



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi mecanístic d'MP-AzeFlu en models *in vitro* d'inflamació nasal

Sònia Vicens Artés

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDI MECANÍSTIC D'MP-AZEFLU EN MODELS IN VITRO D'INFLAMACIÓ DE MUCOSA NASAL

Memòria de tesi doctoral presentada per

SÒNIA VICENS ARTÉS

per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona.

Dirigida per

Dr. JOAQUIM MULLOL MIRET
Servei d'Otorinolaringologia, Hospital
Clínic de Barcelona, FCRB-IDIBAPS, UB,
CIBERES.
(director)

Dr. JORDI ROCA FERRER
Hospital Clínic de Barcelona, FCRB-
IDIBAPS, CIBERES.
(director)

Dr. ISAM ALOBID ALOBID
Servei d'Otorinolaringologia, Hospital Clínic de Barcelona,
FCRB-IDIBAPS, UB, CIBERES.
(tutor)

Programa de Doctorat en Medicina i Recerca Translacional
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat de Barcelona
Setembre 202

Si vols anar ràpid, camina sol.
Si vols arribar lluny, ves-hi acompanyat.

Proverbi africà

AGRAÏMENTS

En primer lloc m'agradaria agrair al **Dr. Mulo**l haver-me donat l'oportunitat de formar part del grup de recerca IRCE en els primeríssims estadis de la meva carrera científica i haver confiat en mi per al següent pas, aquesta tesis doctoral. Al **Dr. Roca-Ferrer** li vull agrair haver acceptat ser codirector en aquesta tesis perquè m'ha ensenyat a tenir una mirada crítica i fer-me les preguntes pertinents a cada moment.

No voldria pas oblidar-me'n del **Dr. Picado**, que va ser la primera persona amb qui em vaig entrevistar com a estudiant de pràctiques. Sense ell, res d'això hagués estat possible.

A la **Maria**, per acompanyar-me i formar-me a les meves primeres setmanes al lab, ensenyant-me les tècniques i els petits trucs que no estan escrits enlloc. Merci per tota l'ajuda brindada, pels tantíssims tubs que hem hagut de rotular i pels cops de mà amb els ELISAs i WBs.

A **Mireya**, por ser un apoyo des del primer día, tanto dentro como fuera del lab, por tu visión positiva y por hacer que los días fueran más llevaderos. También por tu transparencia, tu energía, tu cariño y tu empatía. Gracias por ser buena compañera entre risas y entre lágrimas.

A la **Marina**, per ser la millor companya de doctorat que ningú pugui imaginar. Hem compartit tantes, tantíssimes hores juntes... a cultius, a l'ordinador, als dinars, als cursos. He après molt de tu, ens hem ajudat sempre que ha calgut i hem crescut juntes. Sense tu, aquesta experiència no hagués estat el mateix. Ja saps, amiga, tàndem per sempre.

A **Valeria**, por haber sido una buena postdoc, por guiarme con tus consejos, por transmitirme tu serenidad y por ofrecerme tu perspectiva y punto de vista cuando me sentía perdida.

A **Borja**, por ser un guía en mis primeros años en el lab. Gracias por mostrarme muchas de las facetas de la ciencia, tanto las buenas como las no lo son tanto, y por siempre intentar mantener la esperanza, incluso cuando era difícil.

També a la resta de membres del grup IRCE (**Rosa Muñoz, Joan Bartra, Mariona Pascal, Rocío Casas, Mauricio Lopez, Cristóbal Langdon, Isam Alobid**) per tots els espais compartits, pels projectes on hem pogut col·laborar i pels aprenentatges que m'enduc de cadascuna de vosaltres.

A totes les companyes de la 2B (**Jordi, Elisenda, Mari, Natalia, Marta, Lourdes, Cheles, Roberto i Anna**) per les converses, els riures, els dinars i els ànims. I especialment a la gent, que sou ja amigues, de junts after curro, perquè heu sigut l'impuls que he necessitat al llarg d'aquests anys. A l'**Àlex**, per haver sigut com el meu germà gran. Gràcies per escoltar-me, pels consells, per aguantar els plors, per acompanyar-me i per empenyer-me a créixer i fer-me forta. A **Marta**, perquè en un tiempo récord te convertiste en alguien esencial. Y ahora en la distancia, seguimos construyendo y luchando juntas. Al **Rubèn**, per la teva insaciable curiositat científica, pels debats interminables i per ser una miqueta un geni boig. Y a **Raquel**, por tu energía, entusiasmo y vitalidad.

A mis niñas de make-up sex, **Dafne y Leti**, que sin casi quererlo ni saber cómo os habéis convertido en un pilar en mi vida. No puedo más que agradecerlos la amistad madura y sana que hemos construido. Gracias por celebrar mis éxitos, por acompañarme en mis batallas y sostenerme en los momentos de bajón. En estos años, nos veamos a menudo o cada mucho tiempo, siempre habéis estado presentes, en persona, por llamada o con infinidad de reels. Gracias por cada momento compartido, las cenas, los findes de chicas, las tardes de peli o playa, los paseos y... el taller de velas, que tenemos pendiente pero acabaremos realizando ;)

To my recent friends at COOLtura, **Félix, Laura, Ana María** and **Nina**, because, although we have known each other for less than a year, you have been more than a clear support, you have been the lifeline I needed to not give up in this last year.

A las compis de la 4A, **Elisa, Elena y Roc**, por vuestro interés hacia esta tesis, por ayudarme a cumplir mis horarios de tesis interceptando interrupciones, por los cafés y planes, a veces improvisados, que nos despejan de la rutina y por la terapia grupal en los días malos. También a **Sonsoles**, por permitirme dedicar el tiempo necesario a la tesis, por ponerme todas las posibles facilidades y por tus inestimables consejos. Sin ti, seguramente hoy no estaría aquí.

A les amigues de Labrats y pollitos, que en el seu moment vam ser companyes a CellTec UB, per mostrar-me el que significava fer la tesis i despertar en mi les ganes de fer-la. A **Claudia**, por tu confianza, tu apoyo y por ser una figura referente. A la **Núria**, perquè compartint poiata he après molt de tu. A la **Maria**, per sempre tenir un somriure o una paraula d'alè. Al **Xavi**, per ser inspiració en estat pur. A l'**Àlex**, per la teva dedicació i la teva forma d'entendre la ciència. A **Víctor**, porque con tu luz nos ayudas a brillar a los demás. A la **Janat**, perquè perseguint els teus somnis m'has recordat que no ens hem de posar límits. I al **Marc**, per saber-li posar humor a qualsevol situació.

A les amigues que he anat fent al món escolta, **Ferran, Maria, Marta, Bet, Berta, Hathi, Carlota, Anna i Andrea**. Gràcies per totes les experiències viscudes, pels moments vitals importants compartits, per fer-me veure que el món pot ser un lloc amable, pel vostre escalf, companyia i estima, per haver sigut un motor innegable de creixement personal i per fer-ho tot sempre tan fàcil. Moltes gràcies per fer que el meu cor bategués ben fort.

A les amistats de Falcons de Barcelona, que no sou pas poques. **Esther, Moe, Samu, David, Roger, Maria, Anna, Tibi i Bigolla**. Moltes gràcies per ser-hi durant tots aquests anys, per escoltar pacientment les meves il·lusions i queixes sobre la tesis; i alhora, fer-me desconnectar de tot el que passava al lab. Els sopars post-assaig, els viatges, els vermutos virtuals durant la pandèmia, les excursions, les passejades en el desconfinament, les rutes, els concerts i les calçotades han suposat, sense cap tipus de dubte, aire fresc a la meva vida. A vosaltres i també a l'**Imma**, al **Farrera**, a l'**Isra**, a la **Montse**, al **Manel**, a la **Susana**, a l'**Òscar**, a la **Merche**, al **Sancho**, a la **Cèlia**, a l'**Helena**,

a l'**Anna**, al **Tiscar**, a la **Daniela** i a moltes altres persones de la colla agrair-vos l'acompanyament durant tot aquest temps.

També a la **Sandra Chamoun**, a la **Sandra Andrés**, a l'**Esther Martín**, a la **família Rico-Filbà** i a les **ladies de la EOI** per tots els bons moments, les birres, les trobades i el vostre carinyu.

Per últim, però en absolut menys important, un immens agraïment a la meva família. Començant per la meva mare i el meu pare, que treballant ben dur ens han donat, a mi i al meu germà, l'oportunitat d'estudiar el que més ens agradava. **Mama**, moltes gràcies per cuidar-me de les mil maneres en que ho fas, per fer-me la vida una mica més fàcil quan més saturada i atabalada em trobava i pel ànims quan més ho necessitava. **Papa**, gràcies pel suport i l'empenta, per intentar ajudar-me amb el programa de bibliografia (que al final vaig acabar canviant) i per acompanyar a la mama en les preocupacions que amb aquesta tesi li he pogut generar. Agradeceros **Tete**, **Ester**, **Tío Pedro**, **Tía Olga**, **Patri**, **Alba**, **Raquel**, **yaya**, **Rosa Amelia** y **Tioemilio**, el apoyo, el intentar entender lo que hago y los ánimos, que nunca vienen mal. También la repetida pregunta de cómo están los bichitos o si ya les he dado de comer a las celulitas. Y por supuesto las muchas celebraciones de estos años, aunque en muchas he estado ausente: cumpleaños, bodas, nacimientos, despedidas del verano, jubilaciones, etc. Ya sabéis que siempre encontramos algo que celebrar y, cuando esto acabe, lo celebraremos, y de la mejor forma que sepamos. Y al resto de la gran familia García, gracias por interesaros por mí y mi tesis; cada pregunta, sonrisa o abrazo ha significado mucho.

A totes i cadascuna de vosaltres, moltes gràcies per acompanyar-me en aquest llarg i difícil camí.



FINANÇAMENT

Aquesta tesi doctoral va comptar amb el suport econòmic de MEDA Pharma GmbH & Co. KG (Bad Homburg, Alemanya).

L'estudi 1 d'aquesta tesi es va dur a terme gràcies el projecte DYMECOS, mentre que els estudis 2, 3 i 4 que s'inclouen en aquesta tesi van finançar-se amb el projecte DYMECOS II.

Projecte DYMECOS

TÍTOL	Study of the antiinflammatory effects and mechanism of action of MP29-02, compared to fluticasone propionate and azelastine alone, in an <i>in vitro</i> model of eosinophilic inflammation.
FINANÇAMENT	109.643 €
ANYS	2014-15
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Joaquim Mollol
COL·LABORRADORS	Jordi Roca Ferrer, Laura Pujols, Isam Alobid

Projecte DYMECOS II

TÍTOL	Study of the antiinflammatory mechanisms of action of MP29-02, compared to fluticasone propionate and azelastine alone, in healthy and inflamed human nasal mucosa: regulation on anti- and pro-inflammatory genes and GRa.
FINANÇAMENT	194.300 €
ANYS	2016-19
INVESTIGADORS PRINCIPALS	Joaquim Mollol, Laura Pujols
COL·LABORRADORS	Jordi Roca Ferrer, Isam Alobid



ÍNDEX

AUTORITZACIÓ DE LA PRESENTACIÓ DE LA TESI	3
DECLARACIÓ D'ORIGINALITAT, NO PLAGI I BONES PRÀCTIQUES.....	5
DECLARACIÓ D'AUTORIA.....	7
AGRAÏMENTS.....	11
FINANÇAMENT	15
ÍNDIX.....	19
ABREVIATURES	23
LLISTAT D'ARTICLES DE LA TESI	27
INTRODUCCIÓ.....	31
HIPÒTESI	59
OBJECTIUS	63
MÈTODES I RESULTATS.....	67
ESTUDI 1: Efecte superior de l'MP-AzeFlu al de l'azelastina o el propionat de fluticasona en monoteràpia en la reducció de marcadors inflamatoris.	69
ESTUDI 2: Efecte de l'MP-AzeFlu sobre la IL-6 i d'altres citocines proinflamatòries induïdes per IL-1 beta.	81
ESTUDI 3: Efecte superior de l'MP-AzeFlu en comparació amb el propionat de fluticasona o l'azelastina en monoteràpia sobre l'expressió dels gens antiinflamatoris GILZ, MKP-1 i TTP en mucosa de les via respiratòria superior, tant sana com inflamada.	93
ESTUDI 4: Efecte de l'MP-AzeFlu en comparació amb la monoteràpia sobre l'expressió gènica de COX-2, PGE ₂ i EP2 a la mucosa de la via respiratòria superior.	99
DISCUSSIÓ.....	107
BIBLIOGRAFIA	133



ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic.
AH	Antihistamínic.
ARNm	Àcid ribonucleic missatger.
AZE	Clorhidrat d'azelastina.
CENS	cirurgia endoscòpica nasosinusal.
COX-2	Ciclooxygenasa 2.
EP	Receptor de PGE ₂ .
ERG	Elements de resposta a glucocorticoides.
EVA	Escala visual analògica.
FceRI	Receptor d'alta afinitat d'IgE.
GC	Corticoide.
GILZ	de l'anglès <i>Glucocorticoid-Induced Leucine-Zipper</i> .
GM-CSF	Factor estimador de colònies de granulòcits i macròfags – de l'anglès <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> .
hECM	Medi condicionat per cèl·lules epitelials humanes – de l'anglès <i>human Epithelial-cell Conditioned Media</i> .
IgE	Immunoglobulina E.
IL	Interleucina.
ILC	Cèl·lules limfoides innates – de l'anglès <i>Innate lymphoid cell</i> .
IFN-γ	Interferó gamma.
MKP-1	Proteïna quinasa fosfatasa activada per mitògens 1 – de l'anglès <i>Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase 1</i> .
MN	Mucosa nasal.
NK	Cèl·lula assassina – de l'anglès <i>Natural Killer cell</i> .
PAF	Factor activador de plaquetes – de l'anglès <i>Platelet Activating Factor</i> .
PF	Propionat de fluticasona.
PGD ₂	Prostaglandina D ₂ .
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ .
PN	Pòlip nasal.
RA	Rinitis al·lèrgica.
RG	Receptor de glucocorticoide.
RGα	Receptor de glucocorticoide alfa.
RSC	Rinosinusitis crònica.
RSCaPN	Rinosinusitis crònica amb pòlips nasals.
RSCsPN	Rinosinusitis crònica sense pòlips nasals.
RT-qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa amb transcriptasa inversa – de l'anglès <i>Reverse Transcriptase - quantitative Polymerase Chain Reaction</i> .

ABREVIATURES

SBF	Sèrum boví fetal.
SNOT-22	Test de resultat sinonasal 22 – de l'anglès <i>Sino-Nasal Outcome Test 22</i> .
Th	Limfòcit <i>T helper</i> .
TNF- α	Factor de necrosi tumoral alfa – de l'anglès <i>Tumour Necrosis Factor alpha</i> .
TSLP	Limfopoiètica de l'estroma tímica – de l'anglès <i>Thymic Stromal LymPhopoietin</i> .
TTP	Tristetraprolina.



LLISTAT D'ARTICLES

Tesi en format de compendi de publicacions. La tesi consta de 4 objectius i 4 articles:

Estudi 1

Roca-Ferrer J, Pujols L, Pérez-González M, Alobid I, Callejas B, **Vicens-Artés S**, Fuentes M, Valero A, Picado C, Castor D, Nguyen D, Mullol J.

Superior effect of MP-AzeFlu than azelastine or fluticasone propionate alone on reducing inflammatory markers.

Allergy Asthma Clin Immunol; 2018 Dec; 14 (86); 1-9.

Doi: 10.1186/s13223-018-0311-4.

Factor d'impacte (JCR 2018): 2.7

Quartil: Q2 (immunologia i al·lèrgia)

Estudi 2

Vicens-Artés S, Roca-Ferrer J, Tubita V, Fuentes M, Alobid I, Valero A, Kopietz F, Nguyen D, Mullol J.

Effect of MP-AzeFlu in IL-1 beta-induced IL-6 and proinflammatory cytokines.

Immunol Res. 2023 Jun;71(3):488-496.

Doi: 10.1007/s12026-022-09341-5.

Factor d'impacte (JCR 2023): 3,3

Quartil: Q2 (immunologia)

Estudi 3

Vicens-Artés S, Roca-Ferrer J, Tubita V, Fuentes M, Alobid I, Valero A, Kopietz F, Nguyen D, Mullol J.

Superior effect of MP-AzeFlu compared to monotherapy with fluticasone propionate or azelastine on GILZ, MKP-1 and TTP anti-inflammatory gene expression in healthy and inflamed upper airway mucosa.

Clin Exp Allergy; 2022 Jun; 52(6); 788-791.

Doi: 10.1111/cea.14099.

Factor d'impacte (JCR 2022): 6,1

Quartil: Q2 (immunologia i al·lèrgia)

Estudi 4

Vicens-Artes S, Roca-Ferrer J, Tubita V, Fuentes M, Alobid I, Valero A, Kopietz F, Nguyen D, Mullol J.

Effect of MP-AzeFlu compared to monotherapy on COX-2, PGE₂, and EP2 gene expression in upper airway mucosa.

Immun Inflamm Dis; 2023 Jan; 11(1); e709.

Doi: 10.1002/iid3.709.

Factor d'impacte (JCR 2023): 3,1

Quartil: Q2 (immunologia i al·lèrgia)



INTRODUCCIÓ

1. Sistema respiratori

La funció principal del sistema respiratori és l'intercanvi de gasos entre l'atmosfera i la sang (1,2); essent també responsable d'altres funcions com la protecció contra els patògens, la vocalització o la regulació del pH corporal (3).

Les vies respiratòries es divideixen en superiors, formades pel nas, la boca, la faringe, la laringe i la tràquea; i inferiors, formades pels pulmons, els bronquis, els bronquíols i els alvèols (1,3). En aquesta tesi ens centrarem en l'estudi de la via respiratòria superior.

1.1. Mucosa nasal

La mucosa respiratòria és una estructura comuna que segrega muc i recobreix tota la via respiratòria, tant superior com inferior (4,5).

La mucosa respiratòria que recobreix les cavitats nasal, incloent-hi septa nasal i els cornets nasals, s'anomena mucosa nasal (MN); mentre que la que recobreix els sinus paranasals rep el nom de mucosa sinusal. Aquesta mucosa nasal és clau en el desenvolupament de diferents funcions, com la filtració, escalfament i humidificació de l'aire inspirat així com la protecció envers patògens (2,6–8). Gràcies a les secrecions mucoses amb substàncies antibiòtiques de defensa innata (2,8), el moviment mucociliar (2,6–9), la resistència al flux d'aire (2) i la filtració (2,7) la mucosa nasal és capaç de dur a terme les funcions prèviament anomenades.

La mucosa nasal es divideix en tres seccions principals: l'epiteli, que adopta diferents conformacions segons la seva localització per tal d'adaptar-se i facilitar les diverses funcions que desenvolupa, la membrana basal encarregada de separar l'epiteli de la submucosa, i la submucosa (2,5). Pel que fa a l'epiteli, la conformació més estesa a la fosa nasal és la d'epiteli pseudoestratificat (2,7,10) [Figura 1].

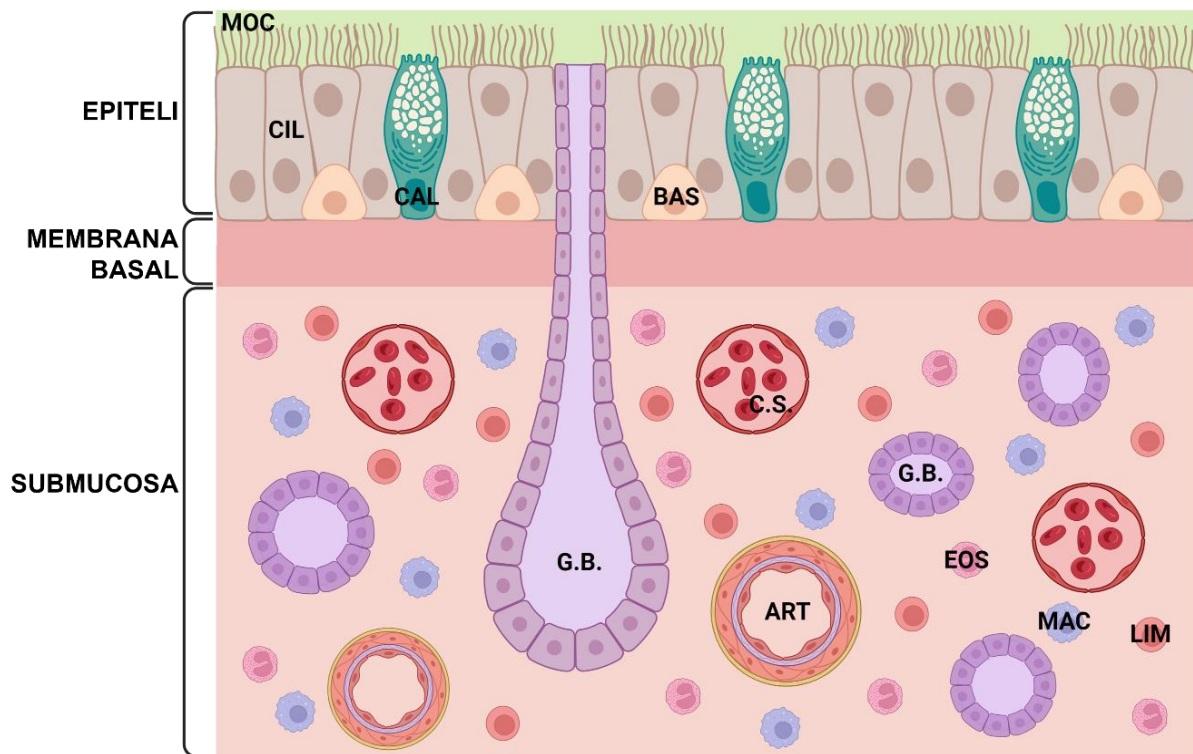


Figura 1: Estructura de la mucosa nasal.

L'epiteli pseudo-estratificat està format per cèl·lules ciliades (CIL), cèl·lules caliciformes (CAL) i cèl·lules basals (BAS), i està cobert d'una capa de moc. La membrana basal separa l'epiteli i la submucosa. La submucosa conté capil·lars sanguinis (C.S.), glàndules de Bowman (G.B.), arterioles (ART) i cèl·lules del sistema immunitari com eosinòfils (EOS), macròfags (MAC) i limfòcits (LIM).

Adaptada de Dkhar et al. 2018.

2. Malalties de la via respiratòria superiors

Pel que fa a la via respiratòria superior, dues malalties inflammatòries rellevants són la rinitis al·lèrgica (RA) i la rinosinusitis crònica (RSC) i tenen en comú que són malalties inflammatòries cròniques que solen presentar nivells elevats de mediadors proinflamatoris i de cèl·lules inflammatòries amb un predomini d'infiltració eosinofílica (11).

En un procés inflamatori es desencadenen un seguit de reaccions que donen lloc a la pèrdua de les condicions fisiològiques (12,13) amb l'objectiu final d'eliminar la causa de la inflamació i recuperar l'estructura, condicions i funcionament originals (12). Hi ha diversos tipus de resposta inflammatòria. La resposta inflammatòria de tipus 1 es dirigeix predominantment envers els virus (14–16) i es caracteritza per la presència dels mediadors TNF- α i IFN- γ i de les cèl·lules Th1, ILC-1 i NK (15–20). La resposta inflammatòria de tipus 2 està dirigida predominantment contra paràsits i al·lèrgens (14–16,21) i les citocines característiques són les alarmines produïdes per l'epiteli respiratori IL-25 i IL-33 i TSLP, així com IL-4, la IL-5 i la IL-13 (15,16,18–24). Aquesta resposta inflammatòria es caracteritza també per la presència de les cèl·lules Th2, ILC-2, eosinòfils i mastòcits (15,17,18,20,22,23). La resposta inflammatòria de tipus 3 actua predominantment contra bacteris i fongs (14–16) i està marcada per la presència tant de les citocines IL-17, IL-22 i IL-3, com de les cèl·lules Th17, ILC-3 i neutròfils (14–20,25). En aquesta tesi ens centrarem en la resposta inflammatòria de tipus 2.

Quan un procés inflamatori perdura, en lloc de resoldre's i recuperar les condicions fisiològiques, genera una inflamació persistent i un remodelat tissular, esdevenint una malaltia inflammatòria crònica (26,27). Això mateix és el que succeeix en el cas de la RA i la RSC.

Aquestes dues malalties, la RA i la RSC, es presenten de forma molt freqüent, afectant del 20% al 40% (28) i del 5% al 13% (22,29,30) de la població general, respectivament. La seva creixent importància es veu reflectida en l'augment de publicacions i guies referents a la epidemiologia, al diagnòstic i al tractament, i de programes específics de prevenció i actuació (22,28,29,31–35).

Tant la RA com la RSC tenen un gran impacte en la qualitat de vida de les persones que les pateixen ja que afecta, no només a nivell clínic, sinó també a l'entorn social, laboral, escolar i de descans (22,23,29,31,36,37). De fet, diversos estudis estableixen que la qualitat de vida d'aquests pacients es veu inclús més afectada que en malalties com la diabetis tipus 2 o la hipertensió (31,38,39).

Aquestes patologies s'associen també amb costos elevats, tant directes en el sistema sanitari, incloent-hi visites, hospitalitzacions, tractament i procediments quirúrgics; com indirectes en la societat general, essent principalment l'absentisme laboral (31,35,40–42). En aquestes patologies, els costos indirectes són molt més elevats que els directes (40,42–44). Per exemple, la RA a Espanya s'associa amb costos indirectes tres cops superiors als costos directes (40).

2.1. Rinitis Al·lèrgica

La RA consisteix en una inflamació de tipus 2 de la mucosa nasal mediada per immunoglobulina E (IgE) com a resultat de l'exposició a al·lèrgens (31,45,46) que desenvolupa símptomes nasals i oculars (31).

2.1.1. Epidemiologia

Es tracta d'una malaltia amb una prevalença a l'alça des dels anys 60 (37,47–49) que en les dues últimes dècades ha augmentat un 50% la seva prevalença (50). Més concretament, es calcula que la prevalença a la població general occidental és del 10% al 30% (47,51,52), a Europa del 17% al 30% (50) i a Espanya del 21,5% (28).

2.1.2. Característiques clíniques

Els símptomes associats a la RA afecten al nas i als ulls principalment. Els nasals inclouen rinorrea o secreció de moc (31,32,39,53), congestió/obstrucció/bloqueig nasal (31,32,39,53), picor nasal (31,32,39), esternuts (31,32,39,53) i, en casos greus, pèrdua parcial d'olfacte (39). Els oculars poden ser picor ocular, vermellor i llagimeig (31,32,39,53).

Pel que fa a la classificació de la RA, es basa actualment en la durada dels símptomes i la gravetat de la malaltia [Figura 2].

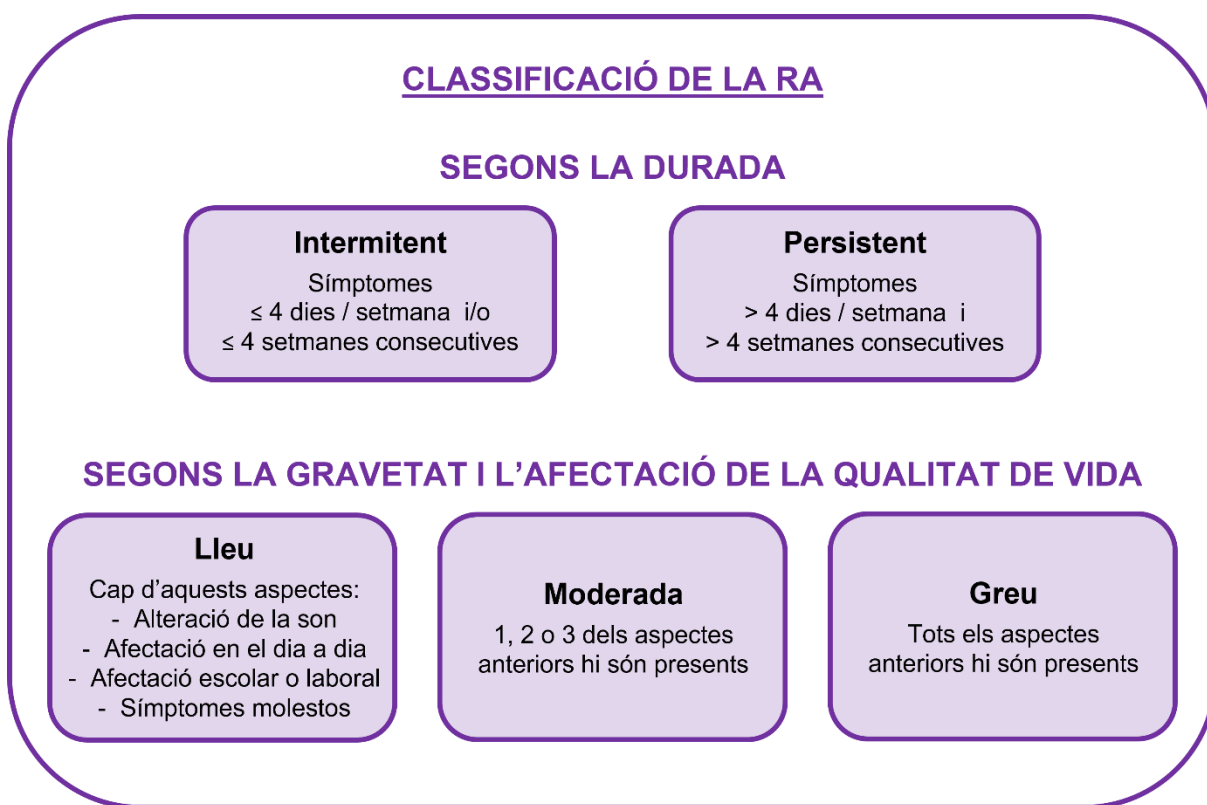


Figura 2: Classificació de la rinitis al·lèrgica (ARIA 2008 i 2016).

La classificació segons la durada distingeix RA intermitent i RA persistent. La classificació segons la gravetat estratifica la malaltia en lleu, moderada o greu.

Adaptada de Bousquet et al. 2008.

Segons la durada dels símptomes, la RA pot considerar-se intermitent, si és menor o igual a 4 dies a la setmana i/o menor o igual a 4 setmanes consecutives, o persistent, si és major a 4 dies a la setmana i major a 4 setmanes consecutives (31). D'acord amb la gravetat de la malaltia, segons ARIA aquesta pot ser lleu, moderada o greu en funció de si es compleixen cap, dels algun o tots els criteris establerts a les guies (31,32,54).

En referència a les principals comorbiditats, trobem la rinosinusitis (38,55), l'asma (38,55,56) i la dermatitis atòpica (55).

2.1.3. Fisiopatologia

La fisiopatologia de la RA es desencadena per una reacció immune mediada per la IgE enfront als al·lèrgens (31,46). Trobem, per una banda, la fase de sensibilització en que es produeix el primer contacte amb els al·lèrgens (sensibilització); i per l'altra, la fase clínica en que té lloc la reacció immunitària i l'aparició dels símptomes.

Durant la sensibilització, els al·lèrgens són capturats i processats per les cèl·lules dendrítiques, que presentaran els al·lèrgens als limfòcits Th0 (57) promovent la seva diferenciació cap a limfòcits Th2 (56,57). A més a més, les cèl·lules ILC2 també afavoreixen aquesta maduració dels limfòcits Th0 cap a Th2. Els limfòcits Th2, alliberant IL-4, IL-5 i IL-13, activen limfòcits B que es transformaran en cèl·lules plasmàtiques capaces de produir IgE específiques (56,57). Aquestes IgE s'uneixen als seus receptors específics d'alta afinitat (FcεRI) a la superfície de basòfils i mastòcits (56) [Figura 3].

En la fase clínica i quan l'al·lèrgen està present, pèptids d'aquests al·lèrgens s'uneixen a les IgE específiques localitzades a la superfície de basòfils i mastòcits, provocant la desgranulació d'aquestes cèl·lules (57). Aquesta desgranulació allibera

mediadors proinflamatoris com la prostaglandina D_2 (PGD_2), el factor activador de plaquetes (PAF) i la histamina, principal mediador efector de la reacció al·lèrgica (56,57). En la resposta temprana, que té lloc al cap de pocs minuts, aquests mediadors són els responsables de l'aparició d'edema, de mucositat i de símptomes com la rinorrea, la congestió nasal i els esternuts (56). Més endavant, passades entre 4 i 6 hores, té lloc la resposta tardana. En aquesta, la producció d'IL-4, IL-5, IL-13, factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF), leucotriens i PAF, entre d'altres, indueix la infiltració o quimiotaxi de més cèl·lules inflamatòries, com eosinòfils, neutròfils, basòfils, monòcits i limfòcits, a la mucosa nasal. Tot això genera unes condicions òptimes per al manteniment crònic de la inflamació i dels símptomes que havien aparegut a la resposta temprana (56) [Figura 3].

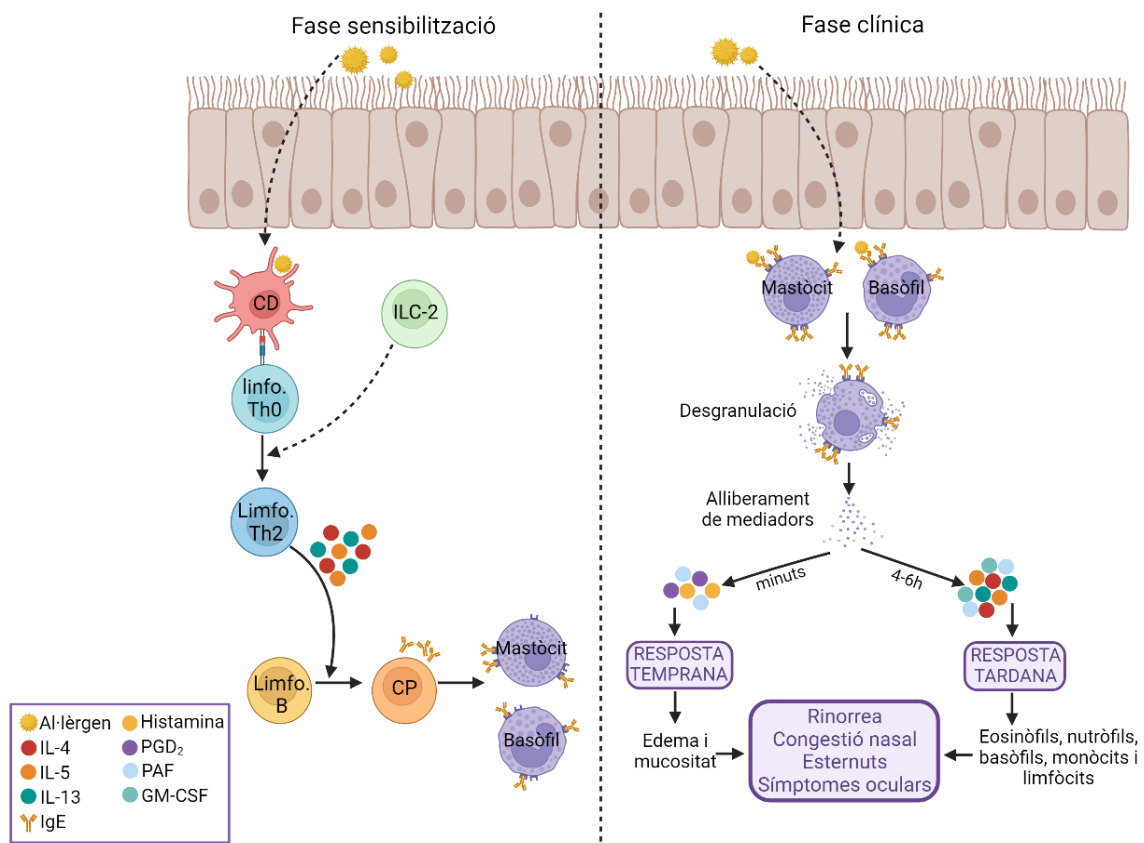


Figura 3: Fisiopatologia de la rinitis al·lèrgica.

La fase de sensibilització s'inicia quan les cèl·lules dendrítiques entren en contacte amb l'al·lèrgen i provoquen la diferenciació de limfòcits Th0 a Th2. En aquesta diferenciació també intervenen les

cèl·lules ILC2. Els limfòcits Th2 estimulen, gràcies a IL-4, IL-5 i IL-13, la maduració de limfòcits B cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgE que s'unirà a mastòcits i basòfils.

La fase clínica es dona quan es torna a estar en contacte amb l'al·lergen, que provoca la desgranulació de basòfils i mastòcits i l'alliberament d'histamina, PGD₂ i PAF, entre molts altres mediadors. Aquests mediadors són responsables de la resposta temprana i es dona en qüestió de minuts. Al cap d'unes hores s'allibera també IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF i PAF, i d'altres mediadors, que donen lloc a la resposta tardana. Tot plegat dona lloc als símptomes de la RA.

CD: cèl·lula dendrítica; Limfo.: limfòcit; CP: cèl·lula plasmàtica.

Adaptada de Nur Husna et al. 2022.

2.1.4. Tractament

El tractament de la RA pot seguir diferents estratègies. Per una banda hi ha mesures ambientals que es basen en l'evitació de l'exposició als al·lèrgens (31). Per l'altra banda trobem les intervencions mèdiques, ja sigui amb tractament farmacològic com antihistamínics (AH), corticoides (GC), antileucotriens, cromones o formulació intranasal de GC+AH, o bé sigui amb immunoteràpia al·lèrgica o inclús, en casos molt específics i greus, l'ús de biològics (1,31,32). Pel que fa al tractament farmacològic, dos dels grups importants de fàrmacs emprats en aquesta patologia són els AH i els GC (31) o la seva formulació intranasal (58,59).

2.2. Rinosinusitis crònica

La rinosinusitis crònica és una malaltia inflamatòria multifactorial, majoritàriament de tipus 2 en països occidentals, que consisteix en un procés inflamatori de la mucosa nasal (rinitis) i dels sins paranasals (rinosinusitis) amb una durada superior a 12 setmanes (7,18,28,29,46).

2.2.1. Epidemiologia

A diferència de la rinitis al·lèrgica, la rinosinusitis crònica presenta una prevalença amb tendència estable (47). La seva prevalença en la població general és d'entre un 5% i un 28% segons simptomatologia, però després de la confirmació clínica es troba entre el 3% i el 12% (18,22,28,29,47). En termes generals, a nivell mundial se

situa en el 10% (23), a nivell europeu en el 10.9% (30) i a Espanya entre el 5% i el 10% (28,60).

2.2.2. Característiques clíniques

La simptomatologia es caracteritza per la congestió/obstrucció/bloqueig nasal (21,22,35,36,61–65), la rinorrea anterior o posterior (21,22,35,36,61–65), la pressió o dolor facial (21,22,35,36,61–65) i la reducció (hipòsmia) o pèrdua (anòsmia) d'olfacte (6,21,22,36,61–66) com els 4 símptomes centrals.

Pel que fa a la classificació de la RSC, trobem principalment tres classificacions que són complementàries [Figura 4].



Figura 4: Classificació de la rinosinusitis crònica.

La classificació segons la gravetat estratifica la malaltia en lleu, moderada i greu. La classificació segons el fenotip diferencia entre RSCsPN i RSCaPN. La classificació segons l'endotip estableix que pot ser T1, T2 o T3.

Adaptada de Fokkens et al. 2020.

La gravetat de la malaltia pot classificar-se en lleu, moderada o greu (22,31,35,61) segons el test de resultat sinonasal 22 (SNOT-22) (29,67) o mitjançant l'escala visual analògica (EVA) (29,68). També es fa una classificació segons en el fenotip, una característica observable o presentació de la malaltia, i distingeix segons la presència (RSCaPN) o l'absència (RSCsPN) de pòlips nasals (6,7,11,13,21,22,36,61,64,65,69,70). Actualment, s'ha incorporat un nou criteri de classificació que es basa en l'endotip, els patrons inflamatoris de la malaltia, i estableix els següents 3 subtipus de RSC: T1, T2 i T3 en funció de si predomina un patró inflamatori de tipus 1, 2 o 3 respectivament (16,18,19,22,25). No obstant, encara no hi ha un ampli consens en relació amb aquests endotips ja que també existeixen patrons cel·lulars mixtes (15,18). Alguns autors descriuen també un endotip eosinofílic i no eosinofílic d'acord amb la presència o no d'eosinòfils (71,72), havent-hi encara discussió quan als punts de tall de la eosinofília sanguínia o tissular als pòlips nasals. Alguns treballs han definit que als països occidentals, hi ha una certa relació entre l'endotip T2 i l'eosinofílic (72,73) i entre els endotips T1 i T3 i el no eosinofílic (72).

Les principals comorbiditats vinculades a la RSC són l'asma (29,60,74), la RA (29,47,66), la dermatitis atòpica (60,75) i la malaltia respiratòria exacerbada per antiinflamatoris no esteroïdals (22,60).

2.2.3. Fisiopatologia

2.2.3.1. RSC sense pòlips nasals (RSCsPN)

Als països occidentals, aquest fenotip generalment s'associa a una inflamació persistent de tipus 1 o 3 (13,16,21,76) i es caracteritza per una elevada neutrofilia i la presència d'IL-8, TNF- α i IFN- γ (20,36,69,72).

Més concretament, el procés inflamatori de la RSCsPN es desencadena per part de les cèl·lules dendrítiques, que intervenen en la sensibilització a al·lèrgica, reconeixent i presentant antígens als limfòcits Th0 promovent la seva diferenciació. En el cas de la RSC de tipus 1, aquestes cèl·lules dendrítiques indueixen les cèl·lules ILC-1 i Th1, que produeixen TNF- α i IFN- γ , responsables de la infiltració de cèl·lules inflamatòries com neutròfils (20,22). A més a més, també es produeix la maduració de limfòcits B cap a cèl·lules plasmàtiques per produir IgE i IgA (20). En canvi, en la RSC de tipus 3, les cèl·lules dendrítiques activen les cèl·lules ILC-3 i Th17, que produeixen IL-17, IL-22 i IL-8, induint la infiltració de cèl·lules inflamatòries i el dany i remodelació de l'epiteli respiratori (20,22). Aquests processos inflamatoris donen lloc a un engruiximent de la membrana basal, hiperplàsia de cèl·lules caliciformes i edema (13).

2.2.3.2. RSC amb pòlips nasals (RSCaPN)

Als països occidentals, aquest fenotip es caracteritza per una inflamació de tipus 2 (13,16,19,21,70,76) associada a major eosinofília en el teixit dels pòlips nasals i sang perifèrica i a un augment d'IgE total, IL-4, IL-5 i IL-13 (20,36,69,70,72).

El procés inflamatori tipus 2 a la RSC es dona com a resposta contra patògens o altres factors nocius i s'inicia amb la inducció de TSLP, IL-25 i IL-33 que actuen sobre cèl·lules dendrítiques i ILC-2 (20,23,47,77,78). Les cèl·lules dendrítiques capturen i presenten els antígens als limfòcits Th0 induint la seva diferenciació cap a limfòcits Th2 que produeixen IL-13, IL-5 i IL-4 (20,23,47,78). Les segones, les ILC-2, també produeixen IL-13, IL-5 i IL-4 (20,47,78). Aquestes citocines indueixen la quimiotaxi de cèl·lules inflamatòries com ara eosinòfils, basòfils, macròfags i monòcits (20,23). D'altra banda, els limfòcits Th2 promouen la diferenciació de les cèl·lules B a cèl·lules plasmàtiques capaces de produir IgE que pot provocar la desgranulació dels mastòcits i basòfils (23,47,77). Tot aquest procés inflamatori genera

remodelació del teixit, moc, congestió nasal, edema, rinorrea i reducció/pèrdua d'olfacte (13,20,65) [Figura 5].

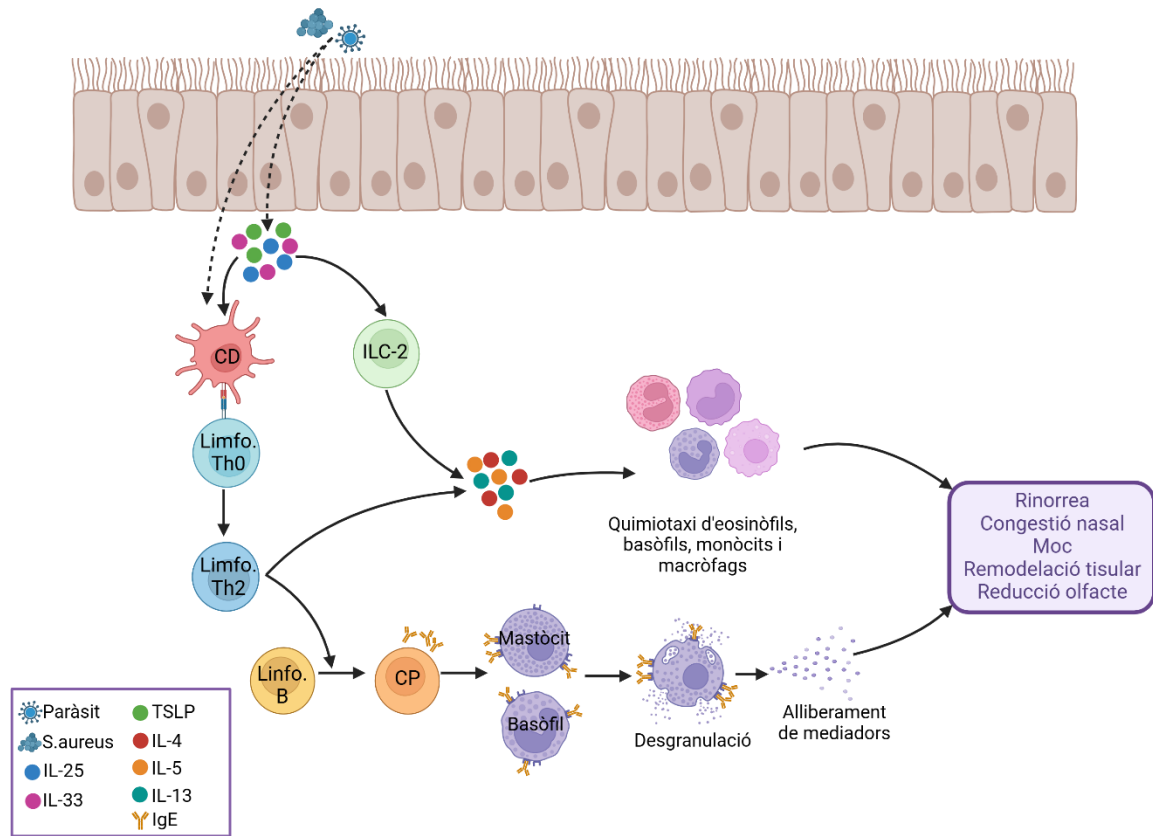


Figura 5: Fisiopatologia de la rinosinusitis crònica amb pòlips nasals.

Les alarmines (TSLP, IL-25 i IL-33) actuen en les cèl·lules dendrítiques i ILC-2. Mentre les cèl·lules dendrítiques presenten els antígens promovent la diferenciació de limfòcits Th0 a Th2 productors d'IL-4, IL-5 i IL-13; les cèl·lules ILC-2 també produeixen aquestes citocines que atreuen (quimiotaxi) a d'altres cèl·lules inflamatòries. A més a més, els limfòcits Th2 provoquen la maduració de limfòcits B cap a cèl·lules plasmàtiques productores d'IgE, produint la desgranulació de mastòcits i basòfils. Tot aquest procés, mediat per cèl·lules i mediadors inflamatoris, dona lloc a l'aparició dels principals símptomes de la RSCaPN.

CD: cèl·lula dendrítica; Limfo.: limfòcit; CP: cèl·lula plasmàtica.

Adaptada de Laidlaw et al. 2021.

2.2.4. Tractament

El tractament de primera línia compren rentats nasals amb sèrum salí, corticoides intranasals i cicles curts de corticoides orals (22,28,29). Quan el tractament farmacològic no ofereix milloria ni control de la malaltia, es recomana la cirurgia endoscòpica nasosinusal (CENS) (7,22,28,29). Recentment també s'estan emprant fàrmacs biològics que consisteixen en anticossos monoclonals que bloquegen diferents dianes d'inflamació tipus 2 com són el dupilumab, un anti-IL-4R α , l'omalizumab, un anti-IgE lliure, i el mepolizumab, un anti-IL-5 lliure, en pacients greus i no controlats malgrat el tractament mèdic i/o quirúrgic (34).

3. Tractament farmacològic de la RA i la RSC

El tractament d'aquestes patologies, tant la RA com la RSCaPN, cerca el control de la malaltia associat a una reducció dels símptomes i una millora de la qualitat de vida dels pacients que la pateixen (22,35,38,49,61,62). En funció de l'assoliment d'aquest control, els pacients es poden trobar ben controlats, parcialment controlats o no controlats tant a la RSCaPN (22) com a la RA (79).

Malgrat que hi ha un gran ventall d'estratègies terapèutiques (22,31,34,36,37,47,64), el tractament farmacològic és l'eina més emprada per al control de la RSC (22,36,64) i la RA (31,45,50), i especialment els GC i els AH (11,22,31). Mentre que ambdues medicacions estan indicades per a la RA (31), en la RSC se solen emprar els GC però els AH només hi estan indicats quan hi ha una RA comòrbida (Fokkens et al. 2020).

3.1. Corticoides

Els GC són el tractament de referència per a malalties inflamatòries respiratòries com ara la RSC (22,29,35,61,80) i la RA (31,32,45,50,59,80,81).

Els GC intranasals, com la fluticasona, la mometasona, la budesonida o la triamcinolona (45,64), són efectius per a símptomes nasals i oculars tant de la RA (31,50) com de la RSCaPN (13,22,29), incloent-hi el sentit de l'olfacte. A més a més, ofereixen una elevada concentració localment sense efectes adversos sistèmics degut a la seva baixa biodisponibilitat, sobretot la fluticasona i la mometasona (50) i poden ser emprats a llarg termini tant en RA (31,50) com en RSC (22,29).

Els corticoides orals o sistèmics, com la prednisona i la prednisolona (13,36,64) solen emprar-se en cicles curts, de 5 a 30 dies, en pacients no controlats o parcialment controlats, en la RA (31) però principalment en la RSCaPN (22,64,70). Els implants de corticoides en els sinus etmoïdals s'han començat a fer servir en

pacients postquirúrgics en la recurrència de la RSCaPN ja que redueixen la inflamació nasal i la necessitat d'altres cirurgies (13,22,29).

3.1.1. Accions fisiològiques

Els corticoides tenen una acció antiinflamatòria potent (80,82) que redueix la supervivència d'eosinòfils (11,82,83) i inhibeix la secreció de mediadors proinflamatoris com IL-6 (11,84), IL-8 (11,84), GM-CSF (11,84), ciclooxigenasa 2 (COX-2) (84,85) i prostaglandina E₂ (PGE₂) (85). En la RSCaPN, aquest efecte antiinflamatori es tradueix en la reducció de la obstrucció nasal (29,74,86), la millora del flux d'aire (87), la reducció de les secrecions nasals (86) i de la mida dels pòlips nasals (29,74,86,87). Tot plegat proporcionant una millor qualitat de vida per als pacients (29,74,86,87). En el cas de la RA, aquest efecte antiinflamatori es trasllada principalment en la reducció dels símptomes nasals i oculars i la millora de la qualitat de vida dels pacients (88,89).

3.1.2. Mecanisme d'acció

La majoria dels corticoides actuen mitjançant la unió al seu receptor específic anomenat receptor de glucocorticoides (RG) (90–94) i la seva isoforma α (RG α) es troba al citoplasma en forma de complex proteic (70,80,81,83,92,94,95). Un cop el corticoide ha travessat la membrana cel·lular, s'uneix al RG α provocant-ne un canvi conformacional amb l'alliberament del complex GC-RG α , que serà translocat cap al nucli (70,80,81,83,91–96) [Figura 6].

Un cop al nucli, el RG α , en forma de dímer, s'uneix als elements de resposta als glucocorticoides (ERG) de l'ADN situats a les regions promotores activant la transcripció de gens antiinflamatoris com ara glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), proteïna quinasa fosfatasa activada per mitògens 1 (MKP-1) i tristetraprolina (TTP) (13,81,83,90–98). Quan s'uneix als ERG negatius es reprimeix la transcripció de gens proinflamatoris com COX-2, IL-6 i IL-8 i d'altres citocines

(13,81,83,90,94,95,97,98). El $\text{RG}\alpha$ pot interaccionar també amb alguns factors de transcripció potenciant la transcripció de gens antiinflamatoris (94), o inhibint la transcripció de gens pro-inflamatoris com COX-2, IL-6 i IL-8 i d'altres citocines (81,83,90,91,93–98). El complex GC- $\text{RG}\alpha$ pot actuar també al citoplasma produint una reducció de proteïnes i ARNm de mediadors inflamatoris com IL-5, IL-6, IL-8 (80,83,91,93,97) [Figura 6]. Un cop finalitzada l'acció del GC, el $\text{RG}\alpha$ queda lliure i serà degradat (12,83,90).

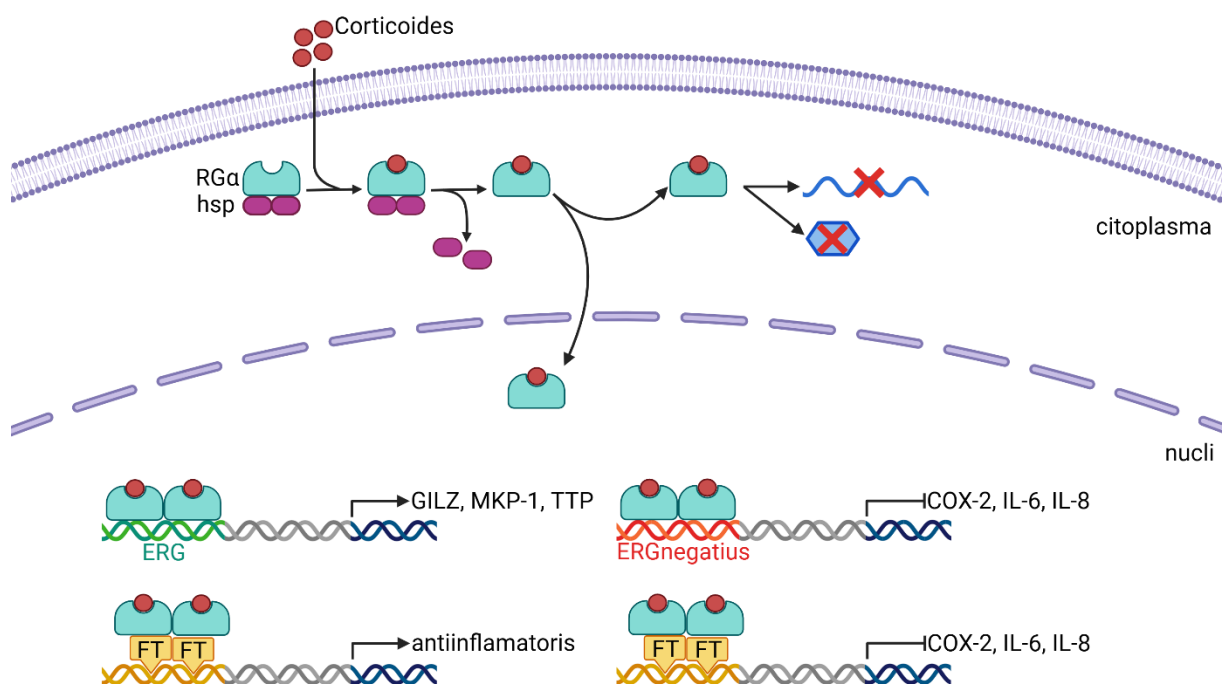


Figura 6: Mecanisme d'acció dels corticoides.

Quan el corticoide s'uneix al seu receptor en el citoplasma es dona un canvi conformacional, s'allibera de les hsp i el complex GC- $\text{RG}\alpha$ es transloca al nucli. Un cop al nucli, unint-se als ERG pot A) induir la transcripció de gens antiinflamatoris o B) inhibir la de gens proinflamatoris. També pot fer aquestes accions de forma indirecta C) i D) unint-se a factors de transcripció. A més a més, pot actuar al citoplasma E) desestabilitzant proteïna o ARNm de mediadors proinflamatoris.

$\text{RG}\alpha$: Receptor de glucocorticoides alfa, hsp: proteïna de xoc tèrmic, ERG: elements de resposta als glucocorticoides, FT: factors de transcripció.

Adaptada de Pujols 2015.

També hi ha uns mecanismes secundaris de l'acció dels corticoides que es donen per la sobreexpressió de TTP, MKP-1 i GILZ. Per una banda, TTP s'uneix a l'ARNm diana per a que se'n produeixi una ràpida degradació (94). D'altra banda, la inducció d'MKP-1 provoca una inactivació de la via MAPK involucrada en processos cel·lulars com l'apoptosi o la mitosi (94). Finalment, l'expressió induïda de GILZ bloqueja la expressió i transcripció de mediadors proinflamatoris com COX-2 o IL-6 (82,93).

3.1.3. Evidències d'estudis anteriors

Els corticoides han estat àmpliament examinats tant en estudis *in vivo* en pacients com en estudis *in vitro* al laboratori en relació a les malalties inflamatòries de la via respiratòria superior, ja sigui RA (99–102) o RSC (103,104). De la gran quantitat de dades que hi ha disponibles es podria destacar que els corticoides redueixen el número d'eosinòfils (99,102,104) i la secreció d'IL-6 (99,103), IL-8 (99), GM-CSF (101) i PGE₂ (100) en mostres nasals.

Tots aquests mediadors tenen un paper rellevant en aquestes malalties inflamatòries. La IL-6 intervé en la producció d'immunoglobulines i en l'estimulació de limfòcits T (105), la IL-8 atrau i promou la desgranulació principalment dels neutròfils però també dels mastòcits i els basòfils (106), el GM-CSF afavoreix la infiltració i supervivència d'eosinòfils (107) i la PGE₂ participa en el manteniment de la inflamació de tipus 2.

3.2. Antihistamínics H₁

Els AH de primera generació, com la clorfeniramina i la hidroxicina, es caracteritzen pels seus efectes adversos amb propietats sedants i anticolinèrgiques (31). En canvi, els antihistamínics de segona generació, ja siguin intranasals com l'azelastina i la olopatadina, o bé orals com la loratadina, la desloratadina, la cetiricina, la levocetiricina, l'ebastina, la rupatadina o la bilastina, mantenen una alta eficàcia sense efectes sedants, anticolinèrgics o d'increment de pes (31,48,108).

Els antihistamínics de segona generació solen emprar-se actualment per al tractament de malalties amb un component al·lèrgic com la rinitis al·lèrgica (31), tot i que poden tenir també un cert efecte antiinflamatori (11,31), incloent l'efecte anti-PAF (109)

Pel que fa a les vies d'administració, en trobem de dos tipus, els orals i els tòpics, que poden ser intranasals o oculars. Els AH orals són efectius de forma ràpida per a la millora dels símptomes nasals, oculars i la qualitat de vida (31,48,50,53,110,111). Els tòpics, ja siguin intranasals o oculars, tenen una acció molt més ràpida que els orals (31,55), actuant de forma localitzada (31,38,53,110), essent ben tolerats i induint molt pocs efectes adversos (31).

3.2.1. Accions fisiològiques

Els AH redueixen els nivells de mediadors proinflamatoris com la PGE_2 , la IL-6, la PGD_2 o la COX-2 i bloquegen la infiltració de cèl·lules inflamatòries com ells eosinòfils. Tot això provoca una reducció de la congestió nasal, la rinorrea, els esternuts i la picor nasal i ocular (88) i inclús una millora de la pèrdua de l'olfacte (112). Els AH estan indicats en malalties al·lèrgiques com la RA; però també per al tractament de la RSCaPN quan els pacients tenen associada una rinitis al·lèrgica (18,22).

3.2.2. Mecanisme d'acció

Existeixen quatre tipus de receptor de la histamina, però el principal implicat en les malalties respiratòries al·lèrgiques és el receptor H_1 (108,113,114).

La histamina actua com a modulador de la inflamació i de la reacció al·lèrgica (114). Quan la histamina és alliberada pels mastòcits i basòfils (48,108,114) s'uneix al receptor H_1 de la membrana cel·lular (108) provocant-ne un canvi de conformació,

d'inactiva a activa, i desencadena una cascada de senyals intracel·lulars (113). Aquest procés acaba provocant una resposta inflamatòria amb l'alliberament de mediadors proinflamatoris, la secreció de moc, la generació de prostaglandines, l'estimulació de la tos i el reclutament o quimiotaxi de cèl·lules proinflamatòries (48,108,114) [Figura 7].

Els antihistamínics bloquegen l'acció de la histamina canviant la conformació del seu receptor específic H₁ (115), d'estat actiu a estat inactiu (116) [Figura 7]. Aquest bloqueig impedeix la cascada de senyals intracel·lulars i bloqueja la resposta inflamatòria.

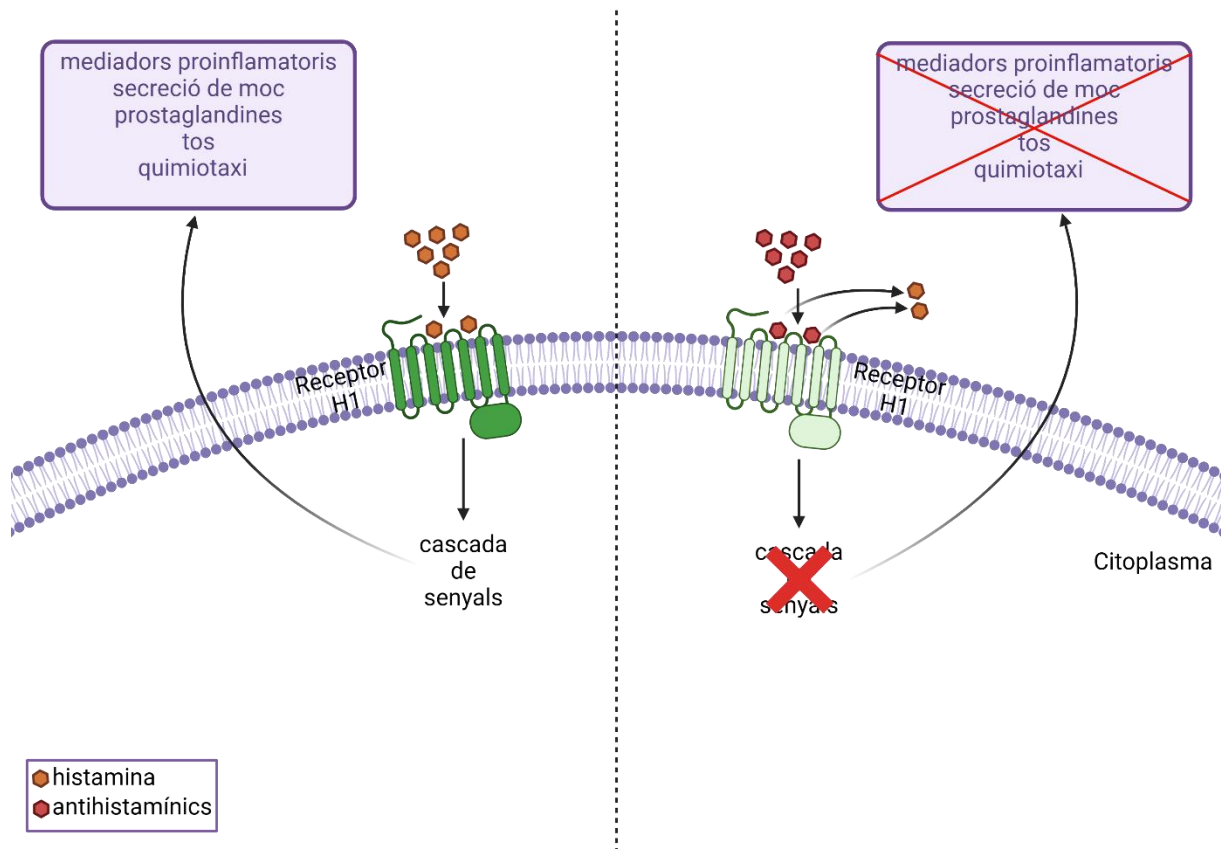


Figura 7: Mecanisme d'acció dels antihistamínics.

Els antihistamínics bloquegen la unió de la histamina al seu receptor H₁, impedit la cascada de senyals que desencadenaria en l'alliberament de mediadors proinflamatoris.

Adaptada de Simons and Simons 2009.

Malgrat que l'efecte antial·lèrgic dels AH ha estat àmpliament estudiat, el component antiinflamatori descrit per a alguns d'aquests fàrmacs no s'ha investigat extensament llevat les propietats anti-PAF d'alguns com la rupatadina (109). La recerca de quins mediadors o gens són responsables d'aquest efecte clínic antiinflamatori pot ser molt rellevant.

3.2.3. Evidències d'estudis anteriors

De forma similar als corticoides, els AH també fa molts anys que suscitaven interès en la recerca de les malalties al·lèrgiques com la RA. Així doncs, existeixen molts estudis que com a objectiu de la seva recerca tenen l'efecte dels AH en mediadors proinflamatoris com IL-6, IL-8, GM-CSF o COX-2 ja que tots ells participen activament de la inflamació de tipus 2.

Alguns d'aquests estudis han determinat que els AH en pacients amb RA redueixen el nombre d'eosinòfils en mucosa nasal (117), els nivells d'IL-6 en sèrum (118) i d'IL-8 en rentats nasals (119), l'expressió de productes intermedis de la via de l'àcid araquidònic en teixit de PN (120) i l'efecte del PAF (109).

3.3. Altres estratègies

Entre les diferents estratègies que existeixen per al tractament de les malalties inflamatòries cròniques de la via respiratòria superior, en destaquen les teràpies farmacològiques combinades (31,32,121).

3.3.1. Descripció

Aquestes teràpies farmacològiques combinades consisteixen en l'ús de dos o més fàrmacs diferents; com per exemple corticoides i antihistamínics (11) o antileucotriens i antihistamínics (122). Cada cop hi ha més estudis sobre el seu ús en la malaltia al·lèrgica o de tipus 2 en els casos que la teràpia clàssica sigui insuficient (31). La combinació de corticoides amb antihistamínics proporciona,

habitualment de forma més ràpida i potent, una millora augmentada dels símptomes respecte a la monoteràpia així com una millora de la qualitat de vida dels pacients (32,53,110,123–125). No obstant, alguns estudis no han pogut determinar aquesta major eficàcia clínica de la teràpia combinada en associacions de propionat de fluticasona com a corticoide amb levocetiricina (126) o cetiricina (127) com a antihistamínic.

S'han realitzat multitud d'estudis i assajos clínics sobre la combinació de corticoides i antihistamínics en pacients amb RA. Actualment, les dues més testades i emprades són la combinació del propionat de fluticasona (PF) i el clorhidrat d'azelastina (AZE) (39,49,51–53,55,59,110,111,125,128) i la del furoat de mometasona i clorhidrat d'olopatadina (123,124,129–132). Ambdues formulacions presenten una ràpida millora dels símptomes i una bona tolerància en els pacients amb RA (49,55,110,123–125,131). Malgrat tots aquests assajos clínics i estudis en pacients, el mecanisme d'acció d'aquest efecte clínic superior de la combinació sobre el tractament en monoteràpia, incloent el de la combinació de fluticasona i azelastina, no ha estat àmpliament estudia, apart d'un estudi *in vitro* de la combinació de furoat de mometasona amb desloratadina (11).

3.3.2. Mecanisme d'acció

D'una banda, la combinació de corticoide i antihistamínic podria combinar sinèrgicament el mecanisme d'acció dels corticoides i els antihistamínics (55). Així doncs, es donaria un efecte sinèrgic en el que el corticoide induiria una potent activitat antiinflamatòria amb l'expressió de molècules antiinflamatòries i la inhibició de marcadors proinflamatoris, sumant-hi els beneficis del bloqueig de la reacció al·lèrgica per part de l'antihistamínic (38). També reduiria la infiltració d'eosinòfils a les vies aèries de forma més potent.

Un estudi del nostre grup suggereix que la reducció de la secreció d'IL-6 i de la supervivència dels eosinòfils podria ser un dels mecanismes responsables d'aquesta eficàcia clínica superior (11). No obstant, cal poder definir millor i més precisament quin és el mecanisme o mecanismes que condueixen a aquest superior efecte clínic, tant a nivell molecular com cel·lular.

4. MP-AzeFlu

4.1. Descripció

MP-AzeFlu és una formulació intranasal comercialitzada (38,53) i indicada per al tractament de rinitis al·lèrgica moderada-greu (39,53,55,58,59,125). Aquesta formulació intranasal conté, a dosis fixes i en un sol esprai, PF i AZE (38,49,51–53,55,58,59,110,111,125,128).

S'ha demostrat que l'MP-AzeFlu és més efectiu que el corticoides intranasal (PF) per al tractament de la RA, proporcionant un alleugeriment superior dels símptomes nasals i oculars (49,51) i millorant la qualitat de vida dels pacients (39), tant en assajos clínics (59,128) com en estudis de vida real (39,49,51,53,110,111,125). També hi ha meta-anàlisis d'aquests i altres assajos clínics que consoliden aquesta eficàcia clínica superior (55,58).

Els efectes adversos de l'MP-AzeFlu coincideixen amb els reportats pels seus components de forma individual, PF o AZE, que solen ser lleus i ben tolerats, essent baixa la seva incidència a llarg termini (52,59). No obstant això, la presència d'azelastina sol deixar un regust amargant en els pacients tractats (134,135).

MP-AzeFlu és una combinació que compleix les necessitats i expectatives dels pacients ja que presenta una acció ràpida, efectes tant en simptomatologia nasal com ocular, un major control de la malaltia (38), una millora de la gravetat i una reducció de la pèrdua d'olfacte (136). Aquestes característiques podrien millorar l'adherència al tractament, la gestió de la malaltia i, en global, la qualitat de vida dels pacients (38,50).

Ara bé, aquesta formulació està només indicada per al tractament de la RA moderada-greu però no pas per a la RSC. Així doncs, caldria determinar si MP-

AzeFlu també presenta un major efecte antiinflamatori per a altres patologies, com ara la RSC.

4.2. Mecanisme d'acció

Per una banda, tal i com s'ha comentat anteriorment, MP-AzeFlu podria estar exercint el seu efecte clínic superior degut a la sinèrgia de l'efecte antiinflamatori del PF i l'efecte antial·lèrgic i antiinflamatori de l'AZE (38,55). D'altra banda, les propietats físiques (viscositat, pH i mida de les gotes) de l'MP-AzeFlu permeten una millor distribució i una major permanència que podrien explicar també aquesta eficàcia clínica superior (38,51).

4.3. Evidències prèvies

En la darrera dècada, s'han destinat molts esforços en estudiar els aspectes clínics de l'MP-AzeFlu; tractant-se principalment d'assajos clínics en diferents fases per comprovar la seva seguretat i eficàcia així com estudis vida real en pacients. No obstant, els estudis de recerca translacional sobre el seu mecanisme d'acció han estat molt escassos.

4.3.1. Estudis clínics

Molts assajos clínics i estudis en pacients a Europa i els Estats Units han provat l'efecte clínic de l'MP-AzeFlu en pacients amb RA moderada-greu. S'ha comprovat que l'MP-AzeFlu millora els símptomes nasals, tant de forma global emprant el qüestionari TNSS (58,59,128) o l'EVA (39,49,51,53,110,111,125,128) com individualment (58,59). De forma similar, s'ha provat que l'MP-AzeFlu redueix la simptomatologia ocular mesurada amb el qüestionari TOSS (58,59). No només això, alguns d'aquests estudis reporten millors puntuacions en els tests d'olfacte i gravetat de la RA (136), millores en l'estat de la mucosa nasal (53) i un clar impacte positiu en la qualitat de vida, en la son i en les activitats diàries (39,53,110,125).

A més a més, aquest efecte es dona de forma més ràpida (49,51,53,59,111,125), amb major rellevància clínica (59,111) i més sostingut en el temps (49,51,53,59,125) que amb l'ús del corticoide en monoteràpia. També en comparació amb l'ús del corticoide, l'MP-AzeFlu proporciona el control de la malaltia mesurat per EVA a un major número de pacients i l'absència de simptomatologia durant més dies (49,51,53,59,111,125).

Finalment, i pel que fa a la tolerància, tots els estudis que la van valorar determinen que l'MP-AzeFlu té una bona tolerància i pocs efectes adversos (39,49,51,110,111,125), essent els més destacats l'alteració del gust o disgèusia (39,55,110,111), el sagnat del nas o epistaxi (39,55,110,111) i la dificultat per respirar o dispnea (39,110).

Degut a que l'MP-AzeFlu no està indicat per al tractament de la RSC i no se n'han fet estudis, es desconeix l'efecte que podria tenir en la simptomatologia, la qualitat de vida i control d'aquesta malaltia.

4.3.2. Recerca bàsica/translacional sobre el mecanisme d'acció

El nostre grup ha estudiat prèviament l'efecte de la combinació de corticoides i antihistamínics en models *in vitro* per tal d'elucidar els mecanismes moleculars i cel·lulars que hi participen (11). Fins al moment, s'ha demostrat que l'MP-AzeFlu inhibeix significativament la supervivència d'eosinòfils induïda pel medi condicionat per cèl·lules epitelials humanes i que ho fa de forma superior a la monoteràpia amb l'azelastina o la fluticasona (137). No obstant, aquest efecte no seria suficient per a explicar la major eficàcia clínica de l'MP-AzeFlu.

5. Pregunta científica

La recerca bàsica i translacional esdevé doncs una estratègia essencial per tal de poder conèixer quins són els mecanismes responsables de l'efecte clínic superior que l'MP-AzeFlu presenta sobre els fàrmacs en monoteràpia (PF i AZE) en pacients amb RA moderada-greu. A més a més, aprofundir en els mecanismes d'acció d'aquesta formulació permetrà determinar les vies implicades en la seva acció i si aquestes hi participen en altres patologies inflamatòries de la mucosa respiratòria nasosinusal com ara la RSCaPN.



HIPÒTESI

Estudis previs realitzats en pacients amb rinitis al·lèrgica moderada-greu mostren una eficàcia clínica superior i un millor control dels símptomes per part de la formulació intranasal MP-AzeFlu en comparació amb els seus components en monoteràpia, propionat de fluticasona i clorhidrat d'azelastina. No obstant, encara no es coneixen completament els mecanismes d'acció responsables d'aquesta superior eficàcia clínica en la simptomatologia i qualitat de vida.

D'altra banda, l'MP-AzeFlu no disposa d'indicació per al tractament de la rinosinusitis crònica amb o sense pòlips nasals. Donat que la RSC i la RA comparteixen part de la fisiopatologia, presentant ambdues inflamació tipus 2; podria existir la possibilitat que l'MP-AzeFlu també fos capaç d'actuar sobre els mecanismes involucrats en la patogènia de la RSC, predominantment en la RSCaPN.

Degut a que estudiar mecanismes d'acció de fàrmacs en pacients sol tenir limitacions importants tant per la quantitat de la mostra com per les condicions experimentals, aquesta tesi analitza alguns dels potencials mecanismes d'acció responsables d'aquesta eficàcia clínica superior de l'MP-AzeFlu en models *in vitro* d'inflamació de vies respiratòries superiors.

La hipòtesi d'aquesta tesi és que, en models humans *in vitro* d'inflamació eosinofílica i d'inflamació en fibroblasts de vies respiratòries superiors, l'MP-AzeFlu presenta uns efectes antiinflamatoris superiors sobre la inflamació eosinofílica, les citocines proinflamatòries, els gens antiinflamatoris i els eicosanoides en comparació als fàrmacs de la formulació emprats en monoteràpia.



OBJECTIUS

1. Determinar l'efecte antiinflamatori de l'MP-AzeFlu, en comparació amb els fàrmacs en monoteràpia, en un model *in vitro* d'inflamació eosinofílica sobre:
 - La secreció d'interleucina 6, interleucina-8 i factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags per part de les cèl·lules epitelials.
 - La supervivència dels eosinòfils induïda per secrecions epitelials.
2. Estudiar l'efecte inhibidor de l'MP-AzeFlu sobre els mediadors proinflamatoris, en comparació amb els fàrmacs en monoteràpia, en un model *in vitro* de fibroblasts de mucosa nasal i de pòlips nasals sobre:
 - L'expressió gènica i la secreció d'interleucina 6, interleucina-8 i factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags.
 - L'expressió gènica i la secreció d'altres citocines proinflamatòries.
3. Valorar l'efecte inductor de l'MP-AzeFlu sobre l'expressió de gens antiinflamatoris, en comparació amb els fàrmacs en monoteràpia, en un model *in vitro* de fibroblasts de mucosa nasal i de pòlips nasals sobre:
 - L'expressió gènica i proteica del glucocorticoid-induced leucine-zipper.
 - L'expressió gènica i proteica de la proteïna quinasa fosfatasa activada per mitògens 1.
 - Expressió gènica i proteica de tristetraprolina.
4. Establir l'efecte de l'MP-AzeFlu en el metabolisme de l'àcid araquidònic en un model *in vitro* de fibroblasts de mucosa nasal i de pòlips nasals sobre:
 - Expressió gènica i proteica de les isoformes de ciclooxigenasa, 1 i 2.
 - Secreció de prostaglandines, D₂ i E₂.
 - Expressió gènica i proteica dels receptors de PGE₂, 2 i 3.

A purple-tinted background image of a laboratory setting. In the foreground, there are several pieces of glassware: a round-bottom flask on the left containing a dark liquid, a rack of test tubes in the center, and another round-bottom flask on the right. A person wearing a white lab coat and gloves is visible in the background, working with the equipment. The overall scene is dimly lit, with the purple tint dominating the color palette.

MÈTODES I RESULTATS

ESTUDI 1: Efecte superior de l'MP-AzeFlu al de l'azelastina o el propionat de fluticasona en monoteràpia en la reducció de marcadors inflamatoris.

Jordi Roca-Ferrer, Laura Pujols, Maria Pérez-González, Isam Alobid, Borja Callejas, **Sònia Vicens-Artés**, Mireya Fuentes, Antonio Valero, César Picado, Dennis Castor, DucTung Nguyen, Joaquim Mullol.

Allergy Asthma Clin Immunol. 2018 Dec;18:14:86.

DOI: 10.1186/s13223-018-0311-4.

Antecedents: L'MP-AzeFlu, una formulació intranasal de clorhidrat d'azelastina (AZE) i propionat de fluticasona (PF), és superior a la monoteràpia amb AZE o PF per al tractament de la rinitis al·lèrgica moderada-greu. Tanmateix, no s'ha caracteritzat el mecanisme d'acció antiinflamatori precís darrere aquesta eficàcia clínica superior de l'MP-AzeFlu.

Objectiu: Investigar els efectes antiinflamatoris de l'MP-AzeFlu, en comparació amb AZE i PF en monoteràpia, en un model *in vitro* establert d'inflamació eosinofílica.

Mètodes: Es van obtenir cèl·lules epitelials de mucosa nasal i eosinòfils de sang perifèrica de voluntaris humans sotmesos a cirurgia correctiva nasal. Les cèl·lules epitelials es van estimular amb sèrum boví fetal (SBF) al 10% en presència d'MP-AzeFlu, AZE o PF (dilució 1:10² a 1:10⁵). Les concentracions d'IL-6, IL-8 i GM-CSF es van mesurar mitjançant ELISA. Els eosinòfils es van incubar en un 10% de medi condicionat per cèl·lules epitelials humanes (hECM) i es va avaluar la supervivència mitjançant l'exclusió del colorant blau de tripà. Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de la mitjana del percentatge de secreció/supervivència, en comparació amb SBF/hECM, respectivament.

Resultats: Es va detectar una reducció significativa, en comparació amb els controls positius, FBS i hECM, de la secreció d'IL-6 i de la supervivència dels eosinòfils per part del PF i l'MP-AzeFlu a totes les dilucions ($1:10^2$ a $1:10^5$) i per part d'AZE a una sola dilució ($1:10^2$). A la dilució $1:10^2$, la secreció d'IL-6 va ser significativament menor amb l'MP-AzeFlu (38,3 %, en comparació amb SBF = 100 %) que amb AZE (76,1 %) o PF (53,0 %). A la dilució $1:10^2$, la supervivència dels eosinòfils va ser significativament menor amb l'MP-AzeFlu al dia 3 (17,5 %) i al dia 4 (2,4 %) respecte al hECM (100%) que amb AZE (dia 3: 75,2 %; dia 4: 44,0 %) o PF (dia 3: 38,5 %; dia 4: 14,6 %).

Conclusió: La superior reducció de la secreció d'IL-6 i de la supervivència dels eosinòfils observades amb l'MP-AzeFlu en aquest model *in vitro* podria ser un dels mecanismes associats a aquesta eficàcia clínica superior de l'MP-AzeFlu enfront de la monoteràpia amb AZE o PF observada en pacients amb rinitis al·lèrgica moderada-greu.

RESEARCH

Open Access



Superior effect of MP-AzeFlu than azelastine or fluticasone propionate alone on reducing inflammatory markers

Jordi Roca-Ferrer^{1,2}, Laura Pujols^{1,2}, Maria Pérez-González^{1,2}, Isam Alobid^{1,2,3}, Borja Callejas^{1,2}, Sònia Vicens-Artés^{1,2}, Mireya Fuentes^{1,2}, Antonio Valero^{1,2,4}, César Picado^{1,2,4}, Dennis Castor⁵, DucTung Nguyen⁵ and Joaquim Mullol^{1,2,3*}

Abstract

Background: MP-AzeFlu, intranasal formulation of azelastine hydrochloride (AZE) and fluticasone propionate (FP), is superior to AZE or FP alone for treatment of allergic rhinitis (AR). However, the precise anti-inflammatory mechanism of action of MP-AzeFlu has not been characterized.

Objective: To investigate the anti-inflammatory effects of MP-AzeFlu compared with AZE or FP alone in an established in vitro model of eosinophilic inflammation.

Methods: Nasal mucosal epithelial cells and peripheral blood eosinophils were obtained from human volunteers. Epithelial cells were stimulated with 10% fetal bovine serum (FBS) in the presence of MP-AzeFlu, AZE, or FP (1:10² to 1:10⁵ dilution). Concentrations of interleukin (IL)-6, IL-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were measured by ELISA. Eosinophils were incubated in 10% human epithelial cell-conditioned medium (HECM) and survival assessed by trypan blue dye exclusion. Results are expressed as mean ± SEM percentage secretion/survival compared with FBS/HECM (respectively).

Results: FP and MP-AzeFlu (all dilutions) and AZE (1:10²) significantly reduced IL-6 secretion and eosinophil survival compared with positive controls. At 1:10² dilution, IL-6 secretion was significantly lower with MP-AzeFlu (38.3 ± 4.2%, compared with FBS = 100%) than with AZE (76.1 ± 4.9%) or FP (53.0 ± 4.9%). At 1:10² dilution, eosinophil survival was significantly lower with MP-AzeFlu at day 3 (17.5 ± 3.0%) and day 4 (2.4 ± 1.4%, compared with HECM = 100%) than with AZE (day 3: 75.2 ± 7.2%; day 4: 44.0 ± 9.7%) or FP (day 3: 38.5 ± 3.5%; day 4: 14.6 ± 4.0%).

Conclusion: Greater reductions in cytokine secretion and eosinophil survival observed with MP-AzeFlu in vitro may underlie MP-AzeFlu's superior clinical efficacy vs. AZE or FP alone observed in AR patients.

Keywords: Cytokines, Eosinophil survival, Nasal mucosa, Epithelial cells, MP-AzeFlu, Azelastine, Fluticasone propionate, Allergic rhinitis, In vitro model

Background

Allergic rhinitis (AR) is one of the most common chronic diseases, impairing quality of life and causing billions of dollars of lost productivity annually [1]. AR is characterized by upper airway inflammation,

sneezing, and nasal congestion, drainage, and itching [1]. Inflammatory mediators and cells in AR include elevated levels of proinflammatory cytokines and eosinophil infiltration [2–5].

Current guidelines recommend intranasal corticosteroids for treatment of AR and, in some cases, the use of oral or intranasal antihistamines [1, 6, 7]. Unfortunately, many patients do not achieve full control of their symptoms and are not satisfied with their treatment [8]. Combination therapy may

*Correspondence: jmullol@clinic.cat

³ Rhinology Unit & Smell Clinic, ENT Department, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

be considered for patients with inadequate response to monotherapy [1] or when a prompt response to initial therapy is desired [6]. In particular, combined intranasal azelastine hydrochloride (AZE) and intranasal fluticasone propionate (FP) in a single intranasal formulation (MP-AzeFlu) is recommended as more effective than monotherapy [8] and as a first-line option for moderate-to-severe AR [7, 8].

In randomized studies, MP-AzeFlu was more effective among patients with seasonal AR and perennial AR than AZE or FP alone, [9–13] and was more effective among patients with non-AR than FP alone [14]. In addition, studies in real-world settings in Europe found significant improvements in AR symptoms with MP-AzeFlu therapy, [15, 16] and a 1-year study of MP-AzeFlu vs. FP alone provided support for the long-term efficacy and safety of MP-AzeFlu in persistent rhinitis [17]. A retrospective US claim database study of AR patients with comorbid asthma has shown, that the AR and asthma related therapy costs were lower when the patients have been treated with MP-AzeFlu than with a free combination of intranasal steroid and intranasal antihistamine [18].

Mechanistic studies have examined the effect of FP (alone and in combination with the antihistamine loratadine) on the expression of inflammatory mediators, including proinflammatory cytokines and eosinophils [19–24]. Typically, FP downregulated cytokine expression and reduced eosinophil survival in these studies, although findings are mixed. In addition, AZE—alone or in combination with other agents—was found to suppress inflammatory markers in several in vitro studies [25–27]. However, the mechanism of action of combined AZE and FP, specifically MP-AzeFlu's effects on inflammatory mediators, has not been characterized. In particular, it is unknown whether there may be an enhanced anti-inflammatory effect of the two drugs in combination, compared with the individual components, which might underlie the superior clinical efficacy [9–14] of the combination compared with monotherapy.

To study the role of inflammatory mediators in upper airway diseases and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs in these diseases, an in vitro model was developed utilizing cultured primary isolated nasal mucosal epithelial cell cultures and peripheral blood eosinophils [28–31]. This in vitro model has been used previously to compare the anti-inflammatory effects of a number of drugs including corticosteroids, chromones, anti-leukotrienes, and second generation antihistamines, [24, 28–34] demonstrating that it is a good model to study the mechanisms of action of these classes of drugs. In a previous study using this in vitro model, the combination of the corticosteroid mometasone furoate

and the antihistamine desloratadine reduced interleukin (IL)-6 and (sICAM)-1 secretion and inhibited eosinophil survival induced by epithelial secretions compared with either agent alone [29].

The objective of the current study was to investigate the anti-inflammatory effects of MP-AzeFlu compared with AZE or FP alone in an established in vitro model of eosinophilic inflammation.

Materials and methods

Materials

AZE and FP were provided by MEDA Pharma (Bad Homburg, Germany). Other materials were purchased from commercial sources (see Additional file 1).

Study population

Nasal mucosa specimens were obtained from 12 patients (nine men, three women), ranging in age from 34 to 73 years (mean $\pm$ standard deviation, 58.2 ± 3.5 years), who underwent nasal corrective surgery for septal dysmorphism, turbinate hypertrophy, or both. The diagnosis of septal dysmorphism and turbinate hypertrophy was based on the clinical history and nasal endoscopic exploration. Skin-prick test was positive (allergen sensitization) in three patients (25.0%). None of the patients in this study had clinical AR, chronic rhinosinusitis (CRS), nasal polyps (NP), and/or asthma. Patients were excluded from this study if they were receiving topical or systemic glucocorticoids or antihistamine treatment 4 weeks prior to the surgery or had an upper or lower airway infection 2 weeks prior to the surgery. All patients gave informed consent to participate in the study at the time of surgery. Tissues used in this study were obtained from the Biobank BTIRCE—R100311-016 at Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Scientific and Ethics Committee of Hospital Clínic de Barcelona gave the ethical clearance for this process.

Normodense eosinophils were obtained from nine volunteers (seven women, two men), ranging in age from 39 to 74 years (mean $\pm$ standard deviation, 59.1 ± 13.6 years) with $>3\%$ peripheral blood eosinophils (mean $\pm$ standard deviation, $7.7 \pm 1.4\%$). Patients were excluded if they received topical or systemic glucocorticoid or antihistamine treatment 4 weeks prior to blood extraction or if they had an upper or lower airway infection two weeks prior to blood extraction. Skin-prick test was positive (allergen sensitization) in four patients (44%). Two of the patients had AR (22%), four patients had CRS with NP (44%), and three patients had CRS with NP and asthma (33%). All patients gave informed consent to participate in the study prior to the venipuncture. Scientific and Ethics Committee of Hospital Clínic de Barcelona gave the ethical clearance for this process.

Epithelial cell isolation, characterization, and culture

Nasal mucosa specimens were placed in Ham's F-12 medium supplemented with 100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 µg/mL amphotericin B (Ham's PS) and immediately transported to the laboratory. Epithelial cells from nasal mucosa were isolated by protease digestion using a technique reported previously [23, 24, 28–35] and described briefly in Additional file 1. Culture of epithelial cells is also described in Additional file 1.

Dilution of MP-AzeFlu

Both azelastine hydrochloride and fluticasone propionate were diluted with dimethyl sulfoxide (DMSO) up to 2.39×10^{-2} M and 7.29×10^{-3} M, respectively. These dilutions from each drug (tenfold concentrated compared with MP-AzeFlu) were diluted with culture medium to 2.39×10^{-3} M (azelastine) and 7.29×10^{-4} M (fluticasone), i.e., the concentration of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate present in MP-AzeFlu. Further dilutions (from dilution 1:10² to 1:10⁵) were prepared with culture medium.

Generation of human epithelial cell-conditioned media

When epithelial cell cultures reached 80% confluence, the hormonally defined serum-free media were switched to RPMI-1640 media supplemented with antibiotics (penicillin 100 UI/mL and streptomycin 100 µg/mL), amphotericin B (2 µg/mL), glutamine (150 µg/mL), and HEPES buffer (25 nM). Because previous studies have shown that non-stimulated epithelial cells produce low levels of cytokines, [23, 24, 28–35] human epithelial cell-conditioned media (HECM) was generated by incubating cells with fetal bovine serum (FBS) at 10% for 24 h. The culture supernatant (HECM) was harvested from wells, centrifuged at 400 g (10 min, 25 °C), sterilized through 0.22 µm filters, and stored at –80 °C. In order to reduce the variability, the conditioned media of nasal mucosa (N=12) was mixed before being used in eosinophil experimental protocols.

To study the effect of MP-AzeFlu on cytokine production, Ham's HD was switched to RPMI (1 mL) in the presence or absence of MP-AzeFlu (dilution 1:10² to 1:10⁵, as described in Additional file 1) or equivalent dilutions of AZE (from 2.39×10^{-5} M to 10^{-8} M) or FP (from 7.29×10^{-6} M to 10^{-9} M) for 1 h before the addition of 10% FBS. After 24 h, the supernatant was harvested from cultures, centrifuged at 400 g for 10 min at room temperature, sterilized through 0.22 µm filters, and stored at –80 °C until used. Because both AZE and FP were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) when preparing the MP-AzeFlu formulation, we investigated the effect of DMSO at the highest final concentration

present in the culture medium on epithelial cell viability and cytokine secretion.

Epithelial cell viability

Cell viability after treatment was analyzed by incubation of cells with the tetrazolium salt XTT (Cell Proliferation Kit II) for 3 h, following the manufacturer's instructions. Absorbance was measured in duplicate at 490 nM.

Enzyme-linked immunoassays of cytokines and sICAM-1

Concentrations of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-6, IL-8, and sICAM-1 were measured in HECM using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Cytokines selected for analysis were those found at detectable levels in previous studies in which this model was used. The assay detection ranges were 15.6–1000 pg/mL for GM-CSF, 9.38–600 pg/mL for IL-6, and 31.2–2000 pg/mL for both IL-8 and sICAM-1. To verify that the substances used in the different experiments (AZE, FBS, FP) did not affect the ELISA results, wells containing either culture media alone or media with the highest drug concentration used in the different protocols were compared (N=3). None of the substances showed any intrinsic effect on the ELISA final values. In order to avoid variability in cytokine concentration caused by differences in the number of cells present in each culture well, cytokine production was normalized by optical density value obtained by the cell proliferation assay.

Isolation of peripheral blood eosinophils

Isolation of eosinophils from peripheral blood samples is described in Additional file 1.

Assessment of eosinophil survival

Eosinophils (2.5×10^5 cells/well) were incubated on 24-well tissue culture plates with RPMI (2 mL) in the presence or absence of MP-AzeFlu (dilution 1:10² to 1:10⁵) or equivalent dilutions of AZE (from 2.39×10^{-5} M to 10^{-8} M) or FP (from 7.29×10^{-6} M to 10^{-9} M) for 1 h before the addition of epithelial cell secretions at 10%. Eosinophil survival index was assessed at 24 h (day 1), 48 h (day 2), 72 h (day 3), and 96 h (day 4) of incubation by trypan blue dye exclusion. Because dead eosinophils become lysed and, consequently, the number of cells present in the culture wells decreases, the results were calculated using the eosinophil survival index instead of the percentage of surviving cells. The eosinophil survival index was calculated as follows: number of eosinophils recovered multiplied by percentage of eosinophil viability divided by number of eosinophils delivered on day 0.

To reduce the variability caused by the incubation of eosinophils with HECM obtained from different nasal mucosa, a mixture of HECM was created with the cell supernatants from all nasal mucosal epithelial cell cultures, and this HECM was used in all eosinophil experimental protocols. Because FP was diluted in DMSO and the HECM added to the eosinophil cultures contained 10% FBS, we investigated the effect of DMSO and FBS on eosinophil survival. Neither DMSO nor FBS at the higher final concentration had a significant effect on eosinophil survival (data not shown).

Statistical analysis

Statistical procedures were performed using SPSS 16.0 software (IBM, Armonk, NY, USA). Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean normalized by the optical density value obtained by the cell proliferation assay. A non-parametric test, the Wilcoxon signed rank test, was used in cytokine secretion experiments, and analysis of variance (ANOVA) with the Dunnett multiple comparisons test was used for statistical comparisons in eosinophil survival experiments. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effect of FBS on cytokine and sICAM-1 secretion

In nasal mucosal epithelial cell cultures, FBS increased the secretion of IL-6, IL-8, GM-CSF, and sICAM-1 compared with control medium (Table 1).

Dose response of MP-AzeFlu, AZE, and FP on cytokine and sICAM-1 secretion induced by FBS in nasal mucosal epithelial cells

AZE at $1:10^2$ dilution significantly inhibited FBS-induced IL-6 release and increased FBS-induced GM-CSF secretion from nasal mucosal epithelial cells compared with FBS alone (Table 2). FP showed a dose-dependent inhibitory

effect on FBS-induced secretion of IL-6, IL-8, and GM-CSF at $1:10^2$ to $1:10^5$ dilutions. MP-AzeFlu, at dilutions $1:10^2$ to $1:10^5$, showed a dose-dependent inhibitory effect on FBS-induced secretion of IL-6 and IL-8. GM-CSF secretion was inhibited by MP-AzeFlu from $1:10^3$ to $1:10^5$ dilutions, with no effect at $1:10^2$ dilution. AZE, FP, and MP-AzeFlu showed no effect on FBS-induced sICAM-1 secretion.

Comparison of MP-AzeFlu, AZE, and FP effects on FBS-induced cytokine secretion at the same drug dilutions

When comparing the effect of FP with MP-AzeFlu (from dilutions $1:10^2$ to $1:10^5$), there were no significant differences on the inhibition of GM-CSF or IL-8 secretion. However, with each drug at dilution $1:10^2$, the inhibitory effect of MP-AzeFlu on IL-6 secretion was significantly greater than that of AZE or FP, as shown by the lower levels of IL-6 secretion with MP-AzeFlu (Fig. 1; see Table 2 for underlying findings at dilution $1:10^2$). In addition, the effect of FP was significantly greater than the effect of AZE. At higher dilutions ($1:10^3$ to $1:10^5$) of FP and MP-AzeFlu, there were no significant differences between drugs in the inhibition of IL-6 secretion.

Time course of MP-AzeFlu (dilution $1:10^2$) effects on HECM-induced eosinophil survival from days 1 to 4

HECM at 10% from nasal mucosal epithelial cells significantly increased eosinophil survival when compared with control medium from days 1 to 4 (Fig. 2). MP-AzeFlu at $1:10^2$ dilution showed a time-dependent inhibitory effect on HECM-induced eosinophil survival from days 2 to 4.

Dose response and time course of MP-AzeFlu, AZE, and FP on HECM-induced eosinophil survival at days 3 and 4

At days 3 and 4, MP-AzeFlu and FP (dilution $1:10^2$ to $1:10^5$) significantly inhibited HECM-induced eosinophil survival (Table 3). However, AZE showed an inhibitory effect only at dilution $1:10^2$. At days 3 and 4, the inhibitory effect of MP-AzeFlu at dilution $1:10^2$ was significantly greater than either AZE or FP at the same dilution, as shown by the lower levels of eosinophil survival with MP-AzeFlu (Fig. 3, see Table 3 for underlying findings at dilution $1:10^2$). In addition, the effect of FP at dilution $1:10^2$ was significantly greater than the effect of AZE at the same dilution. No differences were found when comparing the inhibitory effect of FP with that of MP-AzeFlu from dilutions $1:10^3$ to $1:10^5$.

Discussion

This report shows clear mechanistic effects that are consistent with and may underlie the superior clinical efficacy of MP-AzeFlu compared with corticosteroid or antihistamine alone.

Table 1 Effect of FBS on cytokine secretion from epithelial cells

	pg/mL normalized by tetrazolium XTT		P	N
	Control	10% FBS		
IL-6	679.9 $\pm$ 189.2	2448.0 $\pm$ 539.7	<0.001	9
IL-8	4119.0 $\pm$ 987.3	12,685.0 $\pm$ 1624.0	<0.001	9
GM-CSF	163.1 $\pm$ 40.7	820.2 $\pm$ 257.8	<0.001	9
sICAM-1	287.7 $\pm$ 63.4	439.6 $\pm$ 101.6	<0.05	9

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. The Wilcoxon signed-rank test was used for analysis

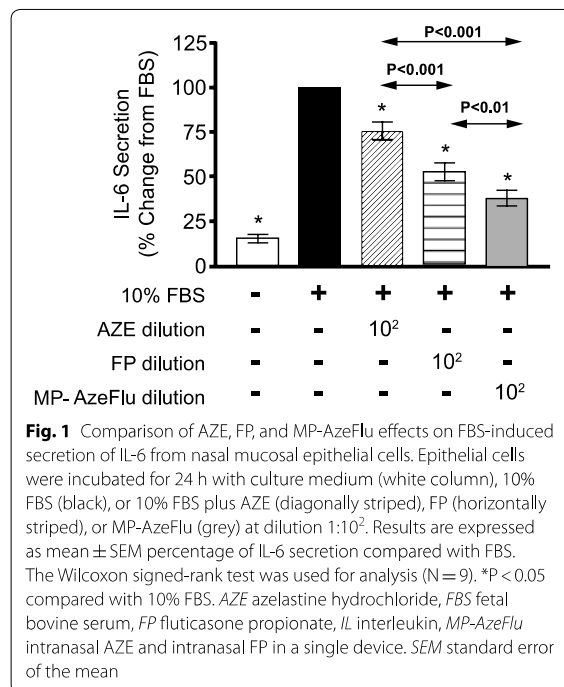
FBS fetal bovine serum, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL interleukin, SEM standard error of the mean, sICAM-1 soluble intercellular adhesion molecule-1

Table 2 Effect of AZE, FP, and MP-AzeFlu on cytokine and sICAM-1 secretion from nasal mucosal epithelial cells

Agent/dilution	Secretion, compared with FBS (%)				N
	IL-6	IL-8	GM-CSF	sICAM-1	
Control media	15.3 ± 2.1*	18.0 ± 2.7*	44.3 ± 4.7*	65.9 ± 5.1*	9
10% FBS	100	100	100	100	9
AZE					
1:10 ²	76.1 ± 4.9*	90.1 ± 5.8	223.5 ± 34.9*	95.2 ± 2.3	9
1:10 ³	88.7 ± 4.3	87.0 ± 5.9	93.8 ± 6.0	92.8 ± 4.6	9
1:10 ⁴	84.6 ± 8.3	93.3 ± 3.3	89.7 ± 5.8	96.9 ± 1.8	9
1:10 ⁵	90.1 ± 3.8	91.0 ± 5.3	87.6 ± 3.8	98.9 ± 1.1	9
FP					
1:10 ²	53.0 ± 4.9*	58.5 ± 2.3*	58.2 ± 5.9*	85.2 ± 3.5	9
1:10 ³	59.1 ± 5.4*	62.0 ± 5.7*	60.2 ± 5.8*	81.8 ± 5.4	9
1:10 ⁴	57.7 ± 6.6*	60.4 ± 3.6*	56.2 ± 6.5*	87.0 ± 3.4	9
1:10 ⁵	75.3 ± 6.9*	65.4 ± 5.9*	65.0 ± 7.2*	84.9 ± 7.3	9
MP-AzeFlu					
1:10 ²	38.3 ± 4.2*	55.3 ± 3.4*	126.9 ± 9.8	84.0 ± 4.8	9
1:10 ³	55.0 ± 6.5*	60.8 ± 4.6*	61.7 ± 5.7*	86.3 ± 6.0	9
1:10 ⁴	52.9 ± 3.1*	60.8 ± 3.2*	57.9 ± 5.3*	92.7 ± 3.2	9
1:10 ⁵	72.4 ± 7.5*	65.1 ± 5.2*	69.7 ± 7.5*	88.9 ± 2.3	9

Results are expressed as mean ± SEM. The Wilcoxon signed-rank test was used for analysis. *P < 0.05 compared with 10% FBS-induced secretion

AZE azelastine hydrochloride, FBS fetal bovine serum, FP fluticasone propionate, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL interleukin, MP-AzeFlu intranasal AZE and intranasal FP in a single device, SEM standard error of the mean, sICAM-1 soluble intercellular adhesion molecule-1



Key findings of this study include: (1) FP and MP-AzeFlu at all tested dilutions, and AZE at 1:10² dilution, significantly reduced secretion of IL-6 compared with FBS-induced secretion; (2) at 1:10² dilution of each agent, the reduction of IL-6 secretion by MP-AzeFlu was significantly greater than with AZE or FP alone; (3) FP and MP-AzeFlu, at all tested dilutions, and AZE at dilution 1:10², significantly reduced eosinophil survival at days 3 and 4 compared with HECM alone; and (4) at 1:10² dilution of each agent, the decrease of eosinophil survival induced by MP-AzeFlu at days 3 and 4 was significantly greater than with AZE or FP alone.

Findings of the current study are largely consistent with previous research with this in vitro model, further validating the model. As in earlier studies, we found that secretion of IL-6, IL-8, GM-CSF, and sICAM-1 from nasal mucosa epithelial cells was increased in response to FBS, [23, 24, 28–31, 35] and HECM increased eosinophil survival [24, 28–31].

In the present study, the corticosteroid FP and the formulation MP-AzeFlu reduced IL-6 and GM-CSF secretions from nasal mucosa epithelial cells relative to FBS. This is consistent with previous findings for the intranasal corticosteroids budesonide, beclomethasone dipropionate, mometasone furoate, FP, and fluticasone furoate [23, 24, 29, 30, 35]. In this study, MP-AzeFlu findings for IL-8, GM-CSF, and sICAM-1 differed little from FP alone. We also found that FP and MP-AzeFlu reduced eosinophil survival relative to HECM, consistent with previous findings for intranasal corticosteroids [24, 29, 30].

In the present study, the antihistamine AZE reduced IL-6 and GM-CSF secretion and eosinophil survival only at 1:10² dilution. These reductions are consistent with previous findings for the antihistamine desloratadine [29, 31]. Our findings for AZE are also consistent with those of previous in vitro studies that found AZE decreased inflammatory markers [25–27]. A possible mechanism for these effects has been suggested by research showing that AZE exhibits direct activity on transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in mouse neuronal cells [36]. We found that AZE did not significantly reduce ICAM-1 expression, in contrast to an earlier study that found such a reduction [37].

The stronger effects of MP-AzeFlu on IL-6 secretion and eosinophil survival in the current study, compared with either AZE or FP alone, mirror and possibly underlie the stronger clinical efficacy of the MP-AzeFlu combination compared with its components [9–14]. The relative magnitude of in vitro effects for MP-AzeFlu vs. AZE or FP alone (Figs. 1, 3) appear similar to the relative magnitude of clinical effects of these agents in treatment of AR. For example, the reduction in total nasal symptom

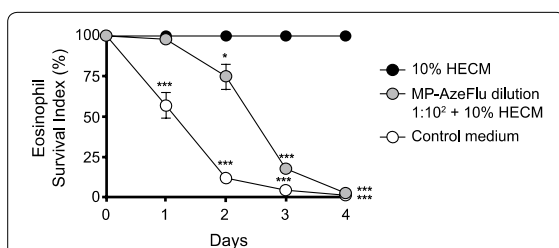


Fig. 2 Time course of MP-AzeFlu effects on HECM-induced eosinophil survival. HECM at 10% from nasal mucosa (black circles) significantly increased eosinophil survival compared with control medium (white circles) from days 1 to 4. MP-AzeFlu (grey circles) at dilution 1:10² significantly decreased eosinophil survival induced by HECM from days 2 to 4. Results are expressed as mean $\pm$ SEM percentage of eosinophil survival compared with HECM. ANOVA with the Dunnett multiple comparison test was used for analysis (N = 7). *P < 0.05; ***P < 0.001 compared with HECM. ANOVA analysis of variance, HECM human epithelial cell-conditioned media, MP-AzeFlu intranasal azelastine hydrochloride and intranasal fluticasone propionate in a single device. SEM standard error of the mean

Table 3 Effect of AZE, FP, and MP-AzeFlu on eosinophil survival induced by human epithelial cell-conditioned media

Dilution	Eosinophil survival index, compared with HECM (%)		N
	Day 3	Day 4	
Control media	4.3 $\pm$ 0.8*	0.8 $\pm$ 0.5*	7
10% HECM	100	100	7
AZE			
1:10 ²	75.2 $\pm$ 7.2*	44.0 $\pm$ 9.7*	7
1:10 ³	93.7 $\pm$ 3.5	78.8 $\pm$ 6.5	7
1:10 ⁴	93.1 $\pm$ 3.7	74.2 $\pm$ 8.2	7
1:10 ⁵	97.9 $\pm$ 1.4	76.1 $\pm$ 6.7	7
FP			
1:10 ²	38.5 $\pm$ 3.5*	14.6 $\pm$ 4.0*	7
1:10 ³	54.4 $\pm$ 7.3*	18.9 $\pm$ 4.1*	7
1:10 ⁴	55.2 $\pm$ 8.3*	26.5 $\pm$ 5.6*	7
1:10 ⁵	57.1 $\pm$ 9.0*	29.1 $\pm$ 6.1*	7
MP-AzeFlu			
1:10 ²	17.5 $\pm$ 3.0*	2.4 $\pm$ 1.4*	7
1:10 ³	60.2 $\pm$ 5.5*	22.6 $\pm$ 5.1*	7
1:10 ⁴	57.6 $\pm$ 7.0*	21.6 $\pm$ 4.6*	7
1:10 ⁵	57.7 $\pm$ 6.4*	30.4 $\pm$ 7.6*	7

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. ANOVA with Dunnett multiple comparison test was used for analysis. *P < 0.05 compared with 10% HECM-induced survival. ANOVA analysis of variance, AZE azelastine hydrochloride, HECM human epithelial cell-conditioned media, FP fluticasone propionate, MP-AzeFlu intranasal AZE and intranasal FP in a single device, SEM standard error of the mean

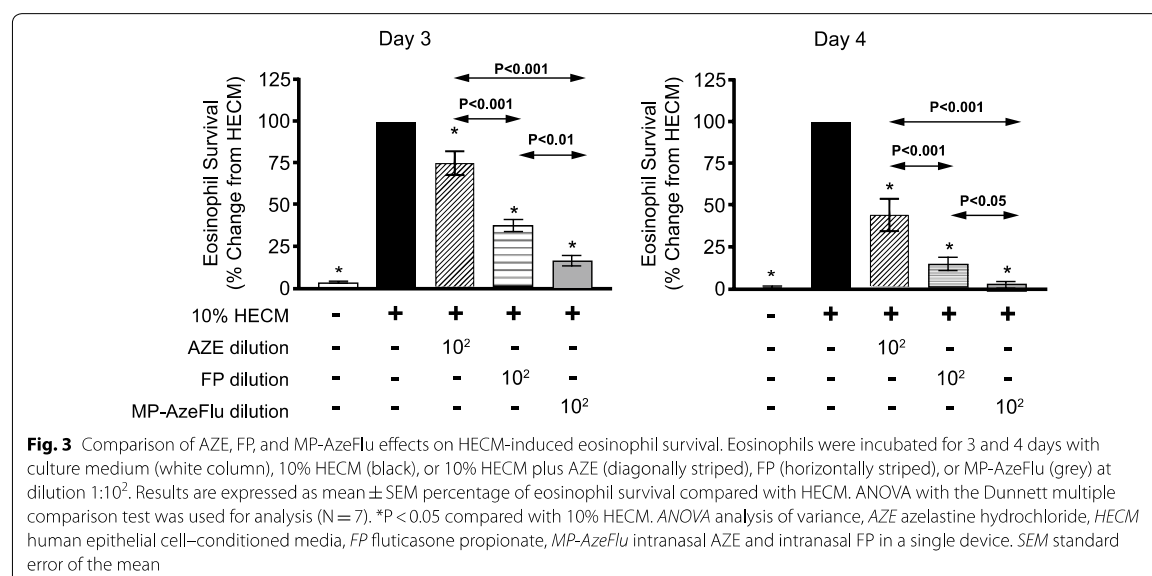
score in 2-week clinical trials was 3.3–4.5 points with AZE and 3.8–5.1 points with FP, compared with a reduction of 5.3–5.6 points with MP-AzeFlu [38].

There is good reason to believe our *in vitro* findings may elucidate the mechanism of action of MP-AzeFlu in AR. The inflammatory mediators IL-6, GM-CSF, and IL-8, as well as eosinophils, play important roles in airway inflammatory diseases. IL-6 is a proinflammatory cytokine with pleiotropic expressions consistent with a primary role in the pathogenesis of local inflammation [39]. IL-6 mediates many biologic functions, acting as an endogenous pyrogen, stimulating the acute phase response, stimulating T lymphocytes, inducing terminal differentiation of B lymphocytes, and stimulating immunoglobulin production [39]. It is well known that CRS is associated with elevated levels of IL-6, as upregulation has been reported in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), [40] on sinus mucosa biopsies, [41–43] and in nasal secretions [44] from patients suffering from CRS. In fact, increased expression of IL-6 messenger RNA in nasal mucosa biopsies of patients suffering from persistent AR has been reported [45], pollen exposure to patients with AR significantly increased IL-6 in nasal secretions [5], and nasal secretions were increased in allergic patients after intranasal administration of IL-6 [39]. In addition, it has been reported that primary cultures of human nasal epithelial cells from patients with AR showed significant upregulation in the release of IL-6 [46, 47].

GM-CSF plays a pivotal role in the maturation, chemotaxis, survival and activation of eosinophils [34, 48]. GM-CSF has also been involved in the regulation of glandular secretion by inducing lactoferrin release in nasal mucosa [49]. Furthermore, it has been reported that a significant correlation exists between GM-CSF concentrations in nasal secretions and in allergen-specific immunoglobulin E antibodies to house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with persistent AR [50].

On the other hand, it has been reported that CRS is associated with elevated levels of IL-8 in PBMCs, [51] sinus mucosa biopsies, [43, 45] and nasal secretions [44]. IL-8, in addition to its potent activity on neutrophils, can cause basophil histamine release and co-induce chemotactic activity for primed eosinophils [52, 53]. The activation and infiltration of eosinophils in AR and their release of proinflammatory mediators has also been described [54, 55]. Furthermore, high levels of IL-8 were detected in nasal secretions of patients with AR after the nasal provocation test [4], and upregulation in the release of IL-8 has been reported in primary cultures of human nasal epithelial cells from patients with AR [46].

Finally, it has been reported that the levels of sICAM-1 and soluble vascular adhesion molecule-1 of patients



with AR were significantly higher when compared with placebo [56, 57]. In addition, it has been shown that GM-CSF and ICAM-1 are important in determining the function of eosinophils, since in the presence of GM-CSF ICAM-1 has been shown to cause significant release of eosinophil-derived neurotoxin and EOS superoxide anion (O₂⁻) generation [58].

Conclusion

In conclusion, we found that both MP-AzeFlu and FP reduce expression of important cytokines and reduce eosinophil survival. MP-AzeFlu lowers both nasal epithelial cell cytokine secretion and eosinophil survival more potently than antihistamine (AZE) or corticosteroid (FP) administered alone. This translational study demonstrates a mechanism of action that may underlie the superior clinical effect of MP-AzeFlu on AR and non-AR when compared with the component drugs used as monotherapy.

Additional file

Additional file 1. Supplementary materials and methods.

Abbreviations

ANOVA: analysis of variance; AR: allergic rhinitis; AZE: azelastine hydrochloride; CRS: chronic rhinosinusitis; DMSO: dimethyl sulfoxide; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FBS: fetal bovine serum; FP: fluticasone propionate; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Ham's PS: Ham's F-12 medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 µg/mL amphotericin B; HECM: human epithelial cell-conditioned medium; IL: interleukin; MP-AzeFlu: azelastine hydrochloride

and fluticasone propionate; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SEM: standard error of the mean; sICAM: soluble intercellular adhesion molecule-1.

Authors' contributions

JRF, LP, MPG, IA, BC, SVA, MF, AV, CP, and JM contributed to the study conception and design, data acquisition, analysis and interpretation, drafting of the manuscript, and critical content revisions, and final approval of the manuscript content. DC and DTN contributed to the design and implementation of the research, analysis of the results, interpretation of the data, and writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Clinical and Experimental Respiratory Immunoallergy, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ² Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain. ³ Rhinology Unit & Smell Clinic, ENT Department, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain. ⁴ Allergy Section, Respiratory and Allergy Department, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵ Clinical Science & Operations, Meda Pharma GmbH & Co. KG (A Mylan Company), Bad Homburg, Germany.

Acknowledgements

The authors acknowledge Lisa Baker, Ph.D., and Roger Hill, Ph.D., for medical writing and Paula Stuckart for editorial assistance in the preparation of the manuscript (Ashfield Healthcare Communications, Middletown, CT, USA). We thank Dr. DucTung Nguyen and Dr. Hans-Christian Kuhl for critical assessment of the data and manuscript review.

Competing interests

JM has conducted research/received research grant support or speaker/consultancy fees from Meda Pharma GmbH & Co. KG (A Mylan Company), Allakos, ALK-Abelló A/S, Genetech-Roche, GlaxoSmithKline, Menarini Group, MSD, Novartis, Sanofi-Genzyme-Regeneron, UCB Pharma, and URIACH Group. JRF, LP, MPG, IA, BC, SVA, MF, AV, and CP have no competing interests to declare. DC and DTN are employees of Meda Pharma GmbH & Co. KG (A Mylan Company).

Availability of data and materials

The datasets generated during the current study are not publicly available because the data reside in a proprietary database maintained by Meda

Pharma GmbH & Co. KG (A Mylan Company); however, data are available from the corresponding author on reasonable request and with permission of Mylan Inc.

Ethics approval and consent to participate

This study was given ethical clearance by the Scientific and Ethics Committee of Hospital Clínic de Barcelona and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice. All patients gave informed consent to participate in the study. Tissues used in this study were obtained from the biobank at Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Funding

This study and medical writing support was funded by Mylan Inc. Canonsburg, Pennsylvania, USA.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 20 September 2018 Accepted: 12 December 2018
Published online: 18 December 2018

References

- Seidman MD, Gurgel RK, Lin SY, Schwartz SR, Baroody FM, Bonner JR, et al. Clinical practice guideline: allergic rhinitis executive summary. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152:197–206.
- König K, Klemens C, Eder K, San Nicolò M, Becker S, Kramer MF, et al. Cytokine profiles in nasal fluid of patients with seasonal or persistent allergic rhinitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2015;11:26.
- Zhao N, Liu HJ, Sun YY, Li YZ. Role of interleukin-6 polymorphisms in the development of allergic rhinitis. *Genet Mol Res*. 2016;15.
- Kim JH, Yoon MG, Seo DH, Kim BS, Ban GY, Ye YM, et al. Detection of allergen specific antibodies from nasal secretion of allergic rhinitis patients. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8:329–37.
- Badorrek P, Müller M, Koch W, Hohlfeld JM, Krug N. Specificity and reproducibility of nasal biomarkers in patients with allergic rhinitis after allergen challenge chamber exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118:290–7.
- Brozek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:950–8.
- Plaza Moral V, Alonso Mostaza S, Alvarez Rodriguez C, Gomez-Outes A, Gomez Ruiz F, Lopez Vina A, et al. Spanish guideline on the management of asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(Suppl 1):1–92.
- Bousquet J, Schunemann HJ, Hellings PW, Arnavielhe S, Bachert C, Bedbrook A, et al. MACVIA clinical decision algorithm in adolescents and adults with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:367–74.
- Berger W, Bousquet J, Fox AT, Just J, Muraro A, Nieto A, et al. MP-AzeFlu is more effective than fluticasone propionate for the treatment of allergic rhinitis in children. *Allergy*. 2016;71:1219–22.
- Carr W, Bernstein J, Lieberman P, Meltzer E, Bachert C, Price D, et al. A novel intranasal therapy of azelastine with fluticasone for the treatment of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1282–9.
- Hampel FC, Ratner PH, Van Bavel J, Amar NJ, Daftary P, Wheeler W, et al. Double-blind, placebo-controlled study of azelastine and fluticasone in a single nasal spray delivery device. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105:168–73.
- Meltzer E, Ratner P, Bachert C, Carr W, Berger W, Canonica GW, et al. Clinically relevant effect of a new intranasal therapy (MP29-02) in allergic rhinitis assessed by responder analysis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161:369–77.
- Meltzer EO, LaForce C, Ratner P, Price D, Ginsberg D, Carr W. MP29-02 (a novel intranasal formulation of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate) in the treatment of seasonal allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of efficacy and safety. *Allergy Asthma Proc*. 2012;33:324–32.
- Price D, Shah S, Bhatia S, Bachert C, Berger W, Bousquet B, et al. A new therapy (MP29-02) is effective for the long-term treatment of chronic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23:495–503.
- Klimek L, Bachert C, Mosges R, Munzel U, Price D, Virchow JC, et al. Effectiveness of MP29-02 for the treatment of allergic rhinitis in real-life: results from a noninterventional study. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36:40–7.
- Klimek L, Bachert C, Stjärne P, Dollner R, Larsen P, Haahr P, et al. MP-AzeFlu provides rapid and effective allergic rhinitis control in real life: a pan-European study. *Allergy Asthma Proc*. 2016;37:376–86.
- Berger WE, Shah S, Lieberman P, Hadley J, Price D, Munzel U, et al. Long-term, randomized safety study of MP29-02 (a novel intranasal formulation of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate in an advanced delivery system) in subjects with chronic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2:179–85.
- Harrow B, Sedaghat AR, Caldwell-Tarr A, Dufour R. A comparison of health care resource utilization and costs for patients with allergic rhinitis on single-product or free-combination therapy of intranasal steroids and intranasal antihistamines. *J Manag Care Spec Pharm*. 2016;22:1426–36.
- Farrokhi S, Mousavi T, Arshi S, Javahertarash N, Varasteh A, Falak R, et al. Effect of treatment with intranasal corticosteroid and oral antihistamine on cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells of patients with allergic rhinitis sensitive to cheno-podium album. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2010;9:225–30.
- Krug N, Gupta A, Badorrek P, Koenen R, Mueller M, Pivovarov A, et al. Efficacy of the oral chemoattractant receptor homologous molecule on TH2 cells antagonist BI 671800 in patients with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:414–9.
- Steelant B, Farré R, Wawrzyniak P, Belmans J, Dekimpe E, Vanheel H, et al. Impaired barrier function in patients with house dust mite-induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:1043–53.
- Wei-Xu H, Wen-Yun Z, Xi-Ling Z, Zhu W, Li-Hua W, Xiao-Mu W, et al. Anti-interleukin-1 beta/tumor necrosis factor-alpha IgY antibodies reduce pathological allergic responses in guinea pigs with allergic rhinitis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:3128182.
- Mullol J, Roca-Ferrer J, Xaubert A, Raserra J, Picado C. Inhibition of GM-CSF secretion by topical corticosteroids and nedocromil sodium. A comparison study using nasal polyp epithelial cells. *Respir Med*. 2000;94:428–31.
- Roca-Ferrer J, Mullol J, Lopez E, Xaubert A, Pujols L, Fernandez JC, et al. Effect of topical anti-inflammatory drugs on epithelial cell-induced eosinophil survival and GM-CSF secretion. *Eur Respir J*. 1997;10:1489–95.
- Kim DH, Kim BY, Shin JH, Kim SW, Kim SW. Intranasal azelastine and mometasone exhibit a synergistic effect on a murine model of allergic rhinitis. *Am J Otolaryngol*. 2017;38:198–203.
- Chand N, Pillar J, Nolan K, Diamantis W, Sofia RD. Inhibition of allergic and nonallergic leukotriene C4 formation and histamine secretion by azelastine: implication for its mechanism of action. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;90:67–70.
- Kempuraj D, Huang M, Kandere-Grzybowski K, Basu S, Boucher W, Letourneau R, et al. Azelastine inhibits secretion of IL-6, TNF-alpha and IL-8 as well as NF-kappaB activation and intracellular calcium ion levels in normal human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;132:231–9.
- Mullol J, Callejas FB, Mendez-Arancibia E, Fuentes M, Alobid I, Martinez-Anton A, et al. Montelukast reduces eosinophilic inflammation by inhibiting both epithelial cell cytokine secretion (GM-CSF, IL-6, IL-8) and eosinophil survival. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24:403–11.
- Mullol J, de Borja Callejas F, Martinez-Anton MA, Mendez-Arancibia E, Alobid I, Pujols L, et al. Mometasone and desloratadine additive effect on eosinophil survival and cytokine secretion from epithelial cells. *Respir Res*. 2011;12:23.
- Mullol J, Pujols L, Alobid I, Perez-Gonzalez M, Fuentes M, de Borja Callejas F, et al. Fluticasone furoate inhibits cytokine secretion from nasal epithelial cells and reduces eosinophil survival in an in vitro model of eosinophilic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163:225–33.
- Mullol J, Roca-Ferrer J, Alobid I, Pujols L, Valero A, Xaubert A, et al. Effect of desloratadine on epithelial cell granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion and eosinophil survival. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:52–8.

32. Mullol J, Lopez E, Roca-Ferrer J, Xaubet A, Pujols L, Fernandez-Morata JC, et al. Effects of topical anti-inflammatory drugs on eosinophil survival primed by epithelial cells. Additive effect of glucocorticoids and nedocromil sodium. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:1432–41.
33. Mullol J, Xaubet A, Gaya A, Roca-Ferrer J, Lopez E, Fernandez JC, et al. Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps. *Clin Exp Allergy*. 1995;25:607–15.
34. Xaubet A, Mullol J, Lopez E, Roca-Ferrer J, Rozman M, Carrion T, et al. Comparison of the role of nasal polyp and normal nasal mucosal epithelial cells on in vitro eosinophil survival. Mediation by GM-CSF and inhibition by dexamethasone. *Clin Exp Allergy*. 1994;24:307–17.
35. Xaubet A, Mullol J, Roca-Ferrer J, Pujols L, Fuentes M, Perez M, et al. Effect of budesonide and nedocromil sodium on IL-6 and IL-8 release from human nasal mucosa and polyp epithelial cells. *Resp Med*. 2001;95:408–14.
36. Singh U, Bernstein JA, Haar L, Luther K, Jones WK. Azelastine desensitization of transient receptor potential vanilloid 1: a potential mechanism explaining its therapeutic effect in nonallergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28:215–24.
37. Luo X, Ma R, Wu X, Xian D, Li J, Mou Z, et al. Azelastine enhances the clinical efficacy of glucocorticoid by modulating MKP-1 expression in allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015;272:1165–73.
38. Prenner BM. A review of the clinical efficacy and safety of MP-AzeFlu, a novel intranasal formulation of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate, in clinical studies conducted during different allergy seasons in the US. *J Asthma Allergy*. 2016;9:135–43.
39. Gentile DA, Yokitis J, Angelini BL, Doyle WJ, Skoner DP. Effect of intranasal challenge with interleukin-6 on upper airway symptomatology and physiology in allergic and nonallergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;86:531–6.
40. Sharma S, Watanabe S, Sivam A, Wang J, Neuwirth SJ, Perez RI, et al. Peripheral blood and tissue T regulatory cells in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26:371–9.
41. Anand VK, Kacker A, Orjuela AF, Huang C, Manarey C, Xiang J. Inflammatory pathway gene expression in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*. 2006;20:471–6.
42. Kuehnemund M, Ismail C, Brieger J, Schaefer D, Mann WJ. Untreated chronic rhinosinusitis: a comparison of symptoms and mediator profiles. *Laryngoscope*. 2004;114:561–5.
43. Lennard CM, Mann EA, Sun LL, Chang AS, Bolger WE. Interleukin-1 beta, interleukin-5, interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in chronic sinusitis: response to systemic corticosteroids. *Am J Rhinol*. 2000;14:367–73.
44. Ohkubo K, Ikeda M, Pawankar R, Gotoh M, Yagi T, Okuda M. Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology*. 1998;36:156–61.
45. Cui XY, Chen X, Yu CJ, Yang J, Lin ZP, Yin M, et al. Increased expression of toll-like receptors 2 and 4 and related cytokines in persistent allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152:233–8.
46. Shi J, Luo Q, Chen F, Chen D, Xu G, Li H. Induction of IL-6 and IL-8 by house dust mite allergen Der p1 in cultured human nasal epithelial cells is associated with PAR/PI3K/NFkappaB signaling. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2010;72(5):256–65.
47. Shiozawa A, Miwa M, Ono N, Homma H, Hirotsu M, Ikeda K. Comparative analysis of cytokine release from epithelial cell cultures of the upper airway. *Rhinology*. 2015;53(2):135–41.
48. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(Suppl 2):S73–80.
49. Roca-Ferrer J, Mullol J, Xaubet A, Benitez P, Bernal-Sprekelsen M, Shelhamer J, et al. Proinflammatory cytokines and eosinophil cationic protein on glandular secretion from human nasal mucosa: regulation by corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:87–93.
50. Tyurin YA, Lissovskaya SA, Fassahov RS, Mustafin IG, Shamsutdinov AF, Shilova MA, et al. Cytokine profile of patients with allergic rhinitis caused by pollen, mite, and microbial allergen sensitization. *J Immunol Res*. 2017;2017:3054217.
51. Wang X, Zhang N, Bo M, Holtappels G, Zheng M, Lou H, et al. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: a multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:1344–53.
52. Fureder W, Agis H, Semper H, Keil F, Maier U, Muller MR, et al. Differential response of human basophils and mast cells to recombinant chemokines. *Ann Hematol*. 1995;70:251–8.
53. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol*. 2004;142:161–71.
54. Denburg JA, Keith PK. Eosinophil progenitors in airway diseases: clinical implications. *Chest*. 2008;134:1037–43.
55. Gelfand EW. Inflammatory mediators in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(Suppl 5):S135–8.
56. Bi J, Hu Y, Peng Z, Liu H, Fu Y. Changes and correlations of serum interleukins, adhesion molecules and soluble E-selectin in children with allergic rhinitis and asthma. *Pak J Med Sci*. 2018;34(5):1288–92.
57. Muntean IA, Bocsan IC, Miron N, Buzoianu AD, Deleanu D. How could we influence systemic inflammation in allergic rhinitis? The role of H1 antihistamines. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;12:3718437.
58. Nagata M, Sedgwick JB, Kita H, Busse WW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19(1):158–66.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ESTUDI 2: Efecte de l'MP-AzeFlu sobre la IL-6 i d'altres citocines proinflamàtòries induïdes per IL-1 beta.

Sònia Vicens-Artés, Jordi Roca-Ferrer, Valeria Tubita, Mireya Fuentes, Isam Alobid, Antonio Valero, Ferdinand Kopietz, DucTung Nguyen, Joaquim Mullol.

Immunol Res. 2023 Jun;71(3):488-496.

DOI: 10.1007/s12026-022-09341-5.

Antecedents: La rinitis al·lèrgica i la rinosinusitis crònica amb pòlips nasals (RSCaPN) són dues malalties inflamatòries cròniques de les vies respiratòries superiors. El tractament de primera línia de la rinitis al·lèrgica inclou antihistamínics i corticoides, mentre que el de la RSCaPN es basa en corticoides intranasals. L'MP-AzeFlu, formulació intranasal de propionat de fluticasona (PF) i clorhidrat d'azelastina (AZE), ha demostrat una superior eficàcia clínica en pacients amb rinitis al·lèrgica moderada-greu, però no s'ha estudiat encara el seu efecte potencial sobre la RSCaPN. A més a més, els mecanismes d'acció de l'MP-AzeFlu no estan clarament establerts.

Objectiu: Determinar els efectes antiinflamatoris superiors de MP-AzeFlu, en comparació amb la monoteràpia de PF, examinant el seu impacte sobre l'expressió d'IL-6, IL-8 i GM-CSF en un model cel·lular d'inflamació de les vies respiratòries superiors.

Mètodes: L'estudi va analitzar l'expressió d'ARNm i proteïnes d'IL-6, IL-8 i GM-CSF en fibroblasts de pacients sotmesos a cirurgia correctiva nasal. Els cultius de fibroblasts es van tractar amb l'estímul proinflamatori IL-1 β (10 ng/mL) com a estímul proinflamatori i amb dilucions seriades d'MP-AzeFlu i PF (desde 1:10² fins a 1:10⁴). L'ARN total es va aïllar dels cultius i es va analitzar mitjançant RT-qPCR i la secreció de proteïnes es va mesurar en els sobrenedants dels cultius mitjançant ELISA. Els resultats es van

expressar com a mitjana $\pm$ error estàndard de la mitjana de canvi per a l'ARNm o de concentració per a la secreció proteica.

Resultats: La IL-1 β promou l'expressió d'ARNm i la secreció de proteïnes d'IL-6, IL-8 i GM-CSF en cultius de fibroblasts. Tant el PF com l'MP-AzeFlu van mostrar efectes inhibidors sobre l'expressió induïda d'ARNm i la secreció de proteïna d'IL-6. L'MP-AzeFlu i el PF van inhibir l'expressió i secreció d'IL-8. L'expressió d'ARNm de GM-CSF va ser inhibida per l'MP-AzeFlu i el PF. Tant el PF com l'MP-AzeFlu van tenir un efecte inhibidor sobre la secreció de proteïna de GM-CSF induïda per IL-1 β .

Conclusió: La regulació a la baixa dels marcadors d'inflamació IL-6, IL-8 i GM-CSF confirma l'efecte antiinflamatori de l'MP-AzeFlu en la inflamació de les vies respiratòries superiors, fet que suggereix alguns dels mecanismes moleculars de l'MP-AzeFlu tant en la rinitis al·lèrgica com en la RSC amb pòlips nasals. Tot i que les dades mostren tendències prometedores en l'efecte de l'MP-AzeFlu sobre la inflamació crònica nasal, es necessiten més investigacions per esbrinar millor el mecanisme d'acció.

BRIEF REPORT



Effect of MP-AzeFlu in IL-1 beta-induced IL-6 and proinflammatory cytokines

Sònia Vicens-Artés¹ · Jordi Roca-Ferrer^{1,2} · Valeria Tubita^{1,3} · Mireya Fuentes^{1,2} · Isam Alobid^{1,2,3,4} · Antonio Valero^{1,2,5} · Ferdinand Kopietz^{6,7} · DucTung Nguyen⁶ · Joaquim Mullol^{1,2,3,4}

Received: 29 June 2022 / Accepted: 7 November 2022 / Published online: 2 December 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abbreviations

AR	Allergic rhinitis
AZ	Azelastine
CRS	Chronic rhinosinusitis
CRSsNP	Chronic rhinosinusitis without nasal polyps
CRSwNP	Chronic rhinosinusitis with nasal polyps
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FP	Fluticasone propionate
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IgE	Immunoglobulin E
IL-1β	Interleukin beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
NM	Nasal mucosa
NP	Nasal polyp
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
N-ERD	NSAID-exacerbated respiratory disease
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
Th-2	T-helper 2

Introduction

Allergic rhinitis (AR) is a T-helper 2 (Th-2) immunoglobulin E (IgE)-mediated disease characterized by elevated levels of proinflammatory mediators, eosinophil infiltration of the nasal mucosa, and mucus hyperproduction [1]. The late-phase molecular response is most likely mediated via the production of a host of cytokines, including interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) by mast cells, Th-2 lymphocytes, or epithelial cells [1]. Chronic rhinosinusitis (CRS) may present with nasal polyps (CRSwNP) or without nasal polyps (CRSsNP) and is a chronic inflammatory disease of the nasal passages characterized by persistent inflammation and remodeling of the sinonasal mucosa. It is frequently associated with asthma and nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-exacerbated respiratory disease (N-ERD).

First-line therapy for AR includes antihistamines and intranasal corticosteroids [2]. For CRSwNP and CRSsNP, intranasal corticosteroids are recommended; treatment with antihistamines is only indicated for CRS patients with concomitant AR [3].

MP-AzeFlu has demonstrated efficacy in patients with AR, including those with perennial and non-allergic rhinitis [4], but the potential effect of MP-AzeFlu on CRS has not yet been investigated. Furthermore, the mechanisms of MP-AzeFlu in IL-1β-induced expression of IL-6 and other proinflammatory cytokines are not clearly understood.

Using an in vitro model of eosinophilic inflammation, we have previously reported an anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu on nasal epithelial cytokines (IL-6, IL-8, and GM-CSF) [5]. We have also demonstrated a superior efficacy of MP-AzeFlu compared to its constituent drugs, fluticasone propionate (FP) and azelastine (AZE), used alone on both IL-6 release from cultured nasal mucosal epithelial cells and on eosinophil survival induced by epithelial cell secretions

✉ Joaquim Mullol
 jmullol@clinic.cat

¹ Clinical and Experimental Respiratory Immunoallergy, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

² CIBER of Respiratory Diseases (CIBERES), Barcelona, Catalonia, Spain

³ Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

⁴ Rhinology Unit & Smell Clinic, ENT Department, Hospital Clinic Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

⁵ Allergy Section, Pulmonology & Allergy Department, Barcelona, Catalonia, Spain

⁶ MEDA Pharma GmbH & Co. KG (A Mylan Company), Barcelona, Catalonia, Spain

⁷ MEDA Pharma GmbH & Co. KG (A Mylan Company), Bad Homburg, Germany

[5]. This anti-inflammatory effect could account, at least in part, for the stronger clinical effect of MP-AzeFlu on moderate to severe AR when compared to FP and AZE used alone.

In this study, we investigated whether MP-AzeFlu has superior anti-inflammatory effects when compared to FP monotherapy by examining its effect on expression of the proinflammatory mediators IL-6, IL-8, and GM-CSF in a cell model of upper airway inflammation induced by IL-1 β .

Methods

Analysis of IL-6, IL-8, and GM-CSF mRNA and protein expression was conducted on cultured fibroblasts isolated from nasal mucosa (NM) and nasal polyp (NP) obtained from patients undergoing nasal corrective surgery for septal deviation/turbinate hypertrophy or endoscopic nasal polypectomy, respectively. None of the patients had an upper airway infection 2 weeks before surgery or suffered from asthma, N-ERD, or other nasosinus diseases (including vasculitis, granulomatosis, and benign or malignant tumors of upper airways). All patients gave informed consent to participate in the study and the study was approved by the Scientific and Ethics Committee at Hospital Clinic Barcelona (Catalonia, Spain).

Fibroblast cultures were performed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS (growth medium), 100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 2 μ g/mL amphotericin B. Purity of fibroblast cultures was confirmed by positive immunostaining of vimentin and negative immunostaining of cytokeratin 1. Fibroblasts were incubated in serum-free media for 24 h before starting experimental protocols.

MP-AzeFlu undiluted solution (364.96 μ g/mL of FP and 1000 μ g/mL of AZE) or undiluted FP (364.96 μ g/mL) was used to perform the serial dilutions in the different experimental protocols. Cultures were incubated for 1 to 24 h with MP-AzeFlu serial dilutions ($1:10^2$ to $1:10^4$) or equivalent dilutions of FP with or without 10 ng/mL interleukin-1 beta (IL-1 β).

To quantify IL-6, IL-8, and GM-CSF mRNA expression, total RNA was isolated from fibroblast cultures using the TRIzolTM reagent (Thermo Fisher Scientific®). RNA was reverse transcribed to cDNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific). GM-CSF, IL-6, and IL-8 mRNA expressions were analyzed by RT-PCR (TaqManTM Gene Expression Assays, Thermo Fisher Scientific) in the 7900 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) following manufacturer's guidelines. Target gene expression was normalized to β -glucuronidase and analysis of results was performed using QuantStudioTM Real-Time PCR software.

Analysis of protein secretion was performed by cytokine enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The concentrations of GM-CSF, IL-6, and IL-8 were measured in supernatants from cell cultures using commercial ELISA

kits (DuoSet[®] ELISA, R&D Systems®). The assay ranges were 15.6 to 1000 pg/mL for GM-CSF, 9.4 to 600 pg/mL for IL-6, and 31.2 to 2000 pg/mL for IL-8.

All study results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Non-parametric paired comparisons were performed using Wilcoxon signed rank tests. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 8.4.0) with an alpha level set at $p < 0.05$.

Results

In both NM and NP fibroblast cultures, mRNA expression and protein secretion of IL-6 (Figs. 1A and 2A), IL-8 (Figs. 3A and 4A), and GM-CSF (Figs. 5A and 6A) were induced by IL-1 β (10 ng/mL) at 6 and 24 h of incubation.

IL-6

Both FP and MP-AzeFlu showed inhibitory effect on IL-1 β -induced mRNA expression and protein secretion of IL-6. In NM fibroblast cultures, FP at $1:10^2$ dilution inhibited IL-1 β -induced IL-6 mRNA expression at 6 and 24 h, while in NP fibroblast cultures the inhibitory effect was present only at 24 h. MP-AzeFlu inhibited IL-1 β -induced IL-6 mRNA expression at dilution $1:10^2$ at 6 h in NM and NP fibroblast cultures (Fig. 1B). At 24 h of incubation, both FP and MP-AzeFlu had an inhibitory effect on IL-1 β -induced IL-6 protein secretion (Fig. 2B).

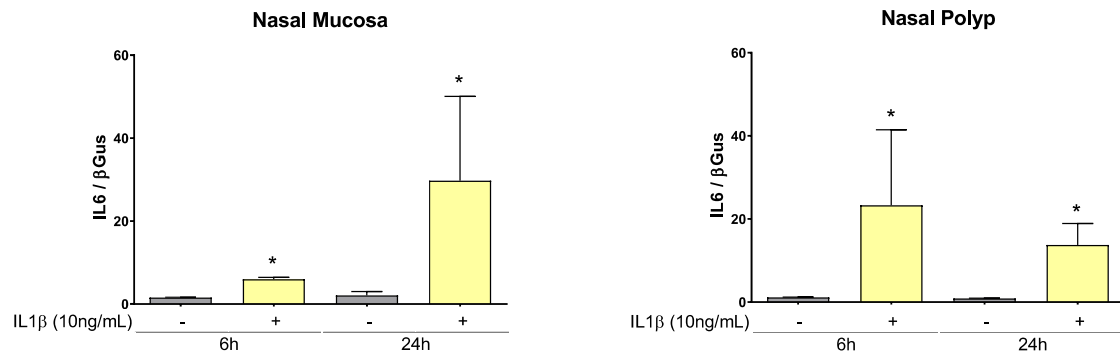
IL-8

Both FP and MP-AzeFlu showed inhibitory effect on IL-1 β -induced mRNA expression and protein secretion of IL-8. In NM fibroblast cultures, FP at $1:10^2$ dilution inhibited IL-1 β -induced IL-8 mRNA expression at 6 and 24 h, while in NP fibroblast cultures the inhibitory effect was present only at 24 h. MP-AzeFlu inhibited IL-1 β -induced IL-8 mRNA expression at dilution $1:10^2$ at 24 h in NM ($p = 0.0625$) and at 6 h in NP fibroblast cultures (Fig. 3B). At 24 h of incubation, both FP and MP-AzeFlu had an inhibitory effect on IL-1 β -induced IL-8 protein secretion (Fig. 4B).

GM-CSF

IL-1 β (10 ng/mL) induced expression of GM-CSF mRNA at 6 and 24 h, but the levels did not reach statistical significance in NM fibroblast cultures (Fig. 5A). IL-1 β (10 ng/mL) induced GM-CSF protein expression in NM and NP (Fig. 6A). In NM fibroblast cultures, FP at $1:10^2$ dilution inhibited IL-1 β -induced GM-CSF mRNA expression at 6 and 24 h, while in NP fibroblast cultures the inhibitory effect was present only at 24 h. In NM and NP fibroblast

A.



B.

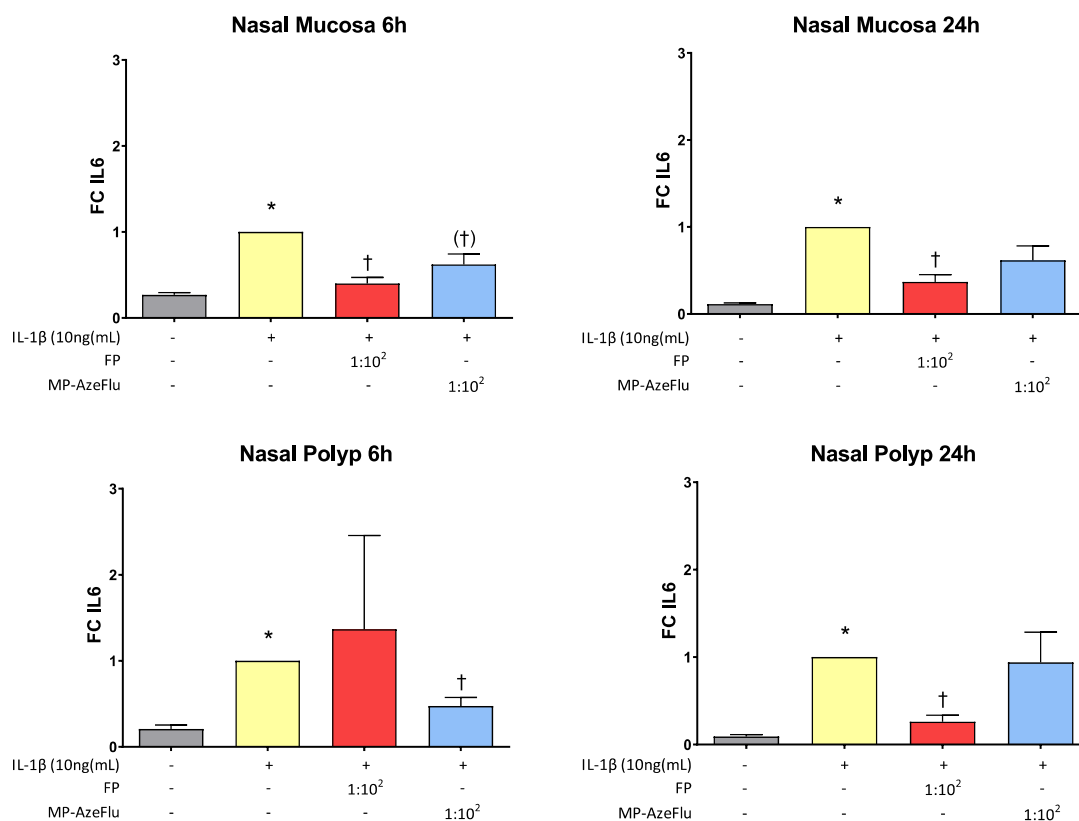


Fig. 1 Effect of MP-AzeFlu compared to FP on mRNA expression (PCR) of IL-6 induced by IL-1β in fibroblasts from nasal mucosa (NM, $n=6$) and nasal polyps (NP, $n=6$). **A** IL-1β (10 ng/mL)-induced IL-6mRNA expression (6 and 24 h). **B** FP and MP-AzeFlu

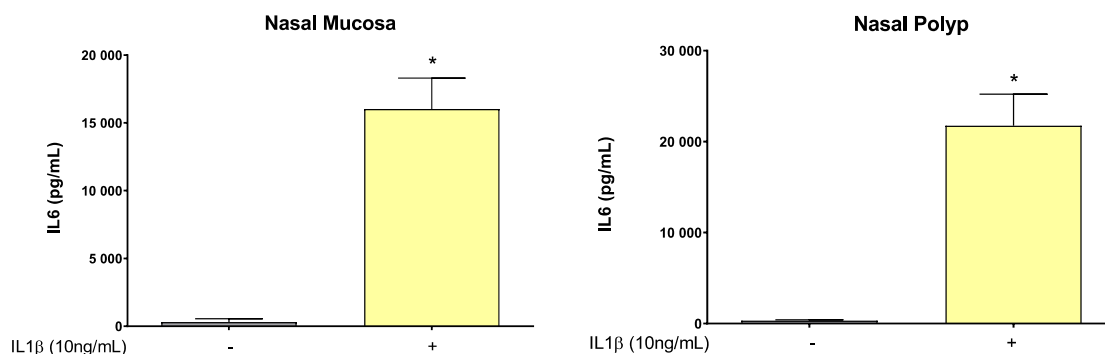
inhibitory effect on IL-1β-induced IL-6 mRNA expression (6 and 24 h). Results are expressed as mean $\pm$ SEM of fold change (FC). Comparisons were performed using Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared to negative control; † $P < 0.05$ and †† $P = 0.06$ compared to IL-1β

cultures, MP-AzeFlu inhibited IL-1β-induced GM-CSF mRNA expression at dilution $1:10^2$ at 6 h (Fig. 5B). At 24 h of incubation, both FP and MP-AzeFlu had an inhibitory effect on IL-1β-induced GM-CSF protein secretion (Fig. 6B).

Discussion

In this study, we examined the effects of MP-AzeFlu and FP on the gene and protein expression of proinflammatory markers

A.



B.

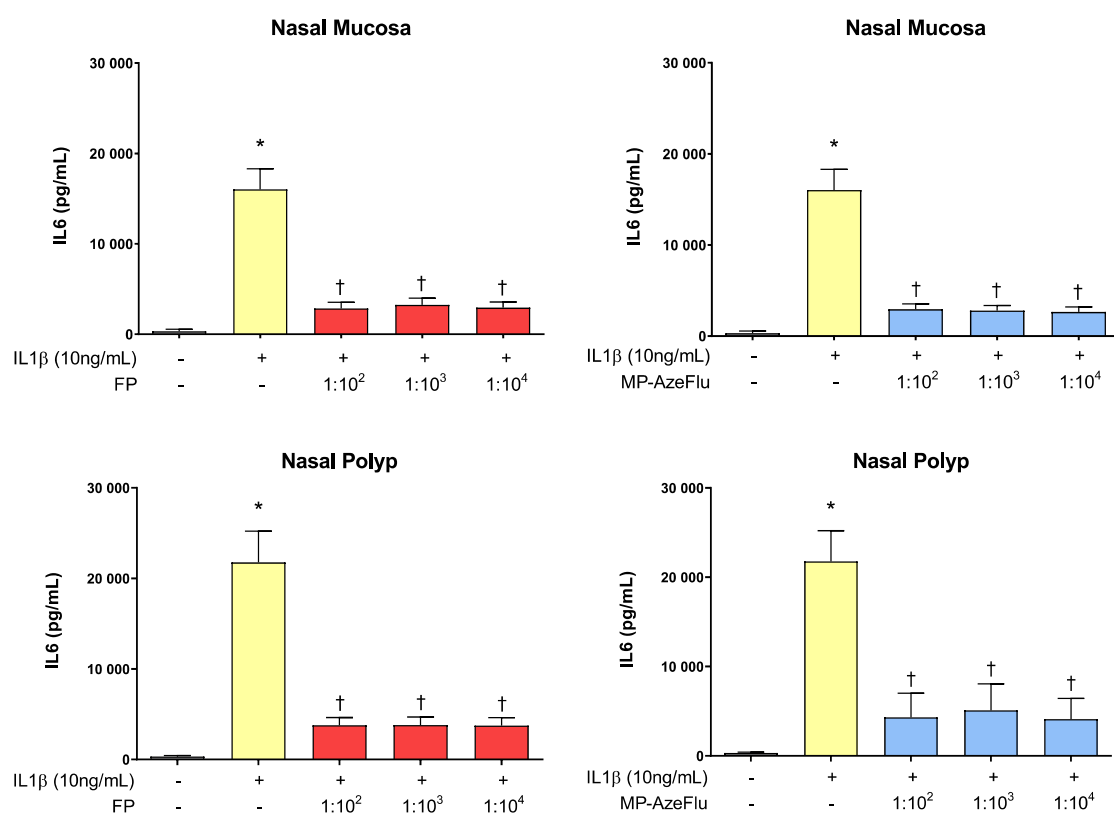


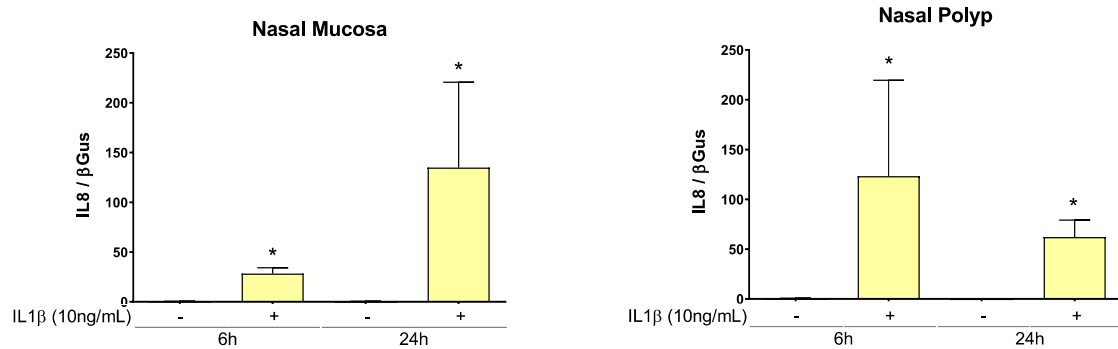
Fig. 2 Effect of MP-AzeFlu compared to FP on protein secretion of IL-6 induced by IL-1β in fibroblasts from nasal mucosa (NM, $n=6$) and nasal polyps (NP, $n=6$). **A** IL-1β-induced IL-6 protein secretion in NM and NP. **B** FP and MP-AzeFlu inhibitory effect on IL-1β-

induced IL-6 protein secretion in NM and NP. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of concentration. Comparisons were performed using Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared to negative control; † $P < 0.05$ compared to IL-1β

IL-6, IL-8, and GM-CSF in cultured fibroblasts from both healthy and inflamed upper airway mucosa. We demonstrated that both MP-AzeFlu and FP inhibited the IL-1β-induced IL-6, IL-8, and GM-CSF mRNA and protein expression in NM and NP.

Our findings suggest some of the molecular mechanisms of action for MP-AzeFlu's therapeutic clinical benefits in treating upper airway inflammation present in both AR and CRS. The study results are in line with previous results demonstrating

A.



B.

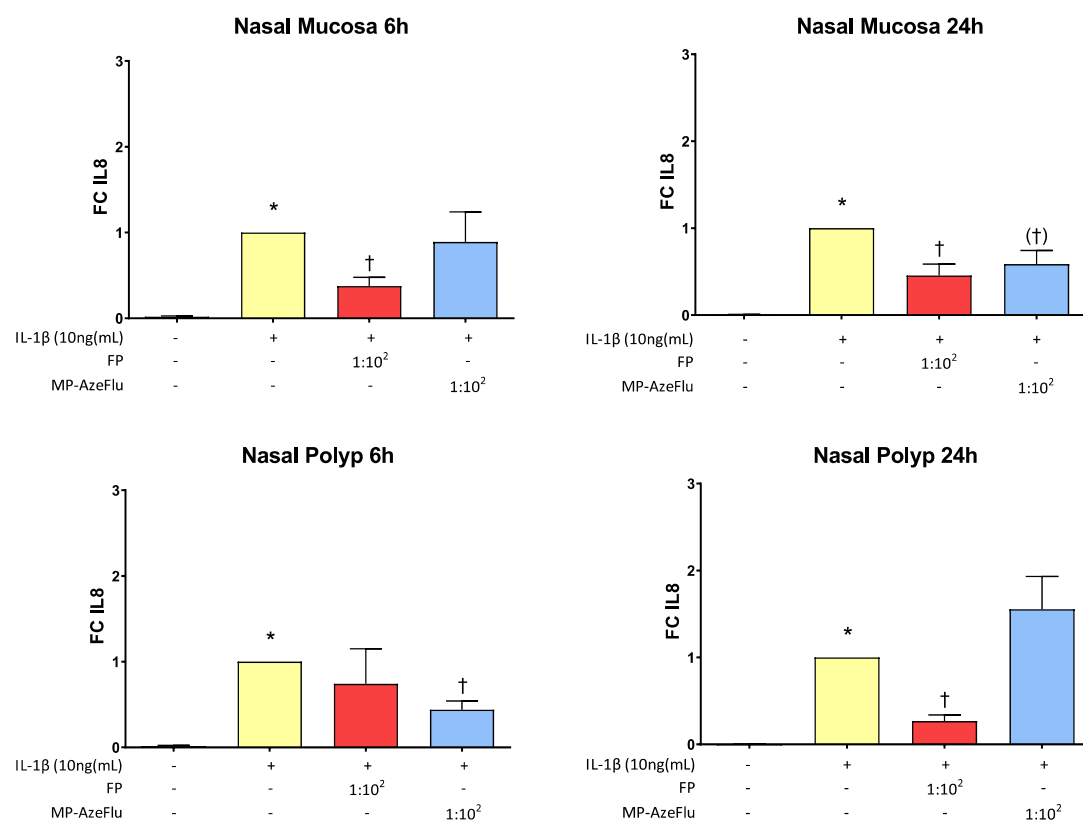


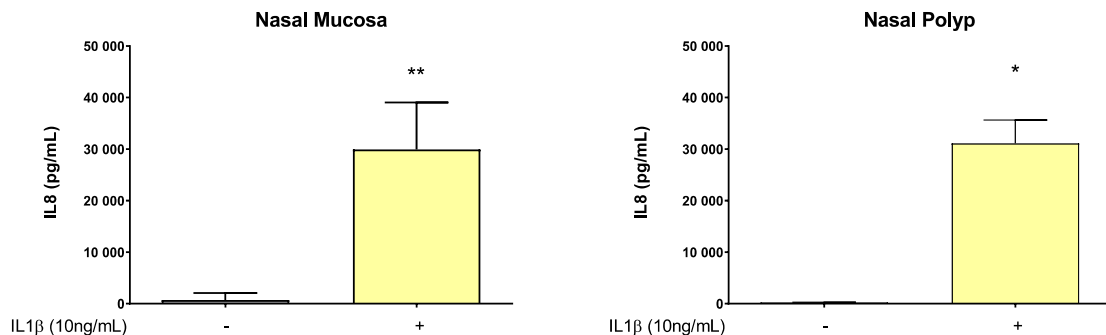
Fig. 3 Effect of MP-AzeFlu compared to FP on mRNA expression (PCR) of IL-8 induced by IL-1β in fibroblasts from nasal mucosa (NM, $n=6$) and nasal polyps (NP, $n=6$). **A** IL-1β-induced IL-8 mRNA expression at 6 and 24 h of incubation in NM and NP. **B**

FP and MP-AzeFlu inhibitory effect on IL-1β-induced IL-8 mRNA expression. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of FC. Comparisons were performed using Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared to negative control; † $P < 0.05$ and †† $P = 0.0625$ compared to IL-1β

that MP-AzeFlu showed inhibitory effects on IL-6 protein secretion from human nasal mucosa epithelial cells as well as on isolated human peripheral blood eosinophils [5].

IL-6 is a proinflammatory cytokine with a relevant role in the pathogenesis of CRS. Upregulation of IL-6 mRNA has been found in nasal mucosa biopsies of patients with persistent

A.



B.

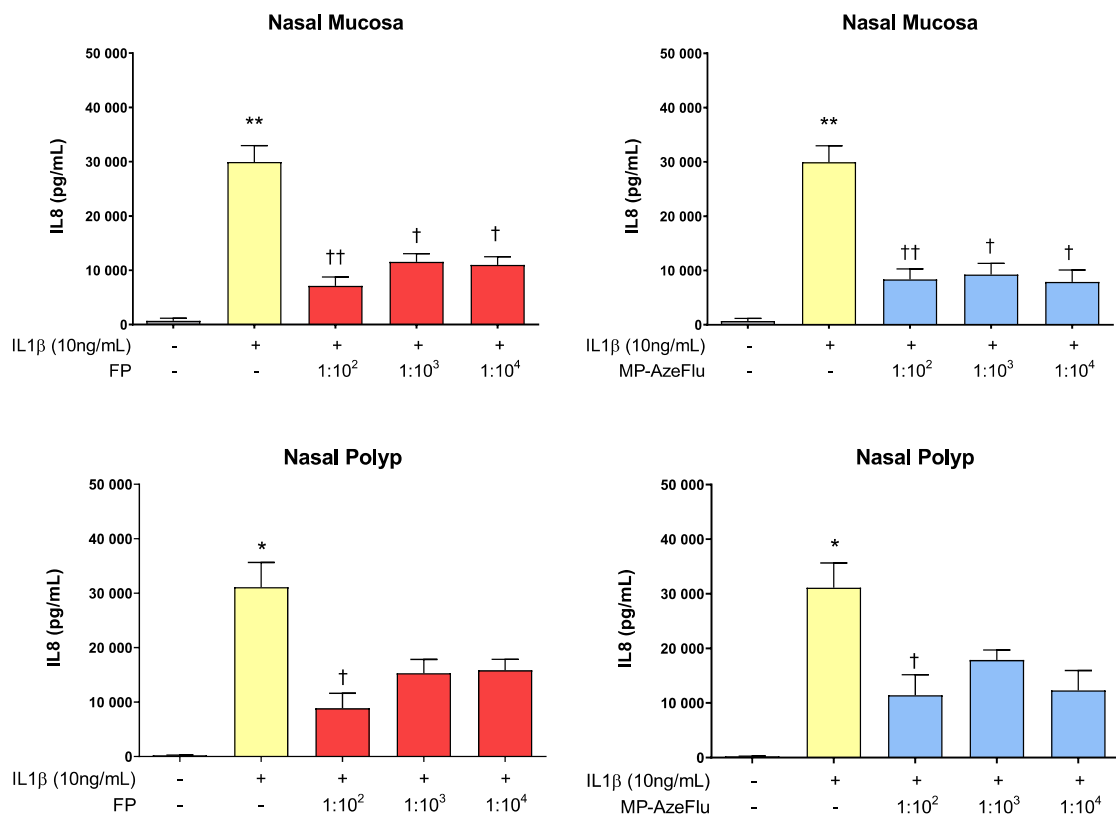


Fig. 4 Effect of MP-AzeFlu compared to FP on protein secretion of IL-8 induced by IL-1 β in fibroblasts from nasal mucosa (NM, $n=6$) and nasal polyps (NP, $n=6$). **A** IL-1 β (10 ng/mL)-induced protein IL-8 secretion in both NM and NP. **B** FP and MP-AzeFlu inhibitory

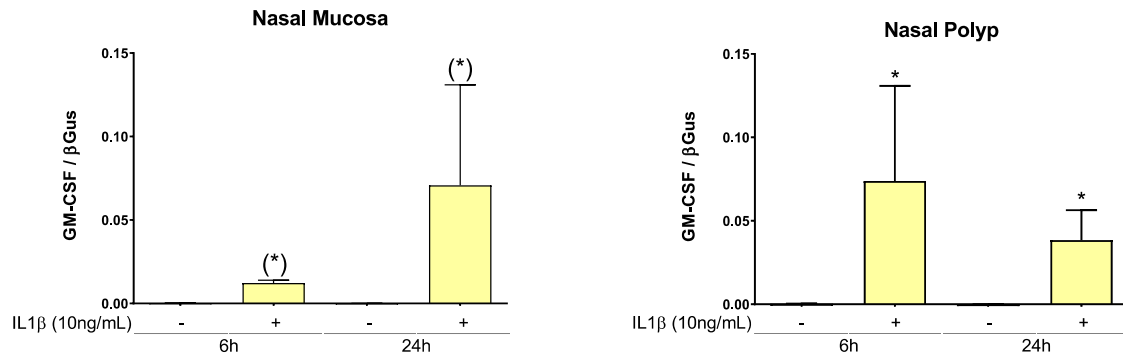
effect on IL-1 β -induced IL-8 protein secretion in NM and NP. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of concentration. Comparisons were performed using Wilcoxon test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to negative control; † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ compared to IL-1 β

AR as well as in patients with AR after pollen exposure [6]. GM-CSF is involved in the maturation, chemotaxis, survival, and activation of eosinophils. In patients with AR, exposure to house dust mites is associated with a correlation between

GM-CSF in nasal secretions and production of immunoglobulin E antibodies [7, 8].

Finally, CRS is associated with elevated levels of IL-8 in sinus mucosa biopsies and nasal secretions. In fact, upregulation of

A.



B.

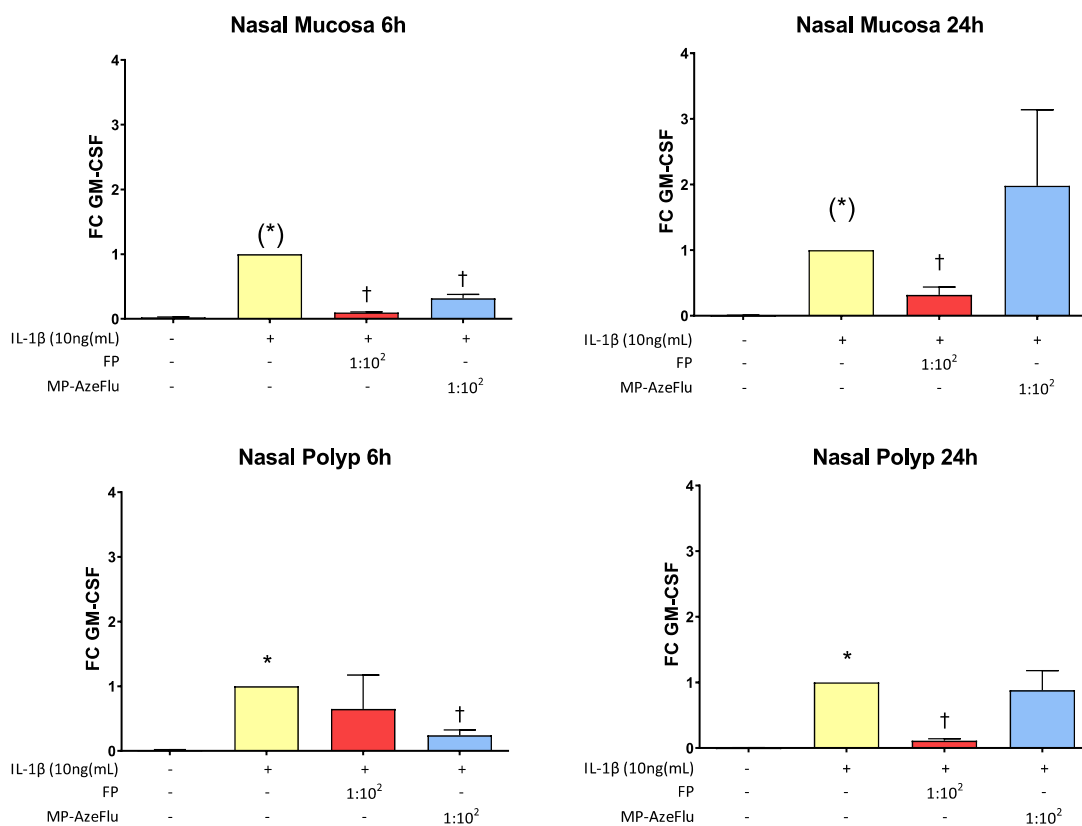


Fig. 5 Effect of MP-AzeFlu compared to FP on mRNA expression (PCR) of GM-CSF induced by IL-1β in fibroblasts from nasal mucosa (NM, $n=6$) and nasal polyps (NP, $n=6$). **A** IL-1β-induced GM-CSF mRNA expression at 6 and 24 h of incubation in NM and NP, without reaching statistical significance in NM. **B** FP and MP-

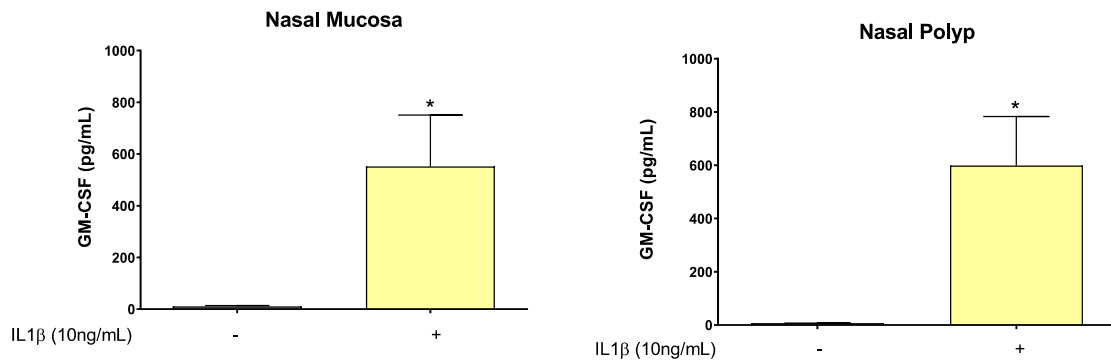
AzeFlu effect on IL-1β-induced GM-CSF mRNA expression. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of FC. Comparisons were performed using Wilcoxon test. * $P < 0.05$ and (*) $P = 0.06$ compared to negative control; † $P < 0.05$ and compared to IL-1β

IL-8 is seen in the nasal epithelial cells of AR patients after nasal provocation tests [9].

Despite the data demonstrating some of the mechanisms of MP-AzeFlu in an in vitro model of upper airway

inflammation, the study has some limitations. We reported the effect of MP-AzeFlu in a structural cell and the concentrations used in the in vitro model may not reflect in vivo therapeutic dosing.

A.



B.

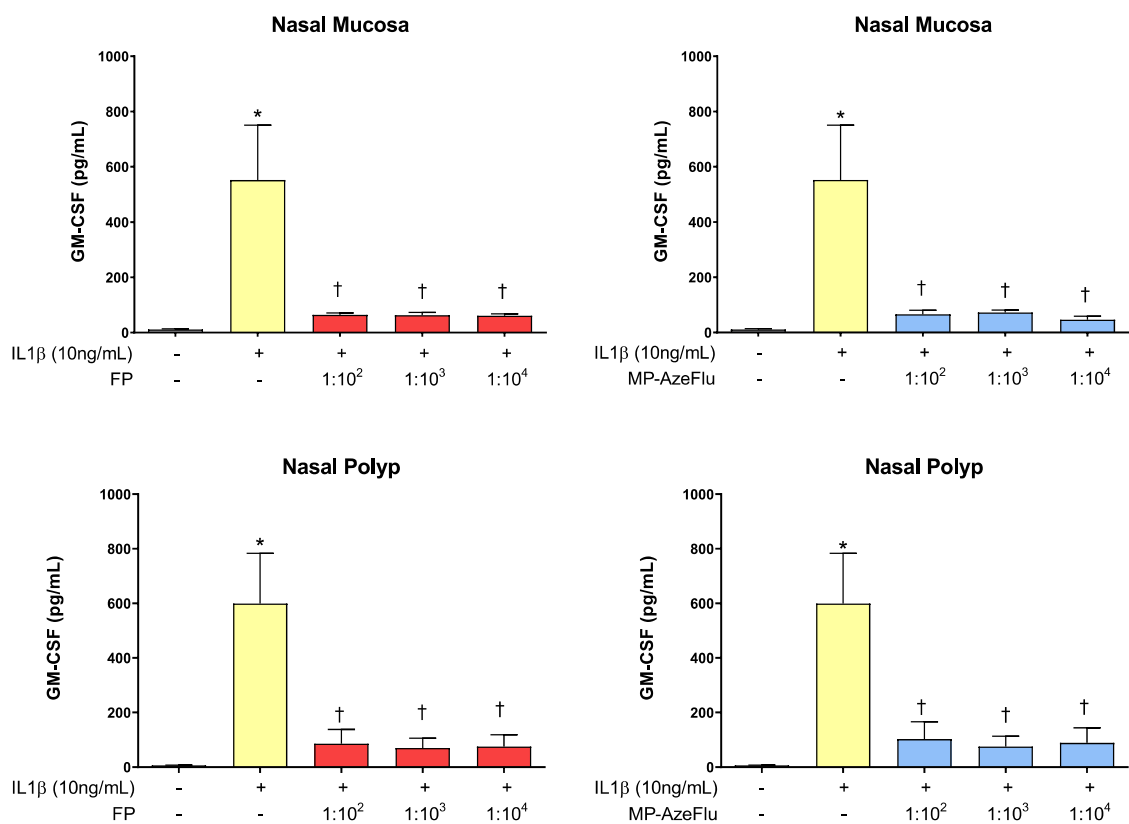


Fig. 6 Effect of MP-AzeFlu compared to FP on protein secretion of GM-CSF induced by IL-1β in fibroblasts from nasal mucosa (NM, $n=6$) and nasal polyps (NP, $n=6$). **A** IL-1β (10 ng/mL)-induced protein IL-8 secretion in both NM and NP. **B** FP and MP-AzeFlu inhibi-

tory effect on IL-1β-induced IL-6 protein secretion in NM and NP. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of concentration. Comparisons were performed using Wilcoxon test. * $P < 0.05$ compared to negative control; † $P < 0.05$ compared to IL-1β

Conclusion

The downregulation of the inflammation markers IL-6, IL-8, and GM-CSF confirms the anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu in upper airway inflammation, suggesting

some of the molecular mechanisms of MP-AzeFlu in both AR and CRSwNP. While the data show promising trends in the effect of MP-AzeFlu on nasal and sinonasal chronic inflammation, further research is needed to better elucidate the mechanism of action in patients.

Acknowledgements Technical, editorial, and medical writing assistance were provided under the direction of the authors by Stephanie Breslan, MS, and Amplity Health.

Author contributions All authors made substantial contributions to the conception or design of the manuscript, or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the manuscript, and all authors were involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. The authors were fully responsible for all content and editorial decisions and received no financial support or other form of compensation related to the development of this manuscript. All authors had final approval of the manuscript and are accountable for all aspects of the work in ensuring the accuracy and integrity of this manuscript.

Funding Funding for this study was provided by Viatriis.

Data availability The datasets during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate All patients gave informed consent to participate in the study. The Dymecos 2 study was approved by the Ethics Committee (CEIm) from Hospital Clinic Barcelona (Catalonia, Spain) on 03 February 2016 under Registration No. HCB/2016/0007.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests Joaquim Mullol is or has been a member of national and international scientific advisory boards (consulting), received fees for lectures, and grants for research projects from Allakos, AstraZeneca, Genentech-Roche, Glenmark, GSK, Menarini, MSD, Mitsubishi-Tanabe, MYLAN-MEDA Pharma (Viatris), Novartis, Procter & Gamble, Sanofi-Genzyme & Regeneron, UCB, and Uriach Group. SV, JRF, VT, MF, IA, AV, FK and DN declare that they have no competing interests.

References

1. Wise SK, Lin SY, Toskala E, Orlandi RR, Akdis CA, Alt JA, et al. International consensus statement on allergy and rhinology: allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018;8(2):108–352.
2. Bousquet J, Schünemann HJ, Togias A, Bachert C, Erhola M, Hellings PW, et al. Next-generation Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) guidelines for allergic rhinitis based on Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) and real-world evidence. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Dec 08];145(1):70–80. e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31627910/>. Accessed 27 Oct 2022
3. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2020. *Rhin*. 2020;58(Suppl S29):1–464.
4. Klimek L, Berger W, Bousquet J, PK K, Smith P, Sole D, et al. MP-AzeFlu in moderate-to-severe allergic rhinitis: a literature review. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2021 Dec 1];182(11):1026–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34082425/>. Accessed 27 Oct 2022
5. Roca-Ferrer J, Pujols L, Pérez-González M, Alobid I, Callejas B, Vicens-Artés S, et al. Superior effect of MP-AzeFlu than azelastine or fluticasone propionate alone on reducing inflammatory markers. *Allergy Asthma Clin Immunol* [Internet]. 2018 Dec 18 [cited 2021 Dec 01];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30574167/>. Accessed 27 Oct 2022
6. Badorek P, Müller M, Koch W, Hohlfeld JM, Krug N. Specificity and reproducibility of nasal biomarkers in patients with allergic rhinitis after allergen challenge chamber exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol* [Internet]. 2017 Mar 01 [cited 2022 Jan 26];118(3):290–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28284536/>. Accessed 27 Oct 2022
7. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2022 Jan 26];125(2 Suppl 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20176269/>. Accessed 27 Oct 2022
8. Tyurin YA, Lissovskaya SA, Fassahov RS, Mustafin IG, Shamsutdinov AF, Shilova MA, et al. Cytokine profile of patients with allergic rhinitis caused by pollen, mite, and microbial allergen sensitization. *J Immunol Res* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jan 26];2017. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29109963/>. Accessed 27 Oct 2022
9. Shi J, Luo Q, Chen F, Chen D, Xu G, Li H. Induction of IL-6 and IL-8 by house dust mite allergen Der p1 in cultured human nasal epithelial cells is associated with PAR/PI3K/NFκB signaling. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* [Internet]. 2010 Sep [cited 2022 Jan 26];72(5):256–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20733339/>. Accessed 27 Oct 2022

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ESTUDI 3: Efecte superior de l'MP-AzeFlu en comparació amb el propionat de fluticasona o l'azelastina en monoteràpia sobre l'expressió dels gens antiinflamatoris GILZ, MKP-1 i TTP en mucosa de les via respiratòria superior, tant sana com inflamada.

Sònia Vicens-Artés, Jordi Roca-Ferrer, Valeria Tubita, Mireya Fuentes, Isam Alobid, Antonio Valero, Ferdinand Kopietz, DucTung Nguyen, Joaquim Mullol.

Clin Exp Allergy. 2022 Jun;52(6):788-791.

DOI: 10.1111/cea.14099.

Antecedents: La rinitis al·lèrgica i la rinosinusitis crònica amb pòlips nasals (RSCaPN) són malalties Th2 mediades per IgE amb mediadors proinflamatoris elevats i infiltració d'eosinòfils. Els antihistamínics i els corticoides intranasals, o la seva formulació intranasal com l'MP-AzeFlu, estan indicats en el tractament de la rinitis al·lèrgica, mentre que per a la RSCaPN estan només indicats els corticoides intranasals. L'MP-AzeFlu ha demostrat una elevada eficàcia clínica en la rinitis al·lèrgica moderada-greu, amb efectes superiors sobre els símptomes i la qualitat de vida en comparació amb els fàrmacs en monoteràpia. Malgrat que es desconeixen els seus mecanismes d'acció, aquest efecte podria ser degut a l'augment de la inducció de gens antiinflamatoris.

Objectiu: Analitzar l'efecte antiinflamatori de l'MP-AzeFlu, en comparació amb la monoteràpia amb propionat de fluticasona (PF) o clorhidrat d'azelastina (AZE), sobre l'expressió de GILZ, MKP-1 i TTP en cultius de fibroblasts tant de mucosa nasal com de pòlips nasals.

Mètodes: Es van aïllar fibroblasts de teixits de mucosa nasal i pòlips nasals de pacients sotmesos a cirurgia correctiva nasal o nasosinusal, respectivament, mitjançant un medi de cultiu de creixement específic. Els fibroblasts es van incubar en presència de l'MP-AzeFlu, AZE o PF (dilucions de $1:10^2$ a $1:10^4$) durant 2-24h. L'expressió gènica i proteica

de GILZ, MKP-1 i TTP es va analitzar mitjançant RT-qPCR i western blot, respectivament. Els resultats es van expressar com a mitjana $\pm$ error estàndard de la mitjana del canvi.

Resultats: L'MP-AzeFlu i el PF van augmentar l'expressió d'ARNm de GILZ i MKP-1 tant als fibroblasts de mucosa nasal com de pòlips nasals, mentre que l'AZE provocava una lleugera inducció a la dilució 1:10² en algun dels temps d'incubació. L'MP-AzeFlu va mostrar un efecte superior en l'expressió d'ARNm de GILZ i parcialment superior per a MKP-1 en comparació amb la monoteràpia amb PF o AZE. Cap fàrmac va regular significativament l'expressió de proteïnes GILZ o MKP-1. L'MP-AzeFlu i el PF també van augmentar l'expressió d'ARNm de TTP tant als fibroblasts de mucosa nasal com de pòlips nasals. L'AZE, en canvi, no va tenir cap efecte sobre l'expressió d'ARNm de TTP. MP-AzeFlu va presentar un efecte superior, respecte a la monoteràpia (als fibroblasts de mucosa nasal i amb 2h d'incubació). L'efecte dels fàrmacs sobre l'expressió de la proteïna TTP no es va estudiar degut a que l'expressió gènica era molt baixa.

Conclusió: L'efecte clínic superior de l'MP-AzeFlu en comparació amb els fàrmacs en monoteràpia (FP i AZE) pot estar, en part, relacionat amb la major regulació de l'expressió gènica antiinflamatòria de GILZ i, en menor mesura, amb l'expressió de MKP-1 i TTP tant en fibroblasts de mucosa nasal com de pòlips nasals.

Superior effect of MP-AzeFlu compared to monotherapy with fluticasone propionate or azelastine on GILZ, MKP-1 and TTP anti-inflammatory gene expression in healthy and inflamed upper airway mucosa

To the Editor,

Allergic rhinitis (AR) is a Th2 IgE-mediated disease with elevated levels of pro-inflammatory mediators, eosinophil infiltration of the nasal mucosa, and mucus hypersecretion. Antihistamines and intranasal corticosteroids, including MP-AzeFlu (intranasal fluticasone and azelastine), are recommended as the first-line therapy for AR.¹ Intranasal corticosteroids are also the first-line treatment for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) or without (CRSsNP), while antihistamines are only indicated in chronic rhinosinusitis (CRS) with concomitant AR.²

MP-AzeFlu has demonstrated efficacy in AR, and a superior effect compared to these drugs administered individually, on nasal and ocular symptoms and quality of life; moreover, MP-AzeFlu has shown earlier and faster AR control in moderate-to-severe AR.³ While MP-AzeFlu is guideline-recommended and its clinical efficacy has been widely studied, the mechanisms by which this therapy exerts its effect in AR are largely unknown.

Our laboratory has used an *in vitro* model of eosinophilic inflammation based on the interaction between cultured primary isolated nasal mucosa epithelial cells and isolated peripheral blood eosinophils to study the effect and potency of anti-inflammatory drugs.^{4,5} Using this model, we have previously reported greater anti-inflammatory effects of the combination of an intranasal corticosteroid and an antihistamine, including MP-AzeFlu, in both nasal mucosa and nasal polyp epithelial cells, compared to the effect of these drugs administered alone.⁵ We have also demonstrated that glucocorticoids induce the transcription of anti-inflammatory genes such as glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 (MKP-1) and tristetraprolin (TTP) in nasal mucosa fibroblasts.⁶

While detailed insights are lacking regarding the mechanisms of pathogenesis in CRSwNP, it is now clear that IgE-mediated Th2 inflammatory pathways play a critical role in this disease.⁷ H₁ receptor antagonists decrease eosinophil survival⁴ and inhibit the release of pro-inflammatory mediators by mast cells⁸ and the production of pro-inflammatory cytokines by nasal epithelial cells.^{4,9} In addition, azelastine (AZE) has been shown to enhance the anti-inflammatory effect

of budesonide and improve nasal symptoms in AR patients through the induction of MKP-1 expression.⁹ As such, it is reasonable to hypothesize that an increased induction of anti-inflammatory genes could partially explain the superior anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu when compared to fluticasone propionate (FP) or AZE alone.

In the present study, we propose to analyse the anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu, compared to monotherapy with FP or AZE, on GILZ, MKP-1 and TTP gene expression in healthy and inflamed upper airway mucosa.

1 | MATERIALS AND METHODS

1.1 | Study population

Nasal mucosa (NM) tissues were obtained from patients undergoing nasal-corrective surgery for nasal deviation and/or turbinate hypertrophy. Patients with current upper respiratory tract infections were excluded. Nasal polyps (NP) were obtained from patients undergoing nasal polypectomy and/or endoscopic sinus surgery for CRSwNP. Patients with asthma, nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease (N-ERD) or other nasal and nasosinus diseases (i.e. vasculitis, granulomatosis, benign or malignant tumours) were excluded.

1.2 | Experimental design

Fibroblasts were isolated using a specific and selective growth culture medium. The purity of fibroblast cultures was confirmed by positive immunostaining to vimentin (fibroblast marker) and negative to cytokeratin 1 (epithelial cell marker).⁶ Cells were incubated with serum-free medium and treated for 2–24 h with MP-AzeFlu (dilution 1:10²–1:10⁴) or equivalent dilutions of FP and AZE. mRNA and protein expression of GILZ, MKP-1 and TTP (at 2, 6 and/or 24 h) were assessed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot, respectively.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](#) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Clinical & Experimental Allergy* published by John Wiley & Sons Ltd.

1.3 | Ethics issues

Prior to study initiation, the protocol was approved by the HCB Ethics Committee. Written informed consent was obtained from all patients prior to their participation.

1.4 | Statistical methods

All results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The Wilcoxon tests were used for the non-parametric paired comparisons. Analyses were performed using GraphPad 8.4.0 with an alpha level set at $p < .05$.

Key Messages

- MP-AzeFlu has demonstrated efficacy in allergic rhinitis, and a superior effect compared with FP and AZE administered in monotherapy.
- We analysed the anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu, compared with FP or AZE, on GILZ, MKP-1 and TTP gene expression in healthy and inflamed upper airway mucosa.
- The superior clinical effect of MP-AzeFlu compared to FP and AZE monotherapy may be related to greater up-regulation of anti-inflammatory GILZ gene expression and, to a lesser extent, MKP-1 and TTP.

2 | RESULTS

2.1 | GILZ

MP-AzeFlu and FP up-regulated GILZ mRNA expression at all time-points (from 2 h to 24 h) and dilutions in both NM and NP. AZE induced a mild up-regulation of GILZ mRNA expression at dilution $1:10^2$ at some time-points. MP-AzeFlu at dilution $1:10^2$ showed a superior effect in the up-regulation of GILZ mRNA expression at 2 and 6 h in NM and at 6 and 24 h in NP compared to monotherapy with FP or AZE (Figure 1). Neither MP-AzeFlu

nor FP significantly up-regulated GILZ protein expression at any time-point or dilution.

2.2 | MKP-1

MP-AzeFlu and FP up-regulated MKP-1 mRNA expression at all time-points and dilutions in both NM and NP. AZE at dilution $1:10^2$ up-regulated MKP-1 mRNA expression at 2 h in both NM and NP.

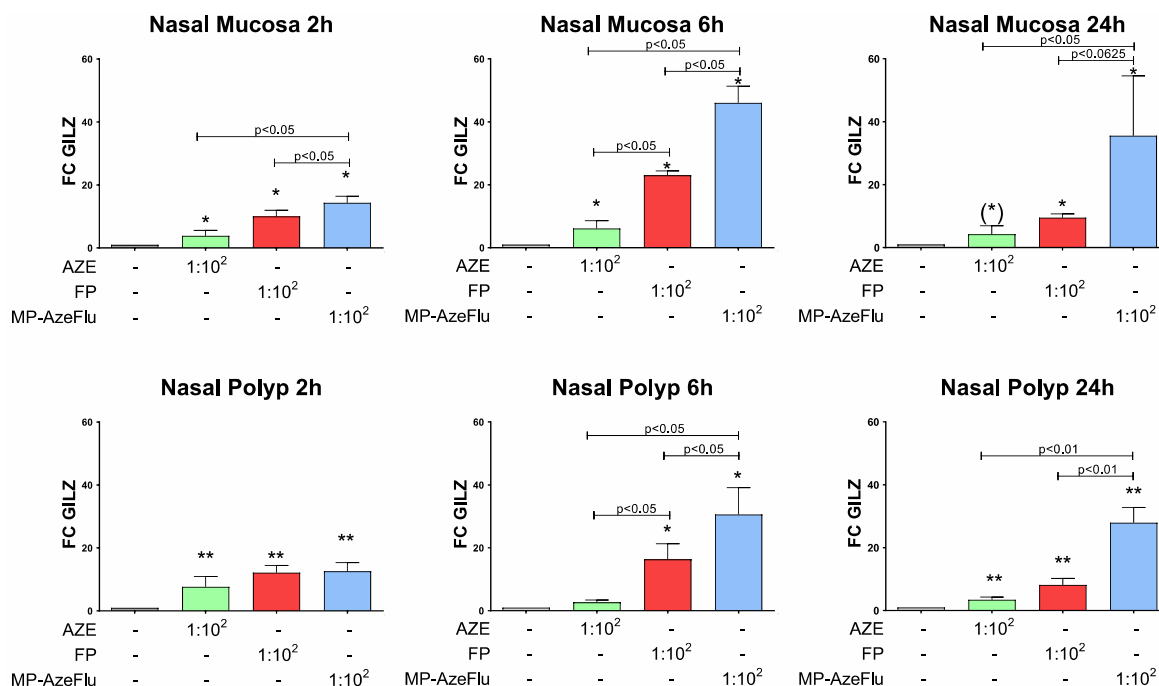


FIGURE 1 Superior effect of MP-AzeFlu compared to monotherapy with fluticasone propionate (FP) or azelastine (AZE) on GILZ mRNA expression in nasal mucosa (NM) and nasal polyps (NP) in a time course (2, 6 and 24 h). * $p < .05$; ** $p < .01$; (*) $p = .06$ compared to negative control

		MKP-1 mRNA		TTP mRNA	
		NM	NP	NM	NP
2 h	MP-AzeFlu	5.9 ± 1.1 [†]	5.6 ± 1.4*	1.7 ± 0.1* [†]	1.9 ± 0.3
	FP	4.5 ± 0.8	4.1 ± 1.0	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.4
	AZE	2.2 ± 0.4	4.7 ± 1.6	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3
6 h	MP-AzeFlu	6.9 ± 2.1 [‡]	7.7 ± 3.2	1.8 ± 0.1 [‡]	2.9 ± 0.2 [†]
	FP	5.3 ± 0.8	6.4 ± 2.6	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.3
	AZE	1.6 ± 0.5	3.0 ± 1.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1

TABLE 1 Superior effect of MP-AzeFlu compared with fluticasone propionate and azelastine monotherapy on MKP-1 and TTP mRNA expression (2 and 6 h)

Note: Data expressed as fold change (mean ± SEM) from untreated cells (control = 1).

Abbreviations: AZE, azelastine; FP, fluticasone propionate; NM, nasal mucosa; NP, nasal polyps.

* $p < .05$ compared to FP; [†] $p < .05$ compared to AZE; [‡] $p < .01$ compared to AZE.

MP-AzeFlu at dilution 1:10² showed a partial superior effect in the up-regulation of MKP-1 mRNA expression compared to monotherapy with FP in NP (at 2 h) and AZE in NM (at 2 h and 6 h; Table 1). MKP-1 protein expression was not detected when cells were incubated with MP-AzeFlu and FP.

2.3 | TTP

MP-AzeFlu and FP at dilution 1:10² increased TTP mRNA expression in NM (at 2 h and 6 h) and NP (at 6 h).

AZE had no effect on TTP mRNA expression. MP-AzeFlu at dilution 1:10² showed a superior effect in the up-regulation of TTP mRNA expression compared to monotherapy with FP and AZE in NM (at 2 h) and with AZE in NM and NP (at 6 h; Table 1). The effect of drugs on TTP protein expression was not studied due to very low gene expression.

3 | DISCUSSION

In this study, MP-AzeFlu, FP and AZE up-regulated GILZ mRNA expression, with MP-AzeFlu showing a superior effect compared with that of monotherapy. MP-AzeFlu, FP and AZE also up-regulated MKP-1 mRNA expression; however, no significant differences were observed between MP-AzeFlu and monotherapy. MP-AzeFlu and FP up-regulated TTP mRNA expression, while AZE did not.

Anti-inflammatory genes are activated when glucocorticoids (GCs) diffuse across the cell membrane to bind to GR α . The ligand-bound receptor translocates to the nucleus and binds GC-responsive elements (GREs) on the promoter region of target genes.¹⁰ The anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu has been confirmed by the up-regulation of anti-inflammatory gene expression of GILZ, MKP-1 and TTP in our *in vitro* model. These findings suggest some of the molecular mechanisms of action of MP-AzeFlu in the upper airway inflammation (both AR and CRSwNP). However, *in vitro* models have limitations. In this artificial setting, interactions between cells are lost. Furthermore, the concentration of drugs used do not correlate

with clinical doses used in the patient care setting. Thus, these findings may not translate to clinical outcomes and further studies are needed to confirm the findings.

In conclusion, the superior clinical effect of MP-AzeFlu on both NP and NM compared with monotherapy may be partly related to the greater up-regulation of the anti-inflammatory gene expression of GILZ and, to a lesser extent, MKP-1 and TTP expression.

KEYWORDS

azelastine, fluticasone, gene expression, GILZ, MKP-1, MP-AzeFlu, TTP

ACKNOWLEDGEMENTS

Technical assistance, editorial assistance and medical writing assistance were provided under the direction of the authors by Stephanie Breslan, MS; Thomas Lee, MS; and Strategix, an affiliate of The Lynx Group, LLC. Funding for this support was provided by Viatrix.

CONFLICT OF INTEREST

Joaquim Mullol is or has been a member of national and international scientific advisory boards (consulting), received fees for lectures, and grants for research projects from Allakos, AstraZeneca, Genentech-Roche, Glenmark, GSK, Menarini, MSD, Mitsubishi-Tanabe, MYLAN-MEDA Pharma (Viatrix), Novartis, Procter & Gamble, Sanofi-Genzyme & Regeneron, UCB and Uriach Group. SVA, JRF, VT, MF, IA and AV do not have conflicts of interest for the present manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors made substantial contributions to the conception or design of the manuscript, or the acquisition, analysis or interpretation of data for the manuscript, and all authors were involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. The authors were fully responsible for all content and editorial decisions and received no financial support or other forms of compensation related to the development of this manuscript. All authors had final approval of the manuscript and are accountable for all aspects of the work in ensuring the accuracy and integrity of this manuscript.

ETHICAL APPROVAL

The Dymecos 2 study was approved by the Ethics Committee (CEIm) from Hospital Clinic Barcelona (Catalonia, Spain) on 3 February 2016 with the Registration No. HCB/2016/0007.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Sònia Vicens-Artés¹

Jordi Roca-Ferrer^{1,2}

Valeria Tubita^{1,3}

Mireya Fuentes^{1,2}

Isam Alobid^{1,2,3,4}

Antonio Valero^{1,2,5}

Ferdinand Kopietz⁶

DucTung Nguyen⁶

Joaquim Mullol^{1,2,3,4}

¹Clinical and Experimental Respiratory Immunology, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²CIBER of Respiratory Diseases (CIBERES), Barcelona, Spain

³Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Rhinology Unit & Smell Clinic, ENT Department, Hospital Clinic Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Allergy Section, Pulmonology & Allergy Department, Barcelona, Spain

⁶MEDA Pharma GmbH & Co. KG (A Viatris Company), Bad Homburg, Germany

Correspondence

Joaquim Mullol, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain.

Email: jmullol@clinic.cat

REFERENCES

1. Eifan A, Durham S. Pathogenesis of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(9):1139-1151.
2. Orlandi RR, Kingdom TT, Hwang PH, et al. International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;Suppl 1:S22-S209.
3. Klimek L, Berger WE, Bousquet J, et al. MP-AzeFlu in moderate-to-severe allergic rhinitis: a literature review. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;182(11):1026-1035.
4. Mullol J, de Borja CF, Martínez-Antón MA, et al. Mometasone and desloratadine additive effect on eosinophil survival and cytokine secretion from epithelial cells. *Respir Res*. 2011;12(1):23.
5. Roca-Ferrer J, Pujols L, Pérez-González M, et al. Superior effect of MP-AzeFlu than azelastine or fluticasone propionate alone on reducing inflammatory markers. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14:86.
6. Fernández-Bertolin L, Mullol J, Fuentes-Prado M, et al. Deficient glucocorticoid induction of anti-inflammatory genes in nasal polyp fibroblasts of asthmatic patients with and without aspirin intolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(5):1243-1246.e12.
7. Kariyawasam HH, James LK. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: targeting IgE with anti-IgE omalizumab therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:5483-5494.
8. Kempuraj D, Huang M, Kandere-Grzybowska K, et al. Azelastine inhibits secretion of IL-6, TNF-alpha and IL-8 as well as NF-kappaB activation and intracellular calcium ion levels in normal human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;132(3):231-239.
9. Luo X, Ma R, Wu X, et al. Azelastine enhances the clinical efficacy of glucocorticoid by modulating MKP-1 expression in allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015;272(5):1165-1173.
10. Hox V, Lourijsen E, Jordens A, et al. Benefits and harm of systemic steroids for short- and long-term use in rhinitis and rhinosinusitis: an EAACI position paper. *Clin Transl Allergy*. 2020;10(1):1.

How to cite this article: Vicens-Artés S, Roca-Ferrer J, Tubita V, et al. Superior effect of MP-AzeFlu compared to monotherapy with fluticasone propionate or azelastine on GILZ, MKP-1 and TTP anti-inflammatory gene expression in healthy and inflamed upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy*. 2022;52:788-791. doi:[10.1111/cea.14099](https://doi.org/10.1111/cea.14099)

ESTUDI 4: Efecte de l'MP-AzeFlu en comparació amb la monoteràpia sobre l'expressió gènica de COX-2, PGE₂ i EP2 a la mucosa de la via respiratòria superior.

Sònia Vicens-Artés, Jordi Roca-Ferrer, Valeria Tubita, Mireya Fuentes, Isam Alobid, Antonio Valero, Ferdinand Kopietz, DucTung Nguyen, Joaquim Mullol.

Immun Inflamm Dis. 2023 Jan;11(1):e709.

DOI: 10.1002/iid3.709.

Antecedents: L'MP-AzeFlu, formulació intranasal de propionat de fluticasona (PF) i clorhidrat d'azelastina (AZE), ha estat àmpliament estudiat en la rinitis al·lèrgica havent-se demostrat que redueix mediadors inflamatoris i la hiperreactivitat nasal. La seva eficàcia clínica en la rinitis al·lèrgica moderada-greu és superior a la dels seus components individuals. Ara bé, els mecanismes pels quals l'MP-AzeFlu produeix aquest efecte clínic superior no han estat completament explicats.

Objectiu: Investigar l'efecte de l'MP-AzeFlu i del PF sobre el metabolisme de l'àcid araquidònic mesurant canvis en l'expressió de les isoformes de la COX, i dels receptors de la prostaglandina E₂ (EP2 i EP3); així com la secreció de les prostaglandines PGD₂ i PGE₂ en un model cel·lular *in vitro* d'inflamació nasal.

Mètodes: L'expressió d'aquests marcadors d'inflamació es va avaluar mitjançant un model *in vitro* d'inflamació de les vies respiratòries superiors. Els fibroblasts derivats de mostres de mucosa de les vies respiratòries humanes superiors, tant mucosa nasal com de pòlips nasals, es van cultivar i tractar amb l'estímul proinflamatori IL-1 β (10 ng/mL) i amb MP-AzeFlu o PF (desde 1:10² fins a 1:10⁴). L'expressió gènica, proteica i la secreció es van mesurar mitjançant RT-qPCR, western blot i ELISA respectivament.

Resultats: L'estudi va trobar que la IL-1 β indueix l'expressió d'ARNm i proteïnes de COX-2 així com la secreció de PGE₂. Aquests increments van ser inhibits per l'MP-AzeFlu i el PF en totes les dilucions i temps estudiats. L'expressió gènica d'EP2 va ser induïda per l'MP-AzeFlu i el PF, tot i que no es va detectar un augment en la expressió proteica. La IL-1 β no va induir l'expressió de COX-1 i EP3 ni la secreció de PGD₂ en fibroblasts.

Conclusió: Aquesta regulació a la baixa de COX-2 i PGE₂ juntament amb l'augment de l'expressió del receptor EP2 reforça l'efecte antiinflamatori de l'MP-AzeFlu en la inflamació de les vies respiratòries superiors, tant en mucosa nasal com en pòlips nasals.

SHORT REPORT

Immunity, Inflammation and Disease

Open Access

WILEY

Effect of MP-AzeFlu compared to monotherapy on COX-2, PGE₂, and EP2 gene expression in upper airway mucosa

Sonia Vicens-Artes¹  | Jordi Roca-Ferrer^{1,2} | Valeria Tubita^{1,3} |
Mireya Fuentes^{1,2} | Isam Alobid^{1,2,3,4} | Antonio Valero^{1,2,5} |
Ferdinand Kopietz⁶ | DucTung Nguyen⁶ | Joaquim Mullol^{1,2,3,4}

¹Clinical and Experimental Respiratory Immunology, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²CIBER of Respiratory Diseases (CIBERES), Barcelona, Spain

³Clinical and Experimental Respiratory Immunology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Rhinology Unit & Smell Clinic, ENT Department, Hospital Clinic Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Allergy Section, Pulmonology & Allergy Department, Barcelona, Spain

⁶MEDA Pharma GmbH & Co. KG (A Viartis Company), Bad Homburg, Germany

Correspondence

Joaquim Mullol, Clinical and Experimental Respiratory Immunology, IDIBAPS, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain.
Email: jmullol@clinic.cat

Funding information

Viartis, Grant/Award Number: n/a

Abstract

MP-AzeFlu (intranasal fluticasone and azelastine) has been widely studied and has demonstrated efficacy in Allergic rhinitis with a superior effect compared to these drugs administered individually; however, the mechanism by which MP-AzeFlu produces this improved clinical effect has not yet been fully explained. In this study, we investigated the effect of MP-AzeFlu and fluticasone propionate (FP) on arachidonic acid metabolism as measured by changes in regulation of cyclooxygenase (COX) isoforms, prostaglandin (PG) D₂, PGE₂, PGE₂ receptor (EP) 2, and EP3. Expression of these key inflammation markers was assessed through an in vitro model of upper airway inflammation using fibroblasts derived from both healthy and inflamed upper airway mucosa. Both MP-AzeFlu and FP inhibited interleukin-1 β -induced COX-2 messenger RNA (mRNA) and protein expression and PGE₂ secretion in vitro. MP-AzeFlu and FP both upregulated EP2 mRNA expression, though neither upregulated EP2 protein expression. This down-regulation of COX-2 and PGE₂ coupled with upregulation of EP2 receptor expression reinforces the anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu in upper airway inflammation.

KEYWORDS

COX-2, EP2, fluticasone, MP-AzeFlu, PGE₂

To the Editor:

Allergic rhinitis (AR) is a disease caused by IgE-mediated reactions that increase cell expression of t-helper 2 (Th2) cytokines (type 2 inflammation) and lead to infiltration of eosinophils into nasal tissue and secretion of mucus.¹ MP-AzeFlu (intranasal fluticasone and azelastine) has been widely studied and has been shown to reduce inflammatory mediators and nasal

hyperreactivity.² Additionally, MP-AzeFlu has demonstrated efficacy in AR with a superior effect compared to its component drugs administered individually.^{3–5} On the other hand, the mechanisms by which this medication improves symptoms of AR have not been fully elucidated.

While the role of epithelial cells on AR pathogenesis has been widely studied, there is increasing

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Immunity, Inflammation and Disease* published by John Wiley & Sons Ltd.

evidence that fibroblasts also play a prominent role in AR. Several studies have demonstrated that fibroblasts release proinflammatory mediators involved in the molecular mechanisms present in the airways of patients suffering from AR. For example, primary nasal fibroblasts isolated from patients with AR showed higher proliferation and migration abilities and increased expression of interleukin (IL)-33 and IL-6 compared to controls.⁶ Furthermore, it has been demonstrated that human fibroblasts from patients with AR release thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in response to IL-17A. Since IL-17A has been implicated in the pathogenesis of AR and TSLP modifies the immune response toward a Th2 phenotype, these results suggest that fibroblasts play a role in the development of AR.⁷ Finally, human nasal fibroblasts showed increased expression of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in response to urban particulate matter, indicating a relationship between fibroblasts and AR pathogenesis.⁸ Consequently, upper airway fibroblasts represent a reliable in vitro model to assess the mechanism involved in these inflammatory diseases due to the relevance of these structural cells in the pathogenesis of AR.⁹

Our laboratory has previously developed in vitro models to study the etiology of upper airways inflammatory diseases as well as the effect and potency of anti-inflammatory drugs.^{10,11} We have reported that abnormalities in arachidonic acid (AA) metabolism are present in structural cells of upper airways inflammatory diseases.¹⁰ In fact, we demonstrated alterations in the regulation of AA metabolism in cultured fibroblasts using IL-1 β as a proinflammatory stimuli.^{10,11}

The objective of this study was to assess the effect of MP-AzeFlu and fluticasone propionate (FP) on AA metabolism by measuring the expression of cyclooxygenase (COX) isoforms, prostaglandin (PG) D₂, PGE₂, PGE₂ receptor (EP) 2, and EP3 in cultured fibroblasts from healthy and inflamed upper airway mucosa using an in vitro model of inflammation.

Nasal fibroblasts were obtained from nasal mucosa (NM) and nasal polyp (NP) tissues from patients undergoing endoscopic sinonasal surgery and isolated using a specific and selective growth culture media. The purity of fibroblast cultures was confirmed by positive immunostaining to vimentin and negative to cytokeratin 1. Isolated fibroblasts were cultured in a serum-supplemented medium as previously described.¹⁰ Cells were treated for 1 to 24 h with MP-AzeFlu or FP (dilutions 1:10², 1:10³, 1:10⁴) with or without 10 ng/ml IL-1 β . COX-2 and EP2 messenger RNA (mRNA) gene and protein expression were assessed, as well as PGE₂ secretion.

1.1 | COX-2 expression

IL-1 β induced COX-2 mRNA expression at 6 (data not shown) and 24 h (Figure 1, Panel A) in NM and NP. MP-AzeFlu and FP inhibited IL-1 β -induced COX-2 mRNA expression at all dilutions at 6 ($p < .05$; data not shown) and 24 h ($p < .05$; Figure 1, Panel A) in NM and NP. IL-1 β also induced COX-2 protein expression at 24 h in NM and NP. MP-AzeFlu and FP inhibited IL-1 β -induced COX-2 protein expression at all dilutions at 24 h in NM ($p < .05$) and NP (not significant) (Figure 2, Panel A).

1.2 | EP2 expression

MP-AzeFlu and FP upregulated EP2 mRNA expression at dilution 1:10² at 24 h in NM ($p < .05$) and NP ($p < .01$; Figure 1, Panel B). Neither MP-AzeFlu nor FP upregulated EP2 protein expression at dilution 1:10² in NM or NP (Figure 2, Panel B).

1.3 | PGE₂ expression

IL-1 β induced PGE₂ secretion at 24 h in NM and NP without reaching statistical significance. MP-AzeFlu and FP demonstrated inhibition of IL-1 β -induced PGE₂ secretion at dilution 1:10² at 24 h in NM and NP without reaching statistical significance (Figure 2, Panel C).

1.4 | COX-1, EP3, and PGD₂

IL-1 β did not induce mRNA expression of COX-1 or EP3 nor protein secretion of PGD₂ in fibroblasts (data not shown).

In this study, we examined the effects of MP-AzeFlu and FP on the expression of COX isoforms, PGD₂, PGE₂, EP2, and EP3 in cultured fibroblasts from both healthy and inflamed upper airway mucosa. We demonstrated that both MP-AzeFlu and FP inhibited IL-1 β -induced COX-2 mRNA and protein expression in NM and NP. In addition, MP-AzeFlu and FP also inhibited IL-1 β -induced PGE₂ secretion at dilution 1:10² at 24 h in NM and NP. Finally, MP-AzeFlu and FP both upregulated EP2 mRNA expression in NM and NP; however, neither upregulated EP2 protein expression. The root cause of the discrepancy between message levels and protein expression is unknown but is likely a result of regulation events occurring between transcription of the mRNA and translation of the protein product. This discordance is frequently described in the literature, as protein products and RNA are single steps in a complex, multi-step

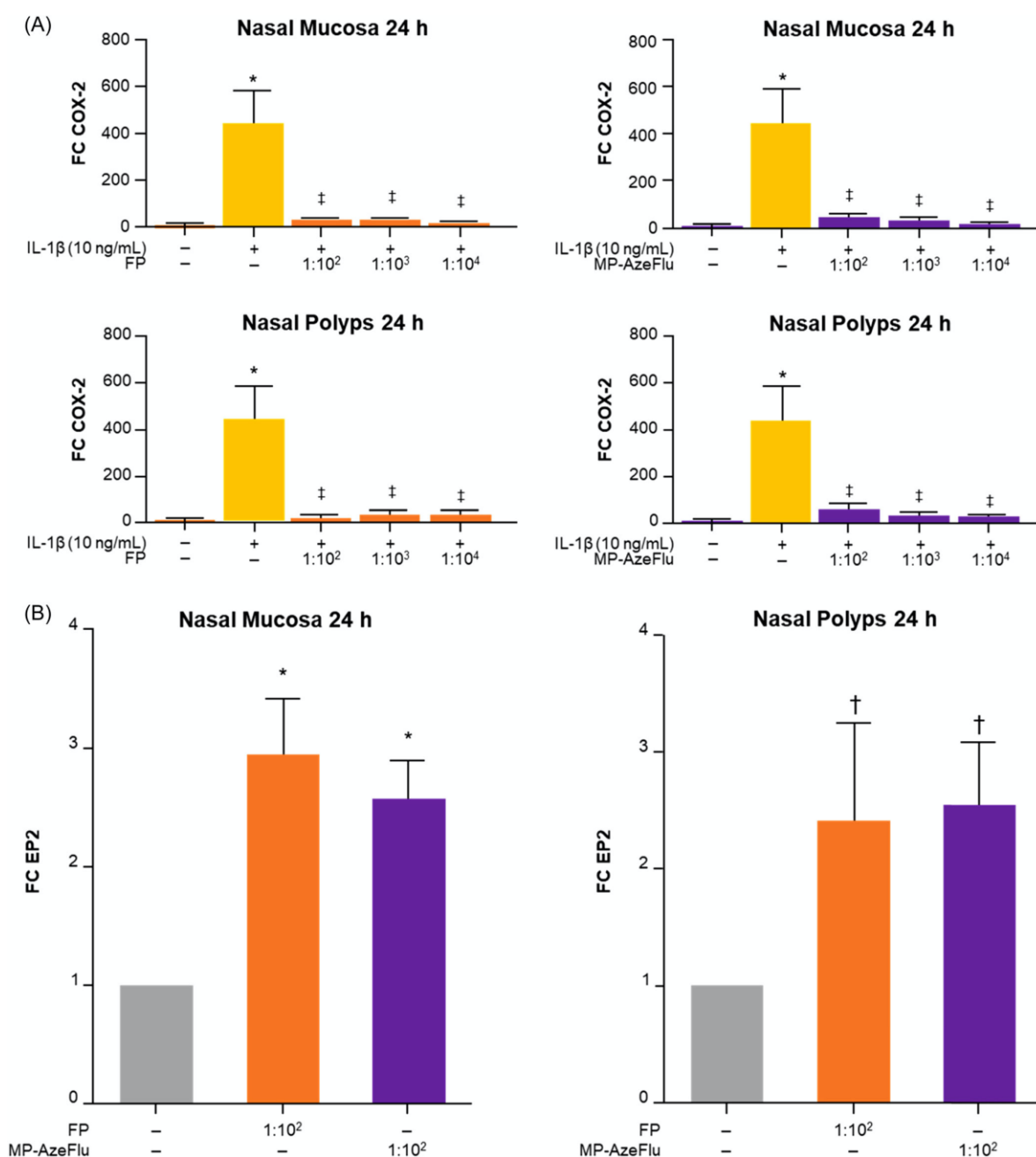


FIGURE 1 MP-AzeFlu and fluticasone effects on COX-2 and EP2 mRNA expression at 24 h. (Panel A) MP-AzeFlu and FP effect on COX-2 mRNA expression. (Panel B) MP-AzeFlu and FP effect on EP2 mRNA expression. * $p < .05$ compared with culture media alone; † $p < .01$ compared with culture media alone; ‡ $p < .05$ compared with IL-1 β . FC, fold change; FP, fluticasone; IL, interleukin; MP-AzeFlu, intranasal fluticasone and azelastine; mRNA, messenger RNA.

molecular process involving dynamic production, modification, and degradation of messages, intermediates, and products.¹² Genome-wide studies of the correspondence between mRNA and protein have shown poor correlation

between message and product expression levels.¹³ Finally, a limitation of this study is that the drug concentrations used in this in vitro environment do not correspond to clinical doses and interactions between

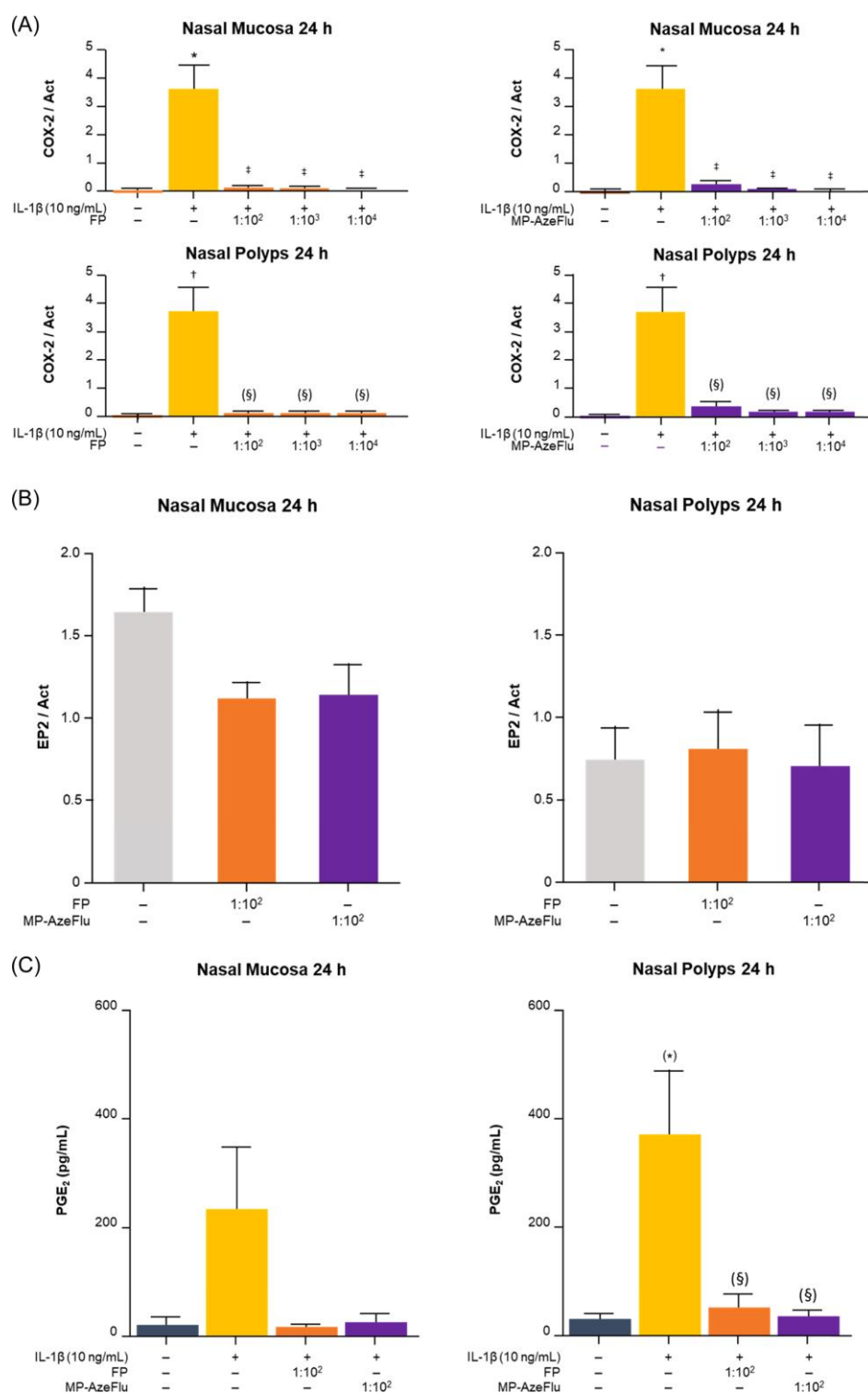


FIGURE 2 (See caption on next page)

cells is lost; thus, these findings may not translate to clinical outcomes. In addition, the endotype of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) can be quite complex, and the inflammatory profile of the CRSwNP samples were not obtained. However, because the patient population included in this study was primarily from Spain (a Western country), it can be reasonably assumed that these individuals with CRSwNP would primarily be characterized as having a T2 endotype.^{14,15} In fact, recent data (*Rhinology*, in press) from our research group indicate that 84% of patients with CRSwNP in Spain have a T2 endotype. This rate increases to 87% in patients severely affected by CRSwNP and 91% of those with airway multimorbidities.¹⁶

In summary, the downregulation of COX-2 and PGE₂, together with the upregulation of the EP2 receptor, reinforces the anti-inflammatory effect of MP-AzeFlu in upper airway inflammation.

Additional information about study methods and findings are available at <https://doi.org/10.5281/zenodo.6038328>

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors made substantial contributions to the conception or design of the manuscript, or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the manuscript, and all authors were involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. The authors were fully responsible for all content and editorial decisions and received no financial support or other form of compensation related to the development of this manuscript. All authors had final approval of the manuscript and are accountable for all aspects of the work in ensuring the accuracy and integrity of this manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Technical, editorial, and medical writing assistance were provided under the direction of the authors by Stephanie Breslan, MS; Thomas Lee, MS; and Amplity Health. Funding for this support was provided by Viatris.

CONFLICT OF INTEREST

Joaquim Mullol is or has been a member of national and international scientific advisory boards (consulting), received fees for lectures, and grants for research projects

from Allakos, AstraZeneca, Genentech-Roche, Glenmark, GSK, Menarini, MSD, Mitsubishi-Tanabe, MYLAN-MEDA Pharma (Viatris), Novartis, Procter and Gamble, Sanofi-Genzyme and Regeneron, UCB, and Uriach Group. The remaining authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The Dymecos 2 study was approved by the Ethics Committee (CEIm) from Hospital Clinic Barcelona (Catalonia, Spain) on February 3, 2016 with the Registration N° HCB/2016/0007.

ORCID

Sonia Vicens-Artes  <http://orcid.org/0000-0002-3839-0417>

REFERENCES

1. Eifan A, Durhan S. Pathogenesis of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(9):1139-1151. doi:10.1111/CEA.12780
2. Kortekaas Krohn I, Callebaut I, Alpizar YA, et al. MP29-02 reduces nasal hyperreactivity and nasal mediators in patients with house dust mite-allergic rhinitis. *Allergy*. 2018;73(5):1084-1093. doi:10.1111/ALL.13349
3. Hampel FC, Ratner PH, Van Bavel J, et al. Double-blind, placebo-controlled study of azelastine and fluticasone in a single nasal spray delivery device. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;105(2):168-173. doi:10.1016/J.ANAI.2010.06.008
4. Carr W, Bernstein J, Lieberman P, et al. A novel intranasal therapy of azelastine with fluticasone for the treatment of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(5):1282-1289. doi:10.1016/J.JACI.2012.01.077
5. Klimek L, Berger WE, Bousquet J, et al. MP-AzeFlu in moderate-to-severe allergic rhinitis: a literature review. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;182(11):1026-1035. doi:10.1159/000516417
6. Li Z, Zou W, Sun J, et al. A comprehensive gene expression profile of allergic rhinitis-derived nasal fibroblasts and the potential mechanism for its phenotype. *Hum Exp Toxicol*. 2022;41:41. doi:10.1177/09603271211069038
7. Wang WW, Yu HW, Zhang B, Pan YL, Shao SW. Interleukin-17A up-regulates thymic stromal lymphopoietin production by nasal fibroblasts from patients with allergic rhinitis. *Eur Arch*

FIGURE 2 MP-AzeFlu and fluticasone effects on COX-2 and EP2 protein expression and PGE₂ secretion. (Panel A) Effect of MP-AzeFlu and FP on COX-2 protein expression. (Panel B) Effect of MP-AzeFlu and FP on EP2 protein expression. (Panel C) Effect of MP-AzeFlu and FP on PGE₂ secretion. **p* = .06 compared with culture media alone. **p* < .001 compared with culture media alone; †*p* < .01 compared with culture media alone; ‡*p* < .05 compared with IL-1β; (§)*p* < .06 compared with IL-1β. Act, β-actin; FP, fluticasone; IL, interleukin; MP-AzeFlu, intranasal fluticasone and azelastine.

- Otorhinolaryngol.* 2021;278(1):127-133. doi:10.1007/S00405-020-06274-3
8. Kim JS, Choi H, Oh JM, et al. Effect of fluticasone propionate on human nasal fibroblasts exposed to urban particulate matter. *Auris Nasus Larynx.* 2020;47(3):415-424. doi:10.1016/J.ANL.2019.11.002
 9. Ball SL, Mann DA, Wilson JA, Fisher AJ. The role of the fibroblast in inflammatory upper airway conditions. *Am J Pathol.* 2016;186(2):225-233. doi:10.1016/J.AJP.2015.09.020
 10. Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, et al. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(1):66-72.e1. doi:10.1016/j.jaci.2011.01.065
 11. Machado-Carvalho L, Martín M, Torres R, et al. Low e-prostanoid 2 receptor levels and deficient induction of the IL-1 β /IL-1 type I receptor/COX-2 pathway: vicious circle in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):99-107.e7. doi:10.1016/J.JACI.2015.09.028
 12. Wang D. Discrepancy between mRNA and protein abundance: insight from information retrieval process in computers. *Comput Biol Chem.* 2008;32(6):462-468. doi:10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2008.07.014
 13. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep.* 2015;5:5. doi:10.1038/SREP10775
 14. Staudacher AG, Peters AT, Kato A, Stevens WW. Use of endotypes, phenotypes, and inflammatory markers to guide treatment decisions in chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2020;124(4):318-325. doi:10.1016/J.ANAI.2020.01.013
 15. Kato A, Peters AT, Stevens WW, Schleimer RP, Tan BK, Kern RC. Endotypes of chronic rhinosinusitis: relationships to disease phenotypes, pathogenesis, clinical findings, and treatment approaches. *Allergy.* 2022;77(3):812-826. doi:10.1111/ALL.15074
 16. Sánchez-Collado I, Mora T, Muñoz-Cano R, Ribó P, Mullol J, Valero A. Epidemiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). *Rhinology.* Forthcoming. <https://www.rhinologyjournal.com/index2.php>

How to cite this article: Vicens-Artes S, Roca-Ferrer J, Tubita V, et al. Effect of MP-AzeFlu compared to monotherapy on COX-2, PGE₂, and EP2 gene expression in upper airway mucosa. *Immun Inflamm Dis* 2023;11:e709. doi:10.1002/iid3.709



DISCUSSIÓ

Aquesta tesi presenta uns resultats que podrien explicar alguns dels mecanismes d'acció que hi ha darrere de l'eficàcia clínica superior de l'MP-AzeFlu, respecte a la monoteràpia dels seus propis components (propionat de fluticasona i clorhidrat d'azelastina), observada en el tractament dels pacients amb rinitis al·lèrgica. Les principals troballes d'aquesta tesi han estat: 1r) L'MP-AzeFlu inhibeix significativament la supervivència d'eosinòfils en un model *in vitro* d'inflamació eosinofílica, i ho fa de forma superior que la monoteràpia; 2n) L'MP-AzeFlu redueix significativament l'expressió de citocines proinflamàtores (IL-6, IL-8, GM-CSF) en els dos models *in vitro* de cultiu primari de cèl·lules epitelials i de fibroblasts de mucosa nasal (control) i pòlips nasals (inflamada) essent, en el cas d'IL-6, superior a l'efecte de la monoteràpia; 3r) L'MP-AzeFlu induïx significativament l'expressió de gens antiinflamatoris (GILZ, MKP-1 i TTP) en un model *in vitro* d'inflamació nasal basat en el cultiu primari de fibroblasts de mucosa nasal (control) i pòlips nasals (inflamada), mostrant un efecte superior a la monoteràpia per al GILZ; i 4t) L'MP-AzeFlu augmenta l'expressió d'EP2 i redueix la de COX-2 i PGE₂, mediadors de la via de l'àcid araquidònic, en aquest mateix model *in vitro* d'inflamació nasal amb fibroblasts.

El nostre grup de recerca té una llarga trajectòria en el camp de l'estudi mecanístic de fàrmacs en models *in vitro* d'inflamació eosinofílica respiratòria. D'una banda, destaca el model d'inflamació eosinofílica generat a partir d'eosinòfils aïllats de sang perifèrica de pacients (11,45,122,138–141) i, de l'altra, els models d'inflamació de les vies respiratòries emprant cultius primaris de cèl·lules epitelials (11,11,45,122,138–143) o fibroblasts (142–144) obtinguts de vies aèries superiors (mucosa nasal i pòlips nasals). De fet, aquests models d'experimentació han estat emprats per a l'estudi de l'efecte antiinflamatori de corticoides tant orals com tòpics (45,139,145), antihistamínics (138), cromones (139,140), antileucotriens (122) i d'altres (142,143); així com la combinació de corticoides i antihistamínics (11). Aquestes investigacions evidencien la consistència dels models emprats en aquesta tesi per a l'estudi mecanístic de fàrmacs antiinflamatoris.

EOSINÒFILS

Els eosinòfils són cèl·lules inflammatòries que desenvolupen un paper molt important en la patogènia de la rinitis al·lèrgica i la rinosinusitis crònica, sobretot amb pòlips nasals (RSCaPN). Diversos estudis en pacients han demostrat que l'exposició a al·lèrgens augmenta el número d'eosinòfils en rentats nasals (99,146) i biòpsies nasals (101) de pacients amb rinitis al·lèrgica. De forma similar, ha estat descrit que la quantitat d'eosinòfils presents en citologies nasals de pacients que pateixen rinitis al·lèrgica, RSCaPN amb endotip al·lèrgic i no al·lèrgic (104) està augmentada quan la malaltia està activa. De fet, s'ha demostrat la relació entre l'evolució de la malaltia i el número d'eosinòfils presents a les vies respiratòries, suggerint que els eosinòfils tenen un paper important en les malalties inflammatòries de la via respiratòria superior i inferior (147).

Una de les dianes terapèutiques del tractament de les malalties inflammatòries de les vies aèries superiors són els eosinòfils. De fet, la disminució en el seu número, és a dir, la seva apoptosi, és un dels mecanismes d'acció dels corticoides. Estudis en pacients han establert que el tractament antiinflamatori amb corticoides, com el propionat de fluticasona (99,101,148,149), el furoat de fluticasona (65,102,104) o el dipropionat de beclometasona (149), redueix el número d'eosinòfils presents en rentats nasals (99,148), biòpsies nasals (65,101), citologia nasal (104) i frotis nasals (102,149) de pacients amb rinitis al·lèrgica, així com en la citologia nasal de pacients amb RSCaPN (104).

En relació amb els antihistamínics, alguns estudis han valorat l'efecte d'aquests fàrmacs en els nivells d'eosinòfils. Un treball ha descrit que el nombre d'eosinòfils, presents tant en sang com en mucosa nasal, disminueix quan els pacients amb rinitis al·lèrgica són tractats amb levocetiricina (117,150), rupatadina (150) o desloratadina (117). També s'ha establert que l'ús de desloratadina (151) o levocetiricina (119) en pacients amb rinitis al·lèrgica redueix els nivells d'eosinòfils en secrecions nasals. Un altre estudi, malgrat no testar la presència o número d'eosinòfils, ha descrit que l'azelastina redueix els nivells de proteïna catiònica dels eosinòfils, resultant de

l'activació dels eosinòfils, en les secrecions nasals de pacients amb pòlips nasals i al·lèrgia a la pols (152).

En la cerca de literatura científica, no hem trobat estudis en pacients amb rinitis al·lèrgica o RSCaPN on s'avaluï l'efecte de l'MP-AzeFlu, o qualsevol teràpia combinada de corticoide i antihistamínic, sobre els eosinòfils.

Aquestes dades evidencien un augment en el número d'eosinòfils quan la malaltia està activa (99,101,104,146) i l'efecte dels corticoides (65,99,101,102,104,148,149) i antihistamínics (117,150,151) en la seva reducció. Tenint això en compte, els nostres resultats serien representatius, en certa forma, amb el que s'observa en pacients. En primer lloc, l'estimulació de la inflamació, ja sigui a través de la exposició a al·lèrgens en pacients al·lèrgics o per estímul proinflamatori en el nostre *estudi in vitro*, a l'**estudi 1**, augmenta la presència i supervivència dels eosinòfils respectivament. En segon lloc, el tractament amb corticoide i antihistamínic inhibeix aquest efecte, tant en pacients com en els models cel·lulars emprats en aquesta tesi.

En l'**estudi 1** de la tesi s'ha demostrat que la supervivència dels eosinòfils augmenta per l'estímul proinflamatori hECM. Aquest efecte ja havia estat demostrat (11,122,139), pel que únicament representa una validació del model *in vitro* que s'ha emprat.

D'altra banda, els resultats de l'**estudi 1** demostren que el propionat de fluticasona redueix la supervivència dels eosinòfils en el model *in vitro*. Tal i com ja havia estat prèviament descrit, els corticoides presenten aquest efecte en el model d'inflamació eosinofílica *in vitro*, doncs diversos corticoides tòpics com ara el propionat de fluticasona (139), el furoat de fluticasona (45), la budesonida (139), el furoat de mometasona (11) o el dipropionat de beclometasona (11,139) inhibeixen aquesta supervivència induïda. Altres grups de recerca també han descrit que el propionat de fluticasona redueix la supervivència de cultius primaris d'eosinòfils (148). Per tant, les

nostres dades se sumen a les ja existents i consoliden l'efecte antiinflamatori dels corticoides.

A l'**estudi 1**, també demostrem que un antihistamínic com el clorhidrat d'azelastina presenta un efecte antiinflamatori disminuint la supervivència dels eosinòfils en el nostre model *in vitro*. Estudis previs havien demostrat que un altre antihistamínic com la desloratadina també tenia aquest efecte (11,138); però no havia estat demostrat amb el clorhidrat d'azelastina *in vitro*, tot i que *in vivo* sí que s'ha descrit aquest efecte antiinflamatori de l'azelastina (152). Aquestes noves dades suggereixen que un mecanisme d'acció del tractament de la rinitis al·lèrgica i la RSCaPN amb antihistamínics es basaria en la reducció de la supervivència dels eosinòfils.

Finalment, destacar que a l'**estudi 1** establím un efecte superior de l'MP-AzeFlu en comparació als fàrmacs individualment sobre la disminució de la supervivència dels eosinòfils quan s'aplica als cultius un corticoide, el propionat de fluticasona, i un antihistamínic, el clorhidrat d'azelastina. Aquest efecte amb aquests dos fàrmacs no havia estat prèviament demostrat i únicament existeix un estudi realitzat pel nostre grup en el mateix model d'inflamació eosinofílica *in vitro* en que es demostra que un altra combinació d'un corticoide, el furoat de mometasona, i un antihistamínic, la desloratadina, també presenta un efecte superior als fàrmacs de forma individual (11).

Així doncs, els resultats obtinguts en aquesta tesi podrien explicar un dels mecanismes de la eficàcia clínica superior de l'MP-AzeFlu, en comparació als fàrmacs en monoteràpia, ja que hem observat que el tractament amb MP-AzeFlu redueix la supervivència dels eosinòfils *in vitro* significativament i de forma superior a la monoteràpia.

INTERLEUCINA 6

La IL-6 és una citocina proinflamatòria amb un paper rellevant en la patogènesi de la rinitis al·lèrgica i la RSC ja que intervé en diferents aspectes de la resposta immunitària, com ara estimulants els limfòcits T, induint la diferenciació terminal dels limfòcits B i estimulants la producció d'immunoglobulines (105). De fet, s'ha establert que els nivells d'IL-6 són superiors en biòpsies nasals (103,153,154) i PBMCs (155) de pacients amb RSC (103,153–155), en comparació amb controls. S'ha observat també que IL-6 augmenta significativament en rentats nasals (146) i secrecions nasals (99,156,157) després de la exposició als al·lèrgens clínicament rellevants en pacients amb rinitis al·lèrgica.

Considerant la IL-6 com a diana terapèutica s'ha demostrat àmpliament que els corticoides redueixen l'expressió d'aquesta citocina. Diversos estudis han demostrat l'efecte inhibidor dels corticoides com el la propionat de fluticasona (99,157) o la prednisona (103) en l'expressió d'IL-6 en secrecions nasals de pacients amb rinitis al·lèrgica (99,157) i biòpsies nasals de pacients amb rinosinusitis crònica (103).

A la literatura hi ha molt poques evidències d'estudis *in vivo* en rinitis al·lèrgica que valorin l'efecte dels antihistamínics en la secreció d'IL-6. Per exemple, un estudi realitzat en pacients amb rinitis al·lèrgica ha descrit que la desloratadina provoca una reducció en els nivells d'IL-6 en el sèrum d'aquests pacients (118).

A la literatura hi ha estudis que valoren l'efecte de la combinació d'antihistamínics i corticoides. Un d'ells va reportar que el tractament amb una combinació de clorhidrat d'azelastina i budesonida produïa una reducció d'IL-6 en sèrum de pacients amb rinitis al·lèrgica (158). Un altre ha observat un descens en els nivells d'IL-6 en sèrum de pacients amb rinitis al·lèrgica quan s'empra la combinació d'un antihistamínic i un corticoide, ja sigui budesonida amb loratadina o furoat de mometasona amb loratadina (159).

Aquestes dades evidencien un augment en la concentració d'IL-6 quan la malaltia està activa així com un efecte inhibidor dels corticoides, antihistamínics i la seva

combinació. Tenint això en compte, els nostres resultats dels **estudis 1 i 2** podrien ser representatius de la patogènia de la rinitis al·lèrgica, doncs l'estimulació de la inflamació, ja sigui a través de la exposició a al·lèrgens en pacients al·lèrgics o per estímul proinflamatori en els estudis *in vitro*, augmenta la secreció d'IL-6 i l'ús dels fàrmacs la redueix .

En els **estudis 1 i 2** de la tesi es mostra que la secreció d'IL-6 augmenta sota l'estímul proinflamatori en cèl·lules epitelials i fibroblasts, respectivament. Aquest resultat són coherents amb els estudis prèviament publicats, doncs hi ha una gran quantitat d'articles que han estudiat l'efecte d'un estímul proinflamatori en l'expressió i secreció d'IL-6. Més concretament, s'ha establert que l'expressió i secreció d'IL-6 augmenta significativament tant si s'aplica sèrum boví fetal (11,45,122,138,141) com antígens d'àcars (160) en cultiu primari de cèl·lules epitelials, així com IgE en mastòcits (161), TNF- α en la línia cel·lular A549 (162) o IL-17A en cultiu primari de cèl·lules epitelials (163). També, en cultius primaris de fibroblasts, s'ha descrit aquesta inducció d'IL-6 per part d'un estímul proinflamatori (164). Les nostres dades, juntament amb les d'aquests estudis, podrien indicar que la IL-6 participa en la inflamació nasal ja que s'ha vist augmentada en multitud de models que inclouen una diversitat d'estímuls proinflammatoris.

En els resultats dels **estudis 1 i 2** d'aquesta tesi es demostra que el tractament amb propionat de fluticasona disminueix la secreció d'IL-6 per part de dues cèl·lules estructurals nasals com són les cèl·lules epitelials i els fibroblasts. Altres estudis han descrit l'efecte antiinflamatori del tractament amb corticoides sobre l'expressió d'IL-6. D'una banda, en cultius primaris de cèl·lules epitelials s'ha inhibit la secreció d'IL-6 per part del propionat de fluticasona (165), el furoat de fluticasona (45), el furoat de mometasona (11), la budesonida (141) i la dexametasona (160). D'altra banda, el propionat de fluticasona en cultius primaris de fibroblasts nasals inhibeix la secreció

d'IL-6 (164). Aquest mateix efecte s'ha descrit per part de la dexametasona a la línia de cèl·lules alveolars A549 (162).

A l'**estudi 1** d'aquesta tesi també es presenta un efecte inhibidor per part del clorhidrat d'azelastina sobre la IL-6 en els cultius de cèl·lules epitelials. Alguns estudis han descrit que la desloratadina (11,138) en cultius primaris de cèl·lules epitelials, el clorhidrat d'azelastina en mastòcits (161) i la rupatadina en la línia cel·lular de mastòcits HMC-1 (166) redueixen l'expressió d'IL-6. El nostre estudi, a diferència dels que trobem a la literatura, ha testat l'efecte del clorhidrat d'azelastina en el cultiu primari de cèl·lules epitelials nasals; i de forma similar als estudis mencionats, també presenta una reducció dels nivells d'IL-6.

En relació a la teràpia combinada, a l'**estudi 1** demostrem un efecte antiinflamatori superior de l'MP-AzeFlu sobre la secreció d'IL-6 en comparació al propionat de fluticasona o el clorhidrat d'azelastina en monoteràpia, en el cultiu primari d'epitelials. Aquest efecte amb aquesta combinació de fàrmacs no havia estat prèviament demostrat i únicament hi ha un estudi realitzat pel nostre grup en el mateix model *in vitro* en el que es detalla que la combinació d'un corticoide, el furoat de mometasona, i un antihistamínic, la desloratadina, també presenta un efecte superior al dels fàrmacs per separat (11).

Així doncs, es podria deduir que aquesta és una de les dianes on actua el tractament, ja que tant els corticoides com els antihistamínics regulen els nivells d'IL-6. És més, els resultats obtinguts en aquesta tesi podrien explicar un dels mecanismes de la major eficàcia clínica de l'MP-AzeFlu ja que hem demostrat que el tractament amb MP-AzeFlu redueix la secreció d'IL-6 significativament i de forma superior a la monoteràpia.

INTERLEUCINA 8

La IL-8 té una potent activitat sobre els neutròfils i pot provocar també l'alliberament d'histamina de basòfils i l'atracció d'eosinòfils (106,167). Diversos grups han estudiat l'expressió d'IL-8 en les patologies respiratòries i han descrit que la IL-8 es troba augmentada tant en mostres de pòlips nasals en pacients amb RSCaPN a les regions europees (55,72) com en secrecions nasals de pacients amb RA després de l'exposició a al·lèrgens (99,156,157,168). En canvi, un estudi no va detectar cap augment significatiu dels nivells d'IL-8 en rentats nasals de pacients exposats a al·lergen (146).

De forma similar al que succeeix amb la IL-6, la IL-8 és una altra de les dianes terapèutiques del tractament de la rinitis al·lèrgica i la rinosinusitis crònica. Malgrat que hi ha multitud d'estudis que han descrit nivells elevats d'IL-8 en les malalties inflamatòries de les vies respiratòries superiors, molts pocs estudis han valorat l'efecte del tractament sobre IL-8 per a aquestes patologies. Existeixen dos estudis que determinen que el tractament amb propionat de fluticasona proporciona un descens significatiu dels nivells d'IL-8 en les secrecions nasals de pacients amb rinitis al·lèrgica (99,157).

Pel que fa als estudis *in vivo* sobre l'efecte dels antihistamínics en IL-8, hi ha poca literatura al respecte. Un estudi realitzat en pacients amb rinitis al·lèrgica a Itàlia ha pogut determinar que els nivells d'IL-8 en els rentats nasals d'aquests pacients disminueixen significativament amb l'ús de levocetiricina (119).

La teràpia combinada amb un corticoide i un antihistamínic també ha estat estudiada en relació amb els nivells d'IL-8. Un estudi ha establert que el tractament amb dues combinacions, budesonida amb loratadina i mometasona amb loratadina, redueixen els valors d'IL-8 que es troben en sèrum de pacients amb rinitis al·lèrgica (159). En aquest cas, no hi ha un grup de pacients amb monoteràpia, de manera que no es pot determinar si l'efecte de la combinació és superior a la monoteràpia amb el corticoide o l'antihistamínic.

De forma similar a la IL-6, es detecta un augment d'IL-8 quan la inflamació està activa, tant en estudis en pacients com en els nostres experiments *in vitro*, i una reducció d'aquesta expressió per part del tractament amb corticoides, antihistamínics i el tractament combinat d'ambdós fàrmacs. Els nostres resultats exemplifiquen el que té lloc *in vivo* en pacients amb rinitis al·lèrgica i RSC.

En dos dels estudis d'aquesta tesi, **estudis 1 i 2**, s'observa que els nivells d'IL-8 augmenten en presència d'un estímul proinflamatori en cèl·lules epitelials i fibroblasts. En els estudis *in vitro*, de forma semblant al que passava amb IL-6, hi ha un gran número d'investigacions que estudien l'expressió d'IL-8 en models d'inflamació respiratòria. L'estímul proinflamatori, ja sigui sèrum boví fetal (11,45,122,138,141) en cultius primaris de cèl·lules epitelials o TNF- α en la línia de cèl·lules alveolars A549 (162), estimula la producció i secreció d'IL-8.

Els **estudis 1 i 2** han establert l'efecte antiinflamatori del propionat de fluticasona sobre l'expressió d'IL-8. En cultius primaris de cèl·lules epitelials, l'aplicació de furoat de fluticasona (45), budesonida (141), dexametasona (160,162) o furoat de mometasona (11) redueixen la secreció induïda d'IL-8. De la mateixa manera, la dexametasona en cultius de la línia cel·lular A549 (160,162) aconseguix el mateix efecte en la IL-8. Mentre que la majoria dels estudis valoren l'efecte antiinflamatori del tractament en la secreció induïda d'IL-8, un estudi determina que el propionat de fluticasona redueix la secreció basal d'IL-8 sense haver-la induït prèviament amb cap estímul proinflamatori (165).

En aquesta tesi, l'**estudi 1** valora l'efecte d'un antihistamínic, el clorhidrat d'azelastina, sobre la IL-8. No només els corticoides tenen un efecte inhibidor en la secreció d'IL-8, sinó que els antihistamínics, com la desloratadina en cultius primaris de cèl·lules epitelials (11) o la rupatadina en la línia cel·lular de mastòcits LAD2 (166), també presenten aquest efecte inhibidor. No obstant, en un estudi previ del nostre grup, no es va aconseguir trobar aquest efecte de la desloratadina en la reducció d'IL-8 (138).

Tant a l'**estudi 1** com a l'**estudi 2** hem observat l'efecte antiinflamatori d'MP-AzeFlu, però no hem pogut identificar un efecte superior de la formulació, en comparació amb el propionat de fluticasona o el clorhidrat d'azelastina en monoteràpia. Pel que fa a la teràpia combinada, cal destacar que un estudi ha valorat l'efecte de l'ús combinat d'un corticoide, el furoat mometasona, i un antihistamínic, la desloratadina, i no s'han observat diferències significatives, en comparació amb la monoteràpia, en la reducció d'IL-8 (11). Aquestes dades, malgrat tractar-se d'una combinació de fàrmacs diferent a la que hi ha en l'MP-AzeFlu, concorden amb l'efecte que nosaltres hem descrit en aquesta tesi.

Amb tot plegat, es podria interpretar que IL-8 intervé en l'acció del tractament ja que aquest inhibeix la secreció induïda d'IL-8. En el nostre cas, no només en cultiu primari de cèl·lules epitelials sinó també en cultiu primari de fibroblasts. Ara bé, les dades d'aquesta tesi no suggereixen que sigui un dels responsables, almenys per si sol, del superior efecte antiinflamatori de l'MP-AzeFlu.

GM-CSF

El GM-CSF està implicat en la maduració, la quimiotaxi, la supervivència i l'activació dels eosinòfils (107,169); així com en la regulació de la secreció glandular en mucosa nasal (145). Alguns dels estudis en pacients citats prèviament en aquesta discussió també estudiaven la secreció de GM-CSF en mostres nasals després de la provocació nasal amb al·lergen. Dos d'ells no van detectar cap canvi en els nivells de GM-CSF en secrecions nasals després de la provocació (99,146) mentre que els altres tres sí que van observar un augment de GM-CSF en secrecions nasals de pacients després de la exposició a l'al·lergen (101,156,157).

Dos estudis han definit l'efecte inhibidor del propionat de fluticasona sobre l'expressió de GM-CSF (101,157). En un d'ells, el propionat de fluticasona redueix els nivells de

GM-CSF en secrecions nasals després de l'exposició a l'al·lergen (157); en canvi, l'altre va detectar un descens en l'expressió de GM-CSF en el grup tractat amb el propionat de fluticasona en comparació amb el grup placebo (101). Aquestes dades suggeririen que GM-CSF està implicat en l'efecte antiinflamatori dels corticoides.

A la literatura hi ha pocs estudis en pacients que analitzin l'expressió de GM-CSF sota l'efecte dels antihistamínics. Un estudi presenta una tendència a l'alça dels nivells de GM-CSF després de l'exposició a l'al·lergen i no s'observa cap efecte per part de la fexofenadina (170).

A la cerca bibliogràfica no hem trobat cap treball en que s'estudiï l'efecte sobre GM-CSF de la combinació de dos fàrmacs, com per exemple un corticoide i un antihistamínic, entre d'altres combinacions.

Amb totes aquestes evidències, es podria dir que el GM-CSF participa més en l'efecte dels corticoides que no pas en el dels antihistamínics ja que hi ha més treballs a la literatura que relacionen el GM-CSF amb els corticoides que amb els antihistamínics. No obstant, les troballes d'aquestes investigacions no són àmpliament consistents i presenten resultats oposats. A aquest fet, cal afegir la inexistència de dades sobre la teràpia combinada. Per tant, caldria molta més recerca per establir el paper de GM-CSF en relació amb els corticoides i els antihistamínics.

En els **estudis 1 i 2** d'aquesta tesi s'ha determinat que el GM-CSF augmenta sota l'estímul proinflamatori tant en les cèl·lules epitelials com en els fibroblasts. Diversos estudis han demostrat que GM-CSF es troba sobreexpressat en cultius primaris de cèl·lules epitelials de persones que pateixen RSCaPN o de rinitis al·lèrgica (163) i que l'estimulació de la inflamació amb sèrum boví fetal (11,45,122,138–140) o IL-17A (163) augmenta els nivells de GM-CSF en el sobrenedant de cultiu primari de cèl·lules epitelials.

En aquesta tesi, tant en l'**estudi 1** com en l'**estudi 2**, hem provat que el propionat de fluticasona redueix la secreció de GM-CSF induïda per l'estímul proinflamatori en els dos models *in vitro*. Multitud d'estudis han valorat l'efecte dels corticoides sobre el GM-CSF. Semblant a l'efecte observat en la IL-6 i la IL-8, els corticoides redueixen tant la secreció induïda de GM-CSF (11,45,139,140) com l'expressió basal de GM-CSF (165) en cultiu primari de cèl·lules epitelials.

L'**estudi 1** també mostra un efecte antiinflamatori del clorhidrat d'azelastina en la secreció de GM-CSF. Altres tractaments, com la desloratadina (11,138), la fexofenadina (171) o els antagonistes del receptor de leucotriens (122) també tenen un efecte inhibidor de la secreció de GM-CSF en cultiu primari de cèl·lules epitelials.

Els valors de GM-CSF no han estat àmpliament estudiats sota l'efecte de la teràpia combinada. Un estudi del nostre grup que avaluava la combinació de furoat de mometasona i desloratadina no va trobar un efecte superior d'aquesta combinació (11). Malgrat no haver-hi estudis *in vitro* que valorin l'efecte de l'MP-AzeFlu, les nostres dades dels **estudis 1 i 2** segueixen el mateix patró que l'estudi previ amb mometasona i desloratadina.

Els resultats d'aquesta tesi concorden amb les investigacions prèvies, tant pel fet que el tractament inhibeix la secreció induïda de GM-CSF com pel fet que amb MP-AzeFlu no trobem aquest efecte additiu que sí s'observa clínicament en els pacients amb rinitis al·lèrgica. Així doncs, els resultats suggeririen que el GM-CSF és un dels responsables de l'efecte antiinflamatori del tractament però que l'efecte superior de MP-AzeFlu no estaria relacionat, almenys directament, amb el GM-CSF.

GENS ANTIINFLAMATORIS (GILZ, MKP-1 i TTP)

El MKP-1 és un factor antiinflamatori que suprimeix l'activitat de les proteïnes quinases activades per mitògens (MAPK) implicades en els mecanismes moleculars dels

processos inflamatoris (172,173). L'expressió de GILZ es redueix o fins i tot està absent en multitud de trastorns inflamatoris, com la RSCaPN, indicant el seu paper rellevant en les malalties inflamatòries (174). Finalment, el TTP regula les respostes inflamatòries ja que desestabilitza i degrada l'ARNm de diversos mediadors proinflamatoris com el GM-CSF o la COX-2 (175,176).

Pel que fa a aquests **gens antiinflamatoris**, no hem trobat a la literatura cap treball en pacients que estudiï l'expressió d'aquests mediadors en relació amb les patologies que tracta aquesta tesi. En certa forma, es tracta d'un fet que no ens hauria de sorprendre gaire ja que, a diferència dels mediadors discutits prèviament, la detecció d'aquests gens és molt complexa de realitzar *in vivo*.

L'estudi 3 d'aquesta tesi estableix que els tres tractament regulen a l'alça l'expressió gènica de GILZ i MKP-1, mentre que només l'MP-AzeFlu i el propionat de fluticasona han demostrat la capacitat d'augmentar els nivells d'ARNm de TTP. De forma similar prèviament s'havia descrit en el nostre grup de recerca que el corticoide dexametasona induïa l'expressió gènica i proteica de GILZ i MKP-1 (177). A diferència del que s'ha descrit anteriorment, hem determinat que l'MP-AzeFlu té un efecte superior, en comparació amb la monoteràpia, en la inducció de l'expressió gènica de GILZ.

Un estudi *in vitro* ha observat que el propionat de fluticasona augmenta significativament els nivells de proteïna d'MKP-1, i de forma no significativa els de l'ARNm, en cèl·lules de múscul llis de bronquis (178). Una altra recerca ha confirmat l'augment de l'expressió gènica de MKP-1 per part del corticoide budesonida, l'antihistamínic clorhidrat d'azelastina i la combinació d'ambdós en cultiu primari de cèl·lules epitelials (179). També s'ha demostrat que la dexametasona i la budesonida augmenten els nivells d'MKP-1 no significativament en la línia cel·lular A549 i en biòpsies de mucosa de bronquis de pacients amb asma, respectivament (180). Altres estudis han descrit que la dexametasona augmenta l'expressió d'MKP-1 en cultius

primaris de cèl·lules epitelials de pòlips nasals (181) i de fibroblasts de mucosa i pòlips nasals (177).

D'altra banda, la dexametasona i la budesonida augmentaren l'expressió de GILZ significativament en la línia cel·lular A549 i en biòpsies de mucosa de bronquis de pacients amb asma (180), mentre que el nostre grup va definir també l'efecte de la dexametasona en la inducció de GILZ en cultius primaris de fibroblasts de mucosa i pòlips nasals (177).

Dos estudis més han determinat que els corticoides budesonida i dexametasona augmenten els nivells de TTP en cèl·lules epitelials bronquials (182) i en la línia cel·lular A549 (183).

Algunes de les discrepàncies entre els nostres resultats i els de la literatura podrien explicar-se ja que el nostre disseny experimental utilitza un model cel·lular i uns fàrmacs diferents als que s'han testat en aquests altres estudis. No obstant, cal molta més recerca per esclarir i detallar l'efecte dels corticoides, antihistamínics i la seva combinació sobre l'expressió d'aquests gens antiinflamatoris.

D'acord amb els nostres resultats, la regulació positiva de l'expressió gènica de GILZ, MKP-1 i TTP en el nostre model *in vitro* podria explicar l'efecte antiinflamatori d'MP-AzeFlu i suggeriria alguns dels mecanismes moleculars d'acció de l'MP-AzeFlu en la inflamació de les vies respiratòries superiors, tant per a la rinitis al·lèrgica com per a la RSCaPN. Addicionalment, l'efecte superior de l'MP-AzeFlu, respecte a la monoteràpia, observat en els nivells d'ARNm de GILZ podria ser una de les explicacions per a la seva superior eficàcia clínica. Ara bé, donat que no hem trobat altres estudis que testin aquesta formulació *in vitro*, caldria dur a terme més investigacions en aquest sentit per tal de confirmar les troballes d'aquesta tesi.

METABOLISME DE L'ÀCID ARAQUIDÒNIC

La PGE₂ i la COX-2 son mediadors claus, pertanyent a la família dels eicosanoids, dels processos inflamatoris perquè augmenten la producció de citocines i anticossos relacionats amb la inflamació de tipus 2 (184).

Alguns estudis han demostrat que la COX-2 no es detecta (185) o els seus nivells no augmenten (186) en biòpsia de pacients amb rinitis al·lèrgica. Un altre treball, comparant pacients amb rinitis al·lèrgica i voluntaris sans, ha identificat en canvi, valors de PGE₂ augmentats en sang perifèrica i una disminució del receptor EP2 en cèl·lules CD4+ en pacients amb rinitis al·lèrgica(187).

Pel que fa a l'efecte del tractament, un estudi ha mostrat que el propionat de fluticasona i la cetiricina redueixen els valors de PGE₂ en les secrecions nasals i el sèrum de pacients amb rinitis al·lèrgica (100). Altres estudis han descrit en teixits de pòlips nasals que la mizolastina (188), la terfenadina (189) i la desloratadina (120) redueixen també l'expressió de mediadors del metabolisme de l'àcid araquidònic com LTC₄, LTD₄ i LTB₄. Un d'aquests estudis també ha determinat que la mizolastina no inhibia l'expressió de PGD₂ (188). No obstant, no hem trobat a la literatura treballs que relacionin l'efecte del tractament combinat d'un corticoide juntament amb un antihistamínic amb els mediadors de l'àcid araquidònic.

En l'**estudi 4** hem observat que la IL-1β, com a estímul proinflamatori, indueix l'expressió gènica i proteica de la COX-2 i la secreció de PGE₂. Un estudi realitzat en una línia cel·lular de cèl·lules epitelials va descriure que l'estímul proinflamatori augmenta els nivells de COX-2 i PGE₂ (162).

En aquesta tesi, l'**estudi 4** demostra que el propionat de fluticasona inhibeix l'efecte inductor de l'estímul proinflamatori sobre COX-2 i PGE₂. Un estudi *in vitro* ha descrit aquest mateix efecte amb la dexametasona en la línia cel·lular A549 (162). Malgrat que aquest estudi es va realitzar en una línia cel·lular i que l'estímul proinflamatori i el

corticoide eren diferents als que nosaltres hem emprat, els nostres resultats són coherents amb aquestes troballes prèvies. En els dos casos l'estímul proinflamatori va induir la expressió tant de COX-2 com PGE₂ i no només això sinó que els corticoides emprats, dexametasona i propionat de fluticasona, tenen la capacitat d'inhibir l'esmentada inducció de COX-2 i PGE₂.

L'estudi 4 d'aquesta tesi presenta l'efecte del clorhidrat d'azelastina sobre COX-2 i PGE₂. Altres estudis han analitzat també l'expressió d'aquests eicosanoids. El primer descriu que el clorhidrat d'azelastina és capaç de reduir significativament la secreció induïda per IL-1 β de PGE₂ en cultius primaris de fibroblasts cutanis (190). El segon, realitzat també pel nostre grup, estableix que l'estimulació de fibroblasts amb IL-1 β incrementa l'expressió de COX-2 i la secreció de PGE₂, de manera significativa en la mucosa nasal i més lleugerament en pòlips nasals (144).

No hi ha dades a la literatura sobre la teràpia combinada en models in vitro per a aquests mediadors de l'àcid araquidònic. No obstant, hi ha un treball realitzat en un model de rinitis al·lèrgica en ratolins on estudien l'efecte de la teràpia combinada, ja sigui loratadina i fluticasona o bé loratadina, fluticasona i antileucotriè, sobre l'expressió d'eicosanoids (191). En aquest treball, descriuen l'efecte inhibidor del tractament combinat, tant doble com triple, en l'expressió d'aquests eicosanoids (191). Les diferències d'aquest estudi amb el nostre són abundants; però malgrat emprar un model diferent i estudiar eicosanoids diferents, els dos treballs presenten una reducció dels eicosanoids amb el tractament combinat.

FORTALESES I LIMITACIONS

En relació a les **fortaleses** d'aquesta tesi podríem destacar: 1r) estudiem el mecanisme d'acció tant de l'MP-AzeFlu com dels seus components, propionat de fluticasona i clorhidrat d'azelastina, en monoteràpia; 2n) fem models d'inflamació nasal corresponents tant a la rinitis al·lèrgica com a la RSCaPN.

En primer lloc, testar l'MP-AzeFlu en comparació al propionat de fluticasona i al clorhidrat d'azelastina ens permet no només conèixer l'efecte d'MP-AzeFlu en comparació amb l'estat basal, sinó també poder determinar un possible efecte additiu o potenciador de la combinació respecte a la monoteràpia. De fet, hem pogut observar que aquest efecte superior es dona en la supervivència d'eosinòfils, la secreció d'IL-6 i l'expressió de GILZ.

En segon lloc, els models que hem fet servir corresponen a la inflamació nasal i més concretament a inflamació de tipus 2. Aquests models, especialment el que simula inflamació eosinofílica, ofereixen els primers indicis a que la formulació estudiada pugui ser efectiva tant en la RSCaPN com en la rinitis al·lèrgica no sols clínicament sinó de forma mecanística. Això constitueix un gran avantatge ja que, amb la realització d'estudis addicionals que confirmin les nostres troballes, podria ampliar-se en el futur la indicació d'ús de l'MP-AzeFlu a d'altres malalties, com la RSC amb (RSCaPN) o sense (RSCsPN) pòlips nasals, sobretot amb una inflamació de tipus 2.

Actualment hi ha molt pocs estudis que avaluïn l'efecte de l'MP-AzeFlu en models *in vitro*. Això suposa una dificultat ja que no tenim referències prèvies per contrastar les nostres dades. Però aquest fet és a la vegada una gran oportunitat ja que ens ha permès fer una recerca innovadora en aquest camp i ser dels primers grups que proposen possibles mecanismes d'acció antiinflamatòria de l'MP-AzeFlu. Ampliar el coneixement del mecanisme d'acció d'aquesta formulació és essencial per tal d'identificar les vies que li proporcionen una major eficàcia clínica.

Pel que fa a les principals **limitacions** d'aquesta tesi, podríem incloure: 1r) la discrepància entre els resultats de l'expressió gènica (ARNm) i proteica que trobem, com per exemple en el GILZ o l'EP2; 2n) les concentracions de fàrmacs emprades que són més altes *in vitro* i difereixen de les que s'empren a la pràctica clínica; 3r) l'ús de models *in vitro*, en alguns casos de cèl·lules estructurals (fibroblasts i epitelials), i les poques dades disponible *in vivo*; i 4t) el desconeixement de l'endotip (malgrat que sí del fenotip) dels pacients dels que s'obtenen les mostres.

D'una banda, es desconeix la causa de la discrepància entre els nivells d'ARNm i l'expressió proteica, però probablement sigui el resultat d'un seguit d'esdeveniments de regulació que es produeixen entre la transcripció de l'ARNm i la traducció a proteïnes. Aquesta discordança es descriu freqüentment a la literatura, ja que els productes proteics i l'ARNm són passos individuals que s'engloben en un procés molecular complex que implica la producció, modificació i degradació de l'ARNm, productes intermedis i la traducció a proteïnes (192). Estudis sobre la correspondència entre l'ARNm i la proteïna a escala de tot el genoma han mostrat una mala correlació entre els nivells d'expressió de l'ARNm i del producte proteic (193).

D'altra banda, estem treballant en un entorn mecanístic tant pel que fa a la concentració dels fàrmacs com al model *in vitro* (cèl·lules individualitzades). Hem fet servir unes concentracions de fàrmac més altes que les corresponents a les dosis clíniques per tal d'adaptar-les a les necessitats i característiques dels nostres cultius cel·lulars. No obstant, la proporció emprada dels dos fàrmacs sí que s'ha mantingut d'acord amb la que trobem a la formulació intranasal d'ús clínic per tal de no magnificar o disminuir l'impacte de cadascun dels fàrmacs. A més a més, l'ús de models *in vitro*, malgrat proporcionar diversos punts a favor com la reproductibilitat o la possibilitat de testar alhora diverses condicions, presenta com a principal limitació la pèrdua d'interaccions cel·lulars que poden influir, a favor o en contra, en l'efecte que té el fàrmac. A més a més, algun dels models emprats es basa en cèl·lules estructurals (epitelials o fibroblasts), cosa que condiciona l'extrapolació de les dades a la pràctica clínica.

A part d'això, la rinosinusitis crònica amb pòlips nasals (RSCaPN) presenta endotips diversos i complexos que inclouen, fins i tot, patrons mixtes (9,19). En els estudis d'aquesta tesi no es va avaluar el perfil inflamatori (endotips) dels pacients dels que s'obtenien les mostres. Tanmateix, seria raonable suposar que l'endotip correspon principalment (>80%) amb un patró inflamatori tipus 2 ja que la nostra mostra es basa en població catalana (194) on la majoria dels casos de RSCaPN presenten un endotip d'inflamació T2 com a d'altres països occidentals (16,19,23). De fet, dades recents indiquen que el 84% dels pacients que pateixen RSCaPN a Catalunya tenen un endotip T2, enfilant-se fins al 87% i 91% en casos de RSCaPN greu i RSCaPN amb diverses comorbiditats respiratòries, com l'asma i l'EREA, respectivament (194).

Per tal de resoldre les incògnites i incerteses derivades de les limitacions que presenta aquesta tesi, caldria realitzar més estudis. En primer lloc, seria molt útil fer servir models més semblants al context fisiològic. Podríem estar parlant de cultius de cèl·lules inflammatòries, cultius d'interfase aire-líquid o de l'ús d'explants però també d'estudis en pacients amb rinitis al·lèrgica o RSCaPN emprant mostres biològiques humanes (sang, orina, secrecions i biòpsies de teixits nasosinusals). En tots aquests casos s'aconseguiria incloure l'element d'interaccions cel·lulars que a la nostra recerca mecanística *in vitro* li ha mancat. En futurs estudis, també seria de gran interès estudiar l'endotip inflamatori dels diferents fenotips de pacients que hi participin. D'aquesta forma es podria conèixer el patró inflamatori predominant i, inclús, cercar possibles diferències o trets característics i respostes al tractament per als diferents endotips.

CONCLUSIONS

A horizontal banner with a purple background. The left side is a solid dark purple, and the right side features a pattern of interlocking puzzle pieces. A hand is visible on the left, placing a puzzle piece into the larger assembly. The word 'CONCLUSIONS' is written in large, white, sans-serif capital letters across the center of the banner.

1. L'MP-AzeFlu redueix la secreció dels mediadors proinflamatoris interleucina 6, interleucina 8 i factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags, induïda per l'estímul proinflamatori, en cultius primaris de cèl·lules epitelials i de fibroblasts de mucosa nasal i pòlips nasals.
2. L'MP-AzeFlu mostra un efecte inhibidor significativament superior al dels fàrmacs en monoteràpia en la reducció d'interleucina 6 en el cultiu primari de cèl·lules epitelials de mucosa nasal i pòlips nasals.
3. L'MP-AzeFlu disminueix la supervivència dels eosinòfils, induïda per l'estímul proinflamatori, i ho fa de forma significativament superior que els fàrmacs en monoteràpia.
4. L'MP-AzeFlu indueix l'expressió dels mediadors antiinflamatoris glucocorticoid-induced leucine-zipper, proteïna quinasa fosfatasa activada per mitògens 1 i tristetraprolina en cultius primaris de fibroblasts de mucosa nasal i pòlips nasals.
5. L'MP-AzeFlu incrementa l'expressió gènica del glucocorticoid-induced leucine-zipper de forma significativament superior als fàrmacs en monoteràpia.
6. L'MP-AzeFlu modifica el metabolisme de l'àcid araquidònic, augmentant l'expressió gènica del receptor 2 de prostaglandina E₂ i reduint l'expressió gènica i proteica de la ciclooxygenasa 2 i la secreció de prostaglandina E₂ en cultius primaris de fibroblasts de mucosa nasal i pòlips nasals.
7. La superior eficàcia clínica de l'MP-AzeFlu podria estar relacionada amb la inhibició de la interleucina 6 i la reducció de la eosinofília, així com l'augment de l'expressió de glucocorticoid-induced leucine-zipper.
8. L'MP-AzeFlu podria tenir un efecte antiinflamatori en altres malalties inflamatòries de les vies respiratòries superiors ja que actua en mediadors característics de la fisiopatologia de la inflamació de tipus 2.



BIBLIOGRAFIA

1. Ciprandi G, Caimmi D, Miraglia Del Giudice M, La Rosa M, Salpietro C, Marseglia GL. Recent Developments in United Airways Disease. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2012;4(4):171–7.
2. Lane AP. Nasal anatomy and physiology. *Facial Plast Surg Clin N Am.* 2004;12(4):387–95.
3. Stucki AO, Sauer UG, Allen DG, Kleinstreuer NC, Perron MM, Yozzo KL, et al. Differences in the anatomy and physiology of the human and rat respiratory tracts and impact on toxicological assessments. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2024;150:105648.
4. Calvén J, Ax E, Rådinger M. The Airway Epithelium—A Central Player in Asthma Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):8907.
5. Salazar I, Sanchez-Quinteiro P, Barrios AW, López Amado M, Vega JA. Anatomy of the olfactory mucosa. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2019. p. 47–65.
6. Czerwaty K, Piszczatowska K, Brzost J, Ludwig N, Szczepański MJ, Dżaman K. Immunological Aspects of Chronic Rhinosinusitis. *Diagnostics.* 2022;12(10):2361.
7. Dkhar LK, Bartley J, White D, Seyfoddin A. Intranasal drug delivery devices and interventions associated with post-operative endoscopic sinus surgery. *Pharm Dev Technol.* 2018;23(3):282–94.
8. Sahin-Yilmaz A, Naclerio RM. Anatomy and physiology of the upper airway. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8(1):31–9.
9. Stevens WW, Lee RJ, Schleimer RP, Cohen NA. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Dec;136(6):1442–53.
10. Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *Laryngorhinootologie.* 2010;9:S15–34.
11. Mullol J, de Borja Callejas F, Martínez-Antón MA, Méndez-Arancibia E, Alobid I, Pujols L, et al. Mometasone and desloratadine additive effect on eosinophil survival and cytokine secretion from epithelial cells. *Respir Res.* 2011;12(1):23.
12. Beck IME, Berghe WV, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: The interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev.* 2009;30(7):830–82.
13. Lee SH. Mechanisms of glucocorticoid action in chronic rhinosinusitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015;7(6):534–7.
14. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(3):626–35.
15. Kato A, Peters AT, Stevens WW, Schleimer RP, Tan BK, Kern RC. Endotypes of chronic rhinosinusitis: Relationships to disease phenotypes, pathogenesis, clinical findings, and treatment approaches. *Allergy.* 2022;77(3):812–26.

16. Staudacher AG, Peters AT, Kato A, Stevens WW. Use of endotypes, phenotypes, and inflammatory markers to guide treatment decisions in chronic rhinosinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2020;124(4):318–25.
17. Klingler AI, Stevens WW, Tan BK, Peters AT, Poposki JA, Grammer LC, et al. Mechanisms and biomarkers of inflammatory endotypes in chronic rhinosinusitis without nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(4):1306–17.
18. Orlandi RR, Kingdom TT, Smith TL, Bleier B, DeConde A, Luong AU, et al. International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis 2021. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2021 Mar 1;11(3):213–739.
19. Stevens WW, Peters AT, Tan BK, Klingler AI, Poposki JA, Hulse KE, et al. Associations Between Inflammatory Endotypes and Clinical Presentations in Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(8):2812–2820.e3.
20. Vlamincx S, Acke F, Scadding GK, Lambrecht BN, Gevaert P. Pathophysiological and Clinical Aspects of Chronic Rhinosinusitis: Current Concepts. *Front Allergy.* 2021;2.
21. Passali D, Cingi C, Cambi J, Passali F, Muluk NB, Bellussi ML. A survey on chronic rhinosinusitis: opinions from experts of 50 countries. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273:2097–109.
22. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology.* 2020;Suppl 29:1–464.
23. Kato A, Schleimer RP, Bleier BS. Mechanisms and pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;149(5):1491–503.
24. Mullol J, Maldonado M, Castillo JA, Miguel-Blanco C, Dávila I, Domínguez-Ortega J, et al. Management of United Airway Disease Focused on Patients With Asthma and Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022;10(9):2438–47.
25. 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.* 2016;137(5):1449–56.
26. Schett G, Neurath MF. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nat Commun.* 2018;9(1):3261.
27. Vassileva V, Piquette-Miller M. Inflammation: The Dynamic Force of Health and Disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(4):401–5.
28. Mullol J, Valero A. GUÍA GEMA 5.3: GUÍA ESPAÑOLA PARA EL MANEJO DEL ASMA. *Soc Esp Neumol Cir Torácica.* 2019;1–230.
29. 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.* 2023;33(5):317–31.
30. 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.* 2011;66(9):1216–23.

31. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update. *Allergy*. 2008;63(SUPPL. 86):8–160.
32. Brożek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):950–8.
33. Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 Revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(3):466–76.
34. Fokkens WJ, Viskens AS, Backer V, Conti D, de Corso E, Gevaert P, et al. EPOS/EUFOREA update on indication and evaluation of Biologics in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps 2023. *Rhinology*. 2023;61(3):194–202.
35. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012;50:1–12.
36. Li N, Peters AT. Chronic rhinosinusitis management beyond intranasal steroids and saline solution irrigations. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36(5):339–43.
37. Scadding GK. Grand Challenges in Rhinology. *Front Allergy*. 2020;1:584518.
38. Klimek L, Berger WE, Bousquet J, Keith PK, Smith P, Sole D, et al. MP-AzeFlu in Moderate-to-Severe Allergic Rhinitis: A Literature Review. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;182(11):1026–35.
39. Van Weissenbruch R, Klimek L, Gálffy G, Emmeluth M, Koltun A, Kopietz F, et al. MP-AzeFlu improves the quality-of-life of patients with allergic rhinitis. *J Asthma Allergy*. 2020;13:633–45.
40. Colás C, Brosa M, Antón E, Montoro J, Navarro A, Dordal MT, et al. Estimate of the total costs of allergic rhinitis in specialized care based on real-world data: the FERIN Study. *Allergy*. 2017;72(6):959–66.
41. Deal RT, Kountakis SE. Significance of Nasal Polyps in Chronic Rhinosinusitis: Symptoms and Surgical Outcomes. *The Laryngoscope*. 2004;114(11):1932–5.
42. Mora T, Sánchez-Collado I, Muñoz-Cano R, Ribó P, Mullol J, Valero A. Differential healthcare direct costs of asthma and chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Catalonia (Spain). *Rhinology*. 2024;62(5):0–0.
43. Lourijsen ES, Fokkens WJ, Reitsma S. Direct and indirect costs of adult patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinol J*. 2020;58(3):213–7.
44. Rudmik L. Economics of Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(4):20.
45. Mullol J, Pujols L, Alobid I, Pérez-Gonzalez M, Fuentes M, De Borja Callejas F, et al. Fluticasone furoate inhibits cytokine secretion from nasal epithelial cells and reduces eosinophil survival in an in vitro model of eosinophilic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163(3):225–33.
46. Tubita V, Vicens-artés S, Roca-ferrer J, Alobid I, Mullol J. MP-AzeFlu : Efectos antiinflamatorios sobre la inflamación nasosinusal. *Rev Rinol*. 2024;23(1).

47. Grimm D, Hwang PH, Lin YT. The link between allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaringol Head Neck Surg.* 2022;30:0–0.
48. Madrilejos R, Bistuer C. Nuevos Antihistamínicos H1. *Butlletí Inf Ter.* 2004;16(1):1–4.
49. Haahr PA, Jacobsen C, Christensen ME. MP-AzeFlu provides rapid and effective allergic rhinitis control: results of a non-interventional study in Denmark. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019;9(4):388–95.
50. Klimek L, Mullol J, Ellis AK, Izquierdo-Domínguez A, Hagemann J, Casper I, et al. Current Management of Allergic Rhinitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2024;12(6):1399–412.
51. Dollner R, Larsen PL, Dheyauldeen S, Steinsvåg S. A Multicenter, Prospective, Noninterventional Study in a Norwegian Cohort of Patients with Moderate-to-Severe Allergic Rhinitis Treated with MP-AzeFlu. *Allergy Rhinol.* 2017;8(3):e148–56.
52. Häussler D, Sommer JU, Nastev A, Aderhold C, Wenzel A, Kramer B, et al. Influence of MP 29-02 on ciliary beat frequency in human epithelial cells in vitro. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018;275(6):1483–90.
53. Kaulsay R, Nguyen DT, Kuhl HC. Real-life effectiveness of MP-AzeFlu in Irish patients with persistent allergic rhinitis, assessed by visual analogue scale and endoscopy. *Immun Inflamm Dis.* 2018;6(4):456–64.
54. Valero A, Ferrer M, Sastre J, Navarro AM, Monclús L, Martí-Guadaño E, et al. A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(2):359–65.
55. Zhong Z, Xun Y, Shi X, Guan B, Wang M. Clinical efficacy and safety of MP-AzeFlu for the treatment of allergic rhinitis: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2022;279(5):2457–64.
56. Nur Husna SM, Tan HTT, Md Shukri N, Mohd Ashari NS, Wong KK. Allergic Rhinitis: A Clinical and Pathophysiological Overview. *Front Med.* 2022;9:874114.
57. Fan B, Jia H, Yu H, Xu Y, Li R, Qiu J, et al. Hydrogel-Based Intranasal Delivery Systems for The Treatment of Allergic Rhinitis. *Adv Ther.* 2023;6(9):2300035.
58. Carr W, Bernstein J, Lieberman P, Meltzer E, Bachert C, Price D, et al. A novel intranasal therapy of azelastine with fluticasone for the treatment of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(5).
59. Meltzer E, Ratner P, Bachert C, Carr W, Berger W, Canonica GW, et al. Clinically Relevant Effect of a New Intranasal Therapy (MP29-02) in Allergic Rhinitis Assessed by Responder Analysis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161(4):369–77.
60. Mullol J, Sastre J, Domínguez-Ortega J, Blanco- Aparicio M, Castillo Vizuite JA, Alobid I, et al. Prevalence of chronic rhinosinusitis without/with nasal polyps according to severity in Spain. *Rhinology.* 2024;62(4):421–31.
61. Lopez-Chacon M, Mullol J, Pujols L. Clinical and Biological Markers of Difficult-to-Treat Severe Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15(5):19.

62. Kosugi EM, Moussalem GF, Simoes JC, de Souza R de P e SF, Chen VG, Saraceni Neto P, et al. Topical therapy with high-volume budesonide nasal irrigations in difficult-to-treat chronic rhinosinusitis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;xxx(xx):xxx-xxx.
63. Rank MA, Hagan JB, Samant SA, Kita H. A proposed model to study immunologic changes during chronic rhinosinusitis exacerbations: Data from a pilot study. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27(2):98-101.
64. Hamilos DL. Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and medical management. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(4):693-707.
65. Venkatesan N, Lavigne P, Lavigne F, Hamid Q. Effects of Fluticasone Furoate on Clinical and Immunological Outcomes (IL-17) for Patients With Nasal Polyposis Naive to Steroid Treatment. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2016;125(3):213-8.
66. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. 2012;
67. Toma S, Hopkins C. Stratification of SNOT-22 scores into mild, moderate or severe and relationship with other subjective instruments. *Rhinology*. 2016;54(2):129-33.
68. Lim M, Lew-Gor S, Darby Y, Brookes N, Scadding G, Lund VJ. The relationship between subjective assessment instruments in chronic rhinosinusitis. *Rhinology*. 2007;45:144-7.
69. Chapurin N, Wu J, Labby AB, Chandra RK, Chowdhury NI, Turner JH. Current insight into treatment of chronic rhinosinusitis: Phenotypes, endotypes, and implications for targeted therapeutics. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;150(1):22-32.
70. Milara J, Peiro T, Armengot M, Frias S, Morell A, Serrano A, et al. Mucin 1 downregulation associates with corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):470-6.
71. Tokunaga T, Sakashita M, Haruna T, Asaka D, Takeno S, Ikeda H, et al. Novel scoring system and algorithm for classifying chronic rhinosinusitis: the JESREC Study. *Allergy*. 2015;70(8):995-1003.
72. Wang X, Zhang N, Bo M, Holtappels G, Zheng M, Lou H, et al. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(5):1344-53.
73. Tan BK, Klingler AI, Poposki JA, Stevens WW, Peters AT, Suh LA, et al. Heterogeneous inflammatory patterns in chronic rhinosinusitis without nasal polyps in Chicago, Illinois. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):699-703.e7.
74. Laidlaw TM, Mullol J, Woessner KM, Amin N, Mannent LP. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021 Mar;9(3):1133-41.
75. Mora T, Sánchez-Collado I, Muñoz-Cano R, Ribó P, Palomo-Jiménez PI, Mullol J, et al. Prevalence and coexistence of type 2 inflammatory diseases. *Clin Transl Allergy*. 2024;14(6):e12376.
76. Divekar R, Rank M, Squillace D, Kita H, Lal D. Unsupervised network mapping of commercially available immunoassay yields three distinct chronic rhinosinusitis endotypes. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(4):373-9.

77. Hulse KE. Immune Mechanisms of Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(1):1.
78. Kolkhir P, Akdis CA, Akdis M, Bachert C, Bieber T, Canonica GW, et al. Type 2 chronic inflammatory diseases: targets, therapies and unmet needs. *Nat Rev Drug Discov.* 2023;22(9):743–67.
79. Caimmi D, Baiz N, Tanno LK, Demoly P, Arnavielhe S, Murray R, et al. Validation of the MASK - rhinitis visual analogue scale on smartphone screens to assess allergic rhinitis control. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(12):1526–33.
80. Pujols L, Mullol J, Picado C. Alpha and Beta Glucocorticoid Receptors: Relevance in Airway Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007;7:93–9.
81. Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102:11–21.
82. Liu J, Zhang M, Niu C, Luo Z, Dai J, Wang L, et al. Dexamethasone Inhibits Repair of Human Airway Epithelial Cells Mediated by Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ). *PLoS ONE.* 2013;8(4):e60705.
83. Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;275:71–8.
84. Adcock IM, Caramori G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol.* 2001;79(4):376–84.
85. Newton R, Seybold J, Kuitert LME, Bergmann M, Barnes PJ. Repression of Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Release by Dexamethasone Occurs by Transcriptional and Post-transcriptional Mechanisms Involving Loss of Polyadenylated mRNA. *J Biol Chem.* 1998;273(48):32312–21.
86. Bachert C, Marple B, Schlosser RJ, Hopkins C, Schleimer RP, Lambrecht BN, et al. Adult chronic rhinosinusitis. *Nat Rev Dis Primer.* 2020 Dec;6:86.
87. Adriaensen GFJPM, Fokkens WJ. Chronic rhinosinusitis: an update on current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14(17):2351–60.
88. Bernstein JA, Bernstein JS, Makol R, Ward S. Allergic Rhinitis: A Review. *Jama.* 2024;331(10):866–77.
89. Bousquet J, Anto JM, Bachert C, Baiardini I, Bosnic-Anticevich S, Walter Canonica G, et al. Allergic rhinitis. *Nat Rev Dis Primer.* 2020 Dec;6:95.
90. Pujols L, Mullol J, Picado C. Importance of glucocorticoid receptors in upper and lower airways. *Front Biosci.* 2010;15:789–800.
91. Clark AR. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;275:79–97.
92. Kassel O, Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;275:13–29.

93. Clark AR, Lasa M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(4):404–11.
94. Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1179:167–78.
95. Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol*. 2006;16(6):301–7.
96. Lasa M, Abraham SM, Boucheron C, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone Causes Sustained Expression of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Phosphatase 1 and Phosphatase-Mediated Inhibition of MAPK p38. *Mol Cell Biol*. 2002;22(22):7802–11.
97. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. 2002;67:529–34.
98. Pujols L. Mecanismos de resistencia a los glucocorticoides en enfermedades respiratorias. *Med Respir*. 2015;8(3):31–42.
99. Erin EM, Zacharasiewicz AS, Nicholson GC, Tan AJ, Higgins LA, Williams TJ, et al. Topical corticosteroid inhibits interleukin-4, -5 and -13 in nasal secretions following allergen challenge. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(12):1608–14.
100. Karaman Ö, Günbay A, Uzuner N, Günbay U, Gülay Z, Sarioglu S. The comparison of the efficacy of fluticasone propionate with cetirizine in perennial allergic rhinitis. *Allergol Immunopathol*. 2001;29(2):55–9.
101. Nouri-Aria KT, Masuyama K, Jacobson MR, Rak S, Lowhagen O, Schotman E, et al. Granulocyte / Macrophage-Colony Stimulating Factor in Allergen-Induced Rhinitis : Cellular Localization , Relation to Tissue Eosinophilia and Influence of Topical Corticosteroid. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;117:248–54.
102. Pai KM, Pillai S, Pai HS, Shetty S. A Comparative Study of Symptoms, Nasal Eosinophilia and Pulmonary Function Tests Before and After Short Term Treatment with Corticosteroid Nasal Spray in Patients with Allergic Rhinitis. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022;74(s2):1001–8.
103. Lennard CM, Mann EA, Sun LL, Chang AS, Bolger WE. Interleukin-1 β , interleukin-5, interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor- α in chronic sinusitis: Response to systemic corticosteroids. *Am J Rhinol*. 2000;14(6):367–73.
104. Špadijer Mirkovic C, Peric A, Vukomanovicdurdevic B, Vojvodic D. Effects of Fluticasone Furoate Nasal Spray on Parameters of Eosinophilic Inflammation in Patients with Nasal Polyposis and Perennial Allergic Rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2017;126(8):573–80.
105. Gentile DA, Yokitis J, Angelini BL, Doyle WJ, Skoner DP. Effect of intranasal challenge with interleukin-6 on upper airway symptomatology and physiology in allergic and nonallergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;86(5):531–6.
106. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol*. 2004;142(1):161–71.

107. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2):S73–80.
108. Montes M, Flores F, Alfonso B. Histamina, receptores y antagonistas. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 2005;68(3):164–9.
109. Muñoz-Cano RM, Casas-Saucedo R, Valero Santiago A, Bobolea I, Ribó P, Mullol J. Platelet-Activating Factor (PAF) in Allergic Rhinitis: Clinical and Therapeutic Implications. *J Clin Med.* 2019;8(9):1338.
110. Price D, Klimek L, Gálffy G, Emmeluth M, Koltun A, Kopietz F, et al. Allergic rhinitis and asthma symptoms in a real-life study of MP-AzeFlu to treat multimorbid allergic rhinitis and asthma. *Clin Mol Allergy.* 2020;18(1):15.
111. Klimek L, Bachert C, Stjärne P, Dollner R, Larsen P, Haahr P, et al. MP-AzeFlu provides rapid and effective allergic rhinitis control in real life: A pan-European study. *Allergy Asthma Proc.* 2016;37(5):376–86.
112. Guilemany JM, García-Piñero A, Alobid I, Centellas S, Mariño FS, Valero A, et al. The Loss of Smell in Persistent Allergic Rhinitis Is Improved by Levocetirizine due to Reduction of Nasal Inflammation but Not Nasal Congestion (the CIRANO Study). *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158(2):184–90.
113. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T, Wright, J. W. and Unger TH. International Union of Pharmacology XIII: Classification of Histamine Receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;49(3):415–72.
114. Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, Arias-Montaña J. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed.* 2009;20(2):100–26.
115. Linton S, Hossenbaccus L, Ellis AK. Evidence-based use of antihistamines for treatment of allergic conditions. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2023;131(4):412–20.
116. Simons FER, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(6):1139-1150.e4.
117. Bocsan IC, Muntean IA, Miron N, Pintea I, Dobrican CT, Ureche C, et al. Are Markers of Allergic Inflammation in Grass Pollen Allergy Influenced by H1 Antihistamines? *J Clin Med.* 2021;11(1):113.
118. Zhang Y, Li W. Effects of oral desloratadine citrate disodium combined with physiological seawater nasal irrigation on IgE levels, IL-4, IL-6, IL-13 and IFN- γ expression and treatment of intermittent allergic rhinitis. *Cell Mol Biol.* 2020;66(5):54–8.
119. Ciprandi G, Cirillo I, Vizzaccaro A, Tosca MA. Levocetirizine improves nasal obstruction and modulates cytokine pattern in patients with seasonal allergic rhinitis: a pilot study. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(6):958–64.
120. Kowalski ML, Lewandowska A, Wozniak J, Makowska J, Jankowski A, DuBuske L. Inhibition of nasal polyp mast cell and eosinophil activation by desloratadine. *Allergy.* 2005;60(1):80–5.
121. Castillo Vizuite JA, Sastre J, Del Cuavillo Bernal A, Picado C, Martínez Moragón E, Ignacio García JM, et al. Rinitis, poliposis nasal y su relación con el asma. *Arch Bronconeumol.* 2019;55(3):146–55.

122. Mullol J, Callejas FB, Méndez-Arancibia E, Fuentes M, Alobid I, Martínez-Antón A, et al. Montelukast reduces eosinophilic inflammation by inhibiting both epithelial cell cytokine secretion (GM-CSF, IL-6, IL-8) and eosinophil survival. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24(4):403–11.
123. Gross GN, Berman G, Amar NJ, Caracta CF, Tantry SK. Efficacy and safety of olopatadine-mometasone combination nasal spray for the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019;122(6):630-638.e3.
124. Patel P, Salapatek AM, Tantry SK. Effect of olopatadine-mometasone combination nasal spray on seasonal allergic rhinitis symptoms in an environmental exposure chamber study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019;122(2):160-166.e1.
125. Stjärne P, Nguyen DT, Kuhl HC. Real-Life Effectiveness of MP-AzeFlu (Dymista®) in Swedish Patients with Persistent Allergic Rhinitis, Assessed by the Visual Analogue Scale. *Pragmatic Obs Res*. 2023;14:1–11.
126. Singh-Franco D, Ghin HL, Robles GI, Borja-Hart N, Perez A. Levocetirizine for the treatment of allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria in adults and children. *Clin Ther*. 2009;31(8):1664–87.
127. Di Lorenzo G, Pacor ML, Pellitteri ME, Morici G, Di Gregoli A, Lo Bianco C, et al. Randomized placebo-controlled trial comparing fluticasone aqueous nasal spray in mono-therapy, fluticasone plus cetirizine, fluticasone plus montelukast and cetirizine plus montelukast for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(8):259–67.
128. Kortekaas Krohn I, Callebaut I, Alpizar YA, Steelant B, Van Gerven L, Skov PS, et al. MP29-02 reduces nasal hyperreactivity and nasal mediators in patients with house dust mite-allergic rhinitis. *Allergy*. 2018;73(5):1084–93.
129. Chen R, Zheng D, Zhang Y, Sima G. Efficacy and safety of twice-daily olopatadine–mometasone combination nasal spray (GSP301) in the treatment of allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2022;279(4):1691–9.
130. Fifer S, Toh L, Barkate H, Aggarwal V, Borade D, Gordonsmith RH, et al. Patient Satisfaction and Sensory Attributes of Nasal Spray Treatments of Olopatadine Hydrochloride/Mometasone Furoate Monohydrate and Azelastine Hydrochloride/Fluticasone Propionate for Allergic Rhinitis in Australia – An Observational Real-World Clinical Study. *Patient Prefer Adherence*. 2023;17:141–51.
131. Hampel FC, Pedinoff AJ, Jacobs RL, Caracta CF, Tantry SK. Olopatadine-mometasone combination nasal spray: Evaluation of efficacy and safety in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2019;40(4):261–72.
132. Samoliński B, Wojas O, Lipiec A, Krzych-Fałta E, Walkiewicz A, Borowicz J, et al. Intranasal combo: fixed-dose combination of mometasone furoate and olopatadine hydrochloride in therapeutic strategies for rhinosinusitis. *Otolaryngol Pol*. 2023;77(6):43–50.
133. Roca-Ferrer J, Pujols L, Pérez-Gonzalez M, Alobid I, Valero A, Picado C, et al. MP29-02* reduces eosinophil survival induced by epithelial cell secretions from nasal mucosa. *Clin Transl Allergy*. 2015;5(Suppl 4):P9.

134. Ekstedt S, Kumlien Georén S, Cardell LO. Effects of MP-AzeFlu enhanced by activation of bitter taste receptor TAS2R. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2020;16(1):45.
135. Zhou B, Cheng L, Pan J, Wang H, Jin Y, Zhao C, et al. A Clinical Study to Assess the Efficacy and Safety of MP-AzeFlu Nasal Spray in Comparison to Commercially Available Azelastine Hydrochloride and Fluticasone Propionate Nasal Sprays in Chinese Volunteers with Allergic Rhinitis. *Pulm Ther*. 2023;9(3):411–27.
136. Klimek L, Poletti SC, Sperl A, Spielhaupter M, Bardenhewer C, Mullol J, et al. Olfaction in patients with allergic rhinitis: an indicator of successful MP-AzeFlu therapy. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(3):287–92.
137. Roca-Ferrer J, Pujols L, Pérez-González M, Alobid I, Callejas B, Vicens-Artés S, et al. Superior effect of MP-AzeFlu than azelastine or fluticasone propionate alone on reducing inflammatory markers. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018 Dec;14(1):86.
138. Mullol J, Roca-Ferrer J, Alobid I, Pujols L, Valero A, Xaubet A, et al. Effect of desloratadine on epithelial cell granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion and eosinophil survival. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(1):52–8.
139. Roca-Ferrer J, Mullol J, Lopez E, Xaubet A, Pujols L, Fernández JC, et al. Effect of topical anti-inflammatory drugs on epithelial cell-induced eosinophil survival and GM-CSF secretion. *Eur Respir J*. 1997;10(7):1489–95.
140. Mullol J, Roca-Ferrer J, Xaubet A, Traserra J, Picado C. Inhibition of GM-CSF secretion by topical corticosteroids and nedocromil sodium. A comparison study using nasal polyp epithelial cells. *Respir Med*. 2000;94(5):428–31.
141. Xaubet A, Mullol J, Roca-Ferrer J, Pujols L, Fuentes M, Pérez M, et al. Effect of budesonide and nedocromil sodium on IL-6 and IL-8 release from human nasal mucosa and polyp epithelial cells. *Respir Med*. 2001;95(5):408–14.
142. Machado-Carvalho L, Roca-Ferrer J, Picado C. IL-4/IFN- γ inflammatory cytokine profile induces a deficient regulation of the IL-1 β /IL-1RI/EP 2 /COX-2 pathway in nasal mucosa. *Respir Med*. 2019;150:136–40.
143. Machado-Carvalho L, Martín M, Torres R, Gabasa M, Alobid I, Mullol J, et al. Low E-prostanoid 2 receptor levels and deficient induction of the IL-1 β /IL-1 type I receptor/COX-2 pathway: Vicious circle in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):99-107.e7.
144. Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, et al. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E2 in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(1):66–72.
145. Roca-Ferrer J, Mullol J, Xaubet A, Benítez P, Bernal-Sprekelsen M, Shelhamer J, et al. Proinflammatory cytokines and eosinophil cationic protein on glandular secretion from human nasal mucosa: Regulation by corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(1):87–93.
146. Badorrek P, Müller M, Koch W, Hohlfeld JM, Krug N. Specificity and reproducibility of nasal biomarkers in patients with allergic rhinitis after allergen challenge chamber exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118(3):290–7.

147. Quirce S, Cosío BG, España A, Blanco R, Mullol J, Santander C, et al. Management of eosinophil-associated inflammatory diseases: the importance of a multidisciplinary approach. *Front Immunol*. 2023;14:1192284.
148. Alvarado-Valdés CA, Blomgren J, Weiler D, Gleich GJ, Reed CE, Field EA, et al. The effect of fluticasone propionate aqueous nasal spray on eosinophils and cytokines in nasal secretions of patients with ragweed allergic rhinitis. *Clin Ther*. 1997;19(2):273–81.
149. Meltzer EO, Orgel HA, Rogenes PR, Field EA. Nasal cytology in patients with allergic rhinitis: Effects of intranasal fluticasone propionate. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(4):708–15.
150. Maiti R, Rahman J, Jaida J, Allala U, Palani A. Rupatadine and Levocetirizine for Seasonal Allergic Rhinitis: A Comparative Study of Efficacy and Safety. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136(8):796.
151. Canonica GW, Tarantini F, Compalati E, Penagos M. Efficacy of desloratadine in the treatment of allergic rhinitis: a meta-analysis of randomized, double-blind, controlled trials. *Allergy*. 2007;62(4):359–66.
152. Mösges R, Klimek L. Azelastine Reduces Mediators of Inflammation in Patients with Nasal Polyps. *Allergy Asthma Proc*. 1998;19(6):379–83.
153. Anand VK, Kacker A, Orjuela AF, Huang C, Manarey C, Xiang J. Inflammatory pathway gene expression in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2006;20(4):471–6.
154. Kuehnemund M, Ismail C, Brieger J, Schaefer D, Mann WJ. Untreated Chronic Rhinosinusitis: A Comparison of Symptoms and Mediator Profiles. *Laryngoscope*. 2004;114(3):561–5.
155. Sharma S, Watanabe S, Sivam A, Wang JH, Neuwirth SJ, Perez RI, et al. Peripheral blood and tissue T regulatory cells in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(5):371–9.
156. Ohkubo K, Ikeda M, Pawankar R, Gotoh M, Yagi T, Okuda M. Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. *Rhinology*. 1998;36(4):156–61.
157. Weido AJ, Reece LM, Alam R, Cook CK, Sim TC. Intranasal fluticasone propionate inhibits recovery of chemokines and other cytokines in nasal secretions in allergen-induced rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1996;77(5):407–15.
158. Qiu C, Feng D. Efficacy and anti-inflammatory analysis of glucocorticoid, antihistamine and leukotriene receptor antagonist in the treatment of allergic rhinitis. *World J Clin Cases*. 2023;11(28):6725–32.
159. Zhang J, Cheng H, Luo Y, Kan D, Wang Y. Effect of Loratadine Tablets in Combination with Other Drugs on Nasal Physiological Function and T Lymphocyte Subsets in Patients with Allergic Rhinitis. Chen D, editor. *Comput Intell Neurosci*. 2022;22:1–8.
160. Shi J, Luo Q, Chen F, Chen D, Xu G, Li H. Induction of IL-6 and IL-8 by house dust mite allergen der p1 in cultured human nasal epithelial cells is associated with PAR/PI3K/NFκB Signaling. *Orl*. 2010;72(5):256–65.

161. Kempuraj D, Huang M, Kandere-Grzybowska K, Basu S, Boucher W, Letourneau R, et al. Azelastine inhibits secretion of IL-6, TNF- α and IL-8 as well as NF- κ B activation and intracellular calcium ion levels in normal human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;132(3):231–9.
162. Gründemann C, Garcia-Käufer M, Sauer B, Stangenberg E, Könczöl M, Merfort I, et al. Traditionally used *Veronica officinalis* inhibits proinflammatory mediators via the NF- κ B signalling pathway in a human lung cell line. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(1):118–26.
163. Shiozawa A, Miwa M, Ono N, Homma H, Hirotsu M, Ikeda K. Comparative analysis of cytokine release from epithelial cell cultures of the upper airway. *Rhinology*. 2015 Jul 24;53(2):135–41.
164. Kim JS, Choi H, Oh JM, Kim YH, Kim SW, Kim SW, et al. Effect of fluticasone propionate on human nasal fibroblasts exposed to urban particulate matter. *Auris Nasus Larynx*. 2020;47(3):415–24.
165. Ohnishi M, Takizawa R, Ohkubo K, Yokosima K. Fluticasone propionate reduced the production of GM-CSF, IL-6 and IL-8 generated from cultured nasal epithelial cells. *Jpn Soc Allergol*. 1994;43(3):441–7.
166. Vasiadi M, Kalogeromitros D, Kempuraj D, Clemons A, Zhang B, Chliva C, et al. Rupatadine Inhibits Proinflammatory Mediator Secretion from Human Mast Cells Triggered by Different Stimuli. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(1):38–45.
167. Füreder W, Agis H, Semper H, Keil F, Maier U, Müller MR, et al. Differential response of human basophils and mast cells to recombinant chemokines. *Ann Hematol*. 1995 May;70(5):251–8.
168. Kim JH, Yoon MG, Seo DH, Kim BS, Ban GY, Ye YM, et al. Detection of allergen specific antibodies from nasal secretion of allergic rhinitis patients. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016;8(4):329–37.
169. Xaubet A, Mullol J, Lopez E, Roca-Ferrer J, Rozman M, Carrion T, et al. Comparison of the role of nasal polyp and normal nasal mucosal epithelial cells on in vitro eosinophil survival. Mediation by GM-CSF and inhibition by dexamethasone. *Clin Exp Allergy*. 1994;24(4):307–17.
170. Bensch GW, Nelson HS, Borish LC. Evaluation of cytokines in nasal secretions after nasal antigen challenge: lack of influence of antihistamines. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002;88(5):457–62.
171. Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Bayram H, Prior AJ, Davies RJ. Effect of fexofenadine on eosinophil-induced changes in epithelial permeability and cytokine release from nasal epithelial cells of patients with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(3):410–20.
172. Lehtola T, Nummenmaa E, Nieminen R, Hämäläinen M, Vuolteenaho K, Moilanen E. The glucocorticoid dexamethasone alleviates allergic inflammation through a mitogen-activated protein kinase phosphatase-1-dependent mechanism in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2024;134(5):686–94.
173. Urzua CA, Chen P, Chaigne-Delalande B, Liu B, Anguita R, Guerrero J, et al. Glucocorticoid Receptor- α and MKP-1 as Candidate Biomarkers for Treatment Response and Disease Activity in Vogt-Koyanagi-Harada Disease. *Am J Ophthalmol*. 2019;207:319–25.

174. Hoppstädter J, Kessler SM, Bruscoli S, Huwer H, Riccardi C, Kiemer AK. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper: A Critical Factor in Macrophage Endotoxin Tolerance. *J Immunol.* 2015;194(12):6057–67.
175. Jalonen U, Lahti A, Korhonen R, Kankaanranta H, Moilanen E. Inhibition of tristetraprolin expression by dexamethasone in activated macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(5):733–40.
176. Jeon DY, Jeong SY, Lee JW, Kim J, Kim JH, Chu HS, et al. FOXO1 Is a Key Mediator of Glucocorticoid-Induced Expression of Tristetraprolin in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):13673.
177. Fernández-Bertolín L, Mullol J, Fuentes-Prado M, Roca-Ferrer J, Alobid I, Picado C, et al. Effect of Lipopolysaccharide on Glucocorticoid Receptor Function in Control Nasal Mucosa Fibroblasts and in Fibroblasts from Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. Beeton C, editor. *PLOS ONE.* 2015;10(5):e0125443.
178. Manetsch M, Rahman MM, Patel BS, Ramsay EE, Rumzhum NN, Alkhouri H, et al. Long-Acting β_2 -Agonists Increase Fluticasone Propionate-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1 (MKP-1) in Airway Smooth Muscle Cells. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e59635.
179. Luo X, Ma R, Wu X, Xian D, Li J, Mou Z, et al. Azelastine enhances the clinical efficacy of glucocorticoid by modulating MKP-1 expression in allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015;272(5):1165–73.
180. Kelly MM, King EM, Rider CF, Gwozd C, Holden NS, Eddleston J, et al. Corticosteroid-induced gene expression in allergen-challenged asthmatic subjects taking inhaled budesonide. *Br J Pharmacol.* 2012 Mar;165(6):1737–47.
181. Chen X, Luo X, Han M, Wu X, Guo J, Zhang J, et al. Corticosteroid Regulates Epithelial Occludin Expression in Nasal Polyps through a MKP-1-Dependent Pathway. *ORL.* 2014;76(5):248–56.
182. Ishmael FT, Fang X, Galdiero MR, Atasoy U, Rigby WFC, Gorospe M, et al. Role of the RNA-binding Protein Tristetraprolin in Glucocorticoid-mediated Gene Regulation 1. *J Immunol.* 2008;180(12):8342–53.
183. Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids Regulate Tristetraprolin Synthesis and Posttranscriptionally Regulate Tumor Necrosis Factor Alpha Inflammatory Signaling. *Mol Cell Biol.* 2006;26(23):9126–35.
184. Mullol J, Boyce J, Dahlén SE, Dahlén B, Picado C, Bobolea I. Eicosanoid dysregulation and type 2 inflammation in AERD. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;148(5):1157–60.
185. Westergren VS, Wilson SJ, Penrose JF, Howarth PH, Sampson AP. Nasal mucosal expression of the leukotriene and prostanoid pathways in seasonal and perennial allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(6):820–8.
186. Plewako H, Holmberg K, Oancea I, Rak S. Increased expression of lipoxygenase enzymes during pollen season in nasal biopsies of pollen-allergic patients. *Allergy.* 2006;61(6):725–30.
187. Li L, Guan K, Zhou Y, Wu J, Wang Y, Wang W. Prostaglandin E2 signal inhibits T regulatory cell differentiation during allergic rhinitis inflammation through EP4 receptor. *World Allergy Organ J.* 2019;12(12):100090.

188. Carayol N, Crampette L, Mainprice B, Ben-Soussen P, Verrecchia M, Bousquet J, et al. Inhibition of mediator and cytokine release from dispersed nasal polyp cells by mizolastine. *Allergy*. 2002;57(11):1067–70.
189. Crampette I, Mainprice B, Bloom M, Bousquet J, Campbell AM. Inhibition of mediator and cytokine release from dispersed nasal polyp cells by terfenadine. *Allergy*. 1996;51(5):346–9.
190. Inoue H, Kubota T, Ando K, Aihara M, Sozumi T, Ishida H. EFFECT OF AZELASTINE ON PGE2 PRODUCTION IN FIBROBLASTS IN NORMAL SKIN. THE POSSIBILITY OF INHIBITION OF INDUCIBLE CYCLOOXYGENASE BY AZELASTINE. *Life Sci*. 1997;61(12):171–6.
191. Shen Y, Mehrabi Nasab E, Hassanpour F, Athari SS. The Effects of Combined Therapeutic Protocol on Allergic Rhinitis Symptoms and Molecular Determinants. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2022;21(2):141–50.
192. Wang D. Discrepancy between mRNA and protein abundance: Insight from information retrieval process in computers. *Comput Biol Chem*. 2008;32(6):462–8.
193. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep*. 2015;5(September 2014):10775.
194. Sanchez-Collado I, Mora T, Munoz-Cano R, Ribo P, Mullol J, Valero A. Prevalence of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in Catalonia (Spain): a retrospective, large-scale population-based study. *Rhinology*. 2022;60(5):384–96.