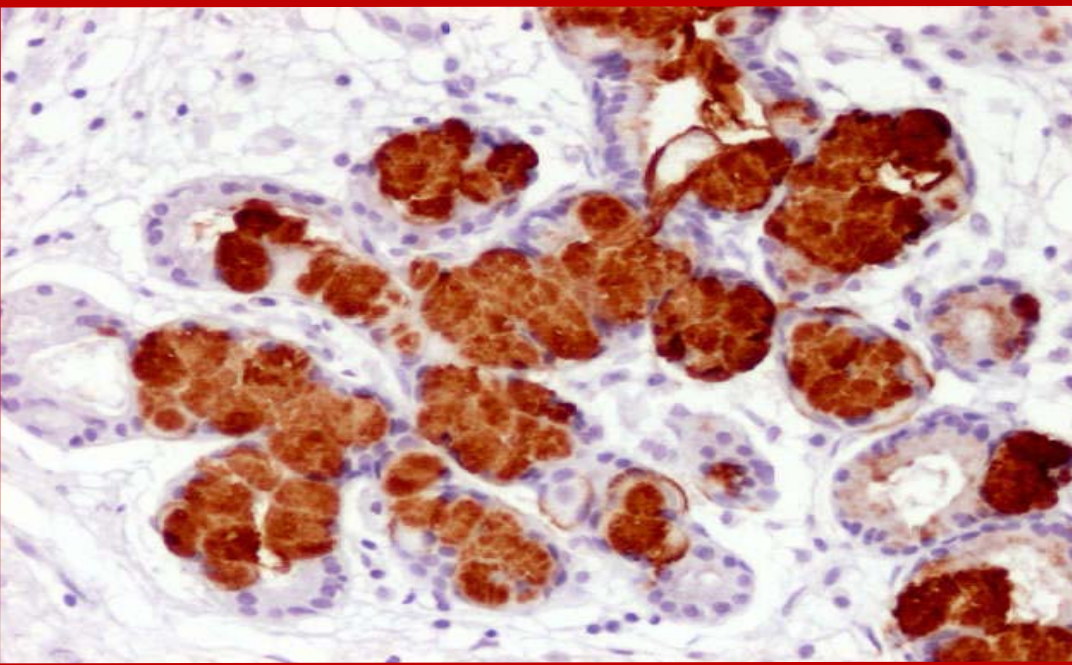


**DOCTORAL THESIS**

**Mucus Hypersecretion, MUC genes and Mucins  
in Inflammatory Nasosinusual Diseases.  
Regulation by Proinflammatory and  
Antiinflammatory Agents**



**M<sup>a</sup> Asunción Martínez Antón**

**July 2008**

## RESUM DE TESI DOCTORAL

**Títol:** HIPERSECRECIÓ DE MOC, GENS MUC I MUCINES A LES MALALTIES INFLAMATÒRIES NASOSINUSALS. REGULACIÓ PER AGENTS PROINFLAMATORIS I ANTIINFLAMATORIS.

**Doctoranda:** ASUNCIÓN MARTÍNEZ ANTÓN

**Laboratori:** IMMUNOAL·LÈRGIA RESPIRATÒRIA CLÍNICA I EXPERIMENTAL, IDIBAPS, HOSPITAL CLÍNIC

**Programa de Doctorat:** BIOPATOLOGIA EN MEDICINA

**Bienni:** 2003-2005

**Departament:** MEDICINA

**Centre:** UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Directors de Tesi:** JOAQUIM MULLOL I MIRET  
JORDI ROCA I FERRER

## **ÍNDEX**

<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÒTESI DE TREBALL.....</b>	<b>5</b>
<b>OBJECTIUS GENERALS.....</b>	<b>5</b>
<b>OBJECTIUS CONCRETS.....</b>	<b>6</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES.....</b>	<b>8</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>13</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSIONS FINALS.....</b>	<b>21</b>
<b>RESUM.....</b>	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>24</b>

## **Introducció.**

D'entre totes les estructures que componen el tracte respiratori, el nas a través de la mucosa nasal, és l'òrgan encarregat de la preparació del moc inhalat mitjançant la filtració, l'escalfament i la humidificació d'aquest abans que arribi als pulmons, exercint d'aquesta manera una acció protectora sobre les vies aèries vers agents irritants i patògens. Per tal de desenvolupar aquesta tasca, la mucosa nasal, concretament l'epiteli i les glàndules submucoses d'aquesta, secreta moc i alhora promou l'aclariment mucociliar a través del seu epiteli ciliat, el qual es troba submergit en les secrecions nasals. Així, la capa de moc que recobreix la mucosa respiratòria proporciona una barrera defensiva enfront a agents nocius i patògens i participa en la resposta de la mucosa en processos d'inflamació i infecció. El moc respiratori està constituït per aigua, ions, secrecions pulmonars, trasudats de proteïnes del sèrum, proteïnes antimicrobianes i glicoproteïnes mucoses (mucines) (1).

Les mucines, component macromolecular principal del moc, són glicoproteïnes d'alt pes molecular responsables de la viscoelasticitat i adhesivitat del moc. Aquestes són produïdes principalment per les cèl·lules caliciformes de l'epiteli i per les cèl·lules mucoses de glàndules submucoses. Fins ara, 20 gens que codifiquen per mucines han estat descrits i subdividits en dos grups principals: mucines secretades i de membrana (2). Concretament, MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-MUC9 i MUC19 són mucines secretades i MUC1, MUC3, MUC4, MUC11-MUC13, MUC17, MUC18 y MUC20 són mucines de membrana, caracteritzades per un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica curta. La resta de mucines (MUC15 i MUC16) no han estat encara caracteritzades. Tot i que 8 d'aquestes mucines es troben normalment expressades en vies respiratòries (3-5), només

MUC5AC i MUC5B han estat descrites com a mucines predominants a les secrecions respiratòries humanes (6, 7).

Tot i que ambdós tipus de mucines (de membrana i secretades) comparteixen una característica comuna en la seva estructura proteica, que consisteix en la presència de diverses repeticions en *tandem* de regions riques en residus de serina i treonina altament glicosilats, aquestes presenten diferències estructurals que determinaran en cert grau la seva funcionalitat. Així, les mucines secretades semblen estar implicades en la funció protectora de la mucosa mentre que les de membrana jugarien un paper important en cascades de transducció de senyal relacionades amb adhesió, migració i proliferació cel·lular.

En general, en patologies respiratòries s'ha trobat un increment en la expressió de mucines respecte teixits sans. Aquest fet pot explicar-se per moltes causes diferents, però les 3 principals són: 1) l'increment en el nombre de cèl·lules productores de mucines (caliciformes i mucoses) que es dona en malalties respiratòries com ara la poliposi nasal i l'asma; 2) la gran quantitat de cèl·lules i mediadors inflamatoris presents en les patologies respiratòries; i 3) la presència de patògens en les vies respiratòries inflamades. Tots aquests factors poden contribuir a la regulació a l'alça de la producció i/ o secreció de mucines.

La poliposi nasal és una malaltia de vies respiratòries superiors que es troba freqüentment associada a d'altres patologies respiratòries com ara la fibrosi quística i l'asma. Aquestes malalties a més de compartir, entre d'altres símptomes, l'obstrucció nasal i la hipersecreció de moc, semblen presentar una composició mucínica anormal del moc en referència a la quantitat, tipus i mida de les

mucines (8-10). Aquests canvis podrien contribuir a les propietats reològiques del moc del tracte respiratori, produint un moc hiperviscós en el cas de la fibrosi quística i l'asma, i un moc aquós en el de la rinitis al·lèrgica i la poliposis nasal. No obstant això, les conseqüències funcionals del moc amb composició mucínica diferent han estat poc estudiades.

Els glucocorticoides són la primera línia de tractament de la poliposi nasal i altres malalties inflamatòries, i tot hi haver-se demostrat la seva efectivitat reduint la mida i el component inflamatori dels pòlips nasals (11, 12), la seva eficàcia sobre l'hipersecreció mucosa present en malalties inflamatòries del tracte respiratori sempre ha causat controvèrsies. Alguns estudis *in vitro* han demostrat un efecte inhibidor dels corticoides sobre la secreció glandular bronquial humana, tant basalment com després d'estimulació amb agonistes colinèrgics (13). En canvi, en altres estudis realitzats *in vivo* en pacients rinítics, els corticoides estimulaven la secreció de mucines però no de lactoferrina (14). Més endavant es va demostrar que els corticoides reduïen la secreció nasal i bronquial tant a nivell basal com després d'estimulació amb agonistes colinèrgics (15) i citocines proinflamatòries com IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (16) en mucosa nasal sana o inflamada.

Un dels objectius actuals en l'estudi de la secreció mucosa i de la regulació dels gens MUC és investigar la relació potencial entre els seus patrons d'expressió, les seves propietats fisiològiques i les seves manifestacions clíniques en patologies respiratòries com ara la poliposi nasal i l'asma. Es desconeix si les mucines i els gens que les codifiquen tenen una expressió fenotípica diferencial en els pòlips nasosinusals de les diferents patologies a les quals s'associen com són la fibrosi quística, l'asma bronquial o la intolerància als

antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs), i l'importància que això pot tenir quan a la gravetat dels símptomes o l'evolució de la malaltia. Es desconeix també si l'expressió d'aquests gens pot ser modulada o no per agents proinflamatoris (citocines, lipopolisacàrid bacterià) i antiinflamatoris (corticoides) en la mucosa nasosinusal sana i/o patològica.

Amb els estudis que componen aquesta tesi, es pretén determinar el paper dels gens MUC en l'etiologia de malalties com la poliposi nasal i l'asma, veure si existeixen patrons de diagnòstic definits, i alhora investigar els mecanismes de regulació d'aquests gens. Els resultats d'aquests estudis contribuiran a augmentar el coneixement de l'etiologia de la poliposi nasosinusal i obrirà noves perspectives per a la millora del tractament actual, donant la possibilitat de dissenyar nous fàrmacs i noves estratègies de tractament per a la rinosinusitis crònica i la poliposi nasosinusal, especialment en relació a la hipersecreció mucosa que acompanya en aquestes malalties.

## Hipòtesi de treball.

**A)** Els diferents tipus de pòlips nasosinusals, en comparació amb la mucosa nasal sana, podrien presentar un patró fenotípic d'expressió de gens MUC diferencial segons siguin pòlips bilaterals simples o associats a d'altres patologies de la mucosa respiratòria com són la fibrosi quística, l'asma bronquial o la intolerància als antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs), o inclús si es tracta de pòlips unilaterals (pòlips antrocoanals). Els canvis en els patrons d'expressió de mucines lligats a malaltia podrien explicar les diferències quant a composició i característiques reològiques del moc, determinant els tractaments adients per a cada patologia.

**B)** Els mediadors proinflamatoris que es troben incrementats en la poliposi nasal i patologies associades (asma, intolerància als AINEs), i els fàrmacs antiinflamatoris que es fan servir per al tractament d'aquestes malalties, podrien actuar a nivell gènic regulant l'expressió dels gens MUC i modificant així les característiques físico-químiques del moc respiratori, normalment alterat en aquestes patologies.

## Objectius Generals.

- 1) Caracteritzar l'expressió de mucines a nivell basal en mucosa nasal humana sana i inflamada (pòlips nasals).
- 2) Analitzar l'expressió de mucines i la regulació que exerceixen els glucocorticoides sobre aquesta en pacients amb poliposi nasal (*in vivo*) i en una línia cel·lular respiratòria (*in vitro*).



## Objectius Concrets.

**Estudi 1.** Estudiar l'expressió de mucines en mucosa nasal humana sana i inflamada (pòlips nasals) a nivell basal.

**1)** Caracteritzar i comparar l'expressió de mucines (MUC1, MUC2, MUC4, MUCAC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8) a nivell epitelial i glandular en mucosa nasal sana i en pòlips nasals de diferents orígens (pòlips antrocoanals, pòlips bilaterals simples i pòlips de pacients amb fibrosi quística), i tant a nivell de gen (hibridació *in situ*) com de proteïna (immunohistoquímica), per tal d'esbrinar si hi ha patrons diferencials d'expressió de mucines.

**2)** Estudiar el component inflamatori en els diferents tipus de mucosa respiratòria nasosinusal, anteriorment esmentades, i determinar si existeix una correlació entre aquest i l'expressió de mucines.

**Estudi 2.** Analitzar l'expressió de mucines i la seva regulació per glucocorticoides en mucosa nasal inflamada *in vivo*.

**1)** Avaluar i comparar l'expressió de mucines (MUC1, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC8) a nivell epitelial i glandular en pòlips nasals de pacients no asmàtics, asmàtics tolerants i asmàtics intolerants a l'aspirina, i avaluar l'efecte dels glucocorticoides orals i intranasals sobre aquesta expressió.

**2)** Investigar l'efecte dels glucocorticoides sobre el nombre de cèl·lules productores de mucines (caliciformes de l'epiteli i mucoses de glàndules submucoses) als grups de pacients

estudiats i determinar si existeixen correlacions entre aquestes i l'expressió de mucines.

**3)** Avaluar els símptomes nasals (obstrucció i rinorrea) en els grups de pacients estudiats abans i després del tractament amb corticoides i determinar si existeix una correlació entre aquests i l'expressió de mucines.

**Estudi 3.** Analitzar l'expressió de mucines, basal i induïda per agents inflamatoris, i la seva regulació per glucocorticoides en una línia cel·lular respiratòria.

**1)** Estudiar l'expressió del gen i la proteïna de MUC5AC i MUC5B a nivell basal i induït per la citocina proinflamatòria interleucina-1 $\beta$ , i determinar l'efecte de la dexametasona sobre ambdues expressions en cultius de cèl·lules de la línia mucoepidermoide de pulmó A549.

**2)** Determinar si l'efecte dels glucocorticoides sobre l'expressió de mucines en cultius cel·lulars d'A549 es dona a nivell transcripcional i/ o post-transcripcional.

**Estudi 4.** Estudi de revisió sobre l'expressió de mucines en malalties respiratòries que cursen amb rinitis.

**1)** Fer un recull bibliogràfic actualitzat sobre l'expressió de mucines en malalties respiratòries de vies aèries superiors i inferiors que cursen amb rinitis com ara la rinosinusitis crònica amb o sense pòlips nasals, la rinitis al·lèrgica, la fibrosi quística i l'asma.

## Material i mètodes.

### Estudi 1.

**Població d'estudi:** L'expressió de gens MUC s'estudiarà en mucosa nasosinusal sana i inflamada (pòlips nasals) de diferents orígens: mucosa nasal sana (MN, n=12), pòlips nasals bilaterals de pacients amb o sense asma i amb o sense tolerància als AINEs (PN, n=38), pòlips nasals bilaterals de pacients amb fibrosi quística (PFQ, n=10) i pòlips antrocoanals (PAC, n=11). La mucosa nasal sana s'obté de pacients sotmesos a turbinectomia i els pòlips nasals de pacients sotmesos a polipectomia per cirurgia endoscòpica nasosinusal.

**Mètodes:** L'estudi de les mucines (MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 i MUC8) es realitzarà per immunohistoquímica (IHQ) en talls de teixit parafinat de 3 µm de gruix amb anticossos específics. Els gens MUC2, MUC4, MUC5AC i MUC6 s'analitzaran per hibridació *in situ* (HIS) en talls *RNase-free* de teixit parafinat. El contingut de cèl·lules inflamatòries (eosinòfils, limfòcits, cèl·lules plasmàtiques i polimorfonuclears) dels teixits es determinarà en seccions tenyides amb hematoxilina-eosina.

Es realitzarà una valoració quantitativa en el cas de la IHQ i les cèl·lules inflamatòries, i qualitativa en el cas de la HIS per microscopia òptica. El patró de reacció es classificarà en epiteli i glàndules i el nombre de cèl·lules positives s'expressarà com a percentatge del nombre total de cèl·lules (cèl·lules comptades: 400). La reactivitat es determinarà per 2 observadors independents en un doble cec, i es farà la mitjana d'ambdós resultats.

**Estadística:** Les dades d'expressió de mucines i de nombre de cèl·lules inflamatòries s'expressarà com a mediana i percentils 25-75 de cèl·lules positives respecte nombre de cèl·lules totals i cèl·lules totals inflamatòries, respectivament. El test estadístic no paramètric U de Mann–Whitney es farà servir per a les comparacions entre grups. L'anàlisi estadístic Rho de Spearman s'emprarà per avaluar les correlacions entre l'expressió de mucines i els marcadors inflamatoris en els diferents teixits. La significància estadística s'establirà en  $P < 0,05$ .

## **Estudi 2.**

**Població d'estudi:** S'inclouran pacients amb poliposi nasal sense asma (n=13), amb asma i tolerància als AINEs (n=11) i amb asma i intolerància als AINEs (n=8). Tots els pacients inclosos en l'estudi presentaran una poliposi nasal greu segons l'escala de Lildholdt (puntuació mitja en test de Lildholdt: 2,7 de 3) (17) el qual es basa en la mida del pòlip determinat per endoscòpia nasal.

**Disseny de l'estudi:** Estudi prospectiu amb període inicial de 4 setmanes sense tractament amb corticoides. Inici de l'estudi amb 2 setmanes de tractament amb corticoides orals (prednisona: 30 mg, dosi única diària, decreixent) i intranasals (budesonida: 400 µg/12h), seguit de 12 setmanes de tractament únicament amb corticoides intranasals. Les biòpsies es recullen abans del tractament i a les 2 i 12 setmanes de tractament. Hi havia un grup control que no va rebre tractament de la setmana 0 a la 2.

**Mètodes:** L'estudi de les mucines (MUC1, MUC4, MUC5AC, MUC5B, i MUC8) es realitzarà per IHQ en talls de teixit parafinat de 3µm de gruix amb anticossos específics. L'estudi del nombre de cèl·lules caliciformes d'epiteli i cèl·lules mucoses de glàndules submucoses (principals cèl·lules productores de mucines) es farà mitjançant la tinció blau d'alcià- àcid periodic Schiff (AB-PAS). Es realitzarà una valoració quantitativa de la IHQ i de la tinció AB-PAS per microscopia òptica. El patró de reacció s'analitzarà tant a nivell epitelial com glandular, i els resultats s'expressaran com a percentatge de cèl·lules positives per nombre de cèl·lules totals (500 cèl·lules comptades). La reactivitat es determinarà per 2 observadors independents en un doble cec, i es va fer la mitjana d'ambdós resultats.

La gravetat dels símptomes nasals es valorarà de la següent manera: 0, assintomàtic; 1, lleu i sense repercussió en l'activitat diària o en el dormir; 2, moderat i amb certa repercussió en l'activitat diària o en el dormir; 3, greu i amb repercussió en l'activitat diària o en el dormir.

**Estadística:** Les dades d'expressió de mucines s'expressaran com a mediana i percentils 25-75 de cèl·lules positives respecte nombre de cèl·lules totals. El test no paramètric U de Mann-Whitney es farà servir per a les comparacions entre grups independents, i el de Wilcoxon per a les comparacions aparellades entre grups de tractament (abans i després del tractament). El test Rho de Spearman s'emprarà per avaluar les correlacions entre l'expressió de mucines i el contingut de cèl·lules caliciformes i mucoses dels diferents teixits, així com també per correlacionar expressió de

mucines i símptomes nasals. La significància estadística s'establirà en  $P < 0,05$ .

### **Estudi 3.**

**Població d'estudi:** Cultius cel·lulars de la línia mucoepidermoide pulmonar A549 en medi RPMI suplementat al 10% de FBS a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>.

**Disseny de l'estudi:** A) Quan les cèl·lules es trobin a subconfluència en plaques de 6 pous, es deixaran 24h amb medi sense FBS, i seguidament s'afegiran els diferents estímuls: IL-1 $\beta$ , 20 ng/ml; TNF- $\alpha$ , 20 ng/ml; LPS, 10  $\mu$ g/ml; CKM, 10 ng/ml; MCh, 10<sup>-6</sup> M; FBS, 10%; i dexametasona, 10<sup>-6</sup> M sola o combinada amb IL-1 $\beta$ . Es recolliran les cèl·lules i els sobrenadants a 1, 6, 12 i 24h.

**Mètodes:** Després de l'extracció de l'ARNm dels lisats de cèl·lules A549 l'estudi dels gens MUC5AC i MUC5B es farà per RT-PCR a temps real. La quantificació de l'ARNm de mucines es realitzarà mitjançant els *índex d'expressió relativa* (18) normalitzats amb l'expressió del gen constitutiu de la  $\beta$ -actina. L'estudi de la secreció de mucines MUC5AC i MUC5B es realitzarà en els sobrenadants de cèl·lules A549 mitjançant la tècnica d'ELISA. Les dades de secreció de mucines s'extrapolaran a partir de la corba de l'estàndard comercial *Mucins from Porcine Stomach type II* (Sigma), i cada condició es compararà amb el seu propi control (controls 6h, 12h i 24h).

**Estadística:** Les dades d'expressió de mucines (ARNm) s'expressaran com a *vegades de canvi* respecte els corresponents controls i representen les mitjanes de 3 experiments independents

realitzats per triplicat. Les dades de secreció de mucines (ELISA) s'expressaran com a unitats arbitràries respecte l'estàndard. Les comparacions es realitzaran amb el test estadístic ANOVA d'un factor i la prova *post hoc* test de Dunnet. La significància estadística s'establirà en  $P < 0,05$ .

## Resultats.

**Estudi 1. Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(4):448-57.**

Amb el propòsit de determinar si hi ha patrons d'expressió específics per a la poliposi nasal i les seves malalties associades, es va analitzar l'expressió de mucines en mucosa nasal sana (MN) i en pòlips nasals de diferents orígens: pòlips nasals bilaterals (PN), pòlips nasals de pacients amb fibrosi quística (PFQ) i pòlips antrocoanals (PAC). Es van emprar tècniques immunohistoquímiques per a la detecció de les mucines MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 i MUC8, obtenint els següents resultats: a) MUC1, MUC4 i MUC5AC es van trobar altament expressades tant a l'epiteli de la mucosa nasal sana com al dels pòlips nasals, mostrant un patró d'expressió similar en tots els tipus de pòlips nasals i diferent al trobat a la mucosa nasal sana. Així, MUC1 (PN:85%, PFQ:90%, PAC:80%) i MUC4 (PN:95%, PFQ:100%, PAC:100%) es trobaven incrementades i MUC5AC (PN:30%, PFQ:17,5%, PAC:22,5%) disminuïda en teixits patològics comparat amb el teixit sà (MUC1: 52,5%, MUC4:52,5%, MUC5AC:55%); b) MUC8 es va detectar en grans quantitats tant a nivell epitelial com glandular, mostrant una gran variabilitat entre grups; c) MUC5B es va detectar principalment en glàndules i la seva expressió fou superior en els teixits patològics que en la mucosa nasal sana (MN:37,5%, PN: 65%, PFQ: 67%). A més a més, l'expressió de MUC5B es va trobar incrementada a l'epiteli dels pòlips nasals de pacients amb fibrosi quística (25%)



respecte als pòlips nasals bilaterals (5%) i la mucosa nasal sana (<5%); d) MUC2 presentava una expressió molt baixa, especialment als pòlips antrocoanals, mentre MUC6 i MUC7 van ser escassament detectats a tots els teixits.

Tant quant a la distribució cel·lular i tissular, com a la quantitat de mucines als diferents teixits, l'anàlisi de l'ARNm de MUC2, MUC4, MUC5AC i MUC6 per hibridació *in situ* va mostrar resultats similars als trobats a nivell de proteïna.

L'estudi de l'infiltrat de cèl·lules inflammatòries, ens va mostrar un increment en el contingut eosinofílic dels pòlips nasals bilaterals (25%) en comparació tant amb el teixit sà (5%) com amb els altres teixits inflamats (PFQ:10%, PAC:10%). La resta de cèl·lules inflammatòries analitzades (limfòcits, cèl·lules plasmàtiques i polimorfonuclears) no van presentar diferències significatives entre teixits.

**Estudi 2. Corticosteroid therapy increases membrane-tethered while decreases secreted mucin expression in nasal polyps. *Allergy 2008 (en premsa).***

Amb el propòsit d'investigar la regulació *in vivo* per corticoides orals i intranasals sobre l'expressió de mucines i les seves cèl·lules productores en pòlips nasals, es va realitzar un estudi prospectiu en pacients amb poliposi nasal, els quals es van distribuir aleatòriament en un grup control i un de tractament (prednisona oral + budesonida intranasal durant 2 setmanes, i budesonida sola durant 10 setmanes). Les biòpsies de pòlip nasal es van obtenir abans i després de 2 i 12 setmanes de tractament amb corticoides. Les mucines de membrana (MUC1 i MUC4) així com les secretades (MUC5AC, MUC5B

i MUC8) es van analitzar mitjançant immunohistoquímica obtenint els següents resultats: a) el tractament amb tandes curtes de prednisona oral combinada amb budesonida intranasal va produir un increment en l'expressió de mucines de membrana (MUC1: de 70 a 98%; MUC4: de 80 a 100%) comparat amb els nivells basals, especialment en els pòlips de pacients amb asma tolerant; b) el tractament de llarga durada amb budesonida intranasal va produir una regulació a la baixa de les mucines secretades comparat amb els nivells basals, especialment MUC5AC a l'epiteli de pacients asmàtics (de 40 a 5%), i MUC5B a les glàndules de pòlips nasals de pacients amb asma tolerant (de 45 a 2,5%); c) després del tractament de 12 setmanes amb budesonida intranasal la mucina soluble MUC8 va incrementar a l'epiteli de pòlips nasals de pacients no asmàtics (de 10 a 75%) i a les glàndules dels asmàtics tolerants (de 2,5 a 45%), comparats amb el basal. En resum, els pòlips de pacients amb asma-tolerant van mostrar els canvis més significatius en totes les mucines analitzades i els de pacients no asmàtics presentaven variacions en MUC1, MUC5B i MUC8. Els pòlips de pacients amb asma intolerant només van presentar canvis en l'expressió de la mucina MUC5AC, mostrant d'aquesta manera una certa resistència al tractament corticoide.

Els corticoides van ser capaços de disminuir el nombre de cèl·lules caliciformes a l'epiteli i de cèl·lules mucoses a les glàndules submucoses, així com també la rinorrea i l'obstrucció nasal en pacients amb pòlips nasals. La davallada en l'expressió de mucines secretades, MUC5AC i MUC5B, després del tractament amb corticoides es correlacionava amb la reducció en el nombre de cèl·lules caliciformes i mucoses, respectivament, així com també amb la

disminució de la rinorrea en pacients amb pòlips nasals després del tractament corticoide.

Aquests resultats suggereixen que els corticoides, mitjançant la reducció en el nombre de cèl·lules productores de mucines i conseqüentment en la producció de mucines i la rinorrea, poden ser considerats una teràpia beneficiosa en el tractament de la hipersecreció mucosa present en els pòlips nasals, a excepció dels pacients amb triada de Widal els quals mostren una tendència a la resistència enfront el tractament corticoide.

### **Estudi 3. Dexamethasone decreases basal and IL-1 $\beta$ -induced MUC5AC expression and secretion in A549 cells (*en preparació*).**

Amb el propòsit d'investigar l'efecte dels glucocorticoides sobre l'expressió dels gens de les mucines tant a nivell basal com en condicions d'inflamació, es van tractar cultius de cèl·lules A549 amb diferents estímuls proinflamatoris i/o amb dexametasona. Les cèl·lules i els medis de cultiu es van recollir a les 1, 6, 12 i 24h d'incubació per tal de ser analitzats mitjançant RT-PCR a temps real (ARNm dels gens MUC5AC i MUC5B) i ELISA (proteïnes MUC5AC i MUC5B), respectivament. Dels estímuls proinflamatoris que es van testar (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS, mescla de citocines, metacolina i sèrum fetal boví) només la IL-1 $\beta$ , la mescla de citocines i el sèrum fetal boví van ser capaços d'induir l'expressió de l'ARNm de MUC5AC. Cap dels estímuls testats va regular l'expressió de l'ARNm de MUC5B. La IL-1 $\beta$  es va triar com a estímul proinflamatori en la resta d'experiments, ja que va ser l'agent que va causar l'efecte proinflamatori més potent i homogeni.

La IL-1 $\beta$  va regular a l'alça l'expressió de MUC5AC de manera dependent de dosi (0,1-20 ng/ml), tant a nivell d'ARNm com de proteïna, mostrant màxim efecte a les 6 i a les 24h, respectivament. D'altra banda, la IL-1 $\beta$  no va causar cap efecte sobre l'expressió de l'ARNm i la proteïna de MUC5B. La dexametasona va regular a la baixa de manera dependent de dosi ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M) l'expressió de l'ARNm i la proteïna de MUC5AC, a nivell basal i induït per IL-1 $\beta$ , amb efecte màxim després de 24h d'incubació. Tot i què MUC5B no va ser induïda per la IL-1 $\beta$ , la dexametasona va ser capaç de disminuir lleugerament l'expressió d'ARNm de MUC5B a nivell basal, tant a les 12 com a les 24h d'incubació.

**Estudi de revisió. Mucin gene expression in rhinitis syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006; 6(3):189-97. [Revisió].**

La rinitis i la rinosinusitis es troben freqüentment associades a d'altres malalties respiratòries com ara l'asma, la fibrosi quística i la poliposi nasal. En aquestes malalties la hipersecreció de moc causa obstrucció nasal i infecció de les vies respiratòries. Les mucines són el component majoritari del moc i són responsables de les seves propietats reològiques. Degut a que s'han trobat alteracions en els patrons d'expressió de mucines a les malalties associades amb la rinitis, les mucines han estat directament implicades en la formació de moc amb característiques anormals, ja sigui de tipus hiperviscós o aquós. Les mucines predominants a les secrecions respiratòries són MUC5AC i MUC5B, i en diverses malalties respiratòries s'han descrit canvis tant en la seva quantitat com en la seva qualitat. En general, l'expressió d'ambdues mucines s'ha trobat incrementada en

patologies respiratòries com ara l'asma, la rinitis al·lèrgica i la poliposi nasal però, en canvi, alguns estudis han demostrat una disminució d'aquestes a les secrecions de pacients amb fibrosi quística comparat amb les d'individus sans.

Els mecanismes involucrats en la regulació de les mucines de vies respiratòries són diversos i depenents de la malaltia. En aquest sentit, les citokines, els factors de creixement i les cèl·lules inflamatòries serien els principals agents implicats en la regulació de les mucines a l'asma i la poliposi nasal, enfront de la regulació exercida principalment per bacteris i els seus exoproductes en pacients amb fibrosi quística.

Un altre factor que podria ser essencial en el desenvolupament d'un fenotip hipersecretor seria l'aparició d'hiperplàsia de cèl·lules caliciformes i l'engrandiment de les glàndules submucoses, característiques que d'altra banda han estat descrites en les malalties anteriorment esmentades.

Tot i què s'han assolit grans avenços en relació a la fisiopatologia de les malalties respiratòries, incloent-hi la hipersecreció mucosa, més informació es fa encara necessària en relació a: a) la biologia cel·lular i estructural de les mucines i del moc, tant en situacions fisiològiques com patològiques; b) la regulació dels gens MUC i la identificació dels mediadors claus implicats en aquesta regulació; i c) el mecanisme que condueix a la hiperplàsia de les cèl·lules caliciformes.

## Conclusions.

Els resultats obtinguts permeten treure les següents conclusions:

- 1) Les mucines majoritàries tant a mucosa nasal sana com als pòlips nasals són MUC1, MUC4, MUC5AC i MUC8 a nivell epitelial, i MUC5B i MUC8 a nivell glandular. MUC1 també es troba altament expressada a nivell glandular però només als teixits patològics.
- 2) Els pòlips nasals presenten un patró d'expressió de mucines, amb MUC1 i MUC4 incrementades i MUC5AC disminuïda, diferent al trobat en mucosa nasal sana.
- 3) Entre els diferents grups de pòlips nasals:
  - a. Els pòlips nasals de pacients amb fibrosi quística, amb un increment de MUC5B, i els pòlips antrocoanals, amb un decrement de MUC2, també presenten un patró diferencial respecte el dels pòlips nasals bilaterals, tot i què hi ha més homogeneïtat quant a la resta de mucines.
  - b. Els pòlips nasals de pacients asmàtics presenten un increment en l'expressió de MUC5AC i MUC8 comparat amb els de pacients no asmàtics.
- 4) El tractament amb glucocorticoides:

- a. Incrementa l'expressió de mucines de membrana (MUC1 i MUC4) i disminueix la de les secretades (MUC5AC i MUC5B) en pòlips nasals, especialment de pacients asmàtics amb tolerància a l'aspirina. Els pacients asmàtics amb intolerància a l'aspirina semblen tenir una tendència a resistir front el tractament amb glucocorticoides.
  - b. Disminueix el nombre de cèl·lules productores de mucines, cèl·lules caliciformes de l'epiteli i cèl·lules mucoses de glàndules submucoses, i aquesta davallada correlaciona amb la reducció en l'expressió de les principals mucines secretades (MUC5AC i MUC5B) després del tractament amb glucocorticoides.
  - c. Redueix l'obstrucció nasal i la rinorrea en pacients amb poliposi nasal, trobant correlacions entre la disminució de la rinorrea i la reducció en l'expressió de les mucines secretades, MUC5AC i MUC5B, després del tractament amb glucocorticoides.
- 5) La dexametasona és capaç de disminuir tant l'expressió basal com la induïda per IL-1 $\beta$  de MUC5AC així com la seva secreció en cèl·lules A549. A més, la dexametasona regula a la baixa l'expressió de MUC5B a nivell d'ARNm en aquestes mateixes cèl·lules.

## Conclusions finals.

1. Hi ha diferents patrons d'expressió de mucines en mucosa nasal sana e inflamada, essent aquestes diferències parcialment responsables de la secreció de moc amb característiques viscoelàstiques alterades en pacients amb poliposi nasal.
2. Els glucocorticoides són capaços d'inhibir l'expressió i/o la secreció de mucines directa o indirectament en situació d'inflamació, tant *in vivo* com *in vitro*. *In vivo*, la regulació a la baixa que produeixen els glucocorticoides sobre les mucines secretades pot ser deguda a l'habilitat d'aquests reduint el nombre de cèl·lules productores de mucines, i pot esdevenir en una disminució de la producció de moc i de la rinorrea en pòlips nasals. *In vitro*, els corticoides són capaços de disminuir directament l'expressió de mucines basal i l'induïda per agents proinflamatoris.
3. Aquestes troballes conjuntament amb futurs estudis sobre l'expressió i regulació de mucines en condicions fisiològiques i patològiques, ajudaran a establir diagnòstics diferencials específics de malaltia i a millorar les teràpies actuals així com també a explorar-ne de noves per al tractament de la hipersecreció mucosa en malalties inflamatòries de vies respiratòries.



## Resum.

Les malalties respiratòries com la poliposi nasal, l'asma i la fibrosi quística cursen amb inflamació de la mucosa i són caracteritzades també per una hipersecreció mucosa. Aquesta hipersecreció pot presentar-se en forma de moc hiperviscós o aquós depenent de la patologia, i aquesta diferent presentació es déu en gran part a l'augment o disminució de la composició mucínica del moc. Els patrons d'expressió de mucines en mucosa nasal inflamada difereixen dels de mucosa nasal sana, i aquesta diferència es tradueix en un increment de la rinorrea en pacients amb pòlips nasals, ja siguin simples o associats a d'altres patologies respiratòries com l'asma, la fibrosi quística i la intolerància als AINEs. El tractament de la hipersecreció mucosa d'aquestes patologies és fa especialment complicat degut a les diferències que existeixen, quan a l'expressió de mucines i a la resposta al tractament, en els subgrups de pòlips nasals, diferències que haurien de ser estudiades rigorosament per tal de poder establir tractaments diferencials per a cadascuna de les patologies.

Fins ara, la teràpia recomanada per al tractament de la poliposi nasal són els glucocorticoides, i aquests han demostrat ser altament efectius disminuint la mida i el component inflamatori dels pòlips. Tot i que encara avui dia l'eficàcia dels glucocorticoides en el tractament de la hipersecreció mucosa és motiu de controvèrsia diversos estudis avalen el seu ús com a teràpia reductora de secreció. Els glucocorticoides han demostrat disminuir la secreció glandular basal i induïda per agents proinflamatoris en mucosa nasal sana i inflamada.

A més a més, en pacients amb pòlips nasals tractats amb glucocorticoides orals i intranasals, s'ha observat una disminució de la rinorrea relacionada amb la davallada d'expressió de les mucines principals a les secrecions de vies respiratòries, MUC5AC i MUC5B.

Tot i què els mecanismes d'acció dels glucocorticoides sobre la secreció mucosa no estan totalment esclarits, aquests poden actuar sobre els pòlips nasals: a) indirectament inhibint la infiltració de cèl·lules inflamatòries productores d'agents proinflamatoris; b) inhibint els mediadors proinflamatoris (citocines, agonistes colinèrgics, lipopolisacàrid bacterià) implicats en l'estimulació de la secreció mucosa; c) disminuint el nombre de cèl·lules productores de mucines, caliciformes i mucoses; i d) inhibint directament la producció i secreció de mucines transcripcionalment.

## Bibliografia

1. Kaliner M, Shelhamer JH, Borson B, Nadel J, Patow C, Marom Z. Human respiratory mucus. *Am Rev Respir Dis* 1986, 134:612-621.
2. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006, 86:245-78.
3. Aust MR, Madsen CS, Jennings A, Kasperbauer JL, and Gendler SJ. Mucin mRNA expression in normal and vasomotor inferior turbinates. *Am J Rhinol* 1997, 11:293-302.
4. Lopez-Ferrer A, Curull V, Barranco C, Garrido M, Lloreta J, Real FX, and de Bolos C. Mucins as differentiation markers in bronchial epithelium. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma display similar expression patterns. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 24:22-29.
5. Martinez-Anton A, Roca-Ferrer J, Mullol J. Mucin gene expression in rhinitis syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006, 6:189-97.
6. Hovenberg JW, Davies JR, and Carlstedt I. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem J* 1996, 318:319-24.
7. Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, and Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J* 1998, 334: 685-93.
8. Sheehan JK, Richardson PS, Fung DC, Howard M, Thornton DJ. Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma: a detailed study from a patient who died in status asthmaticus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 13:748-756.
9. Thornton DJ, Davies JR, Kraayenbrink M, Richardson PS, Sheehan JK, Carlstedt I. Mucus glycoproteins from 'normal' human tracheobronchial secretion. *Biochem J* 1990, 265:179-186.
10. Thornton DJ, Sheehan JK, Lindgren H, Carlstedt I. Mucus glycoproteins from cystic fibrotic sputum. Macromolecular properties and structural 'architecture'. *Biochem J* 1991, 276:667-675.
11. Fokkens WJ, Lund V, Mullol J, on behalf of the European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps group. EP3OS 2007: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinology*. 2007; Suppl 20:1-136.
12. Benítez P, Alobid I, de Haro J, Berenguer J, Bernal-Sprekelsen M, Pujols L, Picado C, Mullol J. A short course of oral prednisone followed by intranasal budesonide is an effective treatment of severe nasal polyps. *Laryngoscope*. 2006; 116:770-5.
13. Shimura S, T Sasaki, K Ikeda, K Yamauchi, H Sasaki, T Takishima. Direct inhibitory action of glucocorticoid on glycoconjugate secretion from airway submucosal glands. *Am Rev Respir Dis* 1990, 141: 1044-1049.

14. McGregor FB, AG Robson, NB Pride. Topical corticosteroids potentiate mucin secretion in the normal nose. *Clin Otolaryngol* 1996, 21: 76-79.
15. Roca-Ferrer J, J Mullol, M Pérez, L Molins, A Xaubet, J de Haro, JH Shelhamer, C Picado. Effects of topical glucocorticoides on in vitro lactoferrin gland secretion. Comparison between human upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 2000, 106: 1053-1062.
16. Roca-Ferrer J, J Mullol, A Xaubet, P Benítez, M Bernal-Sprekelsen, JH Shelhamer, C Picado. Proinflammatory cytokines and eosinophil cationic protein on glandular secretion from human nasal mucosa. Regulation by corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 108: 87-93.
17. Lildholdt T, Rundcrantz H, Lindqvist N. Efficacy of topical corticosteroid powder for nasal polyps: a double-blind, placebo-controlled study of budesonide. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1995, 20:26-30.
18. Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:e45.