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona, mientras que la omaveloxona (OMA) y metformina lo revierten.

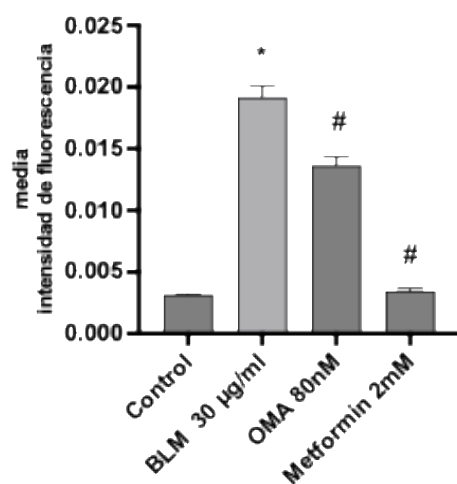


Figura 55. Marcadores de daño celular, expresión de histona H2AX en pacientes con RSCcPN con EREA. Nótese como la bleomicina (BLM) induce un aumento de la expresión de la histona y es significativamente estadístico (*), mientras que la omaveloxona (OMA) y metformina lo revierten (#).

CAPÍTULO 5

Discusión

5.1. ALTERACIONES MOLECULARES

Histonas

Como ya se ha mencionado, la regulación de las histonas en el ciclo celular está muy estudiada, entre ellos, mecanismos apoptóticos, que además son necesarios para el desarrollo del pólipo nasal. *Li et al.*(139) han observado que la trichostatina A puede suprimir la diferenciación de miofibroblastos y la producción de matriz extracelular hiperacetilando las histonas en los pólipos nasales. Este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre el papel de las histonas en los pólipos nasales, convirtiendo a trichostatina A en una nueva candidata para el tratamiento de RSCcPN. Otros trabajos muestran que tanto KDM2B (desmetilasa de histonas) como BRG1 (regulador transcripcional de histonas) frenan el desarrollo de la inflamación del epitelio mucosal nasal en el fenotipo de RSCcPN(140).

Sin embargo, el papel de la histona extranuclear en la RSC aún no se entiende y no hay mucha literatura al respecto. En su estudio *Zhao et al.*(136) investigan la expresión de la histona H2BK en pacientes con PN. Aquí, los resultados del análisis de microarrays revelan que las células epiteliales nasales son una de las principales fuentes celulares de producción de H2BK en pacientes con PN. Estos resultados concuerdan con nuestro estudio, ya que nuestro análisis se realiza en células epiteliales, donde, aunque la protagonista fue la histona H2AX, existe un claro aumento de la expresión de histonas. Además, si bien pueden tener un papel antibacteriano reportado en otros estudios(173), el papel contra *S. aureus* (implicado en la patogénesis inflamatoria de la RSCcPN) no se ha demostrado, por lo que su papel potenciador de la inmunidad en esta patología no está claro. Los estudios no hacen referencia al endotipo EREA o no EREA, aunque nuestro estudio indica que existe mayor expresión de histonas celulares en los pacientes con RSCcPN y con EREA, lo que puede relacionarse con una mayor agresividad de la enfermedad. En resumen, las modificaciones de histonas son comunes en la RSC y deben ser elucidadas en más investigaciones.

Estrés oxidativo (GSH)

Algunos trabajos sugieren un desequilibrio a favor de los ROS en las vías respiratorias superiores que podrían estar en relación con el desarrollo de la patología, y este desequilibrio puede deberse al íntimo contacto con el oxígeno, que podría deplecionar los niveles de GSH(174).

Los resultados de nuestro estudio no arrojan dudas acerca del papel de la bleomicina en la reducción de GSH y el aumento del estrés oxidativo del mismo en los pólipos nasales, así como de su reversión con obacunona y omaveloxolona. Si bien en la revisión de la literatura encontramos varias vertientes de tratamiento principalmente a este respecto: por un lado, estudios que respaldan el uso local de bleomicina en el tejido polipoideo, por otro lado, un grupo que defiende el GSH como agente antioxidante y tratamiento de la PN.

Los fibroblastos derivados de pólipos poseen características de crecimiento más activas, incluyendo proliferación, migración, etapas del ciclo celular y niveles basales de ROS más altos en comparación con los fibroblastos de la mucosa nasal normal. Además, los fibroblastos de los pacientes con RSCcPN son más sensibles a la apoptosis inducida por BLE que los sujetos control(143). Otro dato de interés en este trabajo es que el impacto de BLE en los niveles de ROS en pacientes con PN es más importante que en el control, tal y como sucede en nuestro estudio, traduciendo una mayor sensibilidad al estrés oxidativo en los pacientes con PN. En nuestro estudio, los efectos por nuestros fármacos antioxidantes mejoran los resultados a través del aumento de la producción de GSH.

Aunque los corticosteroides tópicos se consideran el tratamiento de base más eficaz para la rinosinusitis crónica con pólipos nasales como se ha comentado, estudios han demostrado que los fibroblastos de los pólipos nasales son menos sensibles al efecto inhibidor de los corticosteroides(2). Los ensayos clínicos recientes han demostrado que el tratamiento de los pólipos nasales con inyecciones intralesionales de bleomicina A5 es bastante seguro y efectivo(175).

La bleomicina se ha utilizado ampliamente como fármaco antitumoral, pero su uso ha sido limitado por complicaciones serias como fibrosis pulmonar y esclerodermia(176).

Sin embargo, la inyección intralesional de BLE en queloides, cicatrices hipertróficas y otras patologías maxilofaciales ha demostrado ser una alternativa de tratamiento segura y efectiva(177). Además, este tratamiento ya se ha utilizado para el tratamiento de PN en China, especialmente en casos recurrentes, difíciles de tratar y resistentes a los glucocorticoides(143). Una posible explicación para la efectividad de este tratamiento es la capacidad de BLE para inducir la apoptosis de eosinófilos(178), principal agente implicado en el endotipo T2 de la RSCcPN. Sin embargo, el impacto de la BLE en los fibroblastos derivados de la nariz no está claro. En la literatura, parece que la BLE podría inducir la apoptosis de los pólipos y que estos son más sensibles a sus efectos que los pacientes control como ya hemos puntualizado (143), sin embargo, en nuestro estudio, parece que los pacientes con PN y en especial los EREA, presentan una sensibilidad disminuida a la bleomicina con respecto a los sujetos sanos. Una explicación plausible podría ser que ya existe aumento de ROS en la RSCcPN y por lo tanto se trata de un tejido en desequilibrio en cuanto al estrés oxidativo, a favor de este mismo, por lo que ya se encuentra vulnerado y la bleomicina tiene menos campo de actuación. Sin embargo, la dosis de BLE es determinante para su efecto, pues según estudios las dosis bajas de BLE pueden aumentar los niveles de ROS en los fibroblastos para mejorar la proliferación, pero cuando están en exceso, mucho más allá de la capacidad de la célula para crear una respuesta antioxidante efectiva, las ROS suprimen la proliferación e inducen la apoptosis(179,180).

GSH es un antioxidante bien conocido que funciona al agotar las ROS como se ha comentado. El GSH podría inhibir la generación de ROS provocada por BLE y su toxicidad, sugiriendo que las ROS son esenciales en la apoptosis de los pólipos nasales inducida por BLE(92,143).

Reguladores del ciclo celular

Existe muy poca literatura sobre regulación del ciclo celular y la RSC hasta donde estos investigadores conocen. Sí es conocido el papel de *S. aureus* en la apoptosis inducida por bacterias, confirmando su potencial patológico en pacientes colonizados. Por ello se

podría plantear su tratamiento en pacientes asintomáticos. Por otro lado, otros estudios confirman la exposición a alérgenos ambientales o toxinas como estímulos nocivos con daño de la mucosa, seguido de una respuesta inflamatoria y una menor expresión de genes anti-apoptóticos como BCL-2(144,181).

La expresión de p53 ha sido muy variable a lo largo de las investigaciones, con resultados en aumento(182) o disminución(147) del mismo con respecto al control. Si bien existen aún menos estudios con respecto a p21, en algunos se refleja que no existen diferencias entre su expresión con respecto al grupo de sujetos sanos(183), en otros sí existe un aumento en su expresión y una correlación con mayor apoptosis(146). Nuestro estudio es concordante con la bibliografía, con un significativo aumento de p21 con respecto a los pacientes sanos en los pacientes con RSCcPN y mucho más llamativo en el grupo EREA. Además, sí se prueba que el estímulo senescente se asocia con una mayor expresión de p21, y que los fármacos antisenescencia son capaces de disminuir su expresión de manera significativa, aunque a altas dosis. Esto mismo sucede con p16 y también con laminina B1, aunque no hemos encontrado literatura al respecto, por lo que hasta ahora, es el primer estudio que demuestra el aumento de expresión de p16 y de laminina B1 en RSCcPN frente a estímulos senescentes, y la reversión de la misma con obacunona y omaveloxolona. Sería conveniente investigar más estas cuestiones y su papel en la patogenia.

La investigación de *Cha et al.* revela que la expresión de los miRNA en vesículas extracelulares difiere según el fenotipo crónico de la rinosinusitis crónica sin poliposis nasal y la RSCcPN. Al transferir un miRNA de una célula a otra, las vesículas podrían desempeñar un papel funcional en el desarrollo de RSC y también en su fenotipo(184). Los miRNA pueden regular la actividad de las proteínas p53 y p21 en los procesos de daño al DNA. Algunos estudios sugieren que los miRNAs podrían regular las respuestas inmunitarias celulares a patógenos particulares, aumentando su expresión en monocitos como respuesta a la infección bacteriana, lo que podrían ser un buen arma con respecto a los efectos inflamatorios por *S. aureus*(146). Más investigaciones son necesarias para arrojar luz para esta cuestión.

Es interesante comentar el equilibrio entre apoptosis y proliferación celular. Si bien podría considerarse la proliferación celular como uno de los mecanismos clave en el desarrollo del pólipo, ¿si existe mayor apoptosis, esta impediría la proliferación celular? ¿es posible que se den ambos mecanismos al mismo tiempo? *Morawska et al.* prueban los niveles de mRNA de BIRC5 (survivina), que actúa como un biomarcador pronóstico en enfermedades neoplásicas, inhibiendo indirectamente la apoptosis y promoviendo la proliferación celular(146). *Frazzini et al.*(185) encuentran que su sobreexpresión, asociada con la respuesta inmune, podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de pólipos nasales. Sin embargo, examinaron muestras de mucosa de ubicaciones diferentes (el cornete, tejido alrededor de los pólipos y pólipos nasales). *Cho et al.*, que examinan la mucosa del mismo sitio donante (cornete inferior), no informan de una mayor expresión de survivina en el grupo sano y en pacientes con pólipos nasales(186). En cambio, *Morawska et al.* reportan niveles de expresión más bajos de survivina, que es característico de una mayor apoptosis. Debido a su efecto inmunomodulador, BIRC5 puede ser un objetivo terapéutico potencial en RSCcPN. Sin embargo, esta hipótesis requiere más investigación.

Además, las moléculas de miRNA se utilizan en la terapia de muchas enfermedades. Por ejemplo, *Zhao et al.* trataron a pacientes con lesión cerebral traumática con inhibidores de miR-203 y redujeron la apoptosis neuronal inhibiendo la actividad de CASP3 y aumentando la expresión de BCL-2(187).

Longitud de telómeros

No existen estudios, hasta donde conocen estos investigadores, que relacionen la longitud de los telómeros con la RSC. Este sería el primer trabajo que demuestra una disminución en la longitud de los mismos con la poliposis nasal, si bien creemos que la muestra es insuficiente para establecer diferencias entre el grupo sin EREA y con EREA. Sí se ha caracterizado claramente este descenso de la longitud en otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la psoriasis(188). Además, basándonos en el concepto de vía respiratoria única que hemos mencionado al comienzo de este trabajo, pueden establecerse ciertos paralelismos moleculares entre el asma y la RSCcPN. En algunos trabajos ya se ha publicado la

importancia del tratamiento con corticoides en el asma, que es capaz de equiparar la longitud de los telómeros al grupo control, a diferencia de los no tratados, incidiendo en la importancia de la adherencia al tratamiento en este mecanismo de senescencia(189).

Importante también los cambios en los estilos de vida y cómo estos mismos pueden afectar de manera epigenética a los telómeros, como en el estudio de *Tannemann et al*, que observan una disminución en la longitud de los mismos en relación al humo del tabaco(190), actor patógeno también en la PN. Relacionado con la senescencia.

IL- 6

La interleucina-6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica involucrada en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, incluyendo la diferenciación de células plasmáticas, la proliferación de células de mieloma y la supervivencia de células plasmablasticas. Esta molécula se expresa en el citoplasma de las células epiteliales en RSCcPN, y es uno de los agentes principales del endotipo 3(2). Diversos agonistas de receptores tipo toll y citoquinas proinflamatorias pueden inducir a las células epiteliales nasales humanas primarias, recolectadas de pólipos nasales, a secretar más IL-6 que las células de los sujetos control. Consistente con estudios previos(151), nuestros resultados revelaron una tendencia al alza de IL-6 en los pacientes con PN en comparación con los sujetos control, así como un aumento de su expresión con la senescencia estimulada con bleomicina y la reversión de la misma con obacunona y omaveloxolona. Estos hallazgos podrían dejar una puerta abierta a un tratamiento con nuestros fármacos antisenescencia o incluso con fármacos biológicos dirigidos expresamente a IL-6 (tocilizumab), que ya se utilizan en otras patologías inflamatorias como la artritis reumatoide. De hecho, esta interleucina se ha documentado en pacientes refractarios a los tratamientos convencionales, abriendo la posibilidad de una nueva diana molecular en este subtipo de enfermos(191).

Otras moléculas asociadas a IL-6 se están investigando, como la kinasa 1 regulada por suero/glucocorticoides (SGK1), IL-6 induce la expresión de SGK1 y SGK1 regula a la baja la expresión de IL-6. Por lo tanto, SGK1 podría considerarse un objetivo terapéutico

cuando se administran medicamentos adicionales para elevar la expresión de SGK1 con el fin de controlar la secreción de IL-6 y tratar la inflamación inducida por IL-6 en PN(151).

IL 1

Algunos investigadores se preguntan sobre polimorfismos de la IL-1 y su asociación con la RSCcPN, y encuentran una asociación entre el polimorfismo IL-1B (-511C/T) y ambas formas de RSC (con y sin pólipos), destacando que era más prevalente en pacientes con PN. Sí estudian, además, el fenotipo EREA sin poder establecer relaciones entre los mecanismos estudiados, que defienden bajo la premisa de un bajo tamaño muestral(155).

Estos investigadores(160) encuentran que IL-1 α está disminuida en el epitelio nasal pero aumentada en el tejido conectivo subepitelial en pacientes con PN, y es un hallazgo muy relevante, tanto desde el punto de vista inmunológico como en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad. IL-1 α es una citoquina proinflamatoria clave que se produce por células epiteliales y actúa como alarma. La trascendencia del hallazgo reside en tres puntos fundamentales: Disociación epitelio-estroma: la inflamación no está uniformemente distribuida, sino que hay un desequilibrio entre la barrera epitelial y el tejido subyacente. Esto contribuye al daño persistente y la remodelación tisular típica de los pólipos. Además, el aumento de IL-1 α en el estroma podría ser una señal de inflamación "enterrada" que no se detecta superficialmente. Controlar la producción subepitelial de IL-1 α o restaurar su regulación en el epitelio podría ayudar a modular la inflamación y limitar la progresión de la enfermedad.

No hemos encontrado hallazgos sobre la IL-1 β y su papel en la RSCcPN, pero la amplia disregulación de citocinas observada en la literatura y en nuestros resultados apoya este mecanismo como perpetuador de la inflamación crónica propia de esta patología. Más estudios son necesarios a este respecto.

Proliferación celular

Los datos encontrados sobre proliferación celular en RSCcPN son controvertidos. Existen estudios sobre el marcador de proliferación Ki 67 y su papel en la remodelación tisular: ayuda a formar el recubrimiento para los cromosomas condensados durante la mitosis, y se ha probado su papel en distintos tipos de cáncer y en tejidos con inflamación severa(160).

En los pólipos nasales, los cambios en la morfología epitelial (metaplasia escamosa, hiperplasia secretora) ocurren con frecuencia, y muchos estudios han sugerido una desregulación de la proliferación de células epiteliales(1). Se supone que la función de barrera anormal y la remodelación de las células epiteliales nasales también contribuyen a la inflamación crónica y a los procesos de transformación tisular característicos de la rinosinusitis crónica. En algunos trabajos se observa un aumento de células basales con marcadores de proliferación aberrantes (p63+/Ki67+) en el epitelio de los pólipos nasales, lo que entorpece la función de barrera adecuada(161). Estos cambios morfológicos y funcionales en las células epiteliales nasales pueden alterar el ambiente inflamatorio local, ya que las citoquinas derivadas de las células epiteliales, como IL-33 y la linfopoyetina estromal tímica (tal como sucede en nuestros resultados), están asociadas y contribuyen directamente a la fisiopatología de la RSCcPN(161), y además en nuestro estudio, la linfopoyetina estromal tímica está aún más aumentada en los sujetos del grupo EREA.

En otros trabajos, sin embargo, el Ki 67 no aumenta significativamente en los pólipos nasales en comparación con los controles(160). Sí encuentran correlación entre los niveles de esta molécula y de otras citocinas como IL-4, IL-12 e IL-7. La presencia de Ki 67 en nuestras muestras es más probablemente un indicador de una proliferación indistinta en la inflamación persistente, y son las citocinas asociadas las desencadenantes del proceso inflamatorio y de remodelación. Se sabe que IL-4 aumenta el factor de crecimiento transformante (TGF)- β en los pólipos nasales y, por lo tanto, podría ser responsable de la proliferación de las células estromales(192).

Viksne et al. en su estudio, también correlaciona otras citocinas con la proliferación celular(193). En muestras de pacientes con PN recurrente, detectan correlaciones muy fuertes entre IL-6 epitelial e IL-7 epitelial, IL-12 e IL-1 α . Estas citocinas están presentes en el tejido conectivo subepitelial, sobre todo, con concentraciones de las mismas

disminuidas en el epitelio, lo que hace pensar que podría deberse a una barrera epitelial disfuncional (muy típico en la patología que nos ocupa, como hemos comentado). Se ha investigado aún más IL-6 y su influencia en la proliferación: influye en el equilibrio entre Th17 (células T-helper 17) y Treg (células T reguladoras), de hecho, IL-6 puede promover el desarrollo de células T CD+ 4 naive en células Th17 y suprimir la expresión de forkhead box P3 (Foxp3), limitando el desarrollo de células Treg, lo que permite la diferenciación de Th17(194). Esto sugiere una fuerte implicación de IL-6 en la patogénesis de los pólipos nasales. Se ha demostrado que IL-6 influye en la reparación de heridas en estudios in vitro y puede llevar a la proliferación celular observada en los pólipos nasales. Por lo tanto, IL-6 parece estar involucrada en la reparación epitelial y la proliferación celular, y Ki-67 caracteriza la proliferación(193).

Nuestros ensayos con fármacos antiproliferación (bleomicina), frenan tanto la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) al ciclo celular que esta es irreversible con obacunona, omaveloxolona e incluso con metformina. Nuestra teoría es que los fármacos empleados disminuyen los niveles de IL-6, y estudiando la bibliografía citada, esta interleucina es la encargada de la proliferación celular en la RSCcPN, por lo que, al frenar su efecto, también se frena la proliferación celular.

5.2. SISTEMA NRF-2

Nrf- 2 y RSCcPN

Existen pocos estudios sobre la potenciación del sistema Nrf2 como terapia para PN, sin embargo, destaca la crocina como antioxidante natural en el siguiente trabajo, que expone las siguientes premisas(188):

- **Fuentes de estrés oxidativo:** Se identificó que las células epiteliales nasales y los macrófagos en los pólipos nasales presentan una expresión elevada de enzimas oxidantes como NOS2 y NOX1, lo que contribuye al estrés oxidativo y a la inflamación en la rinosinusitis crónica con pólipos nasales.
- **Relación con citoquinas inflamatorias:** Los niveles de estas enzimas oxidantes mostraron una correlación positiva con citoquinas proinflamatorias como IL-5 e

IL-6, mientras que las enzimas antioxidantes, como HO-1 y SOD2, se correlacionaron negativamente con IL-13 e IFN- γ .

- **Efecto de la crocina:** La crocina demostró inhibir la polarización de macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2, reducir la expresión de NOS2 y NOX1, y mejorar la capacidad antioxidante de los macrófagos M2. Además, en células epiteliales nasales humanas tratadas con superantígeno estafilocócico B o lipopolisacárido, la crocina potenció la respuesta antioxidante a través de la vía KEAP1/NRF2/HO-1, disminuyendo la inflamación.

El estudio sugiere que el estrés oxidativo desempeña un papel crucial en la patogénesis de la rinosinusitis crónica con pólipos nasales, y que terapias antioxidantes podrían ser estrategias prometedoras para su tratamiento.

Si bien la rinitis alérgica es una entidad independiente de la RSCcPN, se establecen entre ambas entidades una relación sumamente estrecha por dos razones principales: la rinitis alérgica es una comorbilidad muy frecuente en los pacientes afectados de PN(195), y además las dos patologías comparten mecanismos moleculares subyacentes(196). La relación entre el sistema Nrf2 y la rinitis alérgica ha sido objeto de diversos estudios que destacan su papel en la modulación del estrés oxidativo y la inflamación en esta condición. Algunos hallazgos clave:

- **Actividad antiinflamatoria del ácido α -lipoico(ALA):** Un estudio investigó cómo la ALA influye en la rinitis alérgica al equilibrar la expresión de células Th17/Treg y potenciar la vía Nrf2/HO-1. Los resultados sugieren que la ALA puede aliviar los síntomas de la rinitis alérgica mediante la modulación de estas vías(197).
- **Efectos de la mangiferina:** Otro estudio evaluó el impacto de la mangiferina en la rinitis alérgica inducida por ovalbúmina en ratones. Se encontró que la mangiferina atenúa la inflamación al regular las vías de señalización Nrf2/HO-1/NF- κ B, lo que indica su potencial terapéutico en la rinitis alérgica(198).
- **Impacto del ozono en la rinitis alérgica:** Una investigación analizó cómo la exposición al ozono exacerba la rinitis alérgica mediante la alteración de la expresión de Nrf2 y el aumento del estrés oxidativo en la mucosa nasal. Los

hallazgos sugieren que la inhibición del estrés oxidativo podría mitigar los efectos perjudiciales del ozono en la rinitis alérgica(199).

- **Revisión sobre estrés oxidativo y vías antioxidantes:** Una revisión destacó el papel del estrés oxidativo en la rinitis alérgica y cómo las vías antioxidantes, incluyendo Nrf2/Keap1 y NF-κB, actúan como "interruptores redox moleculares" que modulan las respuestas inflamatorias en esta enfermedad(200)

Estos estudios subrayan la importancia del sistema Nrf2 en la regulación del estrés oxidativo y la inflamación en la rinitis alérgica, sugiriendo que la modulación de esta vía podría ofrecer nuevas estrategias terapéuticas para el manejo de la enfermedad. Apoyándonos en esta bibliografía, podríamos reforzar la idea del tratamiento antioxidante para la PN.

Alteraciones en la barrera epitelial y RSCcPN

Hemos comentado la estrecha relación de la patología con las alteraciones de la integridad de la barrera epitelial. Aunque han sido pocos los estudios, algunos investigadores ahondan en los mecanismos moleculares subyacentes.

Ramanathan et al.(165) examinan el papel del factor de transcripción Nrf2 en la inflamación eosinofílica de los senos paranasales mediante un modelo de ratón. Los resultados fueron una hiperplasia de células caliciformes, un aumento en la infiltración eosinofílica, y una elevación de los niveles de IL-13. La principal fuente de esta molécula fueron los linfocitos T. Concluyen con que la disrupción del Nrf2 epitelial en la mucosa sinonasal aumenta la susceptibilidad a la inflamación eosinofílica en la rinosinusitis, destacando la importancia de Nrf2 en la regulación de la inflamación en la mucosa nasal.

En otros trabajos(165), se explora la disfunción de la barrera epitelial inducida por extracto de humo de cigarro a través de la activación de Nrf2. Se estudian cómo el humo de cigarrillo provoca una alteración en las proteínas de unión celular epitelial, específicamente zonula occludens 1 (ZO-1) y molécula de adhesión de unión intercelular A (JAM-A). Esta alteración se traduce en una disminución de la resistencia eléctrica

transepitelial, reflejando una pérdida de integridad de la barrera epitelial. La activación farmacológica de Nrf2 antes de la exposición al humo conduce a una redistribución y aumento de la expresión de ZO-1 y JAM-A en la superficie celular y esta restauración de las proteínas de unión mejora la resistencia eléctrica transepitelial, sugiriendo una recuperación de la función de barrera epitelial. Por este motivo la activación de Nrf2 emerge como una estrategia terapéutica potencial para contrarrestar la disfunción de la barrera epitelial nasal. En el experimento descrito en el artículo, la activación de Nrf2 se lleva a cabo mediante el uso de un activador farmacológico. El compuesto utilizado en el estudio es Sulforafano (SFN), un conocido activador de Nrf2.(163) Quizá una suplementación dietética con este tipo de compuestos pudiera ser una buena opción terapéutica complementaria a otros tratamientos.

Por otro lado, debemos tener presente el frecuente uso de los antibióticos sobre todo en relación a las reagudizaciones, en este caso, *Kohanski et al.*(201) exploran el papel de los antibióticos bactericidas en el daño oxidativo de las células epiteliales de los pacientes, concretamente, el levofloxacino. La exposición a levofloxacino aumenta la producción de ROS en las células epiteliales sinonasales, lo que genera un ambiente de estrés oxidativo. De nuevo, el papel de SFN es clave, pues reduce la actividad de caspasa-3 inducida por levofloxacino y atenúa la formación de ROS, sugiriendo que la protección contra el estrés oxidativo puede mitigar la apoptosis. El SFN podría ser útil para reducir estos efectos, ofreciendo una vía para proteger la mucosa nasal durante tratamientos antibióticos, reforzando nuestra idea de restauración del sistema nrf2 en la RSCcPN.

Activadores NRF2

Se ha explorado la relación entre el empleo de omaveloxolona, y los efectos protectores en la osteoartritis(168). La osteoartritis es una enfermedad articular degenerativa común, caracterizada por la degradación del cartílago articular, inflamación y apoptosis de condrocitos. El estudio demuestra que el tratamiento con omaveloxolona aumenta la expresión y actividad nuclear de Nrf2 en condrocitos expuestos a IL-1 β . Esto conduce a una mayor expresión de enzimas antioxidantes como la hemo oxigenasa-1 (HO-1) y la

NAD(P)H quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), reduciendo el estrés oxidativo en las células. Se concluye con el efecto protector de la omaveloxolona en la osteoartritis al activar la vía antioxidante Nrf2. Estos mecanismos moleculares conducen a una reducción del estrés oxidativo, la inflamación, la apoptosis de condrocitos y la degradación de la matriz extracelular, sugiriendo que la omaveloxolona podría ser un agente terapéutico potencial para la osteoartritis. Este mecanismo involucrado en la patogenia de esta enfermedad crónica inflamatoria es análogo del estudiado en la PN, y tal como hemos visto, el daño con aumento de IL-1 β también está presente en nuestra patología, por lo que este estudio podría respaldar nuestra hipótesis sobre el papel de omaveloxolona en nuestra patología.

Otras patologías donde la omaveloxolona ha demostrado de gran utilidad es en la ataxia de Friedreich(202). En la ataxia de Friedreich, la deficiencia de frataxina causa disfunción mitocondrial, lo que genera un exceso de ROS. La disfunción mitocondrial en la ataxia de Friedreich reduce la producción de ATP, afectando la energía disponible para las células nerviosas y musculares. Al activar Nrf2, se mejora la función mitocondrial, y además se inhibe NF- κ B, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6). Estos mecanismos patogénicos están implicados también en nuestro estudio.

La piroptosis es una forma de muerte celular programada altamente inflamatoria, mediada por el inflamasoma NLRP3, que contribuye significativamente al daño del tejido nasal en pacientes con RSC a través de la cascada de señalización Nrf2/ROS(203). Al parecer, NLRP3 se activa en respuesta a diversos estímulos presentes en la RSC, como estrés, infecciones bacterianas y virales e irritantes ambientales. Esto activa IL-1 β e IL-18 y provoca permeabilidad del epitelio. Platycodon D ha mostrado inhibir NLRP3 al reducir el estrés oxidativo mediante la activación de Nrf2.

Cada vez más investigaciones pretenden demostrar el papel de la obacunona en diversas patologías, puesto que su acción antioxidante y antisenescencia es considerable. Se trata de estudios preliminares en modelos animales principalmente, por lo que aún serían necesarios más trabajos que confirmen estos mecanismos en humanos. A continuación, se presentan patologías en las que se ha demostrado los beneficios de

este fármaco: cáncer colorrectal(204), dolor Inflamatorio(205), cáncer de Páncreas(206), dolor Pélvico Crónico(207), alopecia androgénica(208), cáncer de Ovario(209), osteoporosis(168), cáncer de próstata(210), colitis ulcerosa(211), y patología cardiovascular crónica(187).

Los estudios recientes van encaminados a sugerir suplementos dietéticos con propiedades específicas activadoras de Nrf2 como son(212):

- Curcumina (Cúrcuma): Induce Nrf2 al modificar Keap1.
- Resveratrol (presente en uvas, vino tinto): Activa la vía Nrf2 a través de la modulación de la actividad de SIRT1.
- Quercetina (presente en cebollas, manzanas, té verde): Mejora la estabilidad de Nrf2 y su unión a ARE.
- Sulforafano (presente en el brócoli y las crucíferas): Altera la estructura de Keap1, liberando Nrf2.
- Epigallocatequina-3-galato (presente en el té verde): Potente activador de Nrf2 con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

EREA vs NO EREA y sistema Nrf2

Este es el primer trabajo en el que se estudian por separado los pacientes EREA y no EREA dentro de la poliposis nasosinusal, y en el que se observan diferencias significativas en cuanto al envejecimiento celular, que es más acusado en los pacientes EREA. Además, los hallazgos en la bibliografía concuerdan con que se trate de un fenotipo más agresivo clínicamente, por lo que tratamientos contra Nrf2 podrían implementarse en este subgrupo de pacientes de manera especial.

En la literatura se plantea como tratamiento específico para el grupo EREA la posibilidad de desensibilización a la aspirina. En su estudio, *Tyrak et al.* plantean la terapia en aquellos pacientes con asma grave, y los resultados muestran que el 82% de los participantes responden favorablemente al tratamiento. Los predictores de una buena

respuesta incluyeron: ser mujer, puntuaciones más altas en el SNOT-22, mayor recuento de eosinófilos en sangre, menor porcentaje de neutrófilos en esputo inducido, mayor expresión del gen HPGD y menor expresión del gen PRG2. Estos hallazgos sugieren que ciertos biomarcadores clínicos y genéticos pueden ser útiles para identificar a pacientes con EREA que podrían beneficiarse más del tratamiento con aspirina(213).

Otros investigadores sugieren modificaciones en la dieta. En su trabajo, *Schneider et al.*(214) exploran cómo la alteración de la ingesta de ácidos grasos omega-3 y omega-6 podría influir en la gravedad de la EREA. Los resultados mostraron mejoras significativas en la función pulmonar, con un aumento promedio del 4.3% en el FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo). Además, se observó una reducción en la puntuación total del SNOT-22, indicando una mejora en los síntomas. Estos hallazgos sugieren que modificar la dieta para aumentar la proporción de ácidos grasos omega-3 puede ser una estrategia beneficiosa para manejar los síntomas en pacientes con EREA, sobre todo en los pacientes con enfermedad no controlada.

Aunque los fármacos biológicos contra moléculas de la inflamación T2 muestran en la bibliografía unos resultados muy favorables con respecto a control de la enfermedad, algunos autores se preguntan sobre su coste, y evalúan concretamente en los pacientes con EREA, otras terapias tradicionales médicas y quirúrgicas como la cirugía endoscópica nasosinusal, y comentan que son necesarios estudios a largo plazo. Además, no debemos dejar de pensar que las terapias biológicas requieren un uso continuo para evitar recurrencias y actualmente tienen un costo mucho mayor que las terapias médicas o quirúrgicas existentes(215). De nuestros pacientes, aproximadamente el 50% con enfermedad no controlada de ambos grupos (tanto sin EREA como EREA) no eran candidatos a fármacos biológicos por no presentar inflamación T2, por lo que sería conveniente valorar en estos pacientes otro tipo de terapias.

Obacunona y omaveloxolona y RSCcPN

Si bien se han realizado estudios sobre modelos animales y fármacos antienviejecimiento, este es el primer trabajo que se realiza sobre obacunona y omaveloxolona en la RSCcPN en humanos. Nuestros hallazgos muestran que ambos

fármacos revierten la senescencia en esta patología, mostrando ambos resultados similares sin poder decantarnos por ninguno a este respecto. Además, no encontramos efectos adversos en la bibliografía, por lo que no existe por parte de este equipo ninguna preferencia entre ambos. Quizá obacunona necesite concentraciones más elevadas que las que encontramos de manera natural en la dieta para alcanzar efectos similares a la omaveloxolona, pero las dosis y la posología necesaria en humanos aún se debe estudiar.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La bleomicina es un claro inductor de senescencia celular en pacientes con PN, en especial con respecto al estrés oxidativo. La bleomicina aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno y estos suprimen la proliferación celular e inducen la apoptosis.
2. Existe un incremento de la IL-6 en los pacientes con RSCcPN, y está implicada en el daño directo de la barrera epitelial. Otras dianas moleculares podrían ser la histona H2XA, pues se ha visto implicada en la regulación del ciclo celular y sus niveles son mayores en los pacientes con la patología que nos ocupa. Obacunona y omaveloxolona revierten este incremento molecular, mejorando la regulación del ciclo celular y ayudando a restaurar la barrera epitelial.
3. Existe un aumento de p21, de p16 y de laminina B1 en RSCcPN frente a estímulos senescentes que traducen disregulación del ciclo celular, sobre todo en los pacientes EREA; y prueba la reversión a situaciones cercanas al control con los fármacos activadores de Nrf2.
4. Hay una disminución en la longitud de los telómeros en pacientes con PN, si bien creemos que la muestra es insuficiente para establecer diferencias entre el grupo sin EREA y con EREA.
5. Obacunona y omaveeloxolona revierten el envejecimiento celular por distintas vías en los pacientes con RSCcPN, y podrían ser estudiados como terapia en esta patología, en especial en el grupo EREA, que presenta una enfermedad más agresiva en cuanto a mecanismos moleculares implicados y de difícil control con las terapias actuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alobid I, Colás C, Castillo JA, Arismendi E, Del Cuvillo A, Gómez-Outes A, et al. Spanish Consensus on the Management of Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps (POLiposis NAsal/POLINA 2.0). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 16 de octubre de 2023;33(5):317-31.
2. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinol J*. 1 de febrero de 2020;0(0):1-464.
3. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA²LEN study. *Allergy*. septiembre de 2011;66(9):1216-23.
4. Jarvis D, Newson R, Lotvall J, Hastan D, Tomassen P, Keil T, et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy*. enero de 2012;67(1):91-8.
5. Grigoreas C, Vourdas D, Petalas K, Simeonidis G, Demeroutis I, Tsioulos T. Nasal polyps in patients with rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2002;23(3):169-74.
6. Staikūniene J, Vaitkus S, Japertiene LM, Ryskiene S. Association of chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma: clinical and radiological features, allergy and inflammation markers. *Med Kaunas Lith*. 2008;44(4):257-65.
7. Castillo J, Picado C, Plaza V, Rodrigo G, Julia B, Mullol J. Aspirin Sensitivity as a Clinical Marker for Severe Asthma and United Airway Disease. *Chest*. 1 de marzo de 2014;145:17A.
8. Hirsch AG, Stewart WF, Sundaresan AS, Young AJ, Kennedy TL, Scott Greene J, et al. Nasal and sinus symptoms and chronic rhinosinusitis in a population-based sample. *Allergy*. febrero de 2017;72(2):274-81.
9. Leung RM, Kern RC, Conley DB, Tan BK, Chandra RK. Osteomeatal complex obstruction is not associated with adjacent sinus disease in chronic rhinosinusitis with polyps. *Am J Rhinol Allergy*. 2011;25(6):401-3.
10. Sella GCP, Tamashiro E, Anselmo-Lima WT, Valera FCP. Relation between chronic rhinosinusitis and gastroesophageal reflux in adults: systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2017;83(3):356-63.
11. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH, Smith TL, Alt JA, Baroody FM, et al. International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. febrero de 2016;6 Suppl 1:S22-209.
12. Clarhed UKE, Svendsen M, Schiöler L, Kongerud J, Torén K, Hellgren J, et al. Chronic Rhinosinusitis Related to Occupational Exposure: The Telemark Population Study. *J Occup Environ Med*. julio de 2018;60(7):656-60.
13. White AA, Stevenson DD. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *N Engl J Med*. 13 de septiembre de 2018;379(11):1060-70.

14. Tomassen P, Vandeplas G, Van Zele T, Cardell LO, Arebro J, Olze H, et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*. mayo de 2016;137(5):1449-1456.e4.
15. Bachert C, Akdis CA. Phenotypes and Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(4):621-8.
16. Gan W, Yang F, Tang Y, Zhou D, Qing D, Hu J, et al. The difference in nasal bacterial microbiome diversity between chronic rhinosinusitis patients with polyps and a control population. *Int Forum Allergy Rhinol*. junio de 2019;9(6):582-92.
17. Delemarre T, Holtappels G, De Ruyck N, Zhang N, Nauwynck H, Bachert C, et al. Type 2 inflammation in chronic rhinosinusitis without nasal polyps: Another relevant endotype. *J Allergy Clin Immunol*. agosto de 2020;146(2):337-343.e6.
18. Lan F, Zhang N, Holtappels G, De Ruyck N, Krysko O, Van Crombruggen K, et al. *Staphylococcus aureus* Induces a Mucosal Type 2 Immune Response via Epithelial Cell-derived Cytokines. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de agosto de 2018;198(4):452-63.
19. Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, et al. Rhinosinusitis: developing guidance for clinical trials. *J Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2006;118(5 Suppl):S17-61.
20. 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. *The Laryngoscope*. octubre de 2014;124(10):2216-23.
21. Durr ML, Pletcher SD, Goldberg AN, Murr AH. A novel sinonasal endoscopy scoring system: the discharge, inflammation, and polyps/edema (DIP) score. *Int Forum Allergy Rhinol*. enero de 2013;3(1):66-72.
22. Lund VJ, Kennedy DW. Staging for rhinosinusitis. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. septiembre de 1997;117(3 Pt 2):S35-40.
23. Sudiro M, Kuntara A, Walid D. Correlation of Lund-Mackay Score on Computed Tomography Scan and Nasoendoscopic Score in Chronic Rhinosinusitis. *Acta Inform Medica*. marzo de 2023;31(1):53-6.
24. Shen KC, Lin YT, Lin CF, Chang CH, Yeh TH. Allergy accelerates the disease progression of chronic rhinosinusitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. enero de 2019;139(1):75-9.
25. Ta NH, Gao J, Philpott C. A systematic review to examine the relationship between objective and patient-reported outcome measures in sinonasal disorders: recommendations for use in research and clinical practice. *Int Forum Allergy Rhinol*. mayo de 2021;11(5):910-23.
26. Valdés P. C, Muñoz M. T, Barría E. T, Bogado B. M, Ruz M. P, Cardemil M. F, et al. Validación de encuesta de calidad de vida "SNOT-22" en población chilena. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello*. diciembre de 2020;80(4):425-33.
27. Litvack JR, Mace JC, Smith TL. Olfactory function and disease severity in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(2):139-44.

28. Drake VE, Rafaels N, Kim J. Peripheral blood eosinophilia correlates with hyperplastic nasal polyp growth. *Int Forum Allergy Rhinol.* septiembre de 2016;6(9):926-34.
29. McHugh T, Snidvongs K, Xie M, Banglawala S, Sommer D. High tissue eosinophilia as a marker to predict recurrence for eosinophilic chronic rhinosinusitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Forum Allergy Rhinol.* diciembre de 2018;8(12):1421-9.
30. Soler ZM, Wittenberg E, Schlosser RJ, Mace JC, Smith TL. Health state utility values in patients undergoing endoscopic sinus surgery. *The Laryngoscope.* diciembre de 2011;121(12):2672-8.
31. Fokkens W, Van Der Lans R, Reitsma S. Dupilumab for the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Expert Opin Biol Ther.* mayo de 2021;21(5):575-85.
32. Wahid NW, Smith R, Clark A, Salam M, Philpott CM. The socioeconomic cost of chronic rhinosinusitis study. *Rhinology.* 1 de abril de 2020;58(2):112-25.
33. Rudmik L, Hopkins C, Peters A, Smith TL, Schlosser RJ, Soler ZM. Patient-reported outcome measures for adult chronic rhinosinusitis: A systematic review and quality assessment. *J Allergy Clin Immunol.* diciembre de 2015;136(6):1532-1540.e2.
34. Hopkins C, Hettige R, Soni-Jaiswal A, Lakhani R, Carrie S, Cervin A, et al. CHronic Rhinosinusitis Outcome MEasures (CHROME), developing a core outcome set for trials of interventions in chronic rhinosinusitis. *Rhinology.* 1 de marzo de 2018;56(1):22-32.
35. Castillo Vizuite JA, Sastre J, Del Cuviello Bernal A, Picado C, Martínez Moragón E, Ignacio García JM, et al. Asthma, rhinitis, and nasal polyp multimorbidities. *Arch Bronconeumol.* marzo de 2019;55(3):146-55.
36. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primer.* 10 de septiembre de 2015;1(1):15025.
37. Castillo JA, Plaza V, Rodrigo G, Juliá B, Picado C, Mullol J. Nasal polyps, aspirin sensitivity, and late onset asthma are crucial to identify severe asthma. *clinicaltrials.gov id : nct01513837.* *Clin Transl Allergy.* 23 de marzo de 2015;5(Suppl 2):O3.
38. Castillo Vizuite JA, Armengot-Carceller M, Delgado Romero J, Gil Melcón M, Colás Sanz C, Plasencia García I, et al. Checklist for the Multidisciplinary Approach to United Airway in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (CRSwNP) and asthma. *Open Respir Arch.* 16 de mayo de 2022;4(3):100180.
39. Rudmik L, Smith TL. Quality of life in patients with chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* junio de 2011;11(3):247-52.
40. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, Hellings PW, Amin N, Lee SE, 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. *Lancet Lond Engl.* 2 de noviembre de 2019;394(10209):1638-50.
41. van der Veen J, Seys SF, Timmermans M, Levie P, Jorissen M, Fokkens WJ, et al. Real-life study showing uncontrolled rhinosinusitis after sinus surgery in a tertiary referral centre. *Allergy.* febrero de 2017;72(2):282-90.

42. Polzehl D, Moeller P, Riechelmann H, Perner S. Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy*. noviembre de 2006;61(11):1275-9.
43. 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*. 1 de febrero de 2019;57(1):43-8.
44. Sommer DD, Rotenberg BW, Sowerby LJ, Lee JM, Janjua A, Witterick IJ, et al. A novel treatment adjunct for aspirin exacerbated respiratory disease: the low-salicylate diet: a multicenter randomized control crossover trial. *Int Forum Allergy Rhinol*. abril de 2016;6(4):385-91.
45. Leung RM, Dinnie K, Smith TL. When do the risks of repeated courses of corticosteroids exceed the risks of surgery? *Int Forum Allergy Rhinol*. noviembre de 2014;4(11):871-6.
46. Guntern P, Eggel A. Past, present, and future of anti-IgE biologics. *Allergy*. octubre de 2020;75(10):2491-502.
47. Han JK, Bachert C, Fokkens W, Desrosiers M, Wagenmann M, Lee SE, et al. Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (SYNAPSE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. octubre de 2021;9(10):1141-53.
48. Tversky J, Lane AP, Azar A. Benralizumab effect on severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP): A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. junio de 2021;51(6):836-44.
49. Tiotiu A, Oster JP, Roux PR, Nguyen Thi PL, Peiffer G, Bonniaud P, et al. Effectiveness of Omalizumab in Severe Allergic Asthma and Nasal Polyposis: A Real-Life Study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020;30(1):49-57.
50. Detoraki A, Tremante E, D'Amato M, Calabrese C, Casella C, Maniscalco M, et al. Mepolizumab improves sino-nasal symptoms and asthma control in severe eosinophilic asthma patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps: a 12-month real-life study. *Ther Adv Respir Dis*. 28 de abril de 2021;15:17534666211009398.
51. Bagnasco D, Brussino L, Bonavia M, Calzolari E, Caminati M, Caruso C, et al. Efficacy of Benralizumab in severe asthma in real life and focus on nasal polyposis. *Respir Med*. septiembre de 2020;171:106080.
52. Nowshien S, Darveaux JI. Dupilumab in the treatment of nasal polyposis: A retrospective, real-world study. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. septiembre de 2021;127(3):386-7.
53. Hall JE, Hall JE, Guyton AC. Guyton and Hall textbook of medical physiology: Student consult. Activate at studentconsult.com. Searchable full text online. 12. ed. Philadelphia, Pa: Saunders, Elsevier; 2011. 1091 p.
54. Fehervari Z, Kiyono H. The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends Immunol*. noviembre de 2008;29(11):503-4.
55. Hens G, Hellings PW. The nose: gatekeeper and trigger of bronchial disease. *Rhinology*. septiembre de 2006;44(3):179-87.

56. ES Elsevier Health [Internet]. [citado 9 de julio de 2024]. Tratado de otorrinolaringología y patología cervicofacial - 9788445822616. Disponible en: <https://tienda.elsevier.es/tratado-de-otorrinolaringologia-y-patologia-cervicofacial-9788445822616.html>
57. Otorrinolaringología - Presentación - EM consulte [Internet]. [citado 9 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.em-consulte.com/es/traite/ORE/presentation/otorrinolaringologia>
58. Berne RM, Levy MN, Koeppe BM, Stanton BA, editores. Berne & Levy physiology. 6th ed. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier; 2008. 834 p.
59. Advancing Heart, Lung, Blood, and Sleep Research & Innovation | NHLBI, NIH [Internet]. 2025 [citado 10 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nhlbi.nih.gov/>
60. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 25 de junio de 2010;141(7):1117-34.
61. Pohl C, Hermanns MI, Uboldi C, Bock M, Fuchs S, Dei-Anang J, et al. Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. junio de 2009;72(2):339-49.
62. Parker D, Prince A. Innate Immunity in the Respiratory Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. agosto de 2011;45(2):189-201.
63. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*. marzo de 2002;109(5):571-7.
64. Mfuna-Endam L, Zhang Y, Desrosiers MY. Genetics of rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. junio de 2011;11(3):236-46.
65. Yu XM, Li CW, Li YY, Liu J, Lin ZB, Li TY, et al. Down-regulation of EMP1 is associated with epithelial hyperplasia and metaplasia in nasal polyps. *Histopathology*. noviembre de 2013;63(5):686-95.
66. Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4. *J Allergy Clin Immunol*. noviembre de 2012;130(5):1087-1096.e10.
67. Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of Airway Tight Junctions by Proinflammatory Cytokines. *Mol Biol Cell*. septiembre de 2002;13(9):3218-34.
68. Toppila-Salmi S, van Drunen CM, Fokkens WJ, Golebski K, Mattila P, Joenvaara S, et al. Molecular Mechanisms of Nasal Epithelium in Rhinitis and Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(2):495.
69. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest*. 15 de marzo de 2002;109(6):693-7.

70. Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* julio de 2009;124(1):37-42.
71. Seshadri S, Lin DC, Rosati M, Carter RG, Norton JE, Suh L, et al. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy.* julio de 2012;67(7):920-8.
72. Wei Y, Xia W, Ye X, Fan Y, Shi J, Wen W, et al. The antimicrobial protein short palate, lung, and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1) is differentially modulated in eosinophilic and noneosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* febrero de 2014;133(2):420-8.
73. Hupin C, Rombaux P, Bowen H, Gould H, Lecocq M, Pilette C. Downregulation of polymeric immunoglobulin receptor and secretory IgA antibodies in eosinophilic upper airway diseases. *Allergy.* diciembre de 2013;68(12):1589-97.
74. Choksi SP, Babu D, Lau D, Yu X, Roy S. Systematic discovery of novel ciliary genes through functional genomics in the zebrafish. *Dev Camb Engl.* septiembre de 2014;141(17):3410-9.
75. Lee RJ, Xiong G, Kofonow JM, Chen B, Lysenko A, Jiang P, et al. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest.* noviembre de 2012;122(11):4145-59.
76. Li YY, Li CW, Chao SS, Yu FG, Yu XM, Liu J, et al. Impairment of cilia architecture and ciliogenesis in hyperplastic nasal epithelium from nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* diciembre de 2014;134(6):1282-92.
77. Xie L, Liu AG, Cui YH, Zhang YP, Liao B, Li NN, et al. Expression profiles of prostaglandin E2 receptor subtypes in aspirin tolerant adult Chinese with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2015;29(5):322-8.
78. Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science.* 24 de agosto de 2012;337(6097):937-41.
79. McKiernan PJ, Molloy K, Cryan SA, McElvaney NG, Greene CM. Long noncoding RNA are aberrantly expressed in vivo in the cystic fibrosis bronchial epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* julio de 2014;52:184-91.
80. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med.* 4 de mayo de 2012;18(5):684-92.
81. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res.* 2007;40(2):97-112.
82. Greene CM, McElvaney NG. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005;53(5):418-27.
83. Tengroth L, Arebro J, Kumlien Georén S, Winqvist O, Cardell LO. Deprived TLR9 expression in apparently healthy nasal mucosa might trigger polyp-growth in chronic rhinosinusitis patients. *PloS One.* 2014;9(8):e105618.

84. Varelle M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The Airway Epithelium: Soldier in the Fight against Respiratory Viruses. *Clin Microbiol Rev.* enero de 2011;24(1):210-29.
85. Rich R. Clinical immunology. *Clinical immunology.* 2013.
86. Hupin C, Gohy S, Bouzin C, Lecocq M, Polette M, Pilette C. Features of mesenchymal transition in the airway epithelium from chronic rhinosinusitis. *Allergy.* noviembre de 2014;69(11):1540-9.
87. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* diciembre de 1961;25:585-621.
88. Noren Hooten N, Evans MK. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J Vis Exp JoVE.* 1 de mayo de 2017;(123):55533.
89. Contrepois K, Coudereau C, Benayoun BA, Schuler N, Roux PF, Bischof O, et al. Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat Commun.* 10 de mayo de 2017;8:14995.
90. Wei W, Ji S. Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *J Cell Physiol.* diciembre de 2018;233(12):9121-35.
91. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* julio de 2014;15(7):482-96.
92. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4350965.
93. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* junio de 2018;28(6):436-53.
94. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer.* julio de 2015;15(7):397-408.
95. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell.* 2015;14(4):644-58.
96. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* noviembre de 2014;15(11):1139-53.
97. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, et al. Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence. *PLOS Biol.* 1 de mayo de 2007;5(5):e110.
98. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal.* abril de 2012;24(4):835-45.
99. Härtlova A, Erttmann SF, Raffi FA, Schmalz AM, Resch U, Anugula S, et al. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity.* 17 de febrero de 2015;42(2):332-43.

100. Yang H, Wang H, Ren J, Chen Q, Chen ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci*. 6 de junio de 2017;114(23):E4612-20.
101. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*. enero de 2021;288(1):56-80.
102. Acosta JC, O’Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*. 13 de junio de 2008;133(6):1006-18.
103. Adams PD. Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Mol Cell*. 9 de octubre de 2009;36(1):2-14.
104. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 28 de febrero de 2010;5(Volume 5, 2010):99-118.
105. Özeş AR, Miller DF, Özeş ON, Fang F, Liu Y, Matei D, et al. NF-κB-HOTAIR axis links DNA damage response, chemoresistance and cellular senescence in ovarian cancer. *Oncogene*. 13 de octubre de 2016;35(41):5350-61.
106. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*. 25 de septiembre de 2015;349(6255):aaa5612.
107. Yosef R, Pilpel N, Papisov N, Gal H, Ovadya Y, Vadai E, et al. p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J*. 1 de agosto de 2017;36(15):2280-95.
108. Tu Z, Zhuang X, Yao YG, Zhang R. BRG1 is required for formation of senescence-associated heterochromatin foci induced by oncogenic RAS or BRCA1 loss. *Mol Cell Biol*. mayo de 2013;33(9):1819-29.
109. Donninger H, Barnoud T, Clark GJ. NORE1A is a double barreled Ras senescence effector that activates p53 and Rb. *Cell Cycle Georget Tex*. septiembre de 2016;15(17):2263-4.
110. Raz V, Vermolen BJ, Garini Y, Onderwater JJM, Mommaas-Kienhuis MA, Koster AJ, et al. The nuclear lamina promotes telomere aggregation and centromere peripheral localization during senescence of human mesenchymal stem cells. *J Cell Sci*. 15 de diciembre de 2008;121(Pt 24):4018-28.
111. Lukášová E, Kovářík A, Bacíková A, Falk M, Kozubek S. Loss of lamin B receptor is necessary to induce cellular senescence. *Biochem J*. 15 de enero de 2017;474(2):281-300.
112. Hutchison CJ. B-type lamins and their elusive roles in metazoan cell proliferation and senescence. *EMBO J*. 7 de marzo de 2012;31(5):1058-9.
113. Ahmad T, Sundar IK, Lerner CA, Gerloff J, Tormos AM, Yao H, et al. Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. julio de 2015;29(7):2912-29.

114. Xiong S, Salazar G, Patrushev N, Ma M, Forouzandeh F, Hilenski L, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 α Is a Central Negative Regulator of Vascular Senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mayo de 2013;33(5):988-98.
115. Lin JR, Shen WL, Yan C, Gao PJ. Downregulation of dynamin-related protein 1 contributes to impaired autophagic flux and angiogenic function in senescent endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* junio de 2015;35(6):1413-22.
116. Volonte D, Zou H, Bartholomew JN, Liu Z, Morel PA, Galbiati F. Oxidative stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6). *J Biol Chem.* 13 de febrero de 2015;290(7):4202-14.
117. Kim HJ, Cho JH, Quan H, Kim JR. Down-regulation of Aurora B kinase induces cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells through a p53-dependent pathway. *FEBS Lett.* 16 de noviembre de 2011;585(22):3569-76.
118. Tran D, Bergholz J, Zhang H, He H, Wang Y, Zhang Y, et al. Insulin-like growth factor-1 regulates the SIRT1-p53 pathway in cellular senescence. *Aging Cell.* agosto de 2014;13(4):669-78.
119. Kim YY, Jee HJ, Um JH, Kim YM, Bae SS, Yun J. Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence. *Aging Cell.* octubre de 2017;16(5):1094-103.
120. Lanna A, Henson SM, Escors D, Akbar AN. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat Immunol.* octubre de 2014;15(10):965-72.
121. Wang R, Yu Z, Sunchu B, Shoaf J, Dang I, Zhao S, et al. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell.* junio de 2017;16(3):564-74.
122. Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol.* agosto de 2015;17(8):1049-61.
123. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* enero de 2016;22(1):78-83.
124. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell.* 23 de marzo de 2017;169(1):132-147.e16.
125. Song J, Lee B, Kang S, Oh Y, Kim E, Kim CH, et al. Agmatine Ameliorates High Glucose-Induced Neuronal Cell Senescence by Regulating the p21 and p53 Signaling. *Exp Neurobiol.* febrero de 2016;25(1):24-32.
126. Pasillas MP, Shields S, Reilly R, Strnadel J, Behl C, Park R, et al. Proteomic analysis reveals a role for Bcl2-associated athanogene 3 and major vault protein in resistance to apoptosis in senescent cells by regulating ERK1/2 activation. *Mol Cell Proteomics MCP.* enero de 2015;14(1):1-14.

127. Kochetkova EY, Blinova GI, Bystrova OA, Martynova MG, Pospelov VA, Pospelova TV. Targeted elimination of senescent Ras-transformed cells by suppression of MEK/ERK pathway. *Aging*. 14 de noviembre de 2017;9(11):2352-75.
128. Weiland T, Lampe J, Essmann F, Venturelli S, Berger A, Bossow S, et al. Enhanced killing of therapy-induced senescent tumor cells by oncolytic measles vaccine viruses. *Int J Cancer*. 1 de enero de 2014;134(1):235-43.
129. Siurala M, Bramante S, Vassilev L, Hirvonen M, Parviainen S, Tähtinen S, et al. Oncolytic adenovirus and doxorubicin-based chemotherapy results in synergistic antitumor activity against soft-tissue sarcoma. *Int J Cancer*. 15 de febrero de 2015;136(4):945-54.
130. Schafer MJ, White TA, Evans G, Tonne JM, Verzosa GC, Stout MB, et al. Exercise Prevents Diet-Induced Cellular Senescence in Adipose Tissue. *Diabetes*. junio de 2016;65(6):1606-15.
131. Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*. marzo de 2013;20(3):259-66.
132. Alaskhar Alhamwe B, Khalaila R, Wolf J, von Bülow V, Harb H, Alhamdan F, et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol*. 2018;14:39.
133. Allam R, Kumar SVR, Darisipudi MN, Anders HJ. Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *J Mol Med Berl Ger*. mayo de 2014;92(5):465-72.
134. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 19 de julio de 2012;12(1):109-16.
135. Chen D, Chen L, Xiao L. [The progress study of tumor suppressor gene and apoptosis gene in nasal polyps]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. diciembre de 2015;29(23):2099-102.
136. Zhao Y, Zhang N, Perez Novo C, Wang Y, Zhang L. Decreased histone expression in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Asia Pac Allergy*. junio de 2024;14(2):70-6.
137. Cho JS, Moon YM, Park IH, Um JY, Kang JH, Kim TH, et al. Effects of histone deacetylase inhibitor on extracellular matrix production in human nasal polyp organ cultures. *Am J Rhinol Allergy*. enero de 2013;27(1):18-23.
138. Yu L, Li N, Zhang J, Jiang Y. IL-13 regulates human nasal epithelial cell differentiation via H3K4me3 modification. *J Inflamm Res*. 9 de enero de 2017;10:181-8.
139. Li J, Qiu CY, Tao YJ, Cheng L. Epigenetic modifications in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Front Genet*. 9 de enero de 2023;13:1089647.
140. Liu CC, Sun C, Zheng X, Zhao MQ, Kong F, Xu FL, et al. Regulation of KDM2B and Brg1 on Inflammatory Response of Nasal Mucosa in CRSwNP. *CORC [Internet]*. 2019 [citado 19 de julio de 2024];42(4). Disponible en: <http://www.corc.org.cn/handle/1471x/4547968>
141. Griffith B, Pendyala S, Hecker L, Lee PJ, Natarajan V, Thannickal VJ. NOX enzymes and pulmonary disease. *Antioxid Redox Signal*. octubre de 2009;11(10):2505-16.

142. Fordham MT, Mulligan JK, Casey SE, Mulligan RM, Wang EW, Sansoni ER, et al. Reactive oxygen species in chronic rhinosinusitis and secondhand smoke exposure. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg.* octubre de 2013;149(4):633-8.
143. Wu F, Tian P, Ma Y, Wang J, Ou H, Zou H. Reactive Oxygen Species Are Necessary for Bleomycin A5-Induced Apoptosis and Extracellular Matrix Elimination of Nasal Polyp-Derived Fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* febrero de 2019;128(2):135-44.
144. Ge Y, Tsukatani T, Nishimura T, Furukawa M, Miwa T. Cell death of olfactory receptor neurons in a rat with nasosinusitis infected artificially with *Staphylococcus*. *Chem Senses.* julio de 2002;27(6):521-7.
145. Tesfaigzi J, Hotchkiss JA, Harkema JR. Expression of the Bcl-2 protein in nasal epithelia of F344/N rats during mucous cell metaplasia and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* junio de 1998;18(6):794-9.
146. Morawska-Kochman M, Śmieszek A, Marcinkowska K, Marycz KM, Nelke K, Zub K, et al. Expression of Apoptosis-Related Biomarkers in Inflamed Nasal Sinus Epithelium of Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (CRSwNP)—Evaluation at mRNA and miRNA Levels. *Biomedicines.* 13 de junio de 2022;10(6):1400.
147. Küpper DS, Valera FCP, Malinsky R, Milanezi CM, Silva JS, Tamashiro E, et al. Expression of apoptosis mediators p53 and caspase 3, 7, and 9 in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Am J Rhinol Allergy.* 2014;28(3):187-91.
148. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J.* 1 de marzo de 1999;18(5):1223-34.
149. Liu S, Liu M, Dong L. The clinical value of lncRNA MALAT1 and its targets miR-125b, miR-133, miR-146a, and miR-203 for predicting disease progression in chronic obstructive pulmonary disease patients. *J Clin Lab Anal.* 25 de junio de 2020;34(9):e23410.
150. Kou W, Sun R, Wei P, Yao HB, Zhang C, Tang XY, et al. Andrographolide suppresses IL-6/Stat3 signaling in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Inflammation.* octubre de 2014;37(5):1738-43.
151. Lai Y, Hu L, Yang L, Hu X, Song X, Yang J, et al. Interaction Between Serum/Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 and Interleukin-6 in Chronic Rhinosinusitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 18 de mayo de 2021;13(5):776-90.
152. Kato A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol.* abril de 2015;64(2):121-30.
153. Mfuna Endam L, Cormier C, Bossé Y, Filali-Mouhim A, Desrosiers M. Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* febrero de 2010;136(2):187-92.
154. Erbek SS, Yurtcu E, Erbek S, Atac FB, Sahin FI, Cakmak O. Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* julio de 2007;133(7):705-9.

155. Mohamad S, Hamid SSA, Azlina A, Md Shukri N. Association of IL-1 gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyp. *Asia Pac Allergy*. 8 de julio de 2019;9(3):e22.
156. Raghavan A, Zhou G, Zhou Q, Ibe JCF, Ramchandran R, Yang Q, et al. Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation Is Controlled by Forkhead Box M1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. abril de 2012;46(4):431-6.
157. Zhao L, Li YY, Li CW, Chao SS, Liu J, Nam HN, et al. Increase of poorly proliferated p63+/Ki67+ basal cells forming multiple layers in the aberrant remodeled epithelium in nasal polyps. *Allergy*. junio de 2017;72(6):975-84.
158. Razi Soofiyani S, Kazemi T, Lotfipour F, Mohammad Hosseini A, Shanehbandi D, Hallaj-Nezhadi S, et al. Gene therapy with IL-12 induced enhanced anti-tumor activity in fibrosarcoma mouse model. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. diciembre de 2016;44(8):1988-93.
159. Deng H, Sun Y, Wang W, Li M, Yuan T, Kong W, et al. The hippo pathway effector Yes-associated protein promotes epithelial proliferation and remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy*. abril de 2019;74(4):731-42.
160. Viksne RJ, Sumeraga G, Pilmane M. Characterization of Cytokines and Proliferation Marker Ki67 in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: A Pilot Study. *Medicina (Mex)*. 11 de junio de 2021;57(6):607.
161. Okada N, Nakayama T, Asaka D, Inoue N, Tsurumoto T, Takaishi S, et al. Distinct gene expression profiles and regulation networks of nasal polyps in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. mayo de 2018;8(5):592-604.
162. Carroll WW, O'Connell BP, Schlosser RJ, Gudis DA, Karnezis TT, Lawrence LA, et al. Fibroblast levels are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps and are associated with worse subjective disease severity. *Int Forum Allergy Rhinol*. febrero de 2016;6(2):162-8.
163. Tharakan A, Halderman AA, Lane AP, Biswal S, Ramanathan M. Reversal of Cigarette Smoke Extract Induced Sinonasal Epithelial Cell Barrier Dysfunction Through Nrf2 Activation. *Int Forum Allergy Rhinol*. noviembre de 2016;6(11):1145-50.
164. Loboda A, Rojczyk-Golebiewska E, Bednarczyk-Cwynar B, Lucjusz Z, Jozkowicz A, Dulak J. Targeting nrf2-mediated gene transcription by triterpenoids and their derivatives. *Biomol Ther*. noviembre de 2012;20(6):499-505.
165. Ramanathan M, Tharakan A, Sidhaye VK, Lane AP, Biswal S, London NR. Disruption of Sinonasal Epithelial Nrf2 Enhances Susceptibility to Rhinosinusitis in a Mouse Model. *The Laryngoscope*. abril de 2021;131(4):713-9.
166. London NR, Tharakan A, Mendiola M, Sussan TE, Chen M, Dobzanski A, et al. Deletion of Nrf2 enhances susceptibility to eosinophilic sinonasal inflammation in a murine model of rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. enero de 2019;9(1):114-9.
167. Zhou J, Zhou J, Liu R, Liu Y, Meng J, Wen Q, et al. The oxidant-antioxidant imbalance was involved in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Front Immunol*. 2 de mayo de 2024;15:1380846.

168. Jiang Z, Qi G, Lu W, Wang H, Li D, Chen W, et al. Omaveloxolone inhibits IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis through the Nrf2/ARE and NF- κ B signalling pathways in vitro and attenuates osteoarthritis in vivo. *Front Pharmacol.* 2022;13:952950.
169. Kim J, Jayaprakasha GK, Patil BS. Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity in vitro by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Biochimie.* octubre de 2014;105:36-44.
170. Li N, Peters AT. Chronic rhinosinusitis management beyond intranasal steroids and saline solution irrigations. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(5):339-43.
171. Oykman 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.* abril de 2022;149(4):1286-95.
172. Montero P, Milara J, Pérez-Leal M, Estornut C, Roger I, Pérez-Fidalgo A, et al. Paclitaxel-Induced Epidermal Alterations: An In Vitro Preclinical Assessment in Primary Keratinocytes and in a 3D Epidermis Model. *Int J Mol Sci.* 20 de enero de 2022;23(3):1142.
173. Kim HS, Cho JH, Park HW, Yoon H, Kim MS, Kim SC. Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de marzo de 2002;168(5):2356-64.
174. Asher BF, Guilford FT. Oxidative Stress and Low Glutathione in Common Ear, Nose, and Throat Conditions: A Systematic Review. *Altern Ther Health Med.* septiembre de 2016;22(5):44-50.
175. Zhang X, Zou J, Sun B, Liang J, Zhao L, Li B. [Study on the treatment of nasal polyposis with bleomycin A5 local injection]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* enero de 2006;20(2):51-3.
176. Atwa K, Abuhasna S, Shihab Z, Hashaykeh N, Hasan R. Acute pulmonary toxicity following intralesional administration of bleomycin for a lymphovenous malformation. *Pediatr Pulmonol.* febrero de 2010;45(2):192-6.
177. Manca G, Pandolfi P, Gregorelli C, Cadossi M, de Terlizzi F. Treatment of keloids and hypertrophic scars with bleomycin and electroporation. *Plast Reconstr Surg.* octubre de 2013;132(4):621e-30e.
178. Zhang X, Zou J, Li B, Ren X, Shi J. [Eosinophil apoptosis in nasal polyposis tissue after bleomycin A5 local injection]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* mayo de 2004;18(5):279-81.
179. Yu JY, Lee SY, Son YO, Shi X, Park SS, Lee JC. Continuous presence of H₂O₂ induces mitochondrial-mediated, MAPK- and caspase-independent growth inhibition and cytotoxicity in human gingival fibroblasts. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* junio de 2012;26(4):561-70.
180. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* mayo de 2012;24(5):981-90.

181. Kolenchukova OA, Smirnova SV, Lazareva AM. [FEATURES OF MICROBIOCENOSIS OF NOSE MUCOUS MEMBRANE DURING ATOPIC AND POLYPOUS RHINOSINUSITIS]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. enero de 2017;(1):67-73.
182. Chalastras T, Athanassiadou P, Patsouris E, Eleftheriadou A, Kandiloros D, Papaxoinis K, et al. Differential rates of proliferation and apoptosis in nasal polyps correspond to alterations in DNA spatial distribution and nuclear polarization as observed by confocal microscopy. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg. julio de 2010;267(7):1075-80.
183. Garavello W, Viganò P, Romagnoli M, Sordo L, Berti E, Tredici G, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins and analysis of apoptosis in normal nasal mucosa and in nasal polyps. Am J Rhinol. 2005;19(6):549-53.
184. Cha S, Seo EH, Lee SH, Kim KS, Oh CS, Moon JS, et al. MicroRNA Expression in Extracellular Vesicles from Nasal Lavage Fluid in Chronic Rhinosinusitis. Biomedicines. 26 de abril de 2021;9(5):471.
185. Frazzi R. BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. Cell Biosci. 7 de enero de 2021;11(1):8.
186. Cho SH, Lee SH, Kim KR, Lee HM, Lee SH, Kim TH. Expression and distributional patterns of the inhibitor of apoptosis protein family and caspase 3 in nasal polyps. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. marzo de 2008;134(3):316-21.
187. Zhao L, Zhang L, Zhu W, Chen H, Ding Y, Cui G. Inhibition of microRNA-203 protects against traumatic brain injury induced neural damages via suppressing neuronal apoptosis and dementia-related molecules. Physiol Behav. 1 de enero de 2021;228:113190.
188. Liu M, Luo P, Liu L, Wei X, Bai X, Li J, et al. Immune-mediated inflammatory diseases and leukocyte telomere length: A Mendelian randomization study. Front Genet. 2023;14:1129247.
189. Lee EY, Oh SS, White MJ, Eng CS, Elhawary JR, Borrell LN, et al. Ambient air pollution, asthma drug response, and telomere length in African American youth. J Allergy Clin Immunol. septiembre de 2019;144(3):839-845.e10.
190. Tannemann N, Erbel R, Nöthen MM, Jöckel KH, Pechlivanis S. Genetic polymorphisms affecting telomere length and their association with cardiovascular disease in the Heinz-Nixdorf-Recall study. PloS One. 2024;19(5):e0303357.
191. Wen W, Zhu S, Ma R, Wang L, Shen X, Li Y, et al. Correlation analysis of TGF- β 1, MMP-9, TIMP-1, IL-1, IL-4, IL-6, IL-17, and TNF- α in refractory chronic rhinosinusitis: A retrospective study. Allergol Immunopathol (Madr). 2022;50(4):137-42.
192. Gandhi NA, Pirozzi G, Graham NMH. Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic diseases. Expert Rev Clin Immunol. mayo de 2017;13(5):425-37.
193. Viksne RJ, Sumeraga G, Pilmane M. Characterization of Cytokines and Proliferation Marker Ki-67 in Chronic Rhinosinusitis with Recurring Nasal Polyps. Adv Respir Med. 14 de octubre de 2022;90(5):451-66.

194. Li H, Wang Y, Wang J. Th17/Treg cells regulated by interleukin 6 in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* julio de 2022;279(7):3493-501.
195. Green BJ, Beezhold DH, Gallinger Z, Barron CS, Melvin R, Bledsoe TA, et al. Allergic sensitization in Canadian chronic rhinosinusitis patients. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 25 de marzo de 2014;10(1):15.
196. Navarro AM, Delgado J, Muñoz-Cano RM, Dordal MT, Valero A, Quirce S. Allergic respiratory disease (ARD), setting forth the basics: proposals of an expert consensus report. *Clin Transl Allergy.* 18 de mayo de 2017;7:16.
197. Van Nguyen T, Piao CH, Fan YJ, Shin DU, Kim SY, Song HJ, et al. Anti-allergic rhinitis activity of α -lipoic acid via balancing Th17/Treg expression and enhancing Nrf2/HO-1 pathway signaling. *Sci Rep.* 27 de julio de 2020;10(1):12528.
198. Piao CH, Fan YJ, Nguyen TV, Song CH, Chai OH. Mangiferin Alleviates Ovalbumin-Induced Allergic Rhinitis via Nrf2/HO-1/NF- κ B Signaling Pathways. *Int J Mol Sci.* 12 de mayo de 2020;21(10):3415.
199. Sun N, Huang Y, Zhang X, Niu Y, Duan Y, Kan H, et al. Involvements of Nrf2 and oxidative stress in the ozone-elicited exacerbation in an allergic rhinitis model. *Ecotoxicol Environ Saf.* 15 de abril de 2023;255:114822.
200. Han M, Lee D, Lee SH, Kim TH. Oxidative Stress and Antioxidant Pathway in Allergic Rhinitis. *Antioxidants.* 9 de agosto de 2021;10(8):1266.
201. Kohanski MA, Tharakan A, London NR, Lane AP, Ramanathan M. Bactericidal antibiotics promote oxidative damage and programmed cell death in sinonasal epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol.* abril de 2017;7(4):359-64.
202. Dayalan Naidu S, Dinkova-Kostova AT. Omaveloxolone (SkyclarysTM) for patients with Friedreich's ataxia. *Trends Pharmacol Sci.* junio de 2023;44(6):394-5.
203. Wang R, Wang Y, Liu H, Zhu J, Fang C, Xu W, et al. Platycodon D protects human nasal epithelial cells from pyroptosis through the Nrf2/HO-1/ROS signaling cascade in chronic rhinosinusitis. *Chin Med.* 4 de marzo de 2024;19(1):40.
204. Luo X, Yu Z, Yue B, Ren J, Zhang J, Mani S, et al. Obacunone reduces inflammatory signalling and tumour occurrence in mice with chronic inflammation-induced colorectal cancer. *Pharm Biol.* diciembre de 2020;58(1):886-97.
205. Nan F, Tian Q, Chen S. Obacunone Alleviates Inflammatory Pain by Promoting M2 Microglial Polarization and by Activating Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Drug Des Devel Ther.* 2024;18:1265-75.
206. Sang CY, Liu JR, Zheng YD, Chai T, Shi JT, Naghavi MR, et al. Obacunone potentiated PD-1 immunotherapy in pancreatic cancer by mediating CD36. *Eur J Pharmacol.* 5 de mayo de 2025;994:177367.

207. Wang Y, Dang Z, Wang X, Chen Y, Dong P, Liu G, et al. Obacunone alleviates chronic pelvic pain and pro-inflammatory depolarization of macrophage induced by experimental autoimmune prostatitis in mice. *Biochem Biophys Res.* diciembre de 2023;36:101565.
208. Liu J, Chen S, Yan W, Liu J, Jin Q, Zhang Y, et al. Obacunone improves dihydrotestosterone-induced androgen alopecia by inhibiting androgen receptor dimerization. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* diciembre de 2024;135:156042.
209. Zhao Y, Liang H, Cui X. Obacunone regulates ferroptosis in ovarian cancer through the Akt/p53 pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 21 de diciembre de 2024;
210. Murthy KNC, Jayaprakasha GK, Patil BS. Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death. *Toxicology.* 2 de marzo de 2015;329:88-97.
211. Luo X, Yue B, Yu Z, Ren Y, Zhang J, Ren J, et al. Obacunone Protects Against Ulcerative Colitis in Mice by Modulating Gut Microbiota, Attenuating TLR4/NF- κ B Signaling Cascades, and Improving Disrupted Epithelial Barriers. *Front Microbiol.* 2020;11:497.
212. Zhang Q, Liu J, Duan H, Li R, Peng W, Wu C. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *J Adv Res.* diciembre de 2021;34:43-63.
213. Tyrak KE, Pajdzik K, Jakiela B, Kupryś-Lipińska I, Ćmiel A, Kacorzyk R, et al. Biomarkers for predicting response to aspirin therapy in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* agosto de 2021;51(8):1046-56.
214. Schneider TR, Johns CB, Palumbo ML, Murphy KC, Cahill KN, Laidlaw TM. Dietary Fatty Acid Modification for the Treatment of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease: A Prospective Pilot Trial. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(3):825-31.
215. Workman AD, Bleier BS. Biologic therapies versus surgical management for aspirin-exacerbated respiratory disease: A review of preliminary data, efficacy, and cost. *World J Otorhinolaryngol - Head Neck Surg.* diciembre de 2020;6(4):230-4.

ABREVIATURAS

AAS: aspirina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIM2: proteína absent in melanoma 2

AINE: antiinflamatorios no esteroideos

AJs: uniones adherentes

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BLE: bleomicina

BrdU: bromodeoxiuridina

CC: corticoides

CDK: quinasa dependiente de ciclina;

CENS: cirugía endoscópica nasosinusal

GPX1: Glutación peroxidasa 1

GSH: glutation

CIN: corticoides intranasales

CO2: dióxido de carbono

CVRS: calidad de vida relacionada con la salud

DAMP: patrones moleculares asociados al peligro

DCN: Decorina

DCP: discinesia ciliar primaria

DDR: Respuesta del ADN al daño

DSB: rupturas de doble cadena;

ELN: Elastina

EMP1: proteína de la membrana epitelial 1

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina o antiinflamatorios no esteroideos

EVA: escala visual analógica

FQ: fibrosis quística.

GEPA: granulomatosis eosinofílica con poliangitis.

GPA: granulomatosis con poliangitis

IF: interferón

IFI16: proteína 16 inducible por interferón

IFN- γ : Interferón gamma (IFN- γ)

Ig: inmunoglobulinas

IL: interleucina

lncRNA: ARN no codificante largo

LMNB1: laminina B1

LT: leucotrienos

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MiDAS: Senescencia asociada a disfunción mitocondrial

mTOR: diana de rapamicina en mamíferos

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos

NF- κ B : factor nuclear kappa B

NRF2: Factor nuclear eritroide 2

NOSE: Nasal Obstruction Symptom Evaluation

NQO1: NADPH quinona deshidrogenasa

O₂: oxígeno

PAMP: patrones asociados a patógenos

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa

RT- PCTR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

PGE₂: prostaglandina E₂

PN: poliposis nasal

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

ROS: especies reactivas del oxígeno

RSC: rinosinusitis crónica

RSCcPN: rinosinusitis crónica con poliposis nasal

RSC-e: rino-sinusitis crónica eosinofílica.

RSC no-e: rinosinusitis crónica no eosinofílica

RSCsPN: rinosinusitis crónica sin poliposis nasal

RT: Transcripción reversa

SAHF: focos de heterocromatina asociados a senescencia

SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia

SA- β -gal : actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia

SGK1: kinasa 1 regulada por suero/glucocorticoides

SLPI: inhibidor de la leucoproteasa secretada

TJs: uniones estrechas

TC: tomografía computarizada

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TNF α : factor de necrosis tumoral α

TLR: receptores tipo Toll

TPDA: Tratamiento posdesensibilización con AINE

TSLP: linfopoyetina tímica estromal

UPR: respuesta a proteínas mal plegadas.

ANEXOS

ANEXO 1

Aprobación del proyecto de investigación titulado *Modulación farmacológica de la senescencia por activadores Nrf2 e inhibidores de proteína quinasa en células epiteliales humanas cultivadas de pacientes de EPOC, FPI y ASMA (SENESFARMA)* por el Comité Ético de Investigación con medicamentos del Consorcio Hospital General Universitario de València.

