

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**Estudio de la respuesta inmunitaria innata del epitelio sinusal
frente a *Staphylococcus aureus* en las poliposis nasales**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011)

Presentada por:

Dña. Miriam Torrecillas Muelas

Dirigida por:

Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona

Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller

Dr. David Navalpotro Rodríguez

Valencia, octubre 2023



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Microbiología y Ecología

Facultad de Medicina y Odontología

Titulación: Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011)

Tesis Doctoral

Estudio de la respuesta inmunitaria innata del epitelio sinusal frente a *Staphylococcus aureus* en las poliposis nasales.

Directores

Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona

Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller

Dr. David Navalpotro Rodríguez

Autor

Miriam Torrecillas Muelas

Valencia, octubre 2023

Prof. Concepción Gimeno Cardona, Profesora Titular del Dpto. de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia. Jefa del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital General Universitario de Valencia.

Prof. Miguel Armengot Carceller, Catedrático de Otorrinolaringología del Dpto. de Cirugía de la Universidad de Valencia. Jefe del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

Dr. David Navalpotro Rodríguez, Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia. F.E.A. de Microbiología y Parasitología en el Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta Dña. Miriam Torrecillas Muelas, con el título “Estudio de la respuesta inmunitaria innata del epitelio sinusal frente a *Staphylococcus aureus* en las poliposis nasales” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctora, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 10 de octubre de 2023.

Fdo.

CONCEPCION|
GIMENO|
CARDONA|
A

Firmado digitalmente por CONCEPCION|GIMENO|CARDONA
Nombre de reconocimiento (DN): cn=CONCEPCION|GIMENO|CARDONA, serialNumber=22645778R, givenName=CONCEPCION, sn=GIMENO CARDONA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, o=CONSELLERIA DE SANIDAD, c=ES
Fecha: 2023.10.20 11:49:35 +02'00'

Dra. Concepción Gimeno

MIGUEL|
ARMENGOT|
CARCELLER|
R

Firmado digitalmente por MIGUEL|ARMENGOT|CARCELLER
Fecha: 2023.10.18 08:24:52 +02'00'

Dr. Miguel Armengot

DAVID|
NAVALPOTRO|
RODRIGUEZ|
EZ

Firmado digitalmente por DAVID|NAVALPOTRO|RODRIGUEZ
Nombre de reconocimiento (DN): cn=DAVID|NAVALPOTRO|RODRIGUEZ, serialNumber=14260767P, givenName=DAVID, sn=NAVALPOTRO RODRIGUEZ, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, o=CONSELLERIA DE SANIDAD, c=ES
Fecha: 2023.10.20 12:57:52 +02'00'

Dr. David Navalpotro

AGRADECIMIENTOS

Pensar en lo que ha significado para mí este proyecto, implica recordar a todas las personas que me han acompañado a lo largo de estos años. De todos ellos me he llevado mucho más que conocimientos y consejos; su amistad, cariño y apoyo. Por ello, a través de estas líneas, les quiero transmitir mi agradecimiento y hacerles saber que, directa o indirectamente, forman parte de este proyecto que con tanta ilusión comenzamos y que, sin ellos y sin su ayuda, no habría podido llevar a su fin.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, Prof. Concepción Gimeno, Prof. Miguel Armengot y Dr. David Navalpotro, el darme la oportunidad de desarrollar este trabajo. La confianza que depositaron en mí me impulsó a introducirme en este campo, uniendo mi pasión por la Microbiología con la investigación, creciendo así profesional y personalmente.

Gran parte de este proyecto se ha desarrollado en la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, donde he tenido la oportunidad de aprender a diseñar mis experimentos y a realizar muchas de las técnicas empleadas. Sonia, Bea, Anselm (y compañía), Alejandro y resto del grupo de “Onco”, gracias por vuestra ayuda y paciencia resolviendo mis innumerables dudas. Vuestras aportaciones han enriquecido mis investigaciones y sin ellas no habría sido posible obtener los resultados que aquí presento. De vosotros también aprendí lo importante que es el trabajo en equipo y el compañerismo.

Gracias a todos los compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Valencia por vuestra ayuda, apoyo y consejos. Especialmente, gracias a David, José Luis, Rober y Vir, por ayudarme con los cultivos, despertar mis inquietudes y, lo peor, aguantarme día a día. Vane, Yoli, Raquel, Bea “jefaza”, Martita, Sonia, Leti, Eli, Helen... ¡¡mil gracias!!

Esta tesis tampoco habría sido posible sin la colaboración de otros profesionales que, desde fuera del laboratorio, han aportado su granito de arena. Por ello, quiero agradecer a los Facultativos del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital General Universitario de Valencia y del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, su amabilidad, disposición y ayuda en este proyecto.

También, quiero agradecer a los profesionales y amigos que me acompañaron durante la etapa final; compañeros del Hospital Universitario de Bellvitge y del Hospital Universitario Cruces, gracias por vuestra acogida y por ayudarme a crecer profesional y personalmente.

Llegado este punto, no me puedo olvidar de vosotras, Violeta, Mónica, Carla, Nago, Irene y Amparo, amigas de Aitzeder Mendi Taldea. En nuestras salidas de monte por Euskadi y alrededores os habéis preocupado por el tema, por su evolución y desarrollo e incluso, habéis mostrado interés y escuchado (increíble, ¡¡pero cierto!!). Os lo agradezco enormemente, ya que me habéis aportado un plus de energía y motivación.

Tampoco puedo olvidarme de la persona que durante estos últimos años me ha acompañado día a día. Miguel, gracias por tu infinita paciencia, por aportarme momentos de desconexión, por tus consejos, por meterme “un poco de presión” en los días que faltaban las ganas y, sobre todo, por recordarme la importancia del trabajo diario (“*poliki-poliki*”). Eres para mí un gran ejemplo a seguir.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a mi familia su apoyo constante e incondicional. Mamá, Papá, Cami, Juan y Jaime, gracias por vuestra paciencia y, sobre todo, gracias por entender que no os visite tan a menudo. Siempre habéis confiado en mí y me habéis hecho saber que puedo alcanzar mis metas.

¡Muchas gracias a todos!

La presente Tesis Doctoral, realizada en el Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), ha sido posible gracias a la siguiente ayuda de investigación:

“Premio Fundación Investigación Hospital General Universitario 2016”, otorgado por la Fundación de Investigación Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV) para la Investigación Biomédica, Docencia y Desarrollo de las Ciencias de la Salud.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	25
1. CONCEPTOS GENERALES.....	27
2. RINOSINUSITIS CRÓNICA CON POLIPOSIS NASAL.....	29
2.1. Epidemiología.....	29
2.2. Factores asociados a la rinosinusitis crónica con poliposis nasal.....	31
2.2.1. Alergia	31
2.2.2. Asma.....	31
2.2.3. Enfermedad Respiratoria Exacerbada por AINEs	32
2.2.4. Factores genético-hereditarios	34
2.2.5. Factores ambientales	34
2.3. Mecanismos fisiopatológicos.....	35
2.3.1. Desencadenantes inflamatorios.....	35
2.3.2. Óxido nítrico	38
2.3.3. Remodelado tisular y disfunción del epitelio nasosinusal	38
2.3.4. Alteraciones de la inmunidad innata	39
2.3.5. Colonización por microorganismos.....	40
2.4. Diagnóstico.....	41
2.5. Tratamiento.....	43
2.5.1. Corticoides.....	44
2.5.2. Antibióticos	44
2.5.3. Antileucotrienos	45
2.5.4. Tratamiento quirúrgico	46
2.5.5. Anticuerpos monoclonales.....	46

3. <i>Staphylococcus aureus</i>. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	47
3.1. Descripción del género y características generales	47
3.2. Patogenia de las infecciones por <i>S. aureus</i>. Determinantes de virulencia	49
3.2.1. Componentes estructurales	50
3.2.2. Toxinas	53
3.2.3. Enzimas extracelulares	56
3.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>Staphylococcus aureus</i>	56
3.3.1. Generalidades	56
3.3.2. Resistencia a antibióticos betalactámicos	57
3.3.3. Resistencia a antibióticos no betalactámicos	58
4. IMPLICACION DE <i>Staphylococcus aureus</i> EN LA RSCcPN	60
4.1. Colonización nasal por <i>S. aureus</i> e influencia en el microbioma	60
4.2. Influencia de <i>S. aureus</i> en la barrera epitelial	61
4.3. Formación de biofilms	62
4.4. Toxinas y otras proteínas estafilocócicas	63
HIPÓTESIS	67
OBJETIVOS	71
MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO	77
1.1. Descripción y ámbito de aplicación	77
1.2. Pacientes	77
1.3. Aspectos éticos	78
2. DISEÑO DEL ESTUDIO	79
2.1. Planificación del proyecto	79
2.2. Variables analizadas	80

3. MÉTODOS	82
3.1. Obtención de muestras	82
3.2. Modelo de estimulación celular <i>in vitro</i> con proteínas de <i>S. aureus</i>	82
3.2.1. Cultivo de la línea celular inmortalizada BEAS-2B	82
3.2.2. Cultivo celular primario de células epiteliales nasosinusales	84
3.2.3. Estimulación de células epiteliales con proteínas de <i>S. aureus</i>	84
3.2.4. Medida de citocinas con Luminex® xMAP®	87
3.3. Estudio microbiológico	90
3.3.1. Estudio microbiológico convencional	90
3.3.2. Detección de <i>S. aureus</i> por PCR Real-Time	91
3.3.3. Tipado molecular de <i>S. aureus</i>	92
3.4. Análisis estadístico	97
RESULTADOS	99
1. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN	101
1.1. Datos demográficos	101
1.2. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el grupo de estudio	101
1.2.1. Hábitos tóxicos y comorbilidades	101
1.2.2. Manifestaciones clínicas	102
1.2.3. Tratamiento farmacológico	104
1.2.4. Episodios de cirugía endoscópica nasosinusal previos	104
2. ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ESTIMULACIÓN CELULAR Y MEDICIÓN CUANTITATIVA DE CITOQUINAS	105
2.1. Cinética de liberación de citoquinas en células BEAS-2B	106
2.2. Cinética de liberación de citoquinas en CEPN de pacientes con EREA	106
2.3. Selección de las condiciones experimentales	110

3. LIBERACIÓN DE CITOQUINAS INDUCIDA POR SpA EN CÉLULAS EPITELIALES DE PÓLIPOS NASALES	110
3.1. SpA induce la liberación de IFN- γ , IL-21 e IL-17A	111
3.2. SpA induce la liberación de IL-10	112
3.3. SpA induce la liberación de IL-13	112
3.4. SpA reduce la producción basal de IL-8	112
4. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS INDUCIDA POR SpA EN CULTIVOS CELULARES DE LOS GRUPOS EREA Y CONTROL.....	115
4.1. Comparación de la producción de IFN- γ , IL-21 e IL-17A	116
4.2. Comparación de la producción de IL-10	116
4.3. Comparación de la producción de IL-8	118
5. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO EN PACIENTES DEL GRUPO EREA	119
5.1. Microorganismos aislados en muestras de exudado nasal	119
5.2. Detección de <i>S. aureus</i> por PCR Real-Time en muestras de exudado nasal	120
5.3. Caracterización de las cepas de <i>S. aureus</i>	121
5.3.1. Sensibilidad antibiótica	121
5.3.2. Caracterización genotípica	121
6. ASOCIACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CITOQUINAS Y PARÁMETROS FISIOPATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS	124
DISCUSIÓN	129
1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	131
2. DISEÑO DEL MODELO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS.....	135
2.1. Cultivos celulares	135
2.2. Selección de las proteínas de <i>S. aureus</i>	137
2.3. Metodología para la cuantificación de citoquinas.....	139
2.4. Selección de las citoquinas analizadas	139

3.	RESPUESTA INDUCIDA POR α -hemolisina y SpA	141
3.1.	α -hemolisina.....	141
3.2.	SpA.....	142
4.	CARACTERÍSTICAS DE <i>S. aureus</i>	144
4.1.	Cultivo bacteriológico de las muestras de exudado nasal.....	144
4.2.	Colonización nasal por <i>S. aureus</i> en pacientes con EREA	146
4.3.	Sensibilidad antibiótica y caracterización genotípica de <i>S. aureus</i>	149
5.	ASOCIACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CITOQUINAS Y PARÁMETROS FISIOPATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS	152
6.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	154
	CONCLUSIONES.....	157
	BIBLIOGRAFÍA	161
	ANEXOS	193

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de respuesta inmune y patrones inflamatorios característicos.

Tabla 2. Clasificación endoscópica de la poliposis nasal propuesta por Lildholdt y cols.

Tabla 3. Clasificación de Lund y Mackay para la valoración de la TC en la poliposis nasal.

Tabla 4. Principales anticuerpos monoclonales evaluados para el tratamiento de la RSCcPN.

Tabla 5. Factores de virulencia de *S. aureus*.

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes incluidos en el grupo de estudio.

Tabla 7. Variables clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el grupo de estudio.

Tabla 8. Transporte y conservación de las muestras utilizadas en el estudio.

Tabla 9. Especificaciones de los paneles Milliplex Millipore para las citoquinas estudiadas.

Tabla 10. Reactivos requeridos para la realización de la técnica de PCR Real-Time en la plataforma de diagnóstico molecular BDMAX™.

Tabla 11. Hábitos tóxicos y comorbilidades de los pacientes con EREA incluidos en el estudio.

Tabla 12. Síntomas y grado de poliposis de los pacientes con EREA incluidos en el estudio.

Tabla 13. Características demográficas y clínicas de los pacientes con EREA en los que se ha realizado el experimento de estimulación celular *in vitro* con SpA.

Tabla 14. Microorganismos aislados de muestras de exudado nasal de pacientes con EREA.

Tabla 15. Perfil de sensibilidad antibiótica de las 19 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA.

Tabla 16. Características de las 19 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA.

Tabla 17. Correlación entre la liberación de citoquinas inducida por SpA en las CEPN de pacientes con EREA (n= 14) y parámetros fisiopatológicos.

Tabla 18. Influencia de la colonización nasal por *S. aureus* en la liberación de IL-8 por las CEPN de pacientes con EREA, en presencia o ausencia de SpA.

Tabla 19. Estudios experimentales en RSC con determinantes antigénicos de *S. aureus*: características metodológicas y principales hallazgos.

Tabla 20. Principales citoquinas relacionadas con la patogénesis de la RSCcPN y la EREA.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de un pólipo nasal extraído mediante cirugía endoscópica nasosinusal.

Figura 2. Representación de un corte histológico de un pólipo nasal eosinofílico.

Figura 3. Ruta metabólica del ácido araquidónico y papel de los mediadores en la patogénesis de la EREA.

Figura 4. Endotipos inflamatorios de RSC y citoquinas predominantes en cada uno de ellos, junto con la distribución de RSCcPN y RSCsPN, y asma.

Figura 5. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la RSCcPN.

Figura 6. Estructura del epitelio nasosinusal en ausencia de patología.

Figura 7. Algoritmo diagnóstico propuesto por las Sociedades Españolas de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC) y de Otorrinolaringología (SEORL) en el Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal.

Figura 8. Algoritmo diagnóstico de EREA.

Figura 9. Algoritmo de tratamiento de la RSCcPN propuesto en el Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal (SEAIC-SEORL).

Figura 10. Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus* en una muestra de hemocultivo.

Figura 11. Colonias de *Staphylococcus aureus* en una placa de agar sangre.

Figura 12. Sistema de regulación génica operón *agr*.

Figura 13. Mecanismo de acción de antígenos convencionales y superantígenos.

Figura 14. Mecanismos de resistencia antibiótica.

Figura 15. Activación de la cascada inflamatoria característica de la RSCcPN debido a la influencia de los microorganismos en la barrera epitelial.

Figura 16. Efectos de los superantígenos estafilocócicos en los diferentes tipos celulares.

Figura 17. Esquema de trabajo del proyecto.

Figura 18. Plan de actividades para el desarrollo de los procedimientos incluidos en el esquema de trabajo.

Figura 19. Cultivo de la línea celular inmortalizada BEAS-2B.

Figura 20. Etapas del cultivo celular primario de células epiteliales nasosinusales.

Figura 21. Fase I de los experimentos de estimulación celular *in vitro* con proteínas de *S. aureus*.

Figura 22. Fase II de los experimentos de estimulación celular *in vitro* con proteínas de *S. aureus*.

Figura 23. Tecnología Luminex® xMAP® basada en microesferas magnéticas teñidas con una mezcla de dos fluorocromos, rojo e infrarrojo.

Figura 24. Fundamento de la tecnología Luminex® xMAP®.

Figura 25. Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics®) a partir de colonias aisladas. Procedimiento y fundamento de la técnica.

Figura 26. Etapas del proceso de electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Figura 27. Distribución de los pacientes con EREA en función de la edad.

Figura 28. Distribución de los pacientes con EREA en función del grado de poliposis.

Figura 29. Antibióticos prescritos a los pacientes con EREA (n= 56) durante el periodo previo a su inclusión en el estudio (> 3 meses).

Figura 30. Episodios de CENS previos a la inclusión de los pacientes en el estudio.

Figura 31. Patrón de liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D), IL-21 (E), IL-5 (F), IL-33 (G) e IL-8 (H), en cultivos celulares de línea BEAS-2B (n= 3) tras la estimulación con α -hemolisina y SpA.

Figura 32. Patrón de liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D), IL-21 (E), IL-5 (F), IL-33 (G) e IL-8 (H), en cultivos primarios de células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n= 3), tras la estimulación con α -hemolisina y SpA.

Figura 33. Efecto de SpA (1 μ g/ml) en la liberación de IFN- γ (A), IL-21 (B) e IL-17A (C) por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Figura 34. Efecto de SpA en la liberación de IL-10 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Figura 35. Efecto de SpA (1 μ g/ml) en la liberación de IL-13 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Figura 36. Efecto de SpA (1 μ g/ml) en la producción de IL-8 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Figura 37. Efecto de SpA en la liberación de IFN- γ (A), IL-21 (B) e IL-17A (C) por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) y células epiteliales de biopsias del cornete medio de pacientes control (n= 6), tras 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Figura 38. Efecto de SpA en la liberación de IL-10 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) y células epiteliales de biopsia del cornete medio de pacientes control (n= 6).

Figura 39. Efecto de SpA en la liberación de IL-8 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) y células epiteliales de biopsia del cornete medio de pacientes control (n= 6).

Figura 40. Patrones de PFGE de las 19 cepas de *S. aureus* obtenidas de pacientes con EREA.

Figura 41. Dendrograma de similitud genotípica entre las 19 cepas de *S. aureus*, obtenido mediante el algoritmo UPGMA.

Figura 42. Relación entre el número de eosinófilos en los pólipos nasales y la liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D), IL-21 (E) inducida por SpA en las CEPN de pacientes con EREA (n= 14).

Figura 43. Comparación de la liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D) e IL-21 (E) inducida por SpA, en las CEPN de pacientes con EREA con cultivos de colonización nasal positivos (n= 6) y negativos (n= 8) para *S. aureus*.

Figura 44. Liberación de IL-8 en las CEPN no estimuladas obtenidas de pacientes con EREA con cultivos de colonización nasal positivos (n= 6) y negativos (n= 8) para *S. aureus*.

Figura 45. Limitaciones encontradas en la realización de los cultivos celulares primarios de células epiteliales. A) contaminación bacteriana. B) crecimiento de fibroblastos.

ABREVIATURAS

5-LO	5-lipooxigenasa
AAS	Ácido acetil salicílico
AcMo	Anticuerpos monoclonales
AINEs	Antinflamatorios no esteroideos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CECNM	Células epiteliales de biopsias del cornete medio
CENS	Cirugía endoscópica nasosinusal
CEPN	Células epiteliales de pólipos nasales
CHGUV	Consortio Hospital General Universitario de Valencia
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
CSIN	Corticoides intranasales
CSO	Corticoides orales
Cys-LTs	Cisteinil-leucotrienos
ECN	Estafilococos coagulasa-negativos
ECP	Proteína catiónica del eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada del eosinófilo
EPO	Peroxidasa del eosinófilo
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPOS	<i>European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps</i>
EREA	Enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs
EVA	Escala visual analógica
FQ	Fibrosis quística
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA	Complejo antígeno leucocitario humano
HUP La Fe	Hospital Universitario y Politécnico La Fe
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ILC	Células linfoides innatas
ILC2	Células linfoides innatas del grupo 2

LTC4S	Leucotrieno C4 sintasa
LTE4	Leucotrieno E4
LPV	Leucocidina de Panton-Valentine
MBP	Proteína básica principal
MEC	Matriz extracelular
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NF-kB	Factor nuclear <i>kappa</i> B
NK	<i>Natural killer</i>
ON	Óxido nítrico
ONn	Óxido nítrico nasal
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBP	Proteína de unión a penicilina
PFGE	Electroforesis de campo pulsado
PGs	Prostaglandinas
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PN	Poliposis nasal
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones citoplasmáticos
RA	Rinitis alérgica
RSC	Rinosinusitis crónica
RSCcPN	Rinosinusitis crónica con poliposis nasal
RSCsPN	Rinosinusitis crónica sin poliposis nasal
SAg	Superantígeno
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SE	Enterotoxinas estafilocócicas
SE-IgE	IgE específica frente a enterotoxinas estafilocócicas
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
SpA	Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>
SST	Síndrome del Shock Tóxico
TC	Tomografía computarizada
TCR	Receptor de Linfocitos T

TGF- β 1	Factor β 1 transformador del crecimiento
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor 1 de TNF
Treg	T reguladoras
TSA	Agar Triptona Soja
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica
TSST-1	Toxina 1 del Síndrome del Shock Tóxico

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La rinosinusitis crónica con poliposis nasal es una enfermedad inflamatoria crónica, frecuentemente asociada a asma e hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos, constituyendo la triada conocida como enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs (EREA), la cual se caracteriza por su mayor gravedad, alta recurrencia de poliposis y dificultad de tratamiento. La desregulación de la respuesta inmunitaria innata juega un papel importante en su patogénesis. Así, *Staphylococcus aureus* y otros microorganismos presentes en la cavidad nasal, podrían actuar como modificadores de la enfermedad al promover la liberación de citoquinas y otras moléculas.

OBJETIVOS

Evaluar la implicación de las proteínas de *S. aureus*, α -hemolisina y SpA, en la activación de la respuesta inmunitaria innata en la EREA, mediante el diseño de un modelo de estimulación celular *in vitro* y la posterior cuantificación de citoquinas. Estudiar las características microbiológicas de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA, así como la asociación entre la liberación de citoquinas y parámetros fisiopatológicos y microbiológicos.

MÉTODOS

Los pacientes incluidos en el estudio fueron divididos en dos grupos, EREA (n =56) y control (n =20). Se tomaron muestras biópsicas de pólipo nasal y cornete medio, respectivamente, y muestras de exudado nasal en el grupo EREA. El proyecto se dividió en diferentes etapas: i) Reclutamiento de pacientes y obtención de muestras. ii) Modelo de estimulación celular *in vitro* y cuantificación de citoquinas con la tecnología Luminex® xMAP®. iii) Estudio microbiológico y aislamiento de *S. aureus* para su caracterización. iv) Análisis estadístico con el software Graphpad Prism versión 7.04.

RESULTADOS

Las células epiteliales de pólipos nasales liberaron IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-21, IL-17A e IL-8 en respuesta a SpA, con niveles significativamente superiores en comparación con el grupo control

y, excepto en IL-8, con las células sin estímulo. La expresión basal de IL-8 fue intensa, tiempo-dependiente y se redujo significativamente con SpA. *S. aureus* fue aislado en el 34% de los pacientes con EREA, mostrando altos porcentajes de resistencia a macrólidos y gran diversidad genética. En pacientes colonizados IL-10 fue significativamente superior, mientras que, en pacientes no colonizados, se observó un incremento significativo de IL-8. El recuento de eosinófilos en el tejido polipoide se correlacionó positivamente con la concentración de IL-13 y negativamente con IL-10. En el caso de IL-21, IFN- γ e IL-17A la tendencia fue positiva, pero no significativa.

CONCLUSIONES

La proteína A de *S. aureus* es capaz de modular la respuesta inmunitaria innata en pacientes con EREA, al inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. El aumento de IL-10 y la reducción de IL-8 inducida por SpA, disminuyen la intensidad de la respuesta inflamatoria, favoreciendo la creación de un entorno que predispone a la colonización nasal persistente.

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTOS GENERALES

La **rinosinusitis crónica (RSC)** está constituida por un grupo heterogéneo de enfermedades inflamatorias, con diferentes etiologías y distintos mecanismos fisiopatológicos, que afectan a la mucosa de las fosas nasales y senos paranasales. Fenotípicamente, se clasifica en dos grupos clínicos: **RSC sin poliposis nasal (RSCsPN)**, neutrofílica, y **RSC con poliposis nasal (RSCcPN)**, la cual se subdivide en **RSCcPN eosinofílica** y **RSCcPN neutrofílica**. Ambos fenotipos presentan combinaciones de patrones inflamatorios tipo 1, 3 y/o tipo 2, que varían entre enfermedades (Tabla 1) (1).

La RSCcPN eosinofílica es bilateral e idiopática y se caracteriza por un gran contenido de células inflamatorias, mostrando un alto grado de eosinófilos activados y linfocitos T, con una demostrada inclinación hacia la expresión de citoquinas de linfocitos T *helper* 2 (Th2), las cuales promueven la liberación de Inmunoglobulina E (IgE). Este tipo se asocia frecuentemente con el asma bronquial y la intolerancia a la aspirina u otros antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), constituyendo así la entidad clínica denominada **ASA triada** (*acetil salicylic acid triad*) (2). Siguiendo las recomendaciones de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI), en la actualidad se emplea el término de **enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs o EREA** (del inglés *Nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease, NSAID-ERD*), para hacer referencia a este síndrome (3). Por el contrario, la RSCcPN neutrofílica presenta menor infiltración eosinofílica y presencia de linfocitos Th1 y Th17 (4).

Tabla 1. Tipos de respuesta inmune y patrones inflamatorios característicos.

Respuesta inmune	Células Th e ILC	Citoquinas típicas	Células del sistema inmune
Tipo 1	Th1 e ILC1	IFN- γ , TNF	Neutrófilos y células NK
Tipo 2	Th2 e ILC2	IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13	Células B productoras de IgE, mastocitos y eosinófilos
Tipo 3	Th17 e ILC3	IL-17, IL-22	Neutrófilos

Th, T *helper*; ILC, células linfoides innatas; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral; IL, interleuquina; NK, *natural killer*.

Modificado de Bachert C *et al* 2020 (1)

La **rinosinusitis crónica con poliposis nasal** se caracteriza por la degeneración edematosa multifocal, bilateral e idiopática de la mucosa de las masas laterales del etmoides, provocando la formación de lesiones polipoides lisas, gelatinosas, translúcidas y piriformes, que progresivamente van ocupando los meatos etmoidales hacia las fosas nasales (Figura 1).

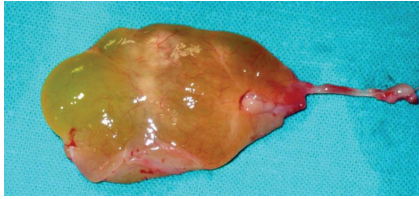


Figura 1. Imagen de un pólipo nasal extraído mediante cirugía endoscópica nasosinusal.

Tomado de Navalpotro D. *et al* 2015 (5)

A nivel histopatológico, los pólipos se caracterizan por presentar un epitelio ciliado y, en menor medida, escamoso; una membrana basal engrosada, y un estroma laxo con escasas estructuras vasculares y glandulares, y ausencia de elementos nerviosos y tejido conjuntivo. En el estroma destaca el abundante infiltrado de células inflamatorias, con predominio de eosinófilos activados y, en menor proporción linfocitos T y macrófagos (Figura 2). En la superficie también se han encontrado inmunoglobulinas, fundamentalmente IgE.

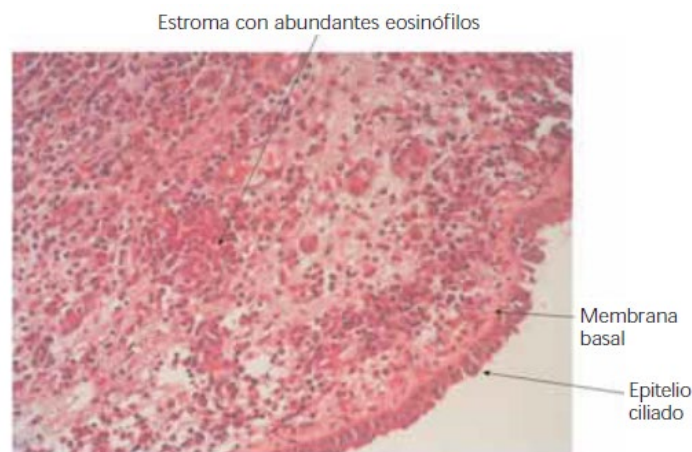


Figura 2. Representación de un corte histológico de un pólipo nasal eosinofílico

Tomado del Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal (6)

Desde un punto de vista clínico, el documento de consenso europeo sobre rinosinusitis y pólipos nasales (7), define la RSC en el adulto, con o sin poliposis nasal (PN), como un proceso inflamatorio de más de 12 semanas de duración, caracterizado por la presencia de dos o más de los siguientes síntomas:

- Obstrucción, bloqueo o congestión nasal
- Rinorrea anterior o posterior
- Dolor o presión facial
- Reducción o pérdida del olfato

En presencia de PN, dichos síntomas se acompañan de hallazgos endoscópicos o tomográficos:

- Presencia de pólipos nasales
- Rinorrea mucopurulenta procedente del meato medio
- Edema u obstrucción de la mucosa, fundamentalmente del meato medio
- Cambios en la mucosa del complejo ostiomeatal o sinusal

La RSCcPN constituye un grave problema de salud pública, con un impacto importante en los costes sociosanitarios y en la calidad de vida de los pacientes, comparable a otras enfermedades crónicas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la diabetes (8,9). Se ha de destacar que la enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs (EREA) representa una de las formas más agresivas de la enfermedad.

Este subgrupo se caracteriza por una mayor exacerbación de los síntomas y alta recurrencia de poliposis, con la consiguiente necesidad de tratamiento quirúrgico periódico (10). Todo ello conlleva a un mayor empeoramiento del cuadro clínico, incrementando de forma significativa los costes sociosanitarios y la repercusión negativa en la calidad de vida de los pacientes (11,12). Entre las posibles causas que podrían contribuir a dicho agravamiento, muchas de las investigaciones se han centrado en la implicación de *Staphylococcus aureus*, debido, en gran medida, a las altas tasas de colonización nasal en dichos pacientes y a los factores de virulencia del microorganismo. A pesar de ello, todavía se desconoce su papel en la patogénesis de la enfermedad.

Dada su importancia y relevancia clínica en el contexto de la RSCcPN, esta Tesis Doctoral tiene como objeto de estudio el grupo de pacientes con EREA, aportando un valor añadido a la participación de *Staphylococcus aureus* en la influencia de la respuesta inflamatoria subyacente.

2. RINOSINUSITIS CRÓNICA CON POLIPOSIS NASAL

2.1. Epidemiología

Los datos epidemiológicos disponibles no permiten establecer con exactitud cuál es la prevalencia de las entidades clínicas englobadas en el conjunto de la RSC. La dificultad para el cálculo de los indicadores epidemiológicos radica principalmente en la heterogeneidad de la enfermedad, ya que los estudios disponibles presentan variabilidad en los criterios de selección de la población y en la metodología diagnóstica empleada. Estudios realizados mediante

encuestas telefónicas, basados en la persistencia de sintomatología nasosinusal durante más de 12 semanas, obtienen una prevalencia de RSC del 15-16% en la población adulta de EE.UU, siendo mayor en mujeres que en hombres (13,14). Sin embargo, la prevalencia se reduce significativamente cuando el diagnóstico se realiza utilizando pruebas de imagen (15). Desde la publicación del documento de consenso EPOS (*European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps*) en 2007 (7), el uso de criterios estandarizados basados en la sintomatología ha permitido la estimación de la prevalencia en grandes poblaciones, así como su comparación entre distintas zonas geográficas. Estos criterios han demostrado tener una buena correlación con los hallazgos endoscópicos (16).

En 2011, la Red de Excelencia Global de Alergia y Asma (GA2LEN), llevó a cabo un estudio multicéntrico europeo en el que obtuvieron una prevalencia de RSC en la población general del 10,9%, siendo mayor en mujeres que en hombres (17). No obstante, estudios recientes realizados en otras regiones muestran datos de prevalencia diferentes, que oscilan entre el 8% y el 28,4% (18–20). En cuanto a la RSCcPN, se estima que está presente en el 2-4% de la población adulta en todo el mundo (21,22). A menudo se asocia con otras entidades clínicas como asma e intolerancia a los AINEs (23,24). Como publicó Regab *et al* (25) en su estudio, donde el 60% de los pacientes con RSCcPN padecían algún tipo de afectación de las vías respiratorias inferiores, diferenciando entre asma (24%) y enfermedad de las vías respiratorias bajas (36%).

La asociación entre poliposis, asma e intolerancia a los AINEs, fue descrita por Widal *et al* en 1922 (26). En 1968 Samter y Beers detallaron sus características clínicas (27) y, posteriormente, en 1975, Andrew Szczeklik asoció la reacción de hipersensibilidad a AINEs con un mecanismo no alérgico (28). Históricamente se han utilizado numerosas denominaciones para hacer referencia a este síndrome, como triada ASA, triada de Widal, triada de Samter o asma inducido por aspirina. En la actualidad se emplea el término enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs o EREA (3). Aunque se desconoce la prevalencia exacta, se estima que las reacciones respiratorias de hipersensibilidad a AINEs afectan aproximadamente al 1,9% de la población general (29), con un incremento destacado en pacientes asmáticos y/o con RSCcPN, alcanzando el 10-20% (29–31). Generalmente se presenta en la edad adulta, entre la tercera y cuarta década de la vida, siendo mayor la incidencia en mujeres que en hombres (ratio 2:1), las cuales presentan un cuadro clínico más severo caracterizado por la aparición temprana de los síntomas (29,32).

2.2. Factores asociados a la rinosinusitis crónica con poliposis nasal

2.2.1. Alergia

La rinitis alérgica (RA) es una enfermedad inflamatoria que afecta al 10-40% de la población (33). Se caracteriza por una respuesta inmunitaria mediada por IgE tras la sensibilización previa del individuo con un alérgeno específico. Los síntomas de la RA pueden superponerse con otras formas de inflamación, incluida la rinosinusitis (34).

Actualmente se desconoce el papel de la RA en la RSCcPN. Aunque hay autores que sugieren que la presencia de alergia predispone a su desarrollo (35), revisiones sistemáticas recientes han demostrado una relación ambigua entre ambas (36). Los datos de prevalencia de RA en la RSCcPN son muy dispares entre diferentes estudios (37,38), probablemente debido a sesgos en la selección de pacientes; normalmente son incluidos en la misma cohorte diferentes subtipos de RSCcPN, algunos de los cuales están más asociados con alergia, como por ejemplo la Rinosinusitis Fúngica Alérgica o la EREA (39,40).

Es conocida la asociación entre la detección de pruebas intradérmicas (*prick-test*) positivas frente a diferentes alérgenos y la rinosinusitis. En un estudio realizado por Tan *et al* (41), se obtuvieron un mayor número de resultados positivos en las pruebas cutáneas de sensibilización en los pacientes con RSCcPN en comparación con la RSCsPN (85,5% vs 79,4%), sugiriendo una posible asociación entre la disfunción de la barrera epitelial, característica de la RSCcPN, y la mayor sensibilización del sistema inmunológico del huésped por múltiples alérgenos. Algunos estudios sugieren que los pacientes con RSC y alergia desarrollan formas más graves, con cambios inflamatorios en la tomografía computarizada (TC), peor pronóstico tras la cirugía y una menor calidad de vida (37,38,42). En la RSCcPN, la inmunoterapia y la reducción del contacto con los alérgenos son útiles para aliviar los síntomas asociados a la rinitis, pero no han demostrado que puedan revertir la enfermedad nasosinusal (43).

2.2.2. Asma

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias. Su relación con la RSCcPN ha sido respaldada por una gran variedad de estudios, demostrando numerosas similitudes (44–46). Se ha estimado que el asma afecta al 20-60% de los pacientes con RSCcPN (47,48), existiendo una fuerte asociación entre ambas en todas las edades (OR ajustado: 3,47; IC 95%: 3,20–3,76), incrementada en pacientes con RSC y rinitis alérgica (OR ajustado: 11,85; IC 95%: 10,57–13,17) (49). Además, la RSCcPN se asocia más frecuentemente con el asma grave

(57,1%-62% de los pacientes) que con el asma leve (38%-42,9% de los pacientes), lo que sugiere que la presencia de RSCcPN puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de cuadros más severos (50). Del mismo modo, pacientes con RSCcPN y asma presentan un peor control de los síntomas, mayor incidencia de rinitis alérgica e importante reducción de la calidad de vida; con recuentos absolutos de eosinófilos y niveles de IgE más altos, así como una mayor puntuación de la TC y necesidad de mayor número de cirugías (51–53).

2.2.3. Enfermedad Respiratoria Exacerbada por AINEs

La enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs es una patología inflamatoria crónica, eosinofílica, que ocurre en pacientes con asma y RSCcPN. En estos pacientes la afectación de las mucosas nasales y senos paranasales es significativamente mayor, con elevadas tasas de recurrencia de poliposis tras la cirugía (10).

La EREA se caracteriza por una reacción de hipersensibilidad a los inhibidores de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) no mediada por IgE. El patrón inflamatorio eosinofílico y las alteraciones en la ruta metabólica de degradación del ácido araquidónico, son elementos clave en relación con la expresión clínica de la EREA (2) (Figura 3). El ácido araquidónico se metaboliza mediante dos rutas diferentes: i) ruta de la 5-lipooxigenasa (5-LO), cuyos metabolitos finales son los cisteinil-leucotrienos (Cys-LTs), y ii) ruta de la ciclooxigenasa (COX), en la que se liberan principalmente prostaglandinas (PGs). Los pacientes con EREA presentan una mayor expresión de receptores para los Cys-LTs que los pacientes tolerantes, así como del enzima leucotrieno C4 sintasa (LTC4S), lo cual determina mayor producción de leucotrieno E4 (LTE4). Además, tras la exposición a AINEs, la disminución de prostaglandina E2 (PGE2) hace que desaparezca el efecto inhibidor/modulador sobre la síntesis de Cys-LTs, favoreciendo su hiperproducción (54,55). Esta desregulación al alza del proceso proinflamatorio hace inclinar la balanza a favor de una clínica caracterizada por la broncoconstricción, la producción de moco y la hipervascularización de la mucosa, dando lugar a edema, congestión nasal y rinorrea (56).

En relación con los mecanismos fisiopatológicos de la EREA, también se han descrito los siguientes:

a) Deficiencia de lipoxinas: se ha relacionado con la desregulación subyacente a favor de los mecanismos fisiopatológicos mediados por Cys-LTs (57). Las lipoxinas son moléculas antiinflamatorias endógenas derivadas del metabolismo del ácido araquidónico, que regulan negativamente la producción de citoquinas proinflamatorias, mediante la unión competitiva al

receptor de Cys-LTs (58). La disminución de la producción de lipoxinas, junto con el incremento simultáneo en la expresión de receptores de Cys-LTs, hacen que se produzca una competencia inadecuada por la unión a los receptores a favor de los Cys-LTs (59).

b) Plaquetas: han sido involucradas en el incremento de los niveles basales de la LTC₄S y de los Cys-LTs en los pacientes con EREA (60). Además, las plaquetas activadas liberan ácido araquidónico y aumentan la función de la 5-LO a través de la liberación del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (56).

c) Activación de los mastocitos: se produce como consecuencia de la liberación de mediadores tras la exposición a AINEs, como histamina, triptasa y prostaglandina D₂ (PGD₂), la cual a su vez, potencia la broncoconstricción y la inflamación del epitelio (56,61). Otras moléculas, como IFN- γ e IL-4, participan en la sobreexpresión del receptor de Cys-LTs en eosinófilos y mastocitos, y en la sobreproducción constitutiva de Cys-LTs. Además, el incremento de IFN- γ favorece la diferenciación de eosinófilos, los cuales producen numerosas citoquinas, entre las que se encuentra IL-4 (56).

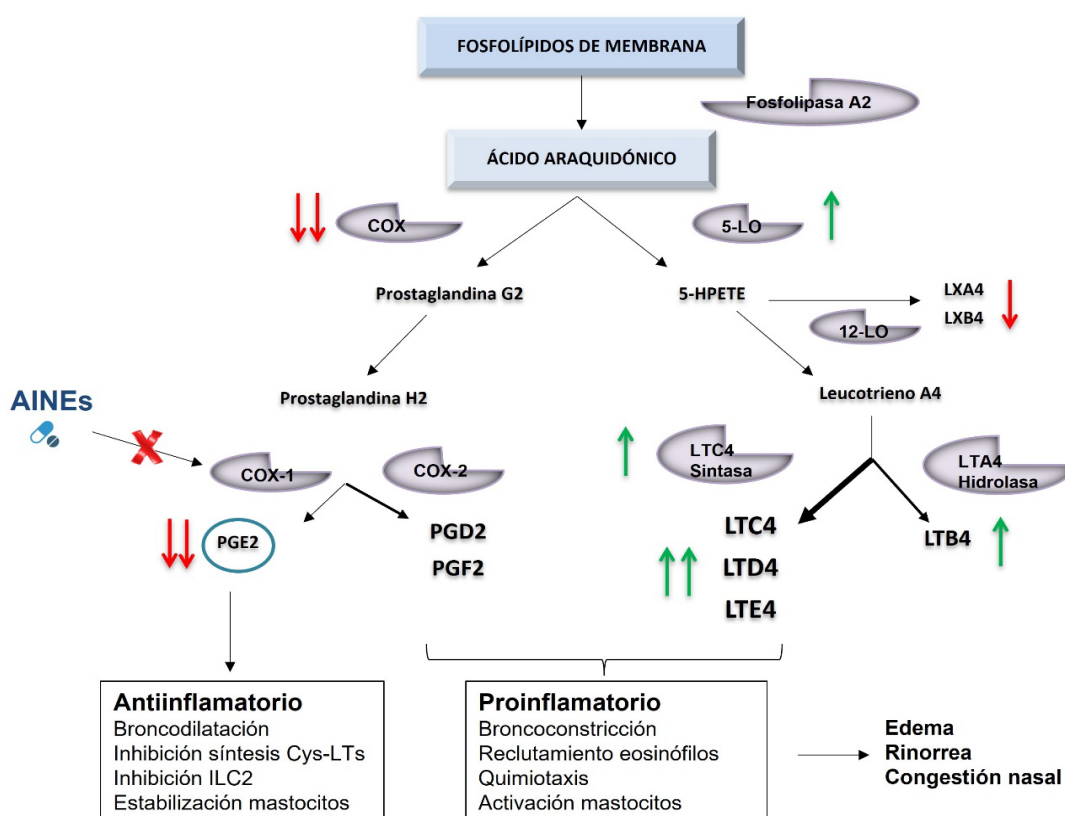


Figura 3. Ruta metabólica del ácido araquidónico y papel de los mediadores en la patogénesis de la EREA.

En la EREA se produce un desequilibrio a favor de la producción de moléculas proinflamatorias (Cys-LTs, PGD₂). La producción defectiva de mediadores antiinflamatorios (PGE₂) se incrementa tras la exposición a AINEs, como consecuencia de la inhibición de la COX-1.

d) Células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2): constituyen una población linfocitaria involucrada en las enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (62). Su contribución a la patogénesis de la EREA, donde se han relacionado directamente con la gravedad de los síntomas, podría estar asociada con su capacidad para producir citoquinas tipo 2, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, y promover la respuesta inflamatoria Th2. Este efecto mediado por ILC2 se produce en respuesta a IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP), liberadas, a su vez, por células epiteliales de las vías respiratorias en respuesta a estímulos externos (63). Además, TSLP activa los mastocitos y, en combinación con IL-33, conduce a un aumento de PGD₂ (64), contribuyendo así a la inflamación del epitelio.

2.2.4. Factores genético-hereditarios

La RSCcPN suele ocurrir en miembros de una misma familia, por lo que factores hereditarios o ambientales compartidos podrían participar en su patogénesis (65,66). Varios estudios presentan indicios de la posible relación entre RSCcPN y la presencia de factores genético-hereditarios, al encontrar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) para los genes IL1 α , TNF y AOA H (67–69), y una asociación significativa entre PN y diferentes alelos del complejo antígeno leucocitario humano (HLA), como HLA-A74, HLA-DR7-DQA1*0201, HLA-DR7-DQB1*0202 y HLA-DQA1*0201-DQB1*0201 (70–72). A pesar de estos hallazgos, no se ha encontrado ningún componente genético con una implicación directa, siendo muy probable que factores ambientales influyan también en el desarrollo de PN.

2.2.5. Factores ambientales

Uno de los factores ambientales más estudiados en el contexto de la RSC ha sido el tabaco. Aunque algunos autores han observado una relación directa entre la RSC y el hábito tabáquico activo (73), estos hallazgos no se han encontrado en otras poblaciones estudiadas (74), por lo que se desconoce su asociación con el desarrollo de la enfermedad (75).

Los compuestos tóxicos aéreos también han sido relacionados con el agravamiento de la RSC (76,77). En un estudio realizado por Kim *et al* (78), se obtuvo una fuerte asociación entre el uso de estufas de leña y el desarrollo de PN.

2.3. Mecanismos fisiopatológicos

La RSC es una entidad clínica heterogénea, de etiología desconocida y multifactorial, caracterizada por la participación de las barreras epitelial e inmunitaria en el proceso inflamatorio crónico de la mucosa nasosinusal. Tradicionalmente, en función de las características clínicas de los hallazgos endoscópicos, se ha clasificado en dos fenotipos, RSCcPN y RSCsPN, también diferenciados por la respuesta de predominio Th2 y eosinofílica, y Th1, respectivamente. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la expresión de un espectro más amplio de perfiles inmunológicos, por lo que dicha diferenciación podría no reflejar adecuadamente la diversidad fisiopatológica de los pacientes con RSC (79). Recientemente, algunos autores han sugerido realizar una diferenciación basada en *endotipos inflamatorios* de RSC, caracterizados por presentar un mecanismo patológico único con participación de moléculas o células específicas (4) (Figura 4). La existencia de diferentes endotipos o perfiles inflamatorios, podría explicar la variabilidad interindividual frente al tratamiento farmacológico en pacientes con el mismo fenotipo de RSC (80).

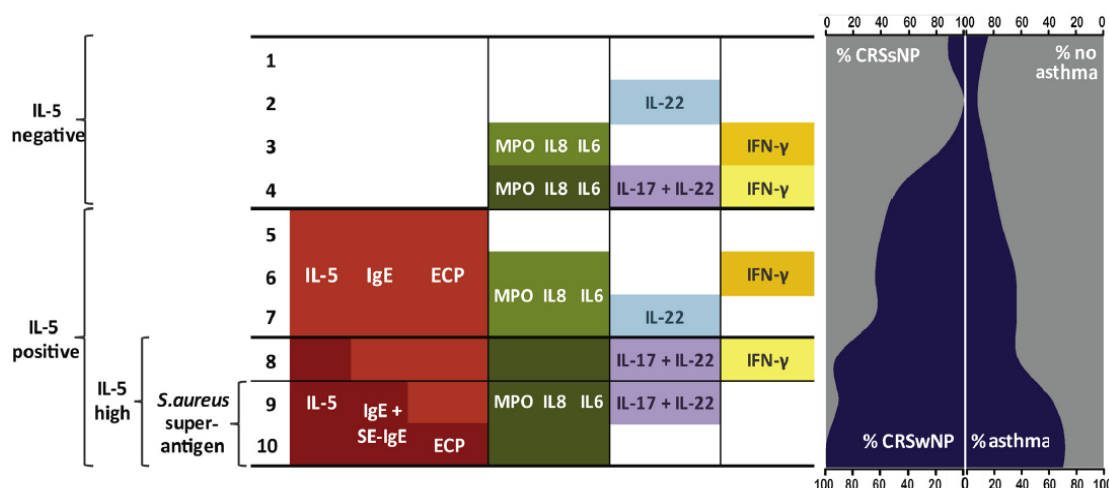


Figura 4. Endotipos inflamatorios de RSC y citoquinas predominantes en cada uno de ellos, junto con la distribución de RSCcPN y RSCsPN, y asma.

Para las citoquinas, el blanco indica que no hay un aumento de la concentración, mientras que los colores claros y oscuros muestran incrementos moderado y elevado, respectivamente. Las líneas horizontales agrupan los diferentes *clusters* en función de los niveles de IL-5 e IgE frente a enterotoxinas estafilocócicas (SE-IgE), así como la proporción de RSCcPN y asma.

Tomado de Tomassen P *et al* 2016 (4).

2.3.1. Desencadenantes inflamatorios

La inflamación eosinofílica persistente en la mucosa nasosinusal se ha considerado durante años el mecanismo fisiopatológico principal y distintivo de la RSCcPN (81). Aunque numerosos estudios han demostrado una mayor eosinofilia tisular en la RSCcPN en comparación

con la RSCsPN (82–84), también es conocida la existencia de formas no eosinofílicas o con predominio de otros tipos celulares (84–86). Estos hallazgos podrían evidenciar que los eosinófilos no son esenciales en el desarrollo de la PN. Sin embargo, cabe destacar, que el grado de eosinofilia tisular se ha relacionado con mayor gravedad de la enfermedad (87,88).

Este mecanismo mediado por eosinófilos, observado principalmente en población caucásica con RSCcPN, se asocia con una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos Th2, con producción de IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 e IL-33 (79), y con una disminución de la actividad de las células T reguladoras (Treg), con reducción de la expresión de TGF- β 1 (factor β 1 transformador del crecimiento) (79,82). La respuesta tipo 2 también es desencadenada por las ILC2 en el tejido polipoide, las cuales producen citoquinas proinflamatorias, principalmente, IL-4 y PGD2 (véase apartado 2.2.3). IL-4 e IL-13 inducen la formación de IgE, mientras que IL-5 actúa como un importante mediador en el reclutamiento y activación de los eosinófilos, favoreciendo la persistencia de los eosinófilos activados en el tejido polipoide al inhibir su apoptosis (89) (Figura 5). A su vez, los eosinófilos activados liberan mediadores inflamatorios citotóxicos y vasoactivos, como la proteína catiónica del eosinófilo (ECP), la proteína básica principal (MBP), la peroxidasa del eosinófilo (EPO) y la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), provocando una respuesta inflamatoria mantenida en la mucosa nasal (90). Eotaxina y RANTES son dos potentes citoquinas quimioatrayentes que, junto con IL-5, participan en el reclutamiento de eosinófilos. Son producidas por varios tipos celulares, entre los que se encuentran monocitos, macrófagos, células epiteliales de las vías respiratorias o células endoteliales (91). El grado de inflamación eosinofílica está fuertemente asociado con los niveles de IL-5 y ECP, siendo más elevados en la RSCcPN que en la RSCsPN, especialmente en pacientes con EREA (92). Bachert *et al* (93) demostraron que el incremento en la concentración de eotaxina en pacientes con PN se correlaciona con un aumento de ECP, sugiriendo un papel importante como quimioatrayente de eosinófilos, junto con IL-5, también significativamente elevada en el grupo de PN.

Además de los eosinófilos, se ha descrito la participación de otras células inmunitarias en la fisiopatología de la RSCcPN, entre las que se encuentran las siguientes:

a) Macrófagos: son células de la inmunidad innata que pueden diferenciarse en dos subtipos, M1 y M2, en función de la respuesta a citoquinas Th1 y Th2, respectivamente. En un estudio realizado por Krysko *et al* (94), se demostró la presencia de niveles significativamente más altos de macrófagos M2 en la mucosa nasosinusal de pacientes con RSCcPN, lo cual relacionan con la persistencia de la colonización nasal por microorganismos, especialmente *S. aureus*, debido a la disminución de la capacidad fagocítica de los macrófagos M2.

b) Mastocitos: son células con capacidad para inducir, aumentar y mantener la inflamación eosinofílica. Las PGs derivadas de mastocitos, fundamentalmente PGD₂, se han implicado en el reclutamiento y activación de linfocitos Th2 (95).

c) Inmunoglobulinas: en el tejido polipoide de pacientes con RSCcPN se han obtenido niveles más altos de linfocitos B, células plasmáticas e Igs, en particular IgA, IgE e IgG, en comparación con RSCsPN y pacientes sanos, posiblemente en respuesta a antígenos bacterianos y fúngicos (93,96,97). Van Zele *et al* (96) han demostrado que en los pacientes con RSCcPN, la hiperproducción local de Igs no se correlaciona con los niveles obtenidos en suero, sugiriendo que dicho incremento podría ser debido a la colonización microbiana persistente de la mucosa nasal. El aumento significativo de IgE total en la PN, ha sido correlacionado con la síntesis policlonal de IgE específica frente a enterotoxinas estafilocócicas (SE-IgE), así como al incremento de ECP tisular y al asma comórbida (93,98).

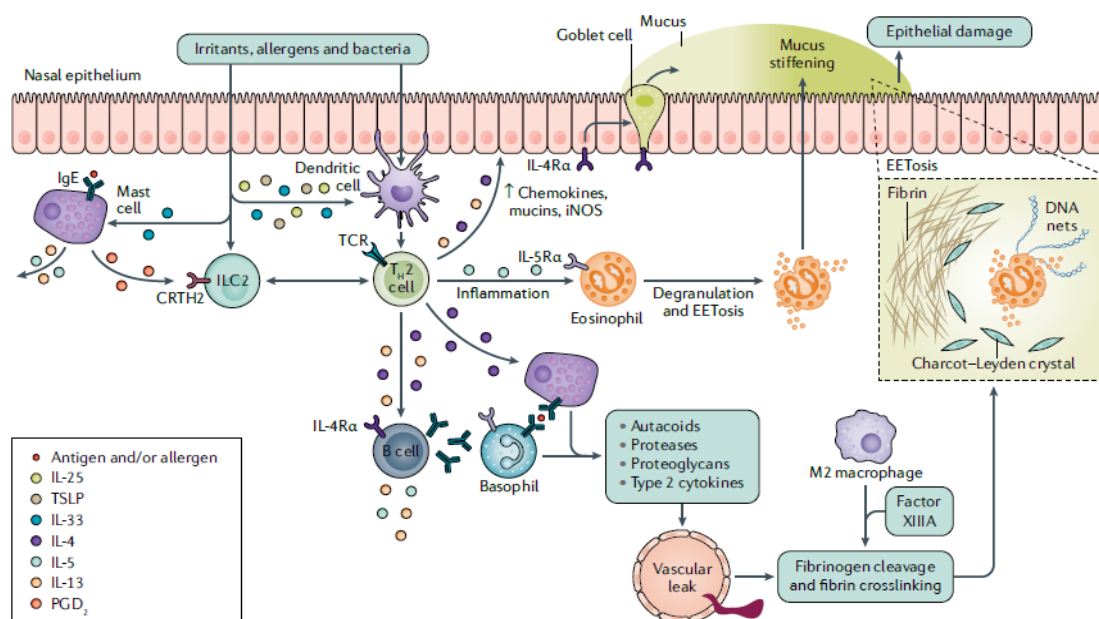


Figura 5. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la RSCcPN.

Los alérgenos, microorganismos u otras moléculas inducen la liberación de **IL-25, TSLP e IL-33** por las **células epiteliales nasales**. Estas citoquinas activan las células dendríticas, las cuales promueven la activación de las **células Th2 e ILC2**. Ambas producen citoquinas proinflamatorias, como **IL-4, IL-5 e IL-13**. IL-5 activa los **eosinófilos**, e IL-13 e IL-4 conducen a la síntesis de IgE por las células B, a la activación de los macrófagos y a la producción de quimiocinas, mucinas y óxido nítrico sintasa inducible por las células epiteliales. La IgE se une a mastocitos y basófilos, los cuales pueden liberar una gran cantidad de moléculas, entre ellas, **PGD₂**, que provoca un mayor reclutamiento de ILC2 y células Th2. Esta respuesta desmesurada, junto con moléculas liberadas por mastocitos y basófilos, provocan una fuga vascular y la extravasación de plasma. La secreción del factor XIIIa por **macrófagos M2** provoca la formación de **redes de fibrina entrecruzadas**. También es característico la desgranulación y formación de **trampas extracelulares de eosinófilos** y la presencia de ADN extracelular y **cristales de Charcot-Leiden**, así como la producción de una mucosidad alterada y espesa, por parte de las células caliciformes.

Tomado de Bachert C *et al* 2020 (1).

2.3.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un marcador importante en muchas enfermedades de las vías respiratorias, como por ejemplo, en la discinesia ciliar primaria, donde los niveles de ON nasal (ONn) se encuentran reducidos notablemente (99). Numerosos autores han reportado niveles de ONn más bajos en RSC con y sin PN en comparación con individuos sanos, obteniendo también una relación inversa entre estos niveles y el *score* de la TC (100–102). Sin embargo, el papel del ON en la fisiopatología de la RSC es todavía desconocido, sin evidencias científicas claras.

2.3.3. Remodelado tisular y disfunción del epitelio nasosinusal

El remodelado tisular hace referencia a una modificación de la composición y organización estructural de los tejidos, generalmente debido a un estímulo de estrés, como puede ser la inflamación crónica. Patrones característicos de remodelado tisular han sido estudiados en diversas enfermedades inflamatorias crónicas, como fibrosis quística (FQ), asma, RA y RSC (103,104).

Estructuralmente, la mucosa nasal consiste en una capa epitelial de células cilíndricas ciliadas y pseudoestratificadas, unidas por uniones estrechas e intercaladas con células caliciformes. Debajo del epitelio residen linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, vasos sanguíneos y glándulas (Figura 6). La motilidad ciliar y la integridad estructural del epitelio sirven como factores mecánicos que limitan la estimulación antigénica.

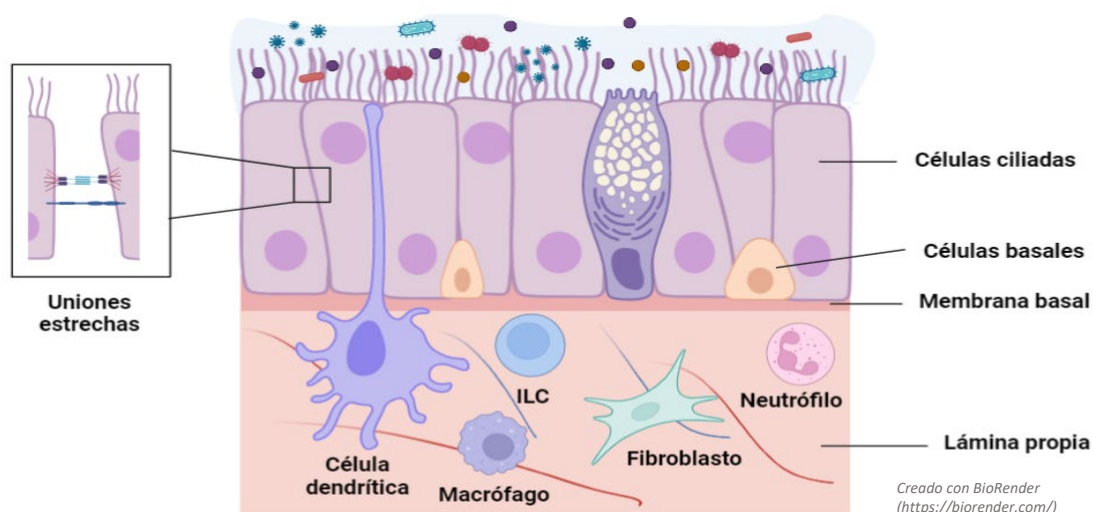


Figura 6. Estructura del epitelio nasosinusal en ausencia de patología.

En cuanto a los patrones de remodelado tisular descritos en la RSCcPN, destacan los siguientes hallazgos:

- Cambios histopatológicos compatibles con fibrosis, lesiones del epitelio, engrosamiento de la membrana basal, hiperplasia y desprendimiento de células caliciformes, edema subepitelial e infiltración de células inflamatorias. Estas modificaciones están estrechamente relacionadas con las observadas en el asma, pudiendo existir mecanismos patogénicos o una predisposición genética comunes (104).

- Cambios en la matriz extracelular (MEC) de la lámina propia con predominio de áreas de edema en la RSCcPN y, por el contrario, mayor grado de fibrosis en la RSCsPN (104). Aunque se desconoce con exactitud el mecanismo que condiciona este patrón de remodelado diferencial, se ha sugerido que podría estar mediado por TGF- β , citoquina fibrogénica que modula el depósito y la síntesis de MEC. Los niveles bajos de TGF- β (típicos de la RSCcPN) se asocian con una disminución de la capacidad de reparación tisular y menor producción de colágeno, con la consiguiente formación de edema. Los niveles altos de TGF- β (típicos de la RSCsPN), dan lugar a un engrosamiento de la membrana basal, exceso de la deposición de colágeno y fibrosis (104,105).

- Alteración en el patrón de expresión de mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular que confieren viscosidad y elasticidad al moco) con aumento de MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC y MUC5B (106–108). Como consecuencia de dicha alteración, se produce un cambio en las características viscoelásticas del moco, con mayor secreción y viscosidad, lo cual dificulta el aclaramiento mucociliar. Debido a la acumulación de sustancias nocivas, la mucosa se inflama y se producen cambios tisulares que tienden a la cronicidad. La hiperviscosidad mucosa se ha asociado con cuadros más graves de RSC (109).

- Disminución de la producción de proteínas desmosómicas o de unión estrecha (110), las cuales forman parte del complejo de adhesión intercelular apical, que mantiene unidas las células epiteliales y la integridad de la barrera epitelial. En relación con la disfunción de la barrera epitelial, modelos celulares *in vitro* han demostrado una mayor tasa de permeabilidad iónica en la RSCcPN, lo cual podría favorecer el edema tisular y el desarrollo de poliposis (111).

2.3.4. Alteraciones de la inmunidad innata

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a cualquier agente extraño, siendo sus principales componentes la barrera epitelial, los péptidos antimicrobianos

humanos, las citoquinas, los receptores de reconocimiento de patógenos, las células fagocíticas y NK (*natural killer*), y la vía alternativa del complemento.

Las células epiteliales juegan un papel central en la respuesta inmunitaria innata. Contienen receptores de reconocimiento de patrones citoplasmáticos (PRRs), siendo los más destacados los receptores tipo Toll (*toll-like receptors*; TLR), que son proteínas transmembrana capaces de interactuar con estructuras moleculares conservadas presentes en los microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Como consecuencia de la interacción, se produce la activación de la respuesta inmunitaria innata en el epitelio, liberándose quimiocinas y citoquinas que atraen neutrófilos y macrófagos (112,113).

En relación con la RSC, uno de los mecanismos fisiopatológicos propuestos más recientemente es la existencia de un déficit en la inmunidad innata, que podría favorecer la colonización microbiana y el desarrollo de una respuesta inmune alterada (114,115). Por otro lado, Ramanathan *et al* (114) sugieren que la expresión de genes de inmunidad innata por parte de las células epiteliales nasosinusales podría estar modulada por citoquinas Th2, en particular IL-4. Dado que la RSCcPN se caracteriza por una respuesta Th2, una regulación negativa de la inmunidad innata podría favorecer la creación de un entorno permisivo para la colonización microbiana persistente de la mucosa nasosinusal.

2.3.5. Colonización por microorganismos

La microbiota nasal es compleja, formada por múltiples especies bacterianas, con una mayor predominancia de miembros pertenecientes al Phylum Actinobacteria (por ejemplo, *Corynebacterium* spp.) y al Phylum Firmicutes (por ejemplo, *Staphylococcus* spp.) (116). Se ha observado una relación antagónica entre ambos géneros bacterianos, así como una competencia entre *S. epidermidis* y *S. aureus* por la persistencia en la cavidad nasal (117,118).

En pacientes con RSCcPN, *S. aureus* ha sido el microorganismo aislado con mayor frecuencia, seguido de estafilococos coagulasa-negativos (ECN). También se aíslan con asiduidad *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, bacterias anaerobias y hongos (119,120).

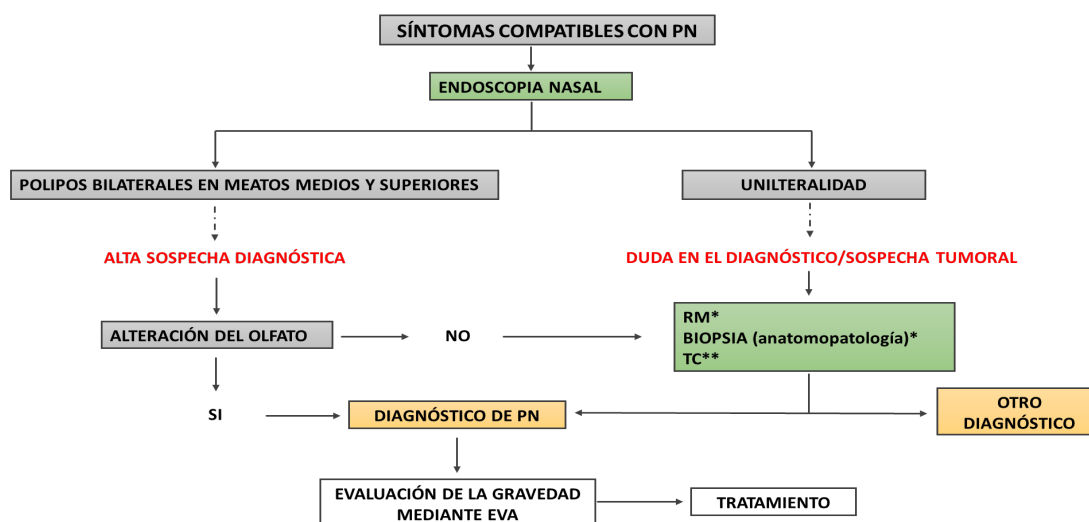
Actualmente se desconoce el papel que juegan los microorganismos en la etiopatogenia de la RSCcPN, pudiendo actuar como moduladores de la respuesta inmunológica al interactuar con el huésped a través de la respuesta inmunitaria innata. En los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas de metagenómica ha dado lugar a un incremento del interés científico acerca

de la participación del microbioma en la patogenia de dicha enfermedad. En este contexto, las investigaciones más recientes se han centrado en la presencia de bacterias intracelulares, biofilms bacterianos, disbiosis de microbiomas y superantígenos (SAGs) (120,121).

S. aureus ha sido el microorganismo más ampliamente estudiado en relación con la RSC, probablemente debido a las altas tasas de colonización nasal de los pacientes, y al elevado número e importancia de los factores de virulencia que posee.

2.4. Diagnóstico

En la mayoría de los casos, la sospecha inicial de PN se establece en base a la historia clínica del paciente y a la exploración endoscópica nasal, siendo necesaria la realización de pruebas de imagen como parte del diagnóstico diferencial, durante el transcurso de la enfermedad y siempre antes de la cirugía (Figura 7). El cuadro clínico, con una duración igual o superior a 12 semanas, se caracteriza por la inflamación de los senos paranasales, siempre acompañada de obstrucción/bloqueo/congestión nasal o rinorrea anterior/posterior. Otros síntomas como dolor facial, presión facial y/o reducción o pérdida del olfato, suelen estar presentes. Con menor frecuencia se han reportado otros, como presión o dolor ótico, halitosis, dolor dental, irritación faríngea, laríngea y traqueal, dolor de garganta, diafonía o alteraciones del sueño (122).



* Diagnóstico diferencial de tumores de fosas y senos paranasales.

** Estudio de extensión y previo a cirugía.

Figura 7. Algoritmo diagnóstico propuesto por las Sociedades Españolas de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC) y de Otorrinolaringología (SEORL) en el Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal.

Tomado del Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal (6).

La exploración endoscópica nasal permite evidenciar la presencia de pólipos nasales y la toma de muestras biópsicas, con el objetivo de determinar alteraciones histopatológicas compatibles con inflamación crónica, las cuales constituyen aspectos esenciales de la enfermedad. Además, permite la correcta visualización y detección de los pólipos nasales, permitiendo evaluar su tamaño y extensión, empleando para ello la escala propuesta por Lildholdt y cols (123) (Tabla 2).

El estudio de imagen mediante TC es el de preferencia (122). Permite valorar la extensión de la enfermedad a nivel de fosas y senos paranasales, por lo que su valor es indiscutible en la valoración preoperatoria. Para evaluar la TC de fosas y senos paranasales se emplea el sistema de puntuación descrito por Lund y Mackay (124), el cual ha sido validado y establecido como estándar por la Academia Americana de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (125) (Tabla 3).

Tabla 2. Clasificación endoscópica de la poliposis nasal propuesta por Lildholdt y cols.

GRADO POLIPOSIS	OBSERVACIONES ENDOSCÓPICAS
0	Ausencia de pólipos
1	Pólipos de pequeño tamaño que no sobrepasan el cornete medio
2	Pólipos que están entre el borde craneal y caudal del cornete inferior
3	Pólipos que rebasan el borde inferior del cornete inferior

Tabla 3. Clasificación de Lund y Mackay para la valoración de la TC en la poliposis nasal.

Seno afectado	Izquierda	Derecha
Maxilar*	0-1-2	0-1-2
Etmoides anterior*	0-1-2	0-1-2
Etmoides posterior*	0-1-2	0-1-2
Esfenoides*	0-1-2	0-1-2
Frontal*	0-1-2	0-1-2
Complejo osteomeatal**	0 o 2	0 o 2
Total	De 0 a 12	De 0 a 12

* Sin ocupación = 0; ocupación parcial = 1; ocupación completa = 2. **libre = 0; ocupado = 2

Tomado del Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal (6)

El diagnóstico de **EREA** se realiza en pacientes con antecedentes de haber sufrido una reacción respiratoria de las vías superiores o inferiores, tras la ingestión de ácido acetil salicílico (AAS) u otro AINE (126). La existencia de patologías crónicas con afectación de las vías respiratorias, como RSCcPN o asma, incrementan la sospecha clínica y la probabilidad de EREA (127). Para el diagnóstico definitivo pueden realizarse pruebas de provocación controladas con AAS por vía oral (*gold standard*), bronquial, nasal o intravenosa (128). En la Figura 8 se describe el algoritmo diagnóstico de EREA.

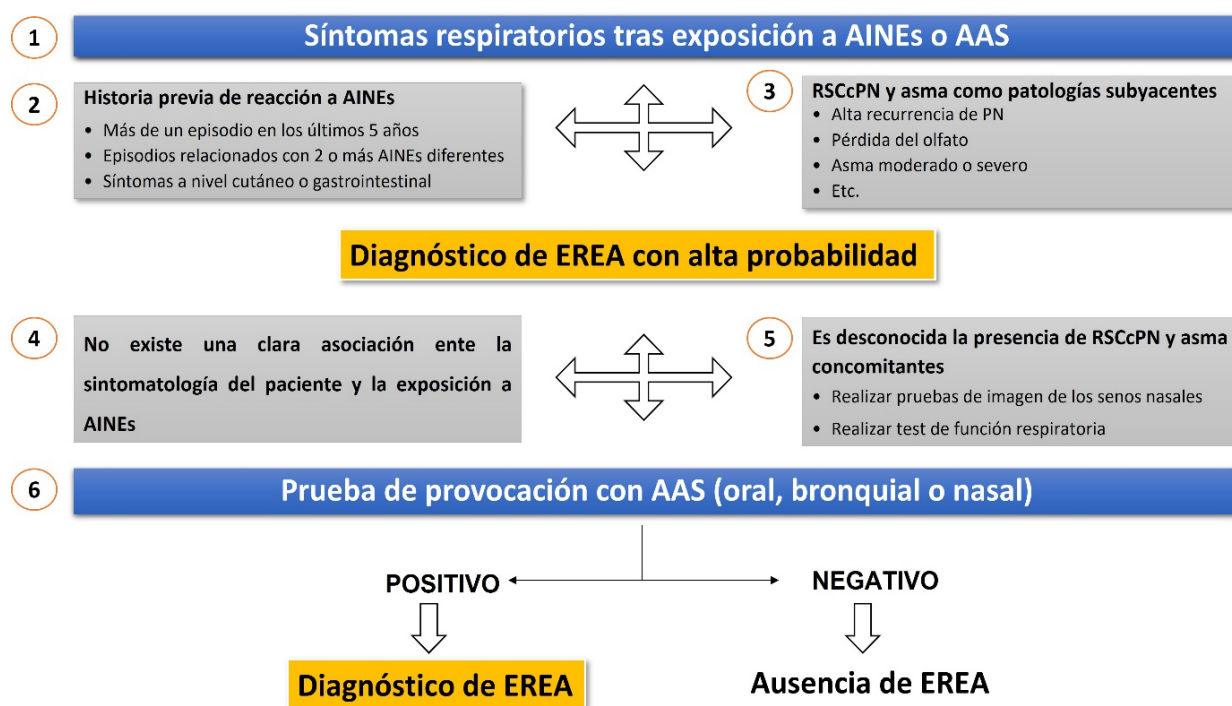


Figura 8. Algoritmo diagnóstico de EREA.

Modificado de Kowalski ML *et al* 2019 (2)

2.5. Tratamiento

Actualmente no existe ningún tratamiento médico-quirúrgico que logre una curación completa y definitiva de la RSCcPN. La reducción de los síntomas, y la disminución y prevención de las recurrencias de poliposis, son los principales objetivos del tratamiento. Dentro del arsenal terapéutico disponible, los corticoides intranasales (CSIN) y sistémicos constituyen el tratamiento farmacológico de elección. Otras alternativas, como antibióticos, antileucotrienos o anticuerpos monoclonales, también han sido utilizadas. Sin embargo, no han demostrado una eficacia superior a los corticoides para el control de los síntomas, la disminución de las

recurrencias o la progresión de la poliposis. El tratamiento quirúrgico mediante cirugía endoscópica nasosinusal (CENS) se suele reservar para casos refractarios a la terapia farmacológica con persistencia de la sintomatología (129). El algoritmo de tratamiento se muestra en la Figura 9.

2.5.1. Corticoides

Debido a su potente efecto antiinflamatorio, los corticoides son la opción terapéutica más efectiva para el tratamiento de la RSCcPN. Numerosos estudios han demostrado la eficacia de los CSIN para el control de los síntomas, así como para la reducción del tamaño de los pólipos y las recurrencias tras la cirugía (130,131). Actualmente constituyen el tratamiento de elección en la PN leve, empleándose también como terapia de mantenimiento junto a otros tratamientos en el resto de los estadios clínicos. La administración de una pauta corta de corticoides orales (CSO) está indicada para el tratamiento de la RSCcPN moderada a severa, o cuando no se observa una mejoría clínica con el tratamiento de primera línea (Figura 9). Estudios aleatorizados en los que se compara el uso de CSO (pauta corta) vs placebo en RSCcPN, han demostrado un mayor beneficio a corto plazo con el uso de CSO, además de una mayor reducción del tamaño de los pólipos y mejora de los síntomas nasales (132,133). La efectividad del tratamiento aumenta cuando la terapia inicial con CSO se combina con una terapia de mantenimiento más prolongada con CSIN, principalmente en el control de la hiposmia, la congestión nasal y el tamaño de los pólipos (132). Tratamientos únicos con CSO a largo plazo así como su administración a dosis altas, no han demostrado resultados terapéuticos óptimos adicionales y se relacionan con mayor incidencia de reacciones adversas (134).

2.5.2. Antibióticos

La evidencia científica sobre el uso de los antibióticos en la RSCcPN es escasa, por lo que se recomiendan ante sospechas de infecciones bacterianas agudas o de repetición (Figura 9). Entre los antibióticos más estudiados en este ámbito, destacan aquellos con potencial efecto antiinflamatorio, debido a la hipótesis de que los SAGs bacterianos pueden modular la respuesta inflamatoria eosinofílica Th2 propia de la RSCcPN (96). Van Zele *et al* (133), en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, demostraron que el uso de doxiciclina durante 20 días (200 mg día 1; 100 mg/día el resto del período) reduce significativamente el tamaño de los pólipos tras 4 semanas, logrando un efecto similar al observado con

metilprednisolona oral, pero más sostenido en el tiempo. En otro estudio, Varvyanskaya *et al* (135) evaluaron el uso prolongado de claritromicina (250 mg/día) en pacientes con RSCcPN sometidos a cirugía, obteniendo menores tasas de recurrencia temprana de poliposis en comparación con placebo.

	PN LEVE (EVA ¹ ≤ 3)	PN MODERADA (EVA ¹ 3-7)		PN GRAVE (EVA ¹ > 7)		
1	CORTICOIDES INTRANASALES (dosis ficha técnica) ± Lavados nasales	CORTICOIDES ORALES ² (pauta corta) + CORTICOIDES INTRANASALES (dosis doble ficha técnica) + lavados nasales				
REVISIÓN ³						
	MEJORÍA ⁴	NO MEJORÍA ⁴	MEJORÍA ⁴	NO MEJORÍA ⁴	MEJORÍA ⁴	NO MEJORÍA ⁴
2	Mantener tratamiento de forma prolongada Ajustar dosis según síntomas, principalmente grado de hiposmia ⁵	Tratar como PN moderada o grave	CORTICOIDES INTRANASALES dosis doble ficha técnica pauta prolongada. Ajustar dosis según síntomas, principalmente grado de hiposmia ⁵	CORTICOIDES INTRANASALES dosis doble ficha técnica, pauta prolongada + ANTILEUCOTRIENO (asma y/o intolerancia a AINES) + ANTIMICROBIANO (MACRÓLIDOS, DOXICICLINA) (rinorrea mucopurulenta o infecciones de repetición) + Lavados nasales	CENS + CORTICOIDES INTRANASALES (doble dosis) + Lavados nasales	
REVISIÓN ³						
			MEJORÍA ⁴	NO MEJORÍA ⁴		
			CORTICOIDES INTRANASALES dosis doble ficha técnica pauta prolongada	CENS + CORTICOIDES INTRANASALES (doble dosis)		

- Intolerancia a AINES: evitar proponer fármacos alternativos y plantear la desensibilización a AAS.
- Alergia: tratar de forma específica.
- Evaluar y tratar patología de la vía respiratoria inferior: asma, EPOC o bronquiectasias.

Figura 9. Algoritmo de tratamiento de la RSCcPN propuesto en el Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal (SEAIC-SEORL).

Modificado del Documento de Consenso sobre Poliposis Nasal (6).

- ¹ Se recomienda un enfoque escalonado basado en la gravedad de la enfermedad, cuya valoración se realiza con la escala visual analógica (EVA), siguiendo el criterio de la guía EPOS (7).
- ² 0'5-1 mg/kg/día prednisona o equivalente durante 7 a 14 días. No es necesario reducir progresivamente la dosis si es menor a 50 mg diarios de prednisona o equivalente.
- ³ Inicialmente (paso 1) se recomienda realizar la revisión al mes de tratamiento. Posteriormente (paso 2) a los 3 (moderada o grave) o a los 6 meses (leve o controlada).
- ⁴ Definimos como mejoría (control o buena respuesta al tratamiento) el descenso en un escalón de gravedad en PN moderada o grave o la reducción en la puntuación de la EVA en la PN leve.
- ⁵ El grado de hiposmia puede medirse de forma subjetiva, con EVA o mediante olfatometría; correlaciona bien con la gravedad de la PN, es el síntoma más específico de PN y puede ayudar a controlar la enfermedad, indicando al paciente que aumente o disminuya la dosis de corticoide intranasal en función del empeoramiento o mejoría.

2.5.3. Antileucotrienos

En los últimos años, los inhibidores de Cys-LTs, como montelukast o zafirlukast (antagonistas competitivos del receptor CysLT1), y zileuton (inhibidor selectivo de la 5-LO), se han empleado como tratamiento adyuvante en el asma y la RA (136). La evidencia en cuanto al

uso de estos fármacos en la RSCcPN es muy limitada, por lo que se emplean en combinación con CSIN en casos moderados-graves con coexistencia de asma o EREA (Figura 9). La escasez de estudios no permite evidenciar que la efectividad sea mayor en pacientes con EREA que en pacientes con RSCcPN tolerantes a AINEs (137).

Diferentes estudios han demostrado la eficacia de montelukast en combinación con corticoides tópicos y/u orales para el tratamiento de la RSCcPN. Así, en los pacientes tratados con montelukast, se ha reportado una mejora significativa de los síntomas y de la función nasal, así como una reducción de los niveles de mediadores inflamatorios a nivel local (138).

2.5.4. Tratamiento quirúrgico

La indicación de CENS se reserva para los casos graves, en los que no es posible un adecuado control de la RSCcPN con el tratamiento farmacológico (Figura 9). Su aplicación ha demostrado una mejora significativa de los síntomas nasosinusales y la calidad de vida de los pacientes (139). Sin embargo, y a pesar de recibir un tratamiento médico correcto tras la cirugía, las recurrencias de poliposis son frecuentes, especialmente en pacientes con EREA (140).

2.5.5. Anticuerpos monoclonales

En los últimos años, ha habido un interés creciente en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la RSCcPN. La falta de respuesta de algunos pacientes a las terapias disponibles (CSIN y tandas de CSO), junto con la preocupación por las reacciones adversas de los CSO, y las altas tasas de recurrencia tras la cirugía, hacen necesario la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. En este sentido, las terapias biológicas dirigidas frente a mediadores inflamatorios involucrados en la patogénesis de la RSCcPN, constituyen un importante campo de estudio en la actualidad, motivado por el éxito de estos fármacos en otras afecciones de similares características como el asma y la DA (141,142).

Los principales anticuerpos monoclonales (AcMo) evaluados para el tratamiento de la RSCcPN se describen en la Tabla 4. Dupilumab (primer AcMo aprobado para la RSCcPN), omalizumab y mepolizumab están indicados para el tratamiento de la RSCcPN grave en pacientes adultos, con fracaso y/o intolerancia a corticoides intranasales y orales, y recurrencia de poliposis tras la cirugía.

Tabla 4. Principales anticuerpos monoclonales evaluados para el tratamiento de la RSCcPN.

AcMo (Referencia)/Año	Diana terapéutica	Efectos terapéuticos	Fase de estudio
Dupilumab (143)/2019	IL-4Rα (IL-4 e IL-13)	Reducción del tamaño de los pólipos y la congestión nasal. Mejora de los síntomas, <i>score</i> TC, CdV, uso de corticoides sistémicos y menor necesidad de cirugía.	Ensayos clínicos fase III (LIBERTY NP SINUS-24; LIBERTY NP SINUS-52) Aprobado FDA, EMA y AEMPS (Dupixent®)
Omalizumab (144)/2020	IgE	Reducción del tamaño de los pólipos nasales. Mejora de los síntomas, <i>score</i> TC y CdV.	Ensayos clínicos fase III (POLYP 1 y POLYP 2) Aprobado FDA, EMA y AEMPS (Xolair®)
Mepolizumab (145)/2021	IL-5	Reducción del tamaño de los pólipos y la obstrucción nasal. Reducción de síntomas secundarios, del tiempo hasta la cirugía y mejora de la CdV.	Ensayo clínico fase III (SYNAPSE) Aprobado FDA, EMA, AEMPS (Nucala®)
Reslizumab (146)/2006	IL-5	Reducción del tamaño de los pólipos. Reducción del recuento de eosinófilos en sangre periférica y niveles séricos de la ECP. Ausencia de mejoría significativa de los síntomas.	Ensayo clínico fase II Sin desarrollo adicional
Benralizumab (147)/2021	IL-5Rα	Reducción del tamaño de los pólipos y la congestión nasal.	Ensayo clínico fase III (OSTRO) Necesidad de estudios posteriores.

TC, tomografía computarizada; CdV, calidad de vida; ECP, Proteína Catiónica del Eosinófilo.

3. *Staphylococcus aureus*. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

3.1. Descripción del género y características generales

S. aureus fue descrito por primera vez en 1880 por el médico escocés Alexander Ogston (1844-1929), quien demostró la presencia y asociación clínica de bacterias de morfología cocoide, en el material purulento de un absceso quirúrgico. Inicialmente dichas bacterias se denominaron '*micrococci*' y, en 1882, pasaron a denominarse *Staphylococci*, nombre que deriva de las palabras griegas "*staphyle*" ("racimo de uvas") y "*kokkus*" ("baya, grano"): "las masas parecían racimos de uvas" (148). En 1884, el médico alemán Friedrich Julius Rosenbach (1842-1923) diferenció las bacterias por el color de sus colonias: *S. aureus* (del latín *aurum*, oro) y *S. albus* (del latín, blanco), el cual pasó a denominarse *S. epidermidis* debido a su ubicuidad como parte de la microbiota de la piel.

Desde 2010, el género *Staphylococcus*, perteneciente al Phylum *Firmicutes*, se ha incluido en la familia *Staphylococcaceae*, dentro del orden Bacillales. Dentro del género *Staphylococcus* se incluyen 44 especies y 21 subespecies diferentes, siendo *S. aureus* la especie más destacada como causa de patología en el ser humano.

Los miembros del género *Staphylococcus*, son cocos gram positivos de 0,5-1,5 μm de diámetro, que se disponen en forma de tétradas o racimos irregulares (Figura 10). Son bacterias ubicuas y poco exigentes en cuanto a los requerimientos nutricionales, siendo capaces de crecer en diversas condiciones ambientales. Sin embargo, el crecimiento se ve favorecido a temperaturas entre 30-37°C y pH próximo a la neutralidad. Son resistentes a la desecación y a los desinfectantes químicos, y toleran concentraciones de NaCl de hasta el 12%. Son microorganismos no móviles, no capsulados y aerobios o anaerobios facultativos, excepto *S. saccharolyticus* y *S. aureus* subespecie *anaerobious*, que son anaerobios estrictos.

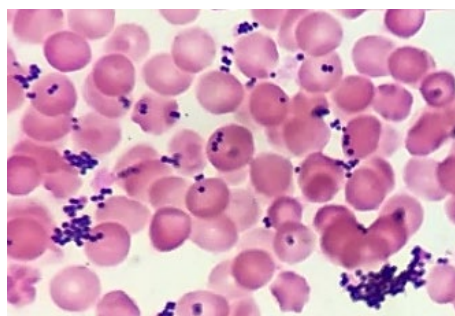


Figura 10. Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus* en una muestra de hemocultivo.

S. aureus, tras 18-24 horas de incubación en agar sangre, crece formando colonias de consistencia cremosa, caracterizadas por la producción de un pigmento amarillo-dorado y la formación de un halo de beta-hemólisis (Figura 11). Crece en los medios de cultivo habituales, siendo los más frecuentemente empleados los enriquecidos con sangre y el agar sal manitol. Una excepción son las variantes de colonia pequeña ("*small colony variants*"), las cuales destacan por su lento crecimiento, alteración en la morfología de las colonias (puntiforme, reducción de la pigmentación y/o ausencia de beta-hemólisis), reducida actividad coagulasa, utilización del manitol y necesidad de CO_2 o ciertos sustratos para su crecimiento. Estas cepas pueden revertir al fenotipo normal cuando se incuban en una atmósfera enriquecida en CO_2 o tras sucesivos subcultivos (149). Desde un punto de vista bioquímico, destacan la producción de catalasa y coagulasa, la capacidad para fermentar el manitol y la trehalosa, y la producción de una desoxirribonucleasa termoestable. La catalasa, enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, permite diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) del género *Streptococcus* (catalasa negativo), mientras que la coagulasa, se utiliza para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) del resto de especies del género, englobándose todas ellas con el término estafilococos coagulasa-negativos.

S. aureus, además de colonizar la piel y las mucosas, especialmente la región anterior de las fosas nasales, es capaz de producir diferentes enfermedades en el ser humano, dando lugar a una gran variedad de procesos infecciosos, como neumonía, empiema, infecciones de piel y partes blandas, bacteriemia, endocarditis, artritis séptica, etc. Algunas de estas infecciones son potencialmente graves, asociándose con altas tasas de morbilidad y mortalidad (150). Su adquisición puede ser comunitaria o nosocomial, en cuyo caso se asocia con cepas bacterianas más resistentes a los antimicrobianos. En este sentido, la resistencia a meticilina ha adquirido una gran importancia tanto a nivel clínico como epidemiológico, clasificándose las cepas en dos grupos: *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).



Figura 11. Colonias de *Staphylococcus aureus* en una placa de agar sangre.

3.2. Patogenia de las infecciones por *S. aureus*. Determinantes de virulencia

S. aureus es un patógeno oportunista capaz de causar gran variedad de infecciones. Su infectividad y versatilidad radican en su habilidad para evadir el sistema inmune del hospedador y sintetizar una amplia gama de factores de virulencia, que incluyen toxinas, moléculas de superficie y enzimas relacionadas con el daño y destrucción tisular (Tabla 5). De este modo, la severidad del cuadro clínico será el resultado de una interacción compleja entre el sistema inmune del hospedador y los factores de virulencia de la cepa bacteriana.

La expresión de los factores de virulencia está regulada tanto por genes cromosómicos como integrados en elementos genéticos móviles (plásmidos o profagos), pudiendo transmitirse entre las cepas por transferencia horizontal de genes (151). El sistema de regulación génica asociado a la producción de factores de virulencia más conocido en *S. aureus* es el **operón *agr* (accessory gene regulator)**, el cual actúa mediante un mecanismo de detección de *quórum sensing* o densidad bacteriana (152) (Figura 12).

Tabla 5. Factores de virulencia de *S. aureus*.

	FACTOR DE VIRULENCIA	EFFECTO BIOLÓGICO
COMPONENTES ESTRUCTURALES	POLISACÁRIDO CAPSULAR	Inhibe la fagocitosis
	POLISACÁRIDO EXTRACELULAR (BIOFILM)	Facilita la adherencia a los cuerpos extraños Inhibe la fagocitosis
	PARED CELULAR	
	Peptidoglicano	Aporta estabilidad osmótica Estimula la producción de pirógeno endógeno Favorece la agregación de leucocitos polimorfonucleares (formación de abscesos) Inhibe la fagocitosis Estimula la activación del complemento Estimula la liberación de IL-1 por los macrófagos
	Ácidos teicoicos	Estimulan una respuesta humoral específica Favorecen la colonización bacteriana
TOXINAS	CITOTOXINAS (α , β , δ , γ , LPV)	Toxicidad celular (leucocitos, eritrocitos, fibroblastos, macrófagos y plaquetas)
	TOXINAS EXFOLIATIVAS (ETA, ETB)	Rompen los puentes intercelulares del estrato granuloso de la epidermis
	ENTEROTOXINAS (A-R)	Superantígenos Estimulan la liberación de mediadores de la inflamación por los mastocitos
	TSST-1	Superantígeno Destrucción de células endoteliales
ENZIMAS	COAGULASA	Convierte el fibrinógeno en fibrina
	HIALURONIDASA	Hidroliza el ácido hialurónico de los tejidos
	FIBRINOLISINA	Disuelve los coágulos de fibrina
	LIPASAS	Hidrolizan los lípidos
	NUCLEASAS	Hidrolizan el ADN

3.2.1. Componentes estructurales

a) **Polisacárido capsular:** es la capa más externa que recubre la pared celular. Se han identificado 11 serotipos capsulares de *S. aureus*, siendo el 5 y el 8 los responsables de la mayor parte de las infecciones en humanos (153). Su papel en la patogénesis se relaciona con la evasión del sistema inmune al aumentar la resistencia de las bacterias a la fagocitosis (154).

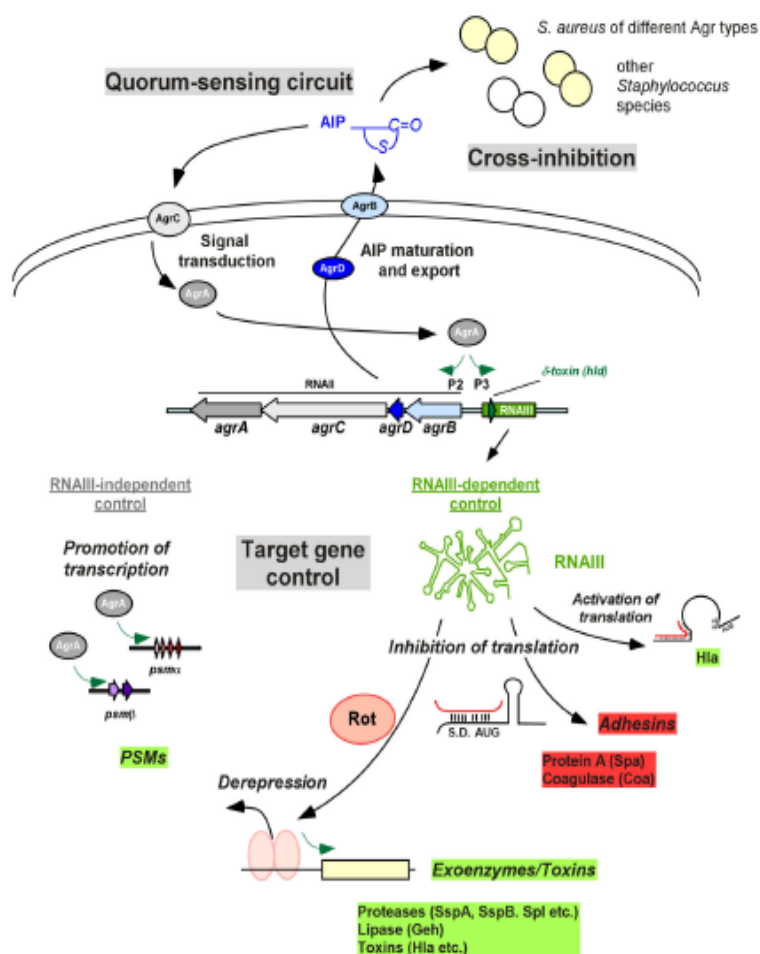


Figura 12. Sistema de regulación génica operón *agr*.

El mecanismo de detección de quórum se muestra en la parte superior. AIP activa el sistema de dos componentes, AgrC-AgrA, y AgrA fosforilado activa la transcripción del promotor P2, lo que da como resultado una regulación de retroalimentación. La inhibición de la actividad del *agr* se produce en presencia de cepas pertenecientes a otras especies (arriba a la derecha), característica denominada especificidad de grupo. El control de los genes diana se realiza a través de RNAIII (parte inferior), cuya transcripción aumenta por AgrA, a través del promotor P3. RNAIII también contiene el gen de la delta-toxina (*hld*). RNAIII puede inhibir la traducción de genes mediante el apareamiento de bases con 5' UTR. Esto se utiliza para la inhibición directa de genes diana inhibidos por Agr, como el de la proteína A, mientras que la inhibición de la traducción del represor Rot, conduce a la desrepresión de la transcripción de muchas de las toxinas diana de Agr clásicas, como la alfa-toxina. AgrA también aumenta la transcripción de los operones *psmA* y *psmB*, que codifican péptidos PSM (modulinas solubles en fenol), en un modo independiente de RNAIII.

Tomado de Le K *et al* 2015 (152).

b) Polisacárido extracelular: está constituido por una biopelícula hidrosoluble laxa, denominada biofilm, la cual es producida por la mayoría de los estafilococos. Los biofilms se definen como comunidades de origen microbiano que crecen embebidos en una matriz de polisacáridos. Se caracterizan por su capacidad de adhesión a tejidos o superficies inertes, como catéteres, derivaciones o material protésico, y por la formación de uniones intercelulares. En *S. aureus*, las cepas productoras de biofilms, se caracterizan por presentar mayor resistencia a la fagocitosis y a la acción de los antibióticos (155).

c) **Pared celular:** está constituida por una gruesa capa de **peptidoglucano**, la cual, a su vez, está formada por numerosas capas de cadenas de glucanos (10-12 subunidades alternantes de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina) y cadenas laterales de oligopéptidos entrecruzadas, lo que confiere a la pared celular una elevada rigidez. El peptidoglucano posee actividad de tipo endotoxina, ya que estimula la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento, la liberación de IL-1 por los macrófagos y la agregación de los leucocitos polimorfonucleares, proceso que da lugar a la formación de abscesos (156,157). En la pared celular también se encuentran los **ácidos teicoicos** o **lipoteicoicos**, que son polímeros fosfatados que se unen a residuos de *N*-acetilmurámico o a la membrana citoplasmática, a través de uniones covalentes o lipofílicas, respectivamente. Aunque son poco inmunógenos, los ácidos teicoicos de *S. aureus* tienen capacidad de estimular la respuesta humoral específica e intervienen en la interacción con el hospedador, favoreciendo la colonización (158). La pared celular constituye la diana de numerosos antibióticos, entre ellos los betalactámicos, los cuales se unen a la proteína de unión a penicilina (PBP) encargada de la síntesis de peptidoglucano.

d) **Proteínas de superficie:** se han identificado numerosas proteínas de superficie, cuya relevancia radica en su participación en los mecanismos de adherencia a los tejidos del hospedador. En este grupo se engloban las proteínas de unión al colágeno (Cna), a la fibronectina (FnBPA y FnBPB) y al fibrinógeno (ClfA y ClfB), así como la proteína A. En su conjunto se denominan **MSCRAMM** (del inglés *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (159,160).

Las **proteínas de unión a la fibronectina** y al **colágeno** juegan un papel importante en la adherencia a las lesiones del epitelio, donde quedan expuestos la lámina basal y el tejido conjuntivo, ricos en fibronectina y colágeno (160). Las **proteínas de unión a fibronectina** también están implicadas en la adherencia de *S. aureus* a las células del hospedador y su posterior internalización (161).

La **proteína A** de *S. aureus* (**SpA**) es una importante molécula de superficie que puede ser secretada en forma libre al espacio extracelular. Está presente en la gran mayoría de las cepas, especialmente en aquellas relacionadas con infecciones de las vías respiratorias (162). SpA es capaz de interactuar con numerosas proteínas presentes en el hospedador y modular la respuesta inmune mediante varios mecanismos. Esto hace que SpA pueda actuar como una molécula proinflamatoria o antiinflamatoria, en función del sustrato de unión y las células con las que interactúe en el hospedador. Por ejemplo: i) impide la opsonización de *S. aureus* por

los neutrófilos al unirse al receptor Fc de la IgG (163); ii) promueve la coagulación intravascular mediante su unión al factor de von Willebrand (164); iii) activa la vía de señalización proinflamatoria característica de TNF- α mediante la unión al receptor 1 de TNF (TNFR1) (162); iv) induce la liberación de IL-8 en las células epiteliales de las vías respiratorias a través del factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) (162); v) favorece la movilización y eliminación de TNFR1, así como la neutralización del TNF- α disponible, disminuyendo la señalización continua de la vía TNFR1 (162), vi) actúa como un SAg al interactuar con la región VH3 de la IgM presente en los linfocitos B (165).

3.2.2. Toxinas

a) Citotoxinas o toxinas con actividad sobre membranas: en este grupo se incluyen las toxinas que actúan sobre la membrana citoplasmática de las células; son las toxinas o hemolisinas α , β , γ , δ y la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV).

La **toxina α** es una proteína codificada por el gen *hla*, integrado en el cromosoma de *S. aureus*. Su expresión está controlada por varios sistemas reguladores, siendo el operon *agr* el mecanismo principal (152). Ejerce su acción citolítica en los hematíes, dando lugar a la formación de poros que alteran la osmorregulación y el flujo de cationes y otras moléculas (166). También puede modular la respuesta inmune al interferir en la liberación de interleuquinas y otros mediadores: incrementa la liberación de IL-1 β por monocitos y macrófagos (167); de IL-8 por monocitos y células epiteliales (168); de IFN- γ por células T (169), y de IL-17A e IL-22 por células mononucleares de sangre periférica y células T (170,171).

La **toxina β** se caracteriza por su capacidad de lisar los hematíes y por su actividad esfingomielinasa; degrada la esfingomielina presente en la superficie celular, conduciendo a su lisis (172). A pesar de que se ha relacionado con la formación de biofilms (173), su contribución en las infecciones mediadas por *S. aureus* es desconocida. Además, muchas cepas de origen humano no expresan la toxina β , debido a la integración del bacteriófago ϕ Sa3 en el gen estructural que la codifica, denominado *hlb* (174).

La **toxina γ** (liberada por la mayoría de las cepas de *S. aureus*) y la **LPV** están formadas por dos componentes, S y F. Se han identificado tres proteínas S y dos proteínas F, por lo que se pueden codificar hasta seis toxinas diferentes. Todas ellas actúan formando poros de membrana que conducen a la destrucción de macrófagos, neutrófilos y hematíes (175). La LPV es un importante factor de virulencia, asociado con necrosis tisular en infecciones de piel y partes

blandas, así como con cuadros de neumonía necrotizante (176,177). Principalmente, es producida por cepas de SARM adquiridas en la comunidad (178).

La **toxina δ** , producida por prácticamente todas las cepas de *S. aureus*, se caracteriza por su amplio espectro de actividad citolítica, afectando a la membrana de una gran variedad de células, principalmente hematíes y neutrófilos (179,180). Además, es capaz de modular la respuesta inmune y se ha relacionado con la formación de biofilms (181). Está codificada por el gen *hld*, cuya transcripción está regulada por el sistema *agr*. El gen *hld* se expresa principalmente durante la fase de crecimiento postexponencial, y se reprime totalmente durante las fases tempranas de crecimiento. Dado que la expresión de la toxina δ depende de la dinámica de crecimiento bacteriano y se secreta sin un péptido señal, se ha sugerido que la propia toxina podría actuar como un marcador de la funcionalidad del operon *agr* (182).

b) Toxinas con actividad de superantígenos: son aquellas capaces de estimular inespecíficamente (proliferación policlonal) y directamente a los linfocitos T, desencadenando reacciones inmunitarias caracterizadas por la liberación masiva de citoquinas (tormenta de citoquinas). Los SAgS se unen simultáneamente al receptor de linfocitos T (TCR) y al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), sin ser previamente procesados por una célula presentadora de antígeno. La unión a los linfocitos T no se produce en las zonas de reconocimiento específico, sino en las adyacentes, concretamente en la región variable de la cadena β del TCR (Figura 13). Las enfermedades mediadas por SAgS cursan con fiebre, hipotensión grave y shock, pudiendo dar lugar a un fallo multiorgánico (183). En este grupo se engloban las toxinas **exfoliativas**, las **enterotoxinas** y la **toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)**.

Las **toxinas exfoliativas** o también denominadas **epidermolíticas**, son las responsables del síndrome de la piel escaldada estafilocócico o síndrome de Ritter. Se han descrito 4 tipos de toxinas exfoliativas (ETA, ETB, ETC y ETD), siendo ETA y ETB las más frecuentes en humanos (184). ETA es una proteína termoestable codificada por el gen *eta*, localizado en el cromosoma pero integrado en el fago ϕ ETA (185). Por el contrario, ETB es termolábil y el gen que la codifica, *etb*, se encuentra en un plásmido (186). En cuanto al mecanismo de acción, la hipótesis más probable se relaciona con su actividad como proteasas de serina en la zona granulosa de la epidermis, destruyendo la cohesión intercelular tras unirse a la desmogleína-1, proteína importante en el mantenimiento de la adhesión entre las células y la epidermis (184). Su actividad como superantígenos ha sido demostrada, pero el efecto que producen es más leve que el de las enterotoxinas o la TSST-1 (187).

Las **enterotoxinas estafilocócicas (SE)** son las causantes de la intoxicación alimentaria estafilocócica, cuadro autolimitado que cursa con vómitos y diarrea. Al ser proteínas termoestables y resistentes a la hidrólisis de los jugos gástricos, la infección ocurre tras la ingestión de las toxinas previamente preformadas en los alimentos. Las SE inducen cambios histológicos a nivel gastrointestinal y la liberación de mediadores de la inflamación (188). Se han descrito 22 SE diferentes, siendo SEA la más comúnmente relacionada con las intoxicaciones alimentarias (189). La mayoría de los genes que codifican estas proteínas se encuentran localizados en elementos genéticos móviles, como fagos (SEA), plásmidos (SED) o islas de patogenicidad de *S. aureus* (SEB, SEC, SEK, SEL) (151,189). Debido a su actividad como SAg, el papel de las SE ha sido ampliamente estudiado en patologías con destacado componente inflamatorio, como en la DA y la RSC (véase apartado 4).

La **TSST-1** es una proteína termoestable y resistente a la acción de las proteasas. Es codificada por el gen *tst* localizado en las islas de patogenicidad SaPI1 y SaPI2, las cuales están estrechamente vinculadas con profagos específicos, que permiten su propagación entre cepas de *S. aureus* (190). La TSST-1 es un potente SAg causante principal del Síndrome del Shock Tóxico (SST), descrito por primera vez en 1978 por Todd *et al* (191). Para su liberación son necesarias condiciones específicas (elevada concentración de oxígeno y pH neutro), lo que podría explicar la baja incidencia del SST en comparación con otras infecciones estafilocócicas (192).

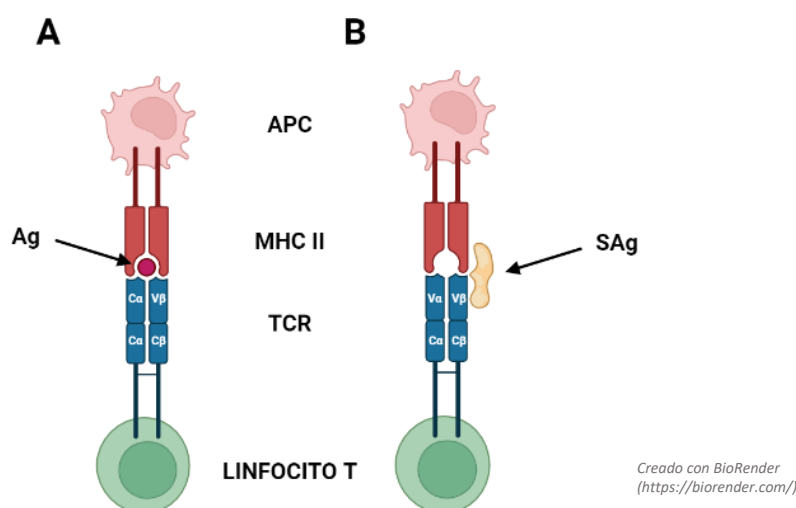


Figura 13. Mecanismo de acción de antígenos convencionales y superantígenos.

Los antígenos convencionales (**A**) son presentados a los linfocitos T a través de las MCH II. Los superantígenos (**B**) se unen directamente a la cadena β del TCR y al MCH II, provocando una activación masiva de linfocitos T. APC: Células presentadora de antígeno; MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; TCR: receptor de linfocitos T; Ag: antígeno; SAg: superantígeno.

3.2.3. Enzimas extracelulares

S. aureus produce una gran variedad de enzimas relacionadas con su capacidad invasiva y propagación tisular. Las más destacadas son la coagulasa, la hialuronidasa, la fibrinolisisina, las lipasas y las nucleasas.

a) **Coagulasa:** promueve la conversión del fibrinógeno en fibrina; forma un complejo con la protrombina e induce en ella un cambio conformacional, dando lugar a la creación de un sitio activo de unión del fibrinógeno de alta afinidad (193). El resultado es la formación de una malla de fibrina que favorece la formación de abscesos, la localización de la infección y la agrupación de los microorganismos, protegiéndolos de la fagocitosis (194).

b) **Hialuronidasa:** hidroliza el ácido hialurónico presente en la matriz extracelular de los tejidos, favoreciendo la propagación y diseminación de *S. aureus* (195).

c) **Fibrinolisisina o estafiloquinasa:** es un cofactor que favorece la diseminación de *S. aureus* en los tejidos mediante la activación del plasminógeno y la consiguiente formación de plasmina, proteasa que disuelve los coágulos de fibrina (196). En este sentido, la producción de estafiloquinasa se ha relacionado con una menor formación de biofilms y con la destrucción de biofilms maduros (197). La fibrinolisisina también contribuye a la protección de *S. aureus* frente a la fagocitosis, al inducir la producción de defensinas (198).

3.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*

3.3.1. Generalidades

S. aureus, al igual que otras bacterias, es capaz de adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos mediante el desarrollo de mecanismos de resistencia, los cuales pueden afectar al propio antibiótico, estructuras celulares o rutas metabólicas (Figura 14). Como consecuencia, los antimicrobianos dejan de ejercer su efecto bacteriostático o bactericida sobre la célula bacteriana. La resistencia antibiótica adquirida puede estar mediada por mutaciones en los genes cromosómicos o por transferencia horizontal de genes entre otras especies o géneros bacterianos, a través de plásmidos u otros elementos genéticos móviles, como transposones o integrones.

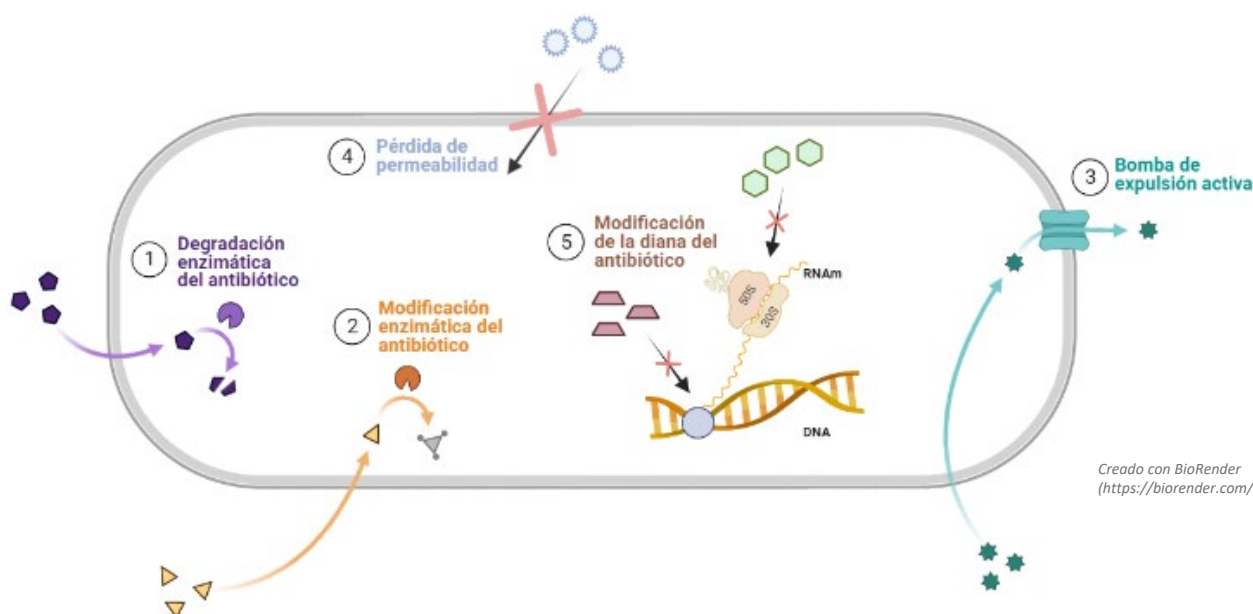


Figura 14. Mecanismos de resistencia antibiótica.

1- Degradación enzimática del antibiótico: es el mecanismo de resistencia a betalactámicos más importante. Las bacterias producen enzimas (betalactamasas) que hidrolizan el antibiótico. **2- Modificación enzimática del antibiótico:** metilación, acetilación, fosforilación, etc. Mecanismo importante en el caso de resistencia a los aminoglucósidos. **3- Bomba de expulsión activa:** las bacterias poseen proteínas en la membrana citoplasmática con capacidad de expulsar al medio externo las moléculas de antibióticos que hubieran penetrado previamente. **4- Pérdida de permeabilidad:** fundamentalmente se debe a la pérdida o modificación estructural de las porinas (por mutaciones, deleciones o inserciones en los genes que las codifican), proteínas que forman canales de membrana a través de los cuales se transportan nutrientes y, secundariamente para la bacteria, numerosos antimicrobianos al interior celular. **5- Modificación de la diana del antibiótico:** la resistencia puede deberse a una alteración del sitio de unión del antibiótico, por ejemplo, modificaciones ribosómicas causadas por metilasas en la subunidad 50S (responsables del fenotipo de resistencia MLSB en grampositivos), o a la disminución de la afinidad de unión al antibiótico, como ocurre en las cepas de SARM debido a la producción de la PBP2a, la cual se caracteriza por su baja afinidad por betalactámicos.

3.3.2. Resistencia a antibióticos betalactámicos

Los betalactámicos son antibióticos con actividad bactericida capaces de unirse a las PBPs situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática. Actúan como análogos del dipéptido D-Ala-D-Ala e inhiben la síntesis del peptidoglicano al impedir que tenga lugar la reacción de transpeptidación. Como consecuencia, la estructura de la pared celular se debilita, dando lugar a su rotura y, por tanto, a la muerte celular.

El fenotipo de resistencia a antibióticos betalactámicos más frecuente en *S. aureus*, incluye resistencia a penicilina y ampicilina debido a la inactivación enzimática mediada por penicilinasas (codificadas por el gen *blaZ*), enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico dando lugar a la inactivación del antibiótico. Estas betalactamasas de clase A son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam), por lo que estas cepas son sensibles a las asociaciones de betalactámicos con inhibidores, así como a las

penicilinas semisintéticas (oxacilina y meticilina) y resto de antibióticos betalactámicos (cefalosporinas o carbapenemas).

En *S. aureus* también es muy frecuente la resistencia a meticilina (y oxacilina) debido a la adquisición del gen *mecA*, el cual codifica una PBP (PBP2a) que posee baja afinidad por los betalactámicos. Las cepas de *S. aureus* que contienen el gen *mecA*, comúnmente denominadas SARM, son resistentes a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas, con la excepción de dos nuevas cefalosporinas con elevada afinidad por la PBP2a, ceftobiprole y ceftarolina (199,200).

3.3.3. Resistencia a antibióticos no betalactámicos

a) Macrólidos – Lincosamidas – Estreptogramina B (MLSB): estos antibióticos presentan diferencias estructurales, pero poseen mecanismos de acción y de resistencia muy relacionados. Actúan sobre la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la translocación de la cadena peptídica en la síntesis proteica. Los mecanismos de resistencia a estos antibióticos en bacterias grampositivas pueden ser los siguientes:

- i. Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas principalmente por genes *erm* y, rara vez, por el gen *cfr*, o mutaciones en el ARNr 23S y/o en las proteínas ribosomales.
- ii. Expulsión activa del antibiótico por parte de proteínas codificadas por diversos genes, como *mef(A)*, *mef(E)*, *msr(A)*, *msr(B)*, *erp(B)*.
- iii. Inactivación del antibiótico mediada por enzimas codificadas por los genes *Inu(A)*, *Inu(B)*, *Inu(C)*, *vat*, *vgb*, y *mph(C)*.

Existen diferentes fenotipos de resistencia en función de los genes implicados y antibióticos afectados. El más común es el denominado **MLSB**, que consiste en la resistencia a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos de carbono, lincosamidas y estreptograminas del grupo B y se debe a la presencia de genes *erm*. Los genes *erm(A)* y *erm(C)* son los más frecuentemente encontrados en *S. aureus* (201). Este fenotipo puede ser de expresión constitutiva o inducible (cMLSB o iMLSB), siendo en este último caso la eritromicina la que induce la expresión del mecanismo de resistencia. Otro fenotipo de resistencia frecuente en *S. aureus* es el **MS** (resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos y a estreptograminas B, pero no a clindamicina ni a macrólidos de 16 átomos), debido a un mecanismo de expulsión activa codificado principalmente por el gen *msr(A)* y *msr(B)*. Otros fenotipos infrecuentes son **L**, **LSA**, **SA** y **SB**,

consistentes en resistencia a lincosamidas; lincosamidas y estreptograminas A; estreptograminas A, y estreptograminas B, respectivamente. En estos casos, destacan los mecanismos de inactivación del antibiótico o modificación de la diana. La inactivación se debe principalmente a enzimas lincosamida-nucleotidiltransferasas, codificadas por 3 genes *Inu(A)*, *Inu(B)* y *Inu(C)*, mientras que la modificación de la diana se debe a una metilasa codificada por el gen *cfr* que se asocia con resistencia combinada a lincosamidas, estreptograminas, fenicoles, pleuromutilinas y oxazolidinonas (202).

b) Aminoglucósidos: actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. En *S. aureus* la resistencia a los aminoglucósidos se produce principalmente por la acción de enzimas modificantes. En cepas de SARM son frecuentes la producción de enzimas codificadas por los genes *aac(6')-aph(2'')* y *ant(4')*, que confieren resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina, y a amikacina, tobramicina y kanamicina, respectivamente. Las cepas de *Staphylococcus* también pueden presentar resistencia a estreptomina debido a la acción de la enzima *ant(6)* o bien a kanamicina y amikacina, por la enzima *aph(3')-III*.

c) Quinolonas: actúan interfiriendo en la acción de la ADN-girasa cromosómica y de la topoisomerasa IV bacteriana. La resistencia a quinolonas en *S. aureus* se debe principalmente a la alteración de la diana, debido a mutaciones en las subunidades GrIA y GrIB (ADN topoisomerasa IV), y GyrA y GyrB (ADN-girasa). También puede estar ocasionada por mutaciones en el gen *norA*, responsable de un mecanismo de expulsión activa (203). Por lo general, las mutaciones responsables de la resistencia en *S. aureus*, se suelen producir primero en la proteína GrIA y posteriormente en GyrA, contribuyendo estas últimas a incrementar el nivel de resistencia.

d) Glucopéptidos: inhiben la síntesis de la pared celular. En general, las cepas de *Staphylococcus* han mantenido una elevada sensibilidad a este grupo de antibióticos. Sin embargo, en los últimos años, se han descrito cepas con sensibilidad disminuida o resistentes debido principalmente a dos mecanismos de resistencia, uno relacionado con el engrosamiento de la pared celular y el aumento de la expresión de PBP2a, y otro debido a la adquisición del gen *vanA*, asociado con un mayor nivel de resistencia (204).

e) Mupirocina: inhibe la síntesis de proteínas mediante la unión a la isoleucil-ARNt sintetasa, impidiendo la incorporación de isoleucina a las proteínas. Se pueden distinguir dos fenotipos de resistencia: i) resistencia de bajo nivel (CMI 8–256 µg/ml) mediada por mutaciones en el gen nativo *ileS*, codificante de la enzima isoleucil-ARNt-sintetasa; ii) resistencia de alto nivel

(CMI $\geq 512 \mu\text{g/ml}$) por adquisición de un plásmido que contiene el gen *mupA*, que codifica una enzima isoleucil-ARNt-sintetasa sin afinidad por mupirocina (205).

f) Tetraciclinas: inhiben la síntesis proteica por unión a la subunidad 30S del ribosoma. La resistencia a tetraciclinas en el género *Staphylococcus* es bastante frecuente, pudiendo ser debida al aumento de la expulsión activa o a una protección del ribosoma. En el primer mecanismo participan los genes *tet(K)* y *tet(L)*, y en el segundo los genes *tet(M)* y *tet(O)*. Los genes más comúnmente encontrados en *S. aureus* son *tet(K)*, asociado únicamente con resistencia a tetraciclina, y *tet(M)*, asociado con resistencia cruzada a tetraciclina, doxiciclina y minociclina (206).

g) Linezolid: antibiótico perteneciente a la familia de las oxazolidinonas. Inhibe la síntesis proteica a través de la unión de N-formilmetionil-ARNt al ribosoma, afectando también a la subunidad 50S. La resistencia a linezolid es poco frecuente, siendo más común en ECN y *Enterococcus* spp. (207). Los mecanismos de resistencia descritos se asocian con mutaciones en la diana (ARNr 23S) (208) o mutaciones en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22 (209). La presencia del gen *cfr*, anteriormente mencionado, también confiere resistencia a linezolid (202).

4. IMPLICACION DE *Staphylococcus aureus* EN LA RSCcPN

Se desconoce con exactitud el papel que desempeña *S. aureus* en la patogénesis de la RSCcPN. Actualmente, las principales hipótesis sugieren que podría actuar como un agente modulador de la enfermedad, promoviendo la desregulación de la respuesta inmunitaria, la disfunción de la barrera epitelial, la reducción del aclaramiento mucociliar y la disbiosis bacteriana, favoreciendo así el carácter recalcitrante de la RSCcPN.

Un mayor conocimiento del papel de *S. aureus* en la RSCcPN, incluyendo su influencia en la respuesta inmunitaria innata y en el microbioma, permitiría optimizar los objetivos de tratamiento, así como conocer la utilidad de la descolonización y la promoción de la homeostasis bacteriana, a favor de una comunidad microbiana diversa en la cavidad nasosinusal.

4.1. Colonización nasal por *S. aureus* e influencia en el microbioma

S. aureus coloniza de forma persistente o intermitente las fosas nasales de aproximadamente el 50% de los adultos sanos (210). En pacientes con RSCcPN, es el microorganismo aislado con mayor frecuencia, siendo las tasas de colonización más altas en

pacientes con asma concomitante o EREA (119,120). En un estudio publicado por Van Zele *et al* (211), *S. aureus* fue aislado en el 63,6% de los pacientes con RSCcPN, alcanzando el 87,5% en pacientes con hipersensibilidad a AINEs. Estos valores fueron muy inferiores en el grupo de RSCsPN y en individuos sanos, donde se reportaron tasas del 33,3% y 27,3%, respectivamente.

Los pacientes con RSCcPN colonizados por *S. aureus* parecen albergar la misma cepa a lo largo del tiempo, siendo capaz de persistir a pesar de la administración de antibiótico oral y/o tópico. Esto podría ser debido a la capacidad del patógeno para resistir la acción antibiótica y/o a la existencia de un reservorio que permita la recolonización (212). Estudios de hibridación *in situ* fluorescente empleando sondas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA-FISH), han demostrado la presencia de formas intracelulares de *S. aureus* en la mucosa sinusal de pacientes con RSCcPN, sin encontrar evidencia de que pueda ocurrir en pacientes con RSCsPN o individuos sanos (213–215). Por otro lado, los aislamientos intraoperatorios de *S. aureus* en las cirugías de senos paranasales, se han asociado con perfiles más graves de RSC y mayor prevalencia de infecciones postoperatorias (216).

En los últimos años, el estudio del microbioma ha adquirido especial interés. En términos generales, la biodiversidad microbiana, medida por la riqueza y la uniformidad, es considerada como un marcador de salud. En pacientes con RSC, Feazel *et al* (217) han demostrado que la disminución de la biodiversidad bacteriana se correlaciona con la abundancia relativa de *S. aureus* en la cavidad nasal. Además, dado que la mayor exposición a los antibióticos da lugar a una menor diversidad, sugieren que el uso frecuente de antimicrobianos puede contribuir a una alteración sostenida del microbioma, potenciando la colonización crónica por *S. aureus*. Varios autores han demostrado que en la RSCcPN se produce una expansión de microorganismos patógenos, específicamente *S. aureus* y anaerobios, siendo la carga bacteriana total similar en pacientes con y sin RSC (218–220).

4.2. Influencia de *S. aureus* en la barrera epitelial

Clásicamente, las investigaciones acerca del papel de los microorganismos en la RSCcPN se han centrado en su influencia sobre la cascada inflamatoria. En este contexto, la teoría de los SAgS estafilocócicos (55,93) y la teoría fúngica, con *Alternaria* como principal protagonista (221–223), adquirieron especial relevancia. De las observaciones derivadas de estudios previos, nació la hipótesis de la barrera inmunitaria, en la que se postula que tanto *Alternaria* como las cepas toxigénicas de *S. aureus*, facilitan la interrupción de la barrera inmunológica y mecánica al promover la eliminación mucociliar defectuosa, que conduce a su vez a la invasión bacteriana y

a la degradación de las proteínas de unión estrecha intercelular (224). Recientemente, Altunbulakli *et al* (225) demostraron que la infección del cornete inferior por *S. aureus* en pacientes sanos, da lugar a un incremento de la expresión de ARNm de proteínas de unión estrecha, como claudinas, ocludina, tricelulina, ZO-3 y E-cadherina, mientras que en el tejido de pacientes con RSCcPN no se produce ningún cambio e incluso, en algunos casos, se produce una disminución de las proteínas de unión estrecha. Otro estudio realizado por Varela *et al* (226), relaciona la presencia de *S. aureus* en el epitelio nasosinusal con una menor capacidad de reparación del tejido dañado en pacientes con RSCcPN.

La barrera epitelial actúa como una primera línea de defensa física frente a los agentes externos. En respuesta al estímulo inducido por determinados virus y bacterias, las células epiteliales liberan citoquinas, como IL-25, IL-33 y TSLP, las cuales inducen la liberación de otras citoquinas tipo 2, como IL-5, IL-9 e IL-13, contribuyendo al inicio o persistencia de la respuesta inflamatoria Th2 a nivel local (227–229) (Figura 15).

La presencia de *S. aureus* en la cavidad nasal se ha relacionado ampliamente con la respuesta inflamatoria Th2 descrita en pacientes con RSCcPN. Un estudio publicado por Lan *et al* (230), demuestra que la acción directa de *S. aureus* (cepas no productoras de enterotoxina) también es capaz de inducir la liberación de citoquinas Th2, IL-33 y TSLP, por parte de las células epiteliales nasales en pacientes con RSCcPN. En otro estudio, Sachse *et al* (214) obtuvieron un aumento significativo de IL-6, tras la estimulación *in vitro* con cepas de *S. aureus* de células epiteliales nasales de pacientes con RSCcPN. De este modo, estos hallazgos demuestran que en pacientes con RSCcPN, las células epiteliales nasales podrían actuar como una fuente de citoquinas tipo 2, cuya liberación podría estar potenciada por la presencia de *S. aureus* en la cavidad nasal, contribuyendo así a la persistencia de la respuesta inflamatoria y la exacerbación de los síntomas.

4.3. Formación de biofilms

Los biofilms son estructuras altamente organizadas compuestas por comunidades de bacterias encerradas dentro de una matriz extracelular, protegiéndolas frente a las defensas del huésped o la acción de los antibióticos (231).

En la RSCcPN, la prevalencia de biofilms bacterianos es superior en comparación con los grupos de RSCsPN y pacientes sanos (232). Sin embargo, no existe evidencia suficiente que relacione dichas estructuras con la patogénesis de la enfermedad. Algunos autores sugieren que

podrían constituir una fuente de exacerbaciones recurrentes al actuar como reservorios y permitir la liberación periódica de microorganismos (233,234). En este sentido, Tan *et al* (215) demostraron una asociación positiva entre la invasión intracelular de *S. aureus* y la formación de biofilms, pudiendo ser la combinación de ambos mecanismos responsable de potenciar el carácter recalcitrante de la RSCcPN. La presencia de biofilms de *S. aureus* también se ha relacionado con un incremento de la respuesta inmune Th2, encontrándose niveles significativamente más elevados de IL-5, ECP y eosinófilos activados (235,236), y con resultados desfavorables después de la cirugía (121).

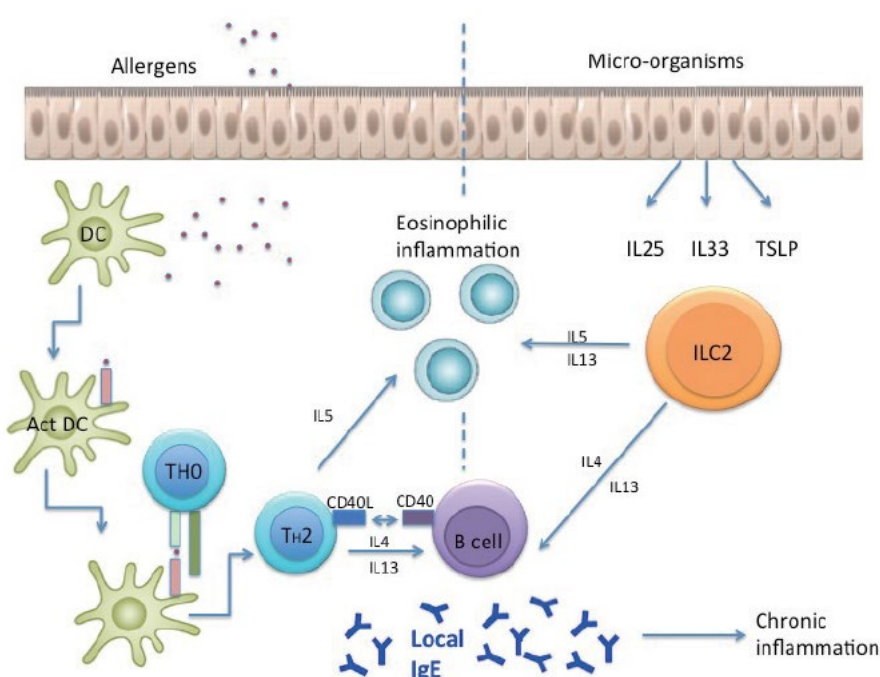


Figura 15. Activación de la cascada inflamatoria característica de la RSCcPN debido a la influencia de los microorganismos en la barrera epitelial.

Tomado de De Schryver E *et al* 2015 (229)

4.4. Toxinas y otras proteínas estafilocócicas

Las toxinas estafilocócicas han sido ampliamente estudiadas en la patogénesis de la RSCcPN, especialmente los SAgS, los cuales se han asociado con otras enfermedades en las que la colonización por *S. aureus* puede ser crucial en el empeoramiento del cuadro clínico, como es la DA (237,238). Debido a su mecanismo de acción, estas toxinas dan lugar a una activación masiva y policlonal de linfocitos T, que a su vez desencadena la proliferación simultánea de células B, con la consiguiente liberación de IL-4, IL-5 e IL-13. Como consecuencia, se produce un incremento de la producción local de IgE policlonal asociada a un aumento de eosinófilos

activados y liberación de histamina. La inflamación eosinofílica persistente e incrementada en la mucosa nasosinusal, podría favorecer el incremento del tamaño de los pólipos y conducir a una exacerbación de los síntomas (239).

Además de la activación policlonal de linfocitos T, los SAgS estafilocócicos son capaces de interactuar con otras células, entre las que se encuentran los linfocitos B, eosinófilos, mastocitos y células epiteliales. Como consecuencia de dicha interacción, se produce un incremento de la proliferación y activación de células T, inmunoglobulinas y citoquinas (Figura 16) (240). En pacientes con RSCcPN se ha demostrado la presencia de linfocitos B y T en el tejido polipoide, pudiendo estar relacionado con una exposición previa a SAgS estafilocócicos a nivel local (241–245). El incremento en la síntesis local de SE-IgE en pacientes con RSCcPN, se ha relacionado con formas más graves de la enfermedad, con mayor inflamación eosinofílica y mayor asociación a asma y/o intolerancia a AINEs (86,93). Los SAgS estafilocócicos también pueden influir en el metabolismo de los eicosanoides (importante en la fisiopatología de la EREA), constituyendo una vía para la desregulación inmunitaria innata que puede conducir a la inflamación persistente (246). La estimulación celular con la enterotoxina B de *S. aureus* (SEB) en pacientes con RSCcPN, se ha relacionado con un incremento significativo de los niveles de citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-5, IL-10, IL-13, INF- γ e IL-17A (247). El sesgo preferencial hacia una respuesta inmunitaria Th2 promueve la diferenciación de macrófagos M2 inmunotolerantes, lo que favorece la persistencia de *S. aureus* al disminuir la fagocitosis (94).

Debido a sus propiedades biológicas, el papel de otras proteínas estafilocócicas, como α -hemolisina y proteína A (SpA), también han sido objeto de estudio en la RSCcPN. α -hemolisina es una citotoxina capaz de regular la respuesta inmune al interactuar con numerosas células (167–171,248,249), mientras que SpA interfiere sobre mecanismos de defensa del huésped al actuar sobre macrófagos, linfocitos B, células epiteliales de las vías respiratorias, etc., pudiendo actuar como una molécula proinflamatoria o antiinflamatoria (162,163,250). En un estudio realizado por Okano *et al* (247), la estimulación celular *in vitro* con α -hemolisina, dio lugar a un aumento significativo de IL-5, IL-13, IFN- γ , IL-17 e IL-10 en pacientes con RSCcPN. En otro estudio, al emplear SpA, observaron un aumento significativo dosis dependiente de IL-13, IL-10 e IL-17A, con respecto a las células sin estímulo (251). También, Patou *et al* (252), obtuvieron un aumento significativo de IL-5 al estimular las células con SpA.

Estos hallazgos demuestran que la respuesta inducida por toxinas estafilocócicas en pacientes con RSCcPN, tiende a ser proinflamatoria y sesgada hacia la producción de citoquinas Th2. Sin embargo, la presencia de SAgS estafilocócicos en el tejido polipoide no ha sido

documentada en todos los pacientes con RSCcPN, lo que sugiere que no son imprescindibles para que la respuesta inflamatoria típica de la RSCcPN tenga lugar. Por ello, cada vez es más aceptada la hipótesis de que *S. aureus* podría actuar como un modulador en la fisiopatología de la RSCcPN, provocando una regulación al alza en la producción de citoquinas proinflamatorias.

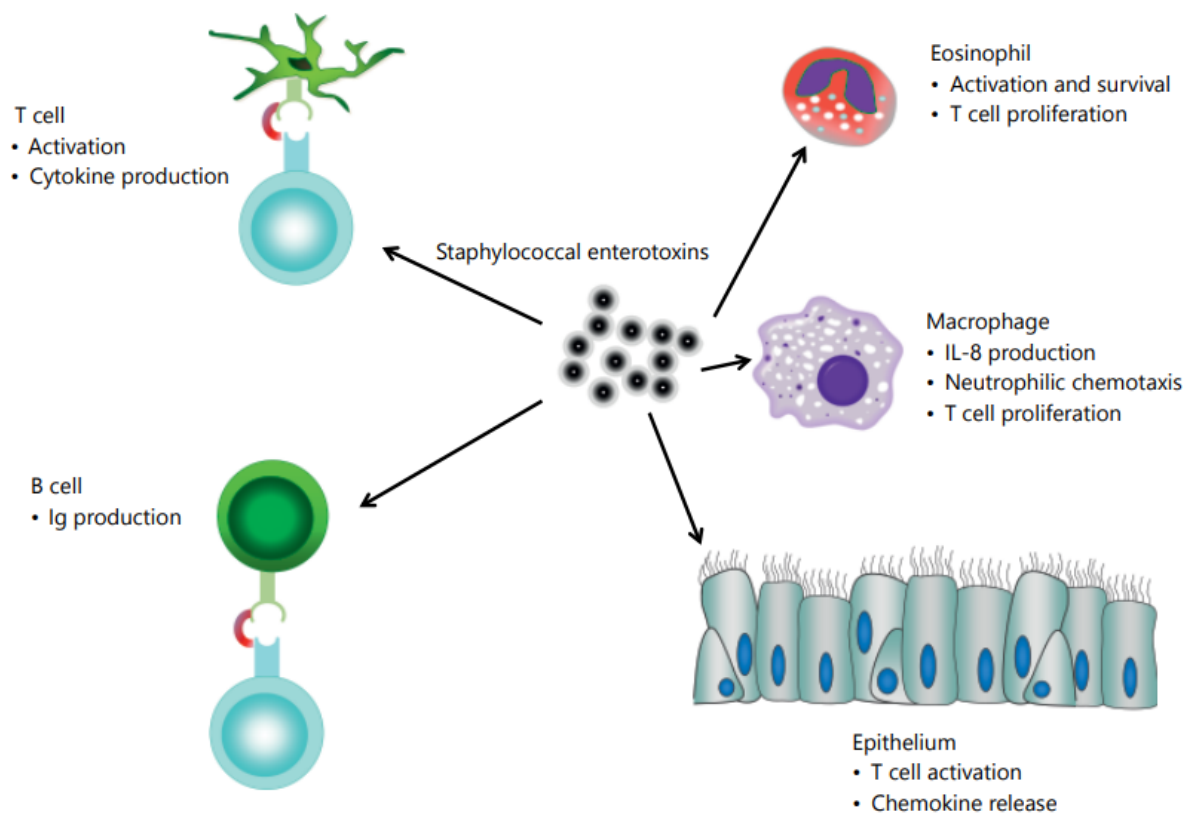


Figura 16. Efectos de los superantígenos estafilocócicos en los diferentes tipos celulares.

Tomado de Huvenne W *et al* 2013 (240)

HIPÓTESIS

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos más ampliamente estudiados en el contexto de la rinosinusitis crónica con o sin poliposis nasal. Sin embargo, todavía se desconoce el papel que pudiera desempeñar en la patogénesis de la enfermedad. Las razones que apoyan la posible implicación de *S. aureus* en la patogénesis de la RSCcPN y las que fundamentan la hipótesis de la presente tesis doctoral son:

- *S. aureus* coloniza frecuentemente la cavidad nasal de pacientes con RSCcPN, siendo capaz de invadir el epitelio y la submucosa. Mayores tasas de colonización han sido reportadas en pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs, caracterizándose por una mayor exacerbación de los síntomas y necesidad de tratamiento quirúrgico periódico, lo que conlleva un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes y en el coste sociosanitario.

- Los principales factores de virulencia de *S. aureus* que se han asociado con la patogénesis de RSCcPN, son la capacidad de formación de biofilms y a la liberación de superantígenos. La presencia de biofilms bacterianos se ha relacionado con cuadros clínicos más severos y mayor recurrencia de poliposis tras la cirugía, pudiendo favorecer el carácter recalcitrante de la enfermedad. Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual la presencia de biofilms facilita dicha exacerbación. En cuanto a la implicación de los superantígenos, numerosos estudios han demostrado que en pacientes con RSCcPN, se producen mayores niveles de IgE frente a enterotoxinas estafilocócicas, pudiendo estar asociados con la activación de células T y la consiguiente liberación masiva de citoquinas Th2.

- En pacientes con RSCcPN, se ha observado que *S. aureus* ejerce un efecto inmunomodulador, que contribuye al mantenimiento de la respuesta inflamatoria Th2 en el tejido polipoide. Como consecuencia, se produce un incremento en el reclutamiento de eosinófilos, que favorece la formación y crecimiento de los pólipos nasales.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, **se establece la siguiente hipótesis:** la respuesta continuada de las células del epitelio nasal frente a determinadas proteínas de *S. aureus*, durante la colonización nasal persistente o intermitente por este patógeno, podría provocar una alteración en la respuesta inmunitaria innata, potenciando la desregulación al alza del proceso inflamatorio crónico característico de la enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs. De este modo, un control mediante la descolonización nasal por *S. aureus*, podría ser de utilidad en el manejo clínico de dicha patología.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la implicación de las proteínas de *S. aureus*, α -hemolisina y proteína A (SpA), en la activación de la respuesta inmunitaria innata de pacientes con EREA, mediante la cuantificación de la producción de citoquinas por las células epiteliales de pólipos nasales.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- a) Diseñar un modelo de estimulación celular *in vitro* con cultivos primarios de células epiteliales de pólipos nasales (CEPN) de pacientes con EREA, obtenidos mediante cirugía endoscópica nasosinusal.
- b) Determinar el patrón de liberación de las citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-5, IL-33 e IL-8 en las CEPN de pacientes con EREA, tras la estimulación con las proteínas α -hemolisina y SpA de *S. aureus*.
- c) Comparar el efecto de SpA en la liberación de las citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-5, IL-33 e IL-8, por CEPN de pacientes con EREA y células epiteliales nasales de pacientes sin patología inflamatoria nasosinusal.
- d) Estudiar las características microbiológicas de las cepas de *S. aureus* aisladas en pacientes con EREA, como sensibilidad antibiótica y diversidad genómica (PFGE), y diversidad genética de la proteína A (SpA).
- e) Determinar si existe asociación entre la liberación de citoquinas en CEPN de pacientes con EREA estimuladas con SpA, y parámetros fisiopatológicos y microbiológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

1.1. Descripción y ámbito de aplicación

El estudio realizado es de carácter observacional, longitudinal, retrospectivo. Se desarrolló entre febrero de 2017 y diciembre de 2020. La selección de los pacientes, recogida de datos clínicos y los procedimientos asociados a la toma y procesamiento de las muestras, se realizaron durante el periodo anteriormente indicado.

El reclutamiento de pacientes se realizó en las Consultas Externas de los Servicios de Otorrinolaringología de dos hospitales de tercer nivel de la Comunidad Valenciana: **i) Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV)**, perteneciente al Departamento de Salud número 9, con 503 camas y responsable de la atención sanitaria de 364.017 habitantes (253); **ii) Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (HUP La Fe)**, hospital de referencia para toda la Comunidad Valenciana, perteneciente al Departamento de Salud número 7, con 1.000 camas y cuya actividad asistencial se extiende a una población de 300.000 habitantes (254).

1.2. Pacientes

Aleatoriamente, los pacientes atendidos en ambos centros fueron invitados a participar en el estudio tras comprobar cumplimiento y ausencia de criterios de inclusión y exclusión, respectivamente (Tabla 6). Los pacientes incluidos se dividieron en dos grupos, **grupo de estudio** y **grupo control**. Teniendo en cuenta la prevalencia de EREA en nuestro entorno, se consideró un tamaño muestral mínimo de 50-70 pacientes incluyendo ambos grupos, con un ratio 3:1 (grupo estudio vs grupo control).

- a. **Grupo de estudio:** se incluyeron pacientes mayores de 18 años con diagnóstico previo de enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs (ASA triada o EREA), caracterizada por la presencia de RSCcPN, asma e intolerancia a la aspirina u otros AINEs. La presencia de RSCcPN se determinó en base a los criterios recogidos en el documento de consenso EPOS 2012 (122). El diagnóstico de asma y la hipersensibilidad a AINEs estuvieron documentadas en la historia clínica, en este último caso, tras una reacción a uno o más AINEs de diferentes grupos químicos, y/o una prueba de provocación con AAS. En total se incluyeron **56** pacientes en el estudio.

- b. Grupo control:** se incluyeron pacientes mayores de 18 años diagnosticados de dismorfia del septum nasal con indicación quirúrgica de septoplastia, sin patología inflamatoria nasosinusal. En total se incluyeron **20** pacientes.

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes incluidos en el grupo de estudio.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
> 18 años	< 18 años
Diagnóstico previo de RSCcPN y asma	Enfermedad otorrinolaringológica inflamatoria distinta a RSCcPN, ya sea tumoral o autoinmune
Episodio de intolerancia a AINEs confirmado clínicamente	Proceso infeccioso agudo (bacteriano, fúngico o vírico) en los últimos tres meses con afectación rinosinusal.
Pacientes candidatos a CENS y/o con pólipos de tamaño suficiente para tomar muestras biópsicas	Tratamiento antibiótico en los últimos tres meses
	Intervención quirúrgica por patología otorrinolaringológica en el último año

1.3. Aspectos éticos

El estudio fue aprobado en enero-febrero de 2017 por los Comités de Ética (Anexo 2) e Investigación (Anexo 3) del CHGUV. La inclusión de pacientes visitados en el HUP La Fe fue autorizada en 2018. El consentimiento informado fue entregado a todos los pacientes, cuya firma y aceptación fue requerimiento imprescindible para su participación en el estudio

El tratamiento de los datos clínicos y demográficos de los pacientes se realizó de acuerdo con el REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos, así como con la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre, relativa a la protección de datos personales y garantía de los derechos digitales. La información tomada de la Historia Clínica Electrónica, excluyendo los datos personales, se recogió en una base de datos codificada exclusiva para el estudio.

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

2.1. Planificación del proyecto

Para el desarrollo de la investigación propuesta y consecución de los objetivos planteados se llevó a cabo el esquema de trabajo detallado en la Figura 17.

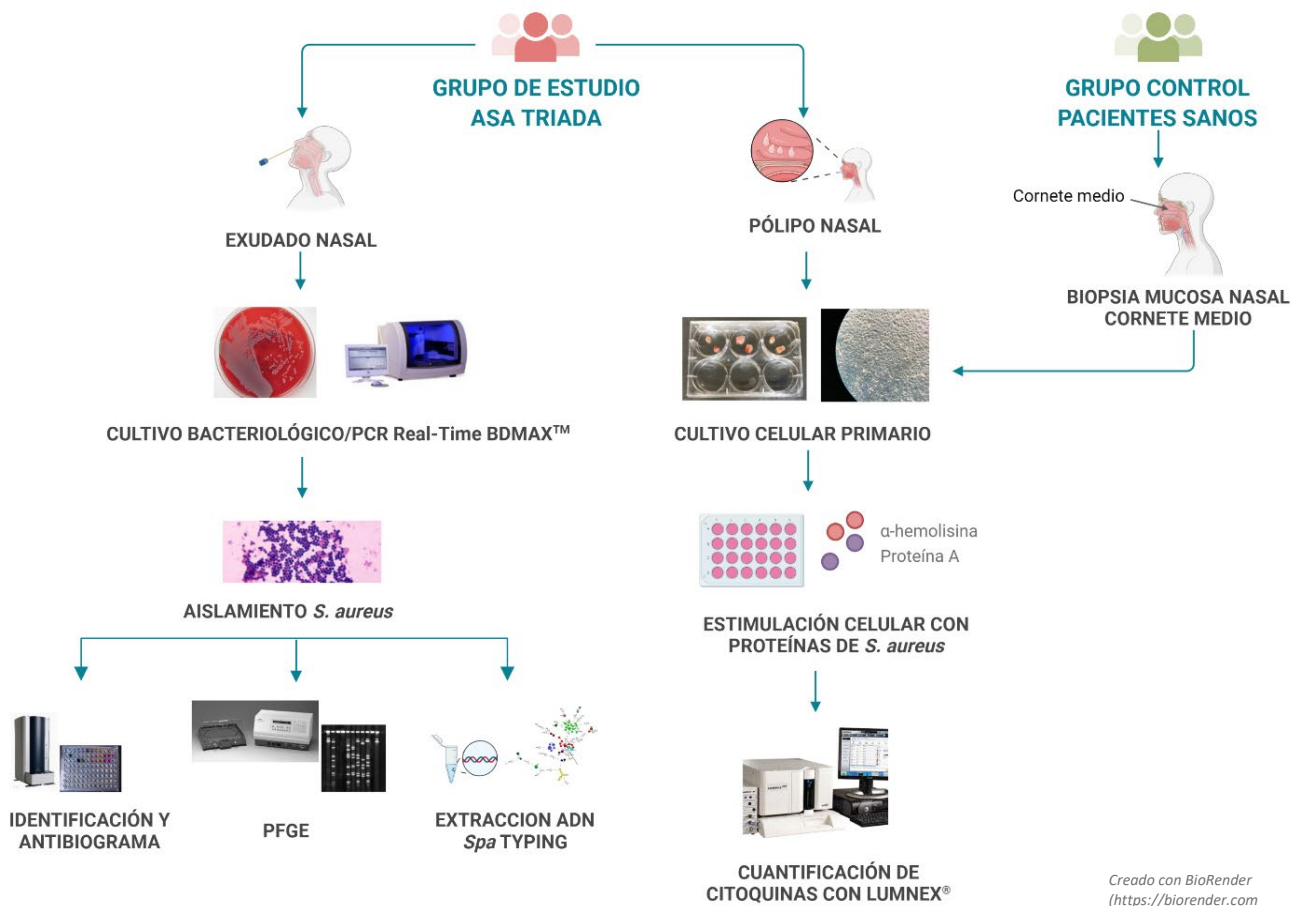


Figura 17. Esquema de trabajo del proyecto.

Los pacientes incluidos en el estudio se dividieron en dos grupos:

- Grupo de estudio o EREA:** se tomaron muestras de pólipo nasal, que se emplearon para los estudios de estimulación celular *in vitro* con proteínas de *S. aureus* (α -hemolisina y SpA), y muestras de exudado nasal para el cultivo bacteriológico, detección y aislamiento de *S. aureus*.
- Grupo control:** se extrajo una **biopsia de la mucosa nasal del cornete medio**, que se utilizó para los estudios de estimulación celular *in vitro* con proteínas de *S. aureus*.

Los procedimientos incluidos en el esquema de trabajo se realizaron siguiendo un plan de actividades durante un periodo de cuatro años, desde 2017 hasta 2020 (Figura 18). El plan propuesto se dividió en cuatro actividades principales: i) Reclutamiento de pacientes y obtención de muestras; ii) Estimulación celular *in vitro*. Medida de citoquinas; iii) Estudio de las cepas de *S. aureus*; iv) Análisis estadístico.

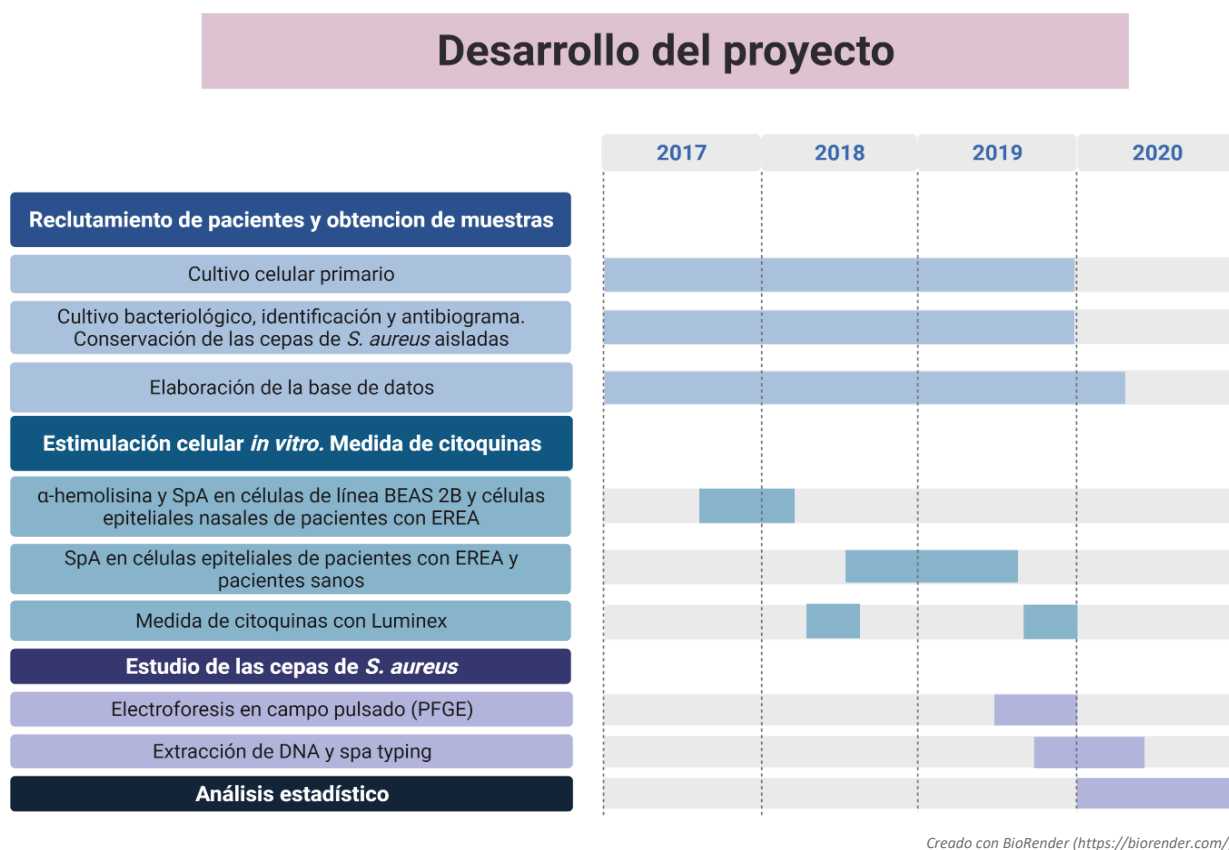


Figura 18. Plan de actividades para el desarrollo de los procedimientos incluidos en el esquema de trabajo.

2.2. Variables analizadas

Los datos clínicos y demográficos de los pacientes incluidos fueron aportados por los Servicios de Otorrinolaringología del CHGUV y del HUP La Fe, y/o tomados de la historia clínica electrónica. La información necesaria para la investigación propuesta se registró en una base de datos codificada, exclusiva para el estudio. Las variables analizadas se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7. Variables clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el grupo de estudio.

TIPOS DE VARIABLES	VARIABLES	DESCRIPCIÓN
DEMOGRÁFICAS	Edad	Númerica
	Sexo	Cualitativa
HÁBITOS TÓXICOS	Tabáquico ¹	Cualitativas
	Enólico	
	UDVP	
COMORBILIDADES ²	EPOC	Cualitativas
	Alergia	
	Inmunosupresión	
	DM	
	HTA	
	Enfermedad CV	
	IRC	
	Hepatopatía crónica	
PARÁMETROS FISIOPATOLÓGICOS	Cáncer	Cuantitativa
	Grado eosinofilia	
MANIFESTACIONES CLÍNICAS ⁴	Síntomas	Cualitativas
	Signos	
	Grado poliposis	
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO PREVIO	Corticoides	Cualitativas
	Antibióticos	
	Otros	
CIRUGÍA ENDOSCÓPICA	Episodios de CENS previos	Númerica

UDVP, usuario de drogas por vía parenteral; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; DM, *diabetes mellitus*; HTA, hipertensión arterial; CV, cardiovascular; IRC, insuficiencia renal crónica; CENS, cirugía endoscópica nasosinusal.

¹⁾ HABITO TABÁQUICO: Definiciones de fumador y exfumador tomadas del Manual Nacional de Abordaje del Tabaquismo de la OMS (255).

²⁾ COMORBILIDADES: Alergia (reacción de hipersensibilidad mediada por IgE frente a alimentos, polen, fármacos...); Inmunosupresión (afectación del sistema inmunológico, excepto neoplasia y terapia corticoidea); DM (hiperglucemia mantenida o glucemia en ayunas >126 mg/dL); HTA (elevación persistente de la presión arterial, PD>140 ml/Hg y/o PS >90ml/Hg); Enfermedad CV (insuficiencia cardíaca, cardiopatía o valvulopatía); IRC (documentada en la Historia Clínica Electrónica y/o alteración de parámetros analíticos como urea y/o creatinina).

³⁾ PARÁMETROS FISIOPATOLÓGICOS: Eosinofilia (expresado como nº eosinófilos/HPF).

⁴⁾ MANIFESTACIONES CLÍNICAS: Síntomas (duración e intensidad de los síntomas compatibles con PN en base a las Guías de Consenso (122,256)); Signos (presencia de pólipos y tamaño, y ocupación del espacio nasosinusal, datos tomados de la endoscopia o TC); Grado de poliposis: se utilizaron las escalas de Lildholdt y cols (tabla 2) y Lund y Makay (tabla 3).

3. MÉTODOS

3.1. Obtención de muestras

- a. **Grupo de estudio (EREA o ASA triada):** se recogieron, en el orden indicado, muestras de exudado y pólipos nasales (Tabla 8). Las muestras de exudado nasal se tomaron directamente, sin la adición previa de ningún tipo de sustancia química que pudiera inhibir el crecimiento microbiano. Para ello, se empleó una torunda de algodón con medio de transporte impregnada en solución salina estéril, la cual se introdujo en una fosa nasal y después en la contralateral, realizando movimientos rotatorios. Las muestras biopsias de pólipos nasales se obtuvieron mediante visión endoscópica.
- b. **Grupo control (pacientes sanos):** se tomaron **biopsias de la mucosa del cornete medio** al inicio de la septoplastia (Tabla 8).

Tabla 8. Transporte y conservación de las muestras utilizadas en el estudio.

	Muestra	Envase	Transporte Conservación	Utilidad
Grupo de estudio EREA	Pólipo nasal	Recipiente estéril con SF	≤2 h; 2-8°C ≤12 h; 2-8°C	Cultivo células epiteliales nasosinusales. Estimulación celular con proteínas de <i>S. aureus</i>
	Exudado nasal	Torunda con medio de transporte	≤2 h; TA ≤24 h; 2-8°C	Cultivo bacteriológico. Aislamiento <i>S. aureus</i>
Grupo control Pacientes sanos	Biopsia mucosa cornete medio	Recipiente estéril con SF	≤2 h; 2-8°C ≤12 h; 2-8°C	Ídem pólipo nasal

En el transporte y conservación de las muestras se hace referencia al tiempo (horas) y la temperatura recomendados hasta su procesamiento. SF, suero fisiológico; TA, temperatura ambiente

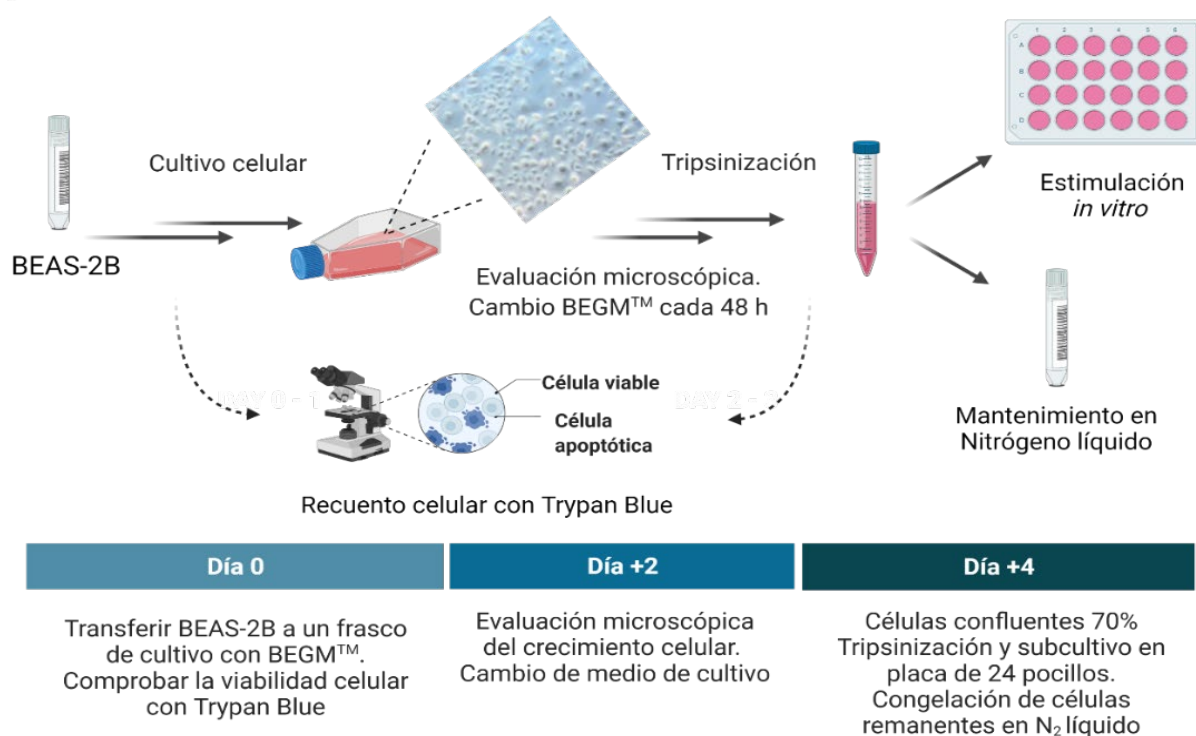
3.2. Modelo de estimulación celular *in vitro* con proteínas de *S. aureus*

3.2.1. Cultivo de la línea celular inmortalizada BEAS-2B

La línea celular inmortalizada no tumoral de epitelio bronquial humano BEAS-2B (257), fue adquirida de la 'European Collection of Authenticated Cell Cultures General Collection' (ECACC 95102433) para la realización de los experimentos. Se utilizó únicamente en la fase inicial

del estudio, con el objetivo de seleccionar las condiciones más favorables para los experimentos de estimulación celular *in vitro* posteriores.

Las células fueron cultivadas en frascos colagenizados de 25 cm² (10µg/cm² colágeno tipo I) con medio de crecimiento para epitelio bronquial (BEGM™, compuesto de medio basal para epitelio bronquial (BEBM) suplementado con extracto de pituitaria bovina 52 µg/mL, hidrocortisona 0.5 µg/mL, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF) 25 ng/mL, epinefrina 0.5 µg/mL, transferrina 10µg/mL, insulina 5 µg/mL, ácido retinoico 50 nM, triiodo-Ltironina 6.5 ng/mL, Gentamicina 40 µg/mL, Anfotericina B 50 ng/mL y albumina sérica bovina 1.5 µg/mL). Se incubaron a 37°C, con 5% CO₂ en atmósfera humidificada. El medio fue reemplazado cada 48 horas y, tras alcanzar una confluencia del 70% aproximadamente, se realizó un subcultivo en placas de 24 pocillos para el experimento de estimulación *in vitro*. La viabilidad celular, superior al 98%, se determinó por análisis de exclusión con Azul de Tripano empleando el contador celular automático Countness® (life technologies) (Figura 19).



Creado con BioRender (<https://biorender.com/>)

Figura 19. Cultivo de la línea celular inmortalizada BEAS-2B.

3.2.2. Cultivo celular primario de células epiteliales nasosinusales

El cultivo celular primario se realizó a partir de las muestras de pólipos nasales (grupo de estudio) y de las biopsias de la mucosa del cornete medio (grupo control).

Ambas muestras, embebidas en SF estéril, se fraccionaron en porciones de 5x5 mm aproximadamente y se depositaron en placas de 6 pocillos colagenizadas, cubriéndose con medio BEGM™. Los fragmentos de PN se orientaron con la capa epitelial en contacto con la placa de cultivo y se incubaron a 37°C, con 5% CO₂ en atmósfera humidificada.

El mantenimiento de los cultivos celulares se realizó cada 48 horas. Tras observar el estado del cultivo con un microscopio óptico (presencia/ausencia de células y contaminación microbiana, morfología celular y confluencia de las células), se realizó el cambio de medio lavando previamente con DPBS (tampón fosfato salino). Cuando la confluencia fue cercana al 100% y las células se disponían formando una monocapa, fueron subcultivadas en frascos de 25 cm² colagenizados (pase 1). Esta etapa se repitió sucesivamente hasta obtener la cantidad de células necesarias para los experimentos de estimulación. Finalmente, en el último subcultivo (pase 3-6), las células se depositaron en placas colagenizadas de 24 pocillos para la estimulación con proteínas de *S. aureus* (Figura 20). Las células epiteliales nasosinusales en monocapa fueron identificadas por criterios morfológicos. La viabilidad celular se determinó por análisis de exclusión con Azul de Tripano empleando el contador celular automático Countness® (life technologies). Los experimentos de estimulación celular se realizaron asegurando una viabilidad celular ≥98%.

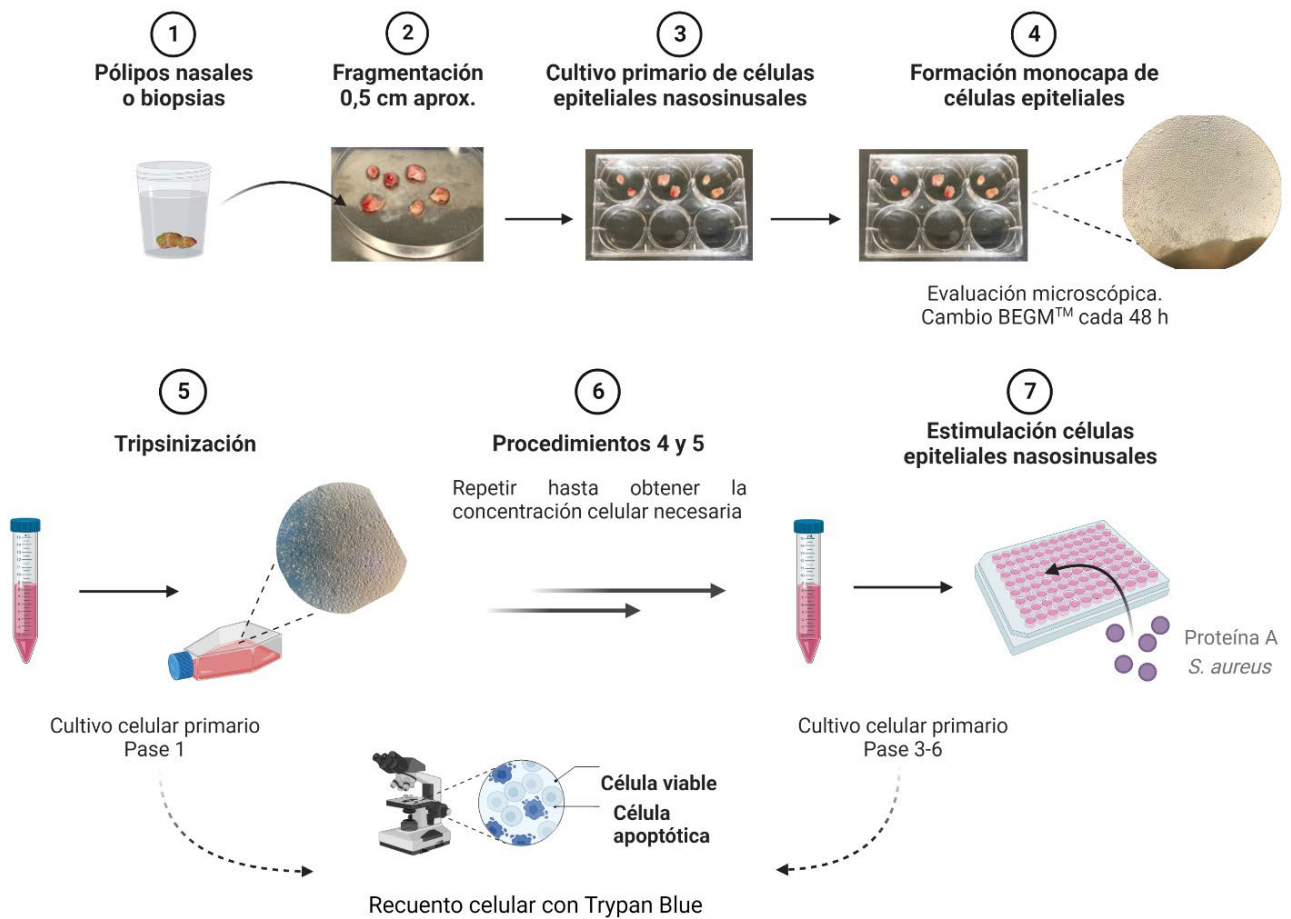
3.2.3. Estimulación de células epiteliales con proteínas de *S. aureus*

Con el objetivo de determinar la influencia de *S. aureus* en la liberación de citoquinas por parte de las células epiteliales nasosinusales, se llevaron a cabo estudios de estimulación celular *in vitro* en dos fases sucesivas, descritas a continuación.

a) FASE I: estimulación de células de línea BEAS-2B y células epiteliales nasosinusales de pacientes con EREA con α-hemolisina y SpA

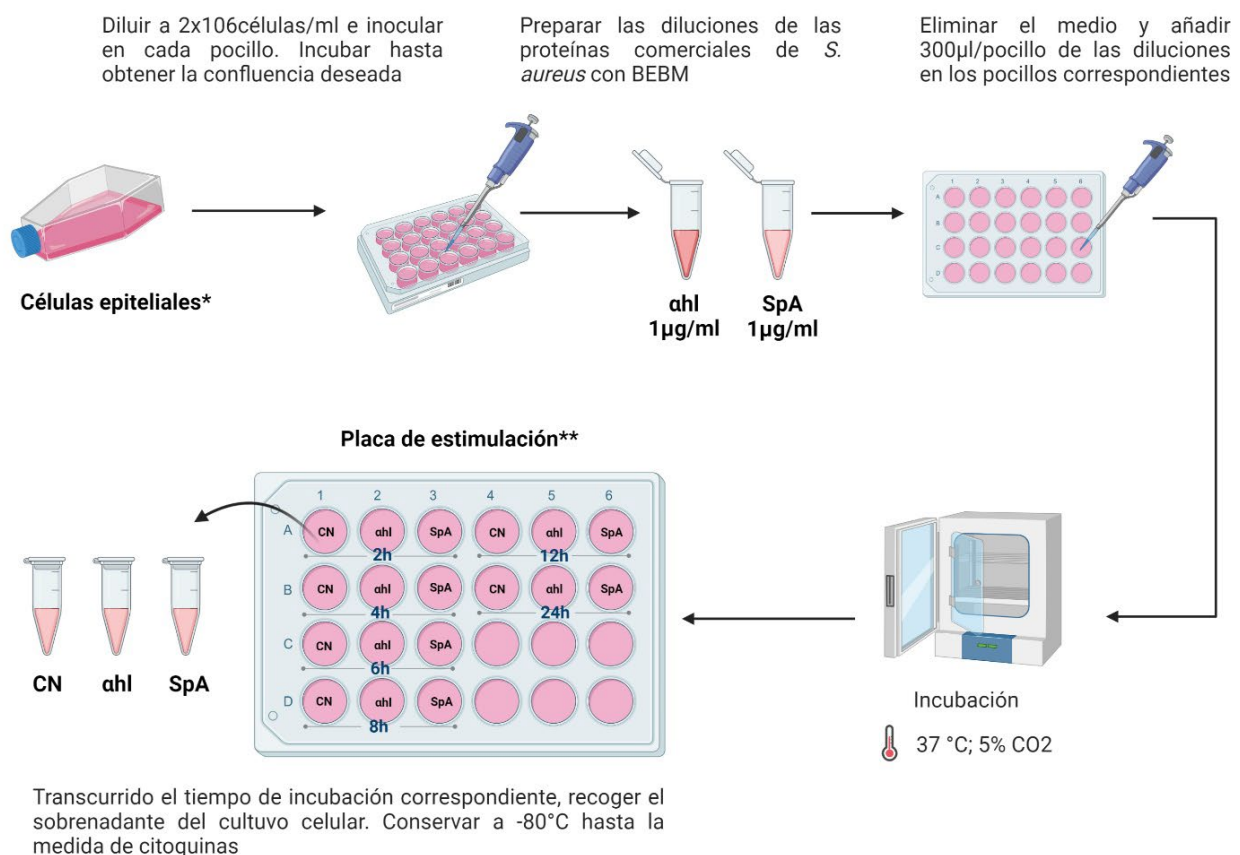
Las células epiteliales de línea BEAS-2B y las células epiteliales de pólipos nasales (CEPN) de pacientes con EREA (grupo de estudio), se cultivaron en placas colagenizadas de 24 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml con medio BEBM. Tras 24 horas de incubación, se llevó a cabo el protocolo de estimulación *in vitro* siguiendo las etapas mostradas en la Figura 21. Las

células fueron estimuladas con α -hemolisina (1 $\mu\text{g/ml}$) y SpA (1 $\mu\text{g/ml}$), durante diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas). Por cada tiempo se añadió un control negativo de células epiteliales sin estímulo, conteniendo únicamente BEBM.



Creado con BioRender (<https://biorender.com/>)

Figura 20. Etapas del cultivo celular primario de células epiteliales nasosinuales.



Creado con BioRender (<https://biorender.com/>)

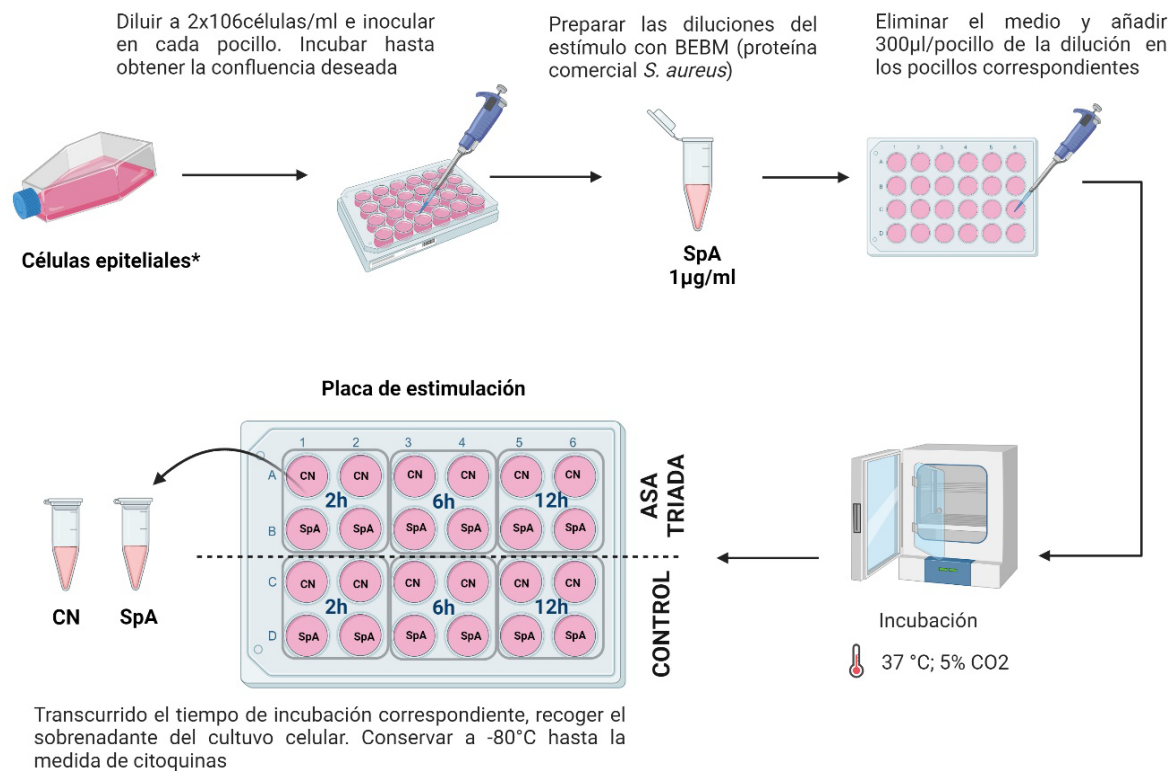
Figura 21. Fase I de los experimentos de estimulación celular *in vitro* con proteínas de *S. aureus*.

*Células de línea BEAS-2B (n= 3) y células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA, CEPN (n= 3). **Cada determinación se realizó por duplicado. ahl, α -hemolisina; SpA, proteína A de *S. aureus*; CN, control negativo.

b) FASE II: estimulación de células epiteliales nasosinusales con SpA

La finalidad de este ensayo fue determinar la influencia de SpA en la liberación de citoquinas por parte de las células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA. Como grupo control se emplearon células epiteliales obtenidas de biopsias de la mucosa del cornete medio de pacientes sanos sin patología nasosinusal.

Las células epiteliales en pase 3 fueron transferidas a placas colagenizadas de 24 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml con medio BEBM. Tras 24 horas de incubación, se llevó a cabo el protocolo de estimulación *in vitro* siguiendo las etapas mostradas en la Figura 22. Las células fueron estimuladas con SpA (1 µg/ml), durante diferentes tiempos (2, 6 y 12 horas). Por cada tiempo se añadió un control negativo de células epiteliales sin estímulo, conteniendo únicamente BEBM.



Creado con BioRender (<https://biorender.com/>)

Figura 22. Fase II de los experimentos de estimulación celular *in vitro* con proteínas de *S. aureus*.

*Células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n= 14) y células epiteliales obtenidas de biopsias de la mucosa del cornete medio de pacientes incluidos en el grupo control (n= 6). SpA, proteína A de *S. aureus*; CN, control negativo.

3.2.4. Medida de citocinas con Luminex® xMAP®

La técnica de inmunoensayo **Luminex® xMAP®** (*multi-analyte profiling*) permite analizar diferentes citoquinas simultáneamente empleando una pequeña cantidad del sobrenadante de cultivo celular (50 µl). Para ello, se utilizan micropartículas o microesferas magnéticas teñidas con una mezcla de dos fluorocromos, rojo e infrarrojo, a diferentes concentraciones. Se obtienen así hasta 100 microesferas distintas, cada una de las cuales puede conjugarse con un analito específico (Figura 23).

El método de detección de los analitos se fundamenta en la técnica de inmunoensayo tipo *sandwich*, diferenciándose tres etapas descritas a continuación y representadas en la Figura 24:

1. La muestra se añade a cada uno de los pocillos con las microesferas, previamente recubiertas con anticuerpos de captura específicos de los analitos. En presencia de los analitos, se produce la unión con el Ac específico.

2. Adición de un segundo Ac biotinilado, que se unirá al complejo Ac-analito. Adición de estreptavidina conjugada con ficoeritrina que permite la detección del complejo Ac-analito-Ac biotinilado.
3. La lectura de la reacción se realiza en un instrumento de detección de láser dual. El láser rojo permite clasificar la microesfera y determinar qué analito se está detectando, mientras que el láser verde, permite cuantificar la magnitud de la señal derivada de ficoeritrina, la cual es directamente proporcional a la cantidad de analito unido.

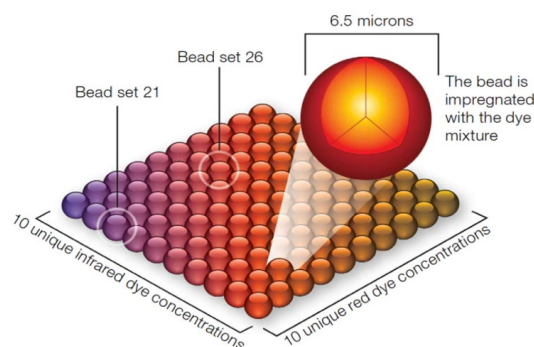


Figura 23. Tecnología Luminex® xMAP® basada en microesferas magnéticas teñidas con una mezcla de dos fluorocromos, rojo e infrarrojo.

Para la realización de este trabajo se emplearon los reactivos Milliplex de Millipore para citoquinas de alta sensibilidad (Tabla 9), así como el equipo Luminex 200® basado en citometría de flujo. El procedimiento experimental se realizó en un centro externo perteneciente a Rafer SL (Zaragoza, España). Las muestras congeladas a -80°C fueron enviadas en hielo seco, manteniendo las condiciones óptimas para el análisis.

La medida de las citoquinas tras los ensayos de estimulación celular, se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los estándares y controles se analizaron por duplicado al igual que las muestras (sobrenadante de cultivo celular), calculándose la concentración como el valor medio entre ambas determinaciones. Para el *background*, recta de calibración y controles se empleó el medio BEBM suplementado, siendo la composición idéntica a la empleada en los cultivos celulares. El análisis de los resultados se realizó con el software Luminex® xPonent® para Luminex 200® (xPonent 4.2).

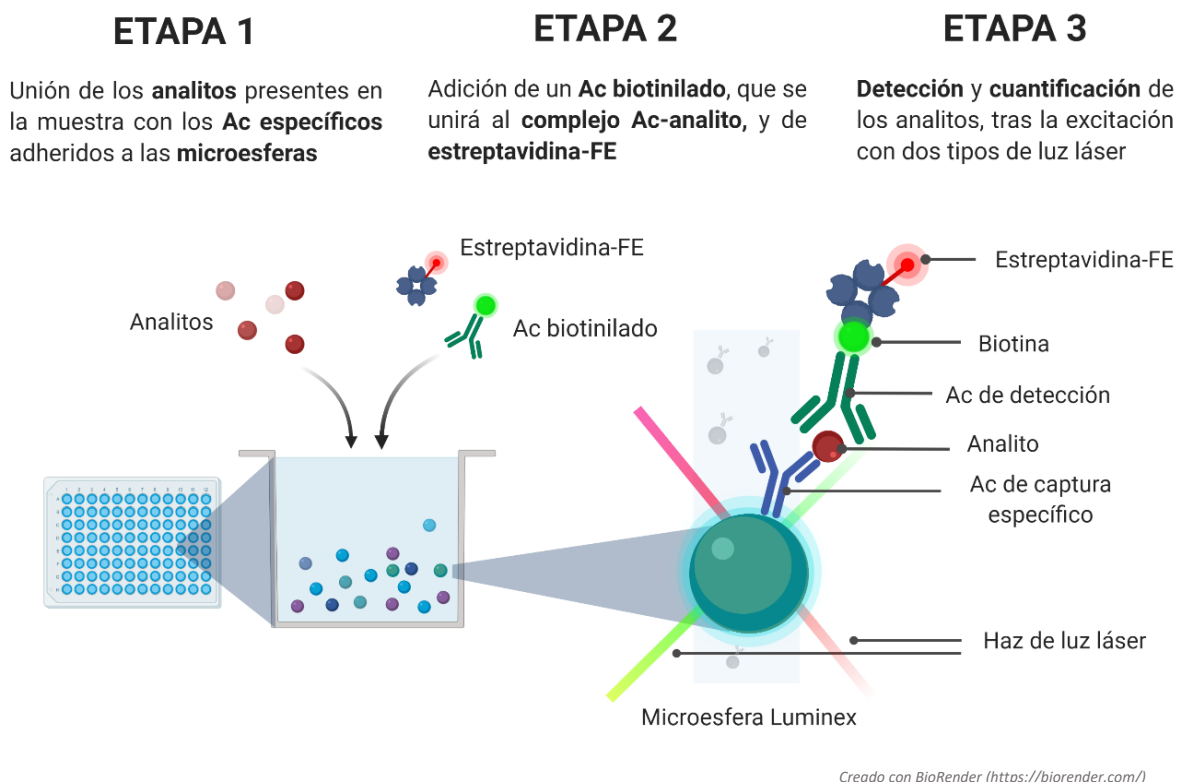


Figura 24. Fundamento de la tecnología Luminex® xMAP®.

Ac, anticuerpo; FE, ficoeritrina.

Tabla 9. Especificaciones de los paneles Milliplex Millipore para las citoquinas estudiadas.

PANEL		CMD	CMD + 2DS	CV	CV
		(pg/ml)	(pg/ml)	interensayo	intraensayo
A	IL-5	0,12	0,22	<5%	<20%
	IL-8	0,13	0,25	<5%	<15%
	IL-10	0,56	0,93	<5%	<20%
	IL-13	0,23	0,34	<5%	<20%
	IL-21	0,14	0,20	<5%	<15%
	IL-17A	0,33	0,52	<5%	<20%
	IFN-γ	0,48	0,94	<5%	<20%
B	IL-33	6,3	10,9	5%	11%

Panel A. Kit Human Magnetic High Sensitivity T Cell Panel Multiplex Assay (7 Plex); Panel B. Kit Map Human Th17 Magnetic (1 Plex). CMD, concentración mínima detectada; DS, desviación estándar; CV, coeficiente de variación.

3.3. Estudio microbiológico

3.3.1. Estudio microbiológico convencional

a) Cultivo bacteriológico

Las muestras de exudado nasal de los pacientes con EREA se utilizaron para el cultivo bacteriológico convencional. Para ello, la muestra se sembró en un medio de cultivo sólido no selectivo y en un medio líquido de enriquecimiento, Agar Triptona Soja (TSA) con sangre de carnero y *Brain Heart Infusion* (BHI), respectivamente. Tras 24-48 horas de incubación a 37°C en 5% CO₂, se procedió a la lectura de los cultivos. En ausencia de crecimiento a las 24 horas, se realizó una resiembra de BHI a TSA, el cual se incubó durante 24 horas en las mismas condiciones de temperatura y CO₂. En presencia de crecimiento, se procedió a la identificación de los microorganismos aislados, así como al estudio de sensibilidad de las cepas de *S. aureus*, las cuales fueron conservadas a -20°C en crioperlas específicas para cepas bacterianas, con el propósito de realizar estudios posteriores.

b) Identificación de los microorganismos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight*).

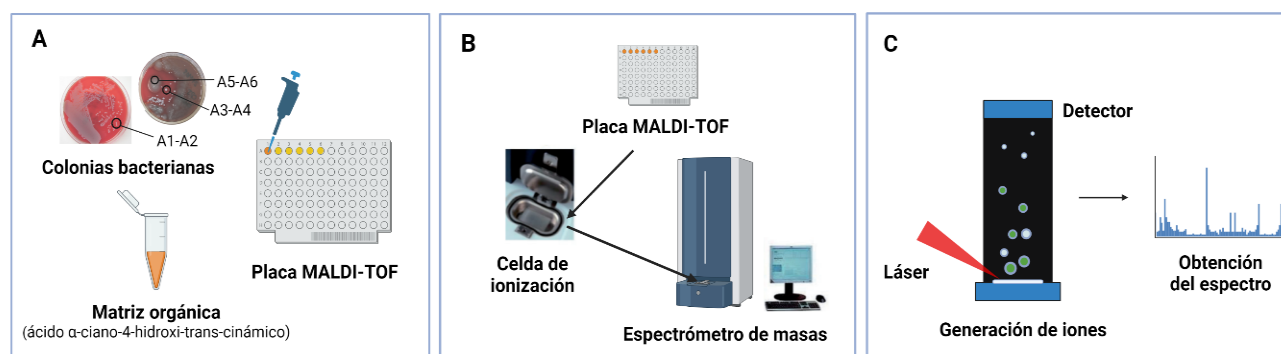
La espectrometría de masas MALDI-TOF, actualmente utilizada en la mayoría de los Servicios de Microbiología, destaca por su rapidez (minutos), sencillez y fiabilidad en la identificación de los microorganismos. El procedimiento y fundamento de la técnica se describen en la Figura 25. Los resultados proporcionados por MALDI-TOF (Bruker Daltonics®) se obtienen tras la comparación de espectros de proteínas, concretamente el adquirido tras la ionización suave de las muestras con un láser de nitrógeno (337 nm) y los espectros específicos de cada una de las especies almacenados en una base de datos de referencia, Maldi BioTyper® MicroFlex LT Bruker BD. En función del grado de concordancia de los espectros, se obtiene una relación de identificaciones a nivel de género y especie del microorganismo a estudio, con un porcentaje de probabilidad o *score*. El procedimiento e interpretación de resultados se realizó siguiendo las recomendaciones indicadas por el fabricante.

c) Estudio de sensibilidad antibiótica de *S. aureus*

Para el estudio de sensibilidad se empleó el sistema automatizado Microscan Walkaway (Beckman Coulter®). Se utilizaron los paneles específicos para bacterias grampositivas, Pos Combo Type 31 panel. Son microplacas de 96 pocillos en las que, de forma simultánea, se realiza la identificación bacteriana mediante pruebas fenotípicas y el estudio de sensibilidad antibiótica

por microdilución en caldo, obteniéndose la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada uno de los antibióticos estudiados. El procedimiento para la preparación de la suspensión bacteriana y su posterior inoculación en los paneles se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las CMIs de cada antibiótico se interpretaron siguiendo las guías internacionales *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) (258), las cuales permiten obtener una interpretación categórica de cada uno de los antibióticos estudiados como sensible, intermedio o resistente. Para comprobar valores de CMIs obtenidos por microdilución se emplearon tiras de gradiente de concentración. La sensibilidad a penicilina, cefoxitina y oxacilina también se determinó por disco-difusión, así como el fenotipo de resistencia a macrólidos (eritromicina y clindamicina).



Creado con BioRender (<https://biorender.com/>)

Figura 25. Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics®) a partir de colonias aisladas. Procedimiento y fundamento de la técnica.

A) la colonia bacteriana objeto de estudio se deposita de forma homogénea en uno de los pocillos de la placa metálica. Se deja secar y se recubre con 1 µL de la matriz orgánica. **B)** Una vez seca, la placa se introduce en la celda de ionización del espectrómetro de masas. **C)** Al incidir el láser, se produce la desorción e ionización de la muestra gracias a la presencia de la matriz orgánica. Los iones generados se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico y pasan por un analizador que los separa en función del ratio masa/carga (m/z). Este ratio determina el tiempo que tarda un ion en alcanzar el detector (tiempo de vuelo o *time of flight*, TOF). Finalmente, los iones impactan con el detector que recoge toda la información necesaria para elaborar el espectro correspondiente.

3.3.2. Detección de *S. aureus* por PCR Real-Time

Se realizó en muestras de exudado nasal de pacientes con EREA, empleando el sistema de diagnóstico molecular BDMAX™ (Becton Dickinson®), el cual permite integrar y automatizar todos los procesos de reacción (lisis celular, extracción de ácidos nucleicos y amplificación, y detección del producto amplificado mediante el uso de sondas).

Para este estudio se utilizó el kit comercial BD MAX™ StaphSR, prueba diagnóstica cualitativa para la detección sobre muestra directa y en la misma reacción, de *S. aureus* y de *S. aureus* resistente a meticilina. La diferenciación es posible por la detección de los genes *mecA* y *mecC*, responsables de la resistencia. La prueba también incluye la detección de la región de unión del casete *SSCmec*, así como un control interno incluido en el tubo de extracción. La descripción de los reactivos necesarios, incluidos los suministrados por el fabricante en el Kit BD MAX™ StaphSR, se muestra en la Tabla 10. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 10. Reactivos requeridos para la realización de la técnica de PCR Real-Time en la plataforma de diagnóstico molecular BDMAX™.

	Reactivo	Descripción
Kit BD MAX™ StaphSR	BD MAX™ StaphSR Master Mix	Mix de PCR con polimerasa, nucleótidos, sondas y cebadores específicos
	BD MAX™ StaphSR Reagent Strip	Tira de reactivos y puntas de pipeta desechables para el procesamiento de muestras y extracción del ADN
	BD MAX™ StaphSR Extraction Tube	Reactivo de extracción de ADN con bolas magnéticas y control interno
	BD MAX™ StaphSR Sample Buffer Tube (with 25 septum caps)	Tampón en el que se inoculan las muestras y tapones perforables
No suministrado	BD MAX™ PCR Cartridges	Soporte donde se realizan las reacciones de amplificación y detección

3.3.3. Tipado molecular de *S. aureus*

a) Electroforesis de Campo Pulsado

La Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) constituye uno de los métodos de tipado molecular más comúnmente empleados a lo largo de los años, principalmente asociado al estudio de brotes hospitalarios. Las principales desventajas radican en su alta exigencia técnica, el tiempo requerido y la limitada comparación entre los diferentes estudios al no disponer de un protocolo y nomenclatura comunes.

La PFGE se basa en la generación de fragmentos de restricción de gran tamaño, al digerir el ADN de una bacteria con enzimas endonucleasas de baja frecuencia de corte. Los patrones

obtenidos para las distintas cepas pueden ser comparados, pudiendo establecerse las relaciones genéticas entre ellas. Esta técnica fue aplicada por primera vez en *S. aureus* en el año 1995 por Bannerman *et al* (259). La enzima más comúnmente utilizada para la digestión del ADN cromosómico de *S. aureus* es *SmaI*. Sin embargo, el hallazgo de una variante genética no tipable por PFGE, pero si por MLST (*multilocus sequence typing*), perteneciente a la secuencia tipo ST398, ha dado lugar al estudio de otras enzimas como *XmaI*, *ApaI*, *BstZI*, *SacII* o *Cfr9I* (260–262). El hecho de que estas cepas sean no tipables por PFGE se debe a una metilación en las bases adenina y citosina que impide el corte por el enzima *SmaI* (260).

Para la realización de la técnica se siguió el protocolo descrito por Murchan *et al* (263) con algunas modificaciones (Figura 26):

ETAPA 1: Preparación de los bloques de agarosa

- i. **Lavado celular:** partiendo de un cultivo puro en placas de agar sangre (18-24 horas de incubación), se recogieron con asa de siembra aproximadamente 20 colonias de *S. aureus* y se disolvieron en 1 mL de tampón TEN (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0), NaCl 0,1M). Se agitó en vortex y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. Tras decantar, se resuspendió el sedimento en 1 mL de TEN.
- ii. **Ajuste de la concentración celular de *S. aureus*:** se preparó una suspensión bacteriana a una concentración 2,8-3,0 McFarland. Las cantidades aproximadas fueron 2 mL de TEN y 600 µL de la suspensión bacteriana de partida.
- iii. **Realización de los bloques:** se transfirió 1 mL de la suspensión bacteriana ajustada a un tubo Eppendorf®, que se centrifugó a 13.000 rpm 10 minutos. Tras desechar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió con 300 µL de TEN y se mezcló con 300 µL de agarosa líquida. La mezcla se dispersó en los moldes adecuados y se dejó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos hasta su completa solidificación. Los bloques fueron transferidos a tubos cónicos de 50 mL, conteniendo 3 mL de TEN, y conservados a 4°C hasta continuar con el procedimiento.

ETAPA 2: Extracción del ADN bacteriano

- i. **Solución de lisis:** se retiró el tampón TEN de los tubos conteniendo los bloques y se añadieron 3 mL de la solución de lisis (Tris-HCl 6 mM (pH 7,0), EDTA 100 mM, NaCl 1 M, Brij (éter polioxietilen) 0,5%, Na⁺ desoxicolato 0,2%), 30 µL de lisozima (100 mg/mL) y

150 µL de lisostafina (1mg/mL). Los tubos fueron incubados en baño termostatzado a 37 °C durante toda la noche.

- ii. **Solución de proteólisis:** se retiró la solución de lisis de cada uno de los tubos y se añadieron 1 mL de la solución de proteólisis (EDTA 0,25 M, sarcosyl (N-Lauril sarcosina) 1%) y 300 µL de proteinasa K (10 mg/mL). Los tubos se incubaron en baño termostatzado a 50 °C durante toda la noche.

ETAPA 3: Lavados y digestión enzimática del ADN bacteriano

- i. **Lavados del ADN bacteriano:** se eliminó la solución de proteólisis y se realizaron 4 lavados con 3 mL de tampón TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M). Los tubos se incubaron en estufa a 37 °C durante 45-60 minutos en el primer lavado, a temperatura ambiente durante 45-60 minutos en el segundo, y a temperatura ambiente durante 30-45 minutos en el tercero y en el cuarto. Tras el cuarto lavado, el tampón TE fue reemplazado por otros 3 mL de TE, permitiendo conservar los bloques a 4 °C hasta su utilización.
- ii. **Digestión enzimática del ADN bacteriano:** cada bloque se cortó por el extremo curvo, aproximadamente 1/3 de su tamaño, y se introdujo en un tubo Eppendorf® con 150 µL de tampón Tango 1X. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se retiró el tampón y se añadieron otros 150 µL de tampón Tango 1X y 30 UI de la enzima *Sma*I (lo que equivale a 3 µL). Los tubos se incubaron toda la noche a 30 °C en el termobloque.

ETAPA 4: Electroforesis

- i. **Preparación del gel de agarosa y adición de los bloques digeridos:** se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0,5X (TBE 10X: Tris-HCl 890 mM (pH 8,3), EDTA 20 mM (pH 8,0), ácido bórico 890 mM). La mezcla se dejó enfriar sobre la cubeta de electroforesis, la cual había sido previamente sellada y contenía el peine para el marcado de los carriles en el gel. Una vez solidificado, se retiró el peine y los bloques digeridos se colocaron en los carriles correspondientes, dejando la primera y la última posición libres para adicionar dos marcadores de peso molecular. Finalmente, los carriles se sellaron con agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X. Se dejó enfriar hasta la solidificación.
- ii. **Electroforesis en el instrumento CHEF-DR® III System (BioRad):** el gel se depositó en la cámara de electroforesis del equipo y se recubrió con aproximadamente 2 L de tampón

TBE 0,5X. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: voltaje 6 V/cm con pulsos de 5 a 15 segundos, a una temperatura de 12 °C durante 10 horas.

ETAPA 5: Tinción del gel y visualización. Análisis de los resultados

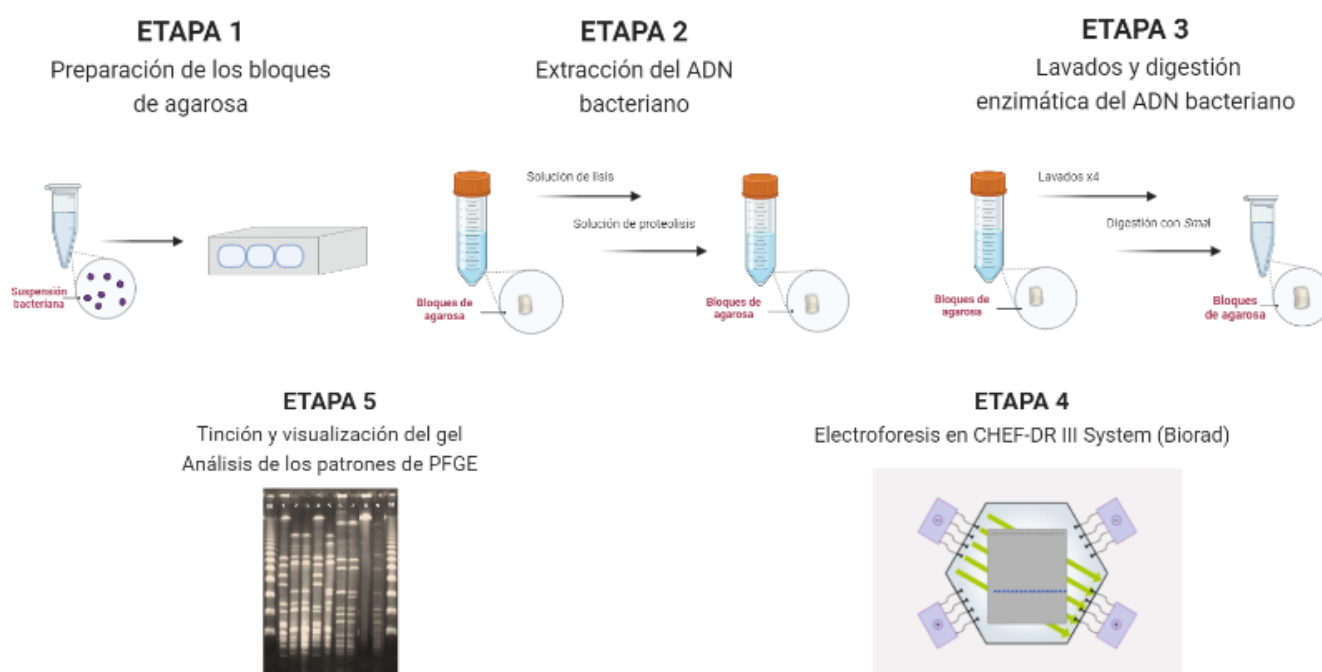
- i. **Tinción y visualización:** el gel se tiñó por inmersión, introduciéndolo en una solución acuosa de bromuro de etidio (10 µL de bromuro de etidio en 200 mL de agua destilada) durante 20 minutos en agitación. Después se visualizó con luz ultravioleta y, en función del resultado obtenido, se introdujo en agua destilada durante 20-30 minutos para reducir el grado de tinción.
- ii. **Análisis de los patrones de PFGE:** una vez obtenidos los perfiles electroforéticos de cada cepa, éstos fueron comparados e interpretados de forma visual y con el software PyElph versión 1.3 (264). La similitud entre las bandas fue analizada empleando el coeficiente de Dice [(número de bandas comunes entre dos muestras x 2 x 100) / (total número de fragmentos en las dos muestras)]. Los dendrogramas se construyeron con el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). Para clasificar los distintos patrones electroforéticos en grupos se siguieron los criterios de Tenover *et al* (265); se asignó una letra mayúscula a cada patrón de PFGE diferente (PFGE grupo) y números a los distintos subtipos dentro de un mismo patrón (PFGE tipo). Por subtipo se consideró aquellos patrones con tres o menos bandas de diferencia. El coeficiente de similitud se fijó en el 80% según las recomendaciones de Struelens *et al* (266). Para la comparación de bandas, solo se analizaron fragmentos delimitados por los marcadores de peso molecular.

b) Tipado de la región polimórfica del gen *spa*

La técnica “*spa-typing*” fue desarrollada en 1996 por Frenay *et al* (267). Se basa en la amplificación y posterior secuenciación de una región polimórfica del gen *spa*, que codifica la proteína A de *S. aureus*. Este gen sufre adiciones y/o pérdidas de los fragmentos repetidos, así como mutaciones espontáneas en estas regiones. De esta forma, analizando el número de repeticiones y su variabilidad se pueden asignar distintos tipos, o lo que se denomina “*spa-types*” (268).

Las cepas de *S. aureus* de pacientes con EREA se caracterizaron genéticamente según su tipo de *spa*. Previamente, se realizó la extracción del ADN bacteriano utilizando el sistema

automatizado MagNA Pure 24 (Roche). El procedimiento se realizó por duplicado, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación de la región polimórfica X del gen *spa* por PCR, con los *primers* 1095F (5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3') y 1517R (5'-GCTTTTGCAATGTCATTACTG-3') (269). El fragmento amplificado fue secuenciado por el método Sanger en el instrumento ABI 3500 (Applied Biosystems™). Finalmente, se realizó el análisis de las secuencias para la obtención de los *spa*-types en la plataforma web <http://www.spaserver.ridom.de/> desarrollada por Ridom GmbH y SeqNet.org (<http://www.SeqNet.org/>) (268).



Creado con BioRender (<https://biorender.com/>)

Figura 26. Etapas del proceso de electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Para preparar la suspensión bacteriana se partió de un cultivo puro de *S. aureus* en agar sangre incubado 18-24 horas (ETAPA 1). Tras adicionar la solución de lisis los tubos se incubaron *overnight* a 37°C. Tras adicionar la solución de proteólisis los tubos se incubaron *overnight* a 50°C (ETAPA 2). Para digerir el DNA cromosómico de *S. aureus* se empleó la enzima *Sma*I (ETAPA 3). La tinción del gel se realizó por inmersión en una solución acuosa de bromuro de etidio (ETAPA 5). Todos los reactivos empleados, así como su composición, se describen en el texto.

3.4. Análisis estadístico

Para el análisis de la población estudiada se calcularon media, mediana, desviación estándar e IQR. Los resultados de las variables cualitativas se expresaron en números absolutos (n) y porcentajes (%).

Los experimentos de estimulación celular, así como la cuantificación de citoquinas mediante Luminex®, se realizaron por duplicado. La concentración de cada uno de los analitos en las muestras se expresó como la media aritmética $\pm$ desviación estándar (s). Para comparar los resultados entre grupos (EREA vs CONTROL) se usó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, mientras que, para comparar los valores obtenidos dentro de un mismo grupo, se empleó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Finalmente, para los estudios de asociación se utilizó el método de correlación de rangos de Spearman. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para el análisis de los resultados se utilizó el software GraphPad Prism versión 7.04 (GraphPad Software Inc., CA, USA).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN

1.1. Datos demográficos

Se incluyeron en el estudio 56 pacientes con diagnóstico de RSCcPN, asma e intolerancia a AINEs (grupo EREA o ASA TRIADA), 34 (60,7%) procedentes del CHGUV y 22 (39,3%) del HUP La Fe. La mediana $\pm$ desviación estándar (s) (rango intercuartílico, IQR) de la edad fue de $55,5 \pm 10,63$ (50,25-63,00) años. El rango etario más numeroso fue el de los 50-59 años, con un 41,1% de los pacientes. En cuanto a la distribución por sexos, el número de hombres y mujeres fue muy similar, 26 (46%) y 30 (54%), respectivamente. Destacan las diferencias entre hombres y mujeres en cuanto a la distribución por edades, siendo la población femenina superior en el grupo de pacientes con más de 50 años e inferior en el de menos de 50 años (Figura 27). El 90% de las mujeres tenía más de 50 años, en comparación con el 61,5% de los hombres.

En el grupo control se incluyeron 20 pacientes. La mediana $\pm$ s (IQR) de la edad fue de $27 \pm 11,6$ (25-39) años. El número de hombres incluidos fue superior al de mujeres, siendo 14 (70%) y 6 (30%), respectivamente.

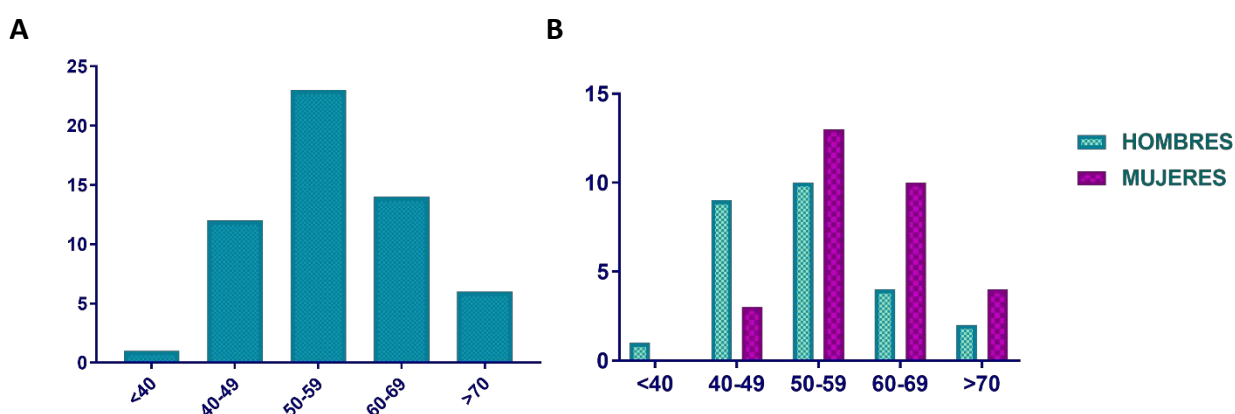


Figura 27. Distribución de los pacientes con EREA en función de la edad.

A) Número de pacientes por intervalo de edad. B) Número de pacientes por intervalo de edad y sexo.

1.2. Datos clínicos de los pacientes incluidos en el grupo de estudio

1.2.1. Hábitos tóxicos y comorbilidades

La mayoría de los pacientes incluidos en el grupo de estudio refirieron ser no fumadores (70%), sin hábitos enólicos (93%) ni uso de drogas por vía parenteral (100%). El 98% de los pacientes presentó alguna comorbilidad y en el 50% se encontraron dos o más factores de comorbilidad. La patología más frecuente fue la alergia (68%), siendo el polen, los fármacos y los ácaros los alérgenos más frecuentemente asociados. Otras comorbilidades halladas en un

porcentaje importante de la población fueron la hipertensión (43%), la dislipemia (32%) y la insuficiencia cardíaca (18%). Los resultados se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11. Hábitos tóxicos y comorbilidades de los pacientes con EREA incluidos en el estudio.

	PACIENTES EREA (n = 56)
Hábitos tóxicos	
TABACO	
Fumador	5 (9%)
Exfumador	12 (21%)
No fumador	39 (70%)
ENOL	4 (7%)
UDVP	0 (0%)
Comorbilidades	
Sin comorbilidades	1 (2%)
Dos o más	28 (50%)
Alergia	38 (68%)
EPOC	3 (5%)
<i>Diabetes mellitus</i>	8 (14%)
Hipertensión	24 (43%)
Dislipemia	18 (32%)
Insuficiencia cardíaca	10 (18%)
Insuficiencia renal crónica	2 (4%)
Hepatopatía crónica	2 (4%)
Neoplasias	0 (0%)

Los resultados se expresan como números absolutos (%). UDVP, uso de drogas por vía parenteral; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

1.2.2. Manifestaciones clínicas

a) Sintomatología

Los síntomas principales y que, con mayor frecuencia, se asocian a una peor calidad de vida de los pacientes con RSCcPN se enumeran en la Tabla 12. De todos ellos, la obstrucción/bloqueo/congestión nasal (80%) y la rinorrea (77%) fueron los más comúnmente reportados por los pacientes en el momento del estudio, seguidos del dolor/presión facial (50%) y la disminución del olfato/anosmia (48%).

Tabla 12. Síntomas y grado de poliposis de los pacientes con EREA incluidos en el estudio.

	PACIENTES EREA (n = 56)
Síntomas	
Obstrucción/bloqueo/congestión nasal	45 (80%)
Rinorrea	43 (77%)
Dolor/presión facial	28 (50%)
Cefalea	21 (38%)
Disminución del olfato/anosmia	27 (48%)
Dolor ótico/acúfenos/hiposmia	17 (30%)
Disnea	18 (32 %)
Otros	11 (20%)
Grado de poliposis	
Grado 0	0 (0%)
Grado 1	8 (14%)
Grado 2	21 (38%)
Grado 3	27 (48%)

Los resultados se expresan como números absolutos (%).

b) Grado de poliposis

El grado de poliposis se evaluó mediante endoscopia nasal, aplicando la escala de Lildholdt y cols (123). El 86% de los pacientes (n= 48) se clasificaron en grado 2/3 (Tabla 12), por lo que el valor medio en la población estudiada fue alto, igual a 2,34. La distribución de los pacientes en función del grado de poliposis se muestra en la Figura 28.

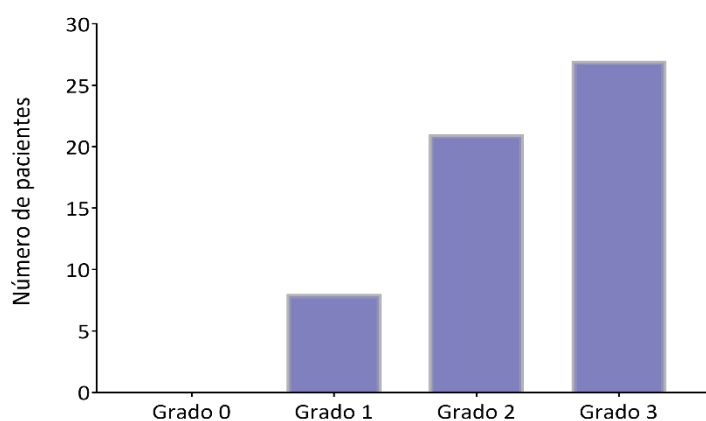


Figura 28. Distribución de los pacientes con EREA en función del grado de poliposis.

1.2.3. Tratamiento farmacológico

a) Tratamiento con corticoides

Todos los pacientes incluidos en el estudio habían recibido corticoides inhalados, siendo mometasona furoato, fluticasona propionato y fluticasona furoato los principios activos más frecuentemente administrados. En el 64% de los pacientes (n= 36) se habían incluido pautas cortas de corticoides sistémicos durante la terapia, más comúnmente dexametasona o prednisona. El 32% de los pacientes (n= 18) se consideró resistente a la terapia corticoidea en el momento de su inclusión en el estudio.

b) Tratamiento con antibióticos

Ningún paciente incluido en el estudio había recibido terapia antibiótica en los tres meses previos. Antes de dicho periodo, el 80% (n= 45) de los pacientes había recibido, al menos, una pauta de antibiótico durante el curso de la enfermedad. De éstos, el 56% había recibido dos o más tandas de tratamiento antibiótico. Teniendo en cuenta la última pauta de tratamiento antibiótico prescrita en cada paciente (n= 45), los más comúnmente utilizados fueron los macrólidos, concretamente la claritromicina (n= 26), seguido de azitromicina (n= 8). Otros antibióticos administrados con relativa frecuencia fueron amoxicilina/clavulánico (n= 7) y levofloxacino (n= 4) (Figura 29).

c) Otros fármacos

En el momento de la inclusión de los pacientes en el estudio, el 9% (n= 5) estaban en tratamiento con omalizumab y el 7% (n= 4) eran candidatos para ser tratados con dicho fármaco.

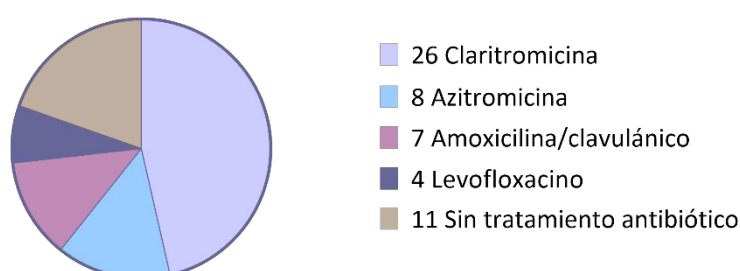


Figura 29. Antibióticos prescritos a los pacientes con EREA (n= 56) durante el periodo previo a su inclusión en el estudio (>3 meses).

1.2.4. Episodios de cirugía endoscópica nasosinusal previos

El promedio de los episodios de CENS realizados antes de la inclusión de los pacientes en el estudio fue de $1,04 \pm 0,96$ (media $\pm$ s). En el 28,6% (n= 16) de los casos no se había realizado

ninguna CENS previa; en el 42,8% (n= 24) se había registrado 1 episodio de CENS previo, y en el 28,6% restante (n= 16) se habían realizado dos o más cirugías previas (Figura 30), lo cual supone una alta tasa de recurrencia de poliposis tras la cirugía.

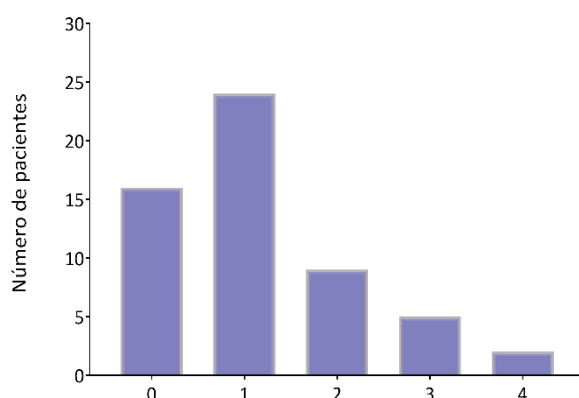


Figura 30. Episodios de CENS previos a la inclusión de los pacientes en el estudio.

2. ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE ESTIMULACIÓN CELULAR Y MEDICIÓN CUANTITATIVA DE CITOQUINAS

Para determinar las condiciones idóneas de estimulación, así como la capacidad de producción de citoquinas por células epiteliales en respuesta a las proteínas de *S. aureus*, α -hemolisina y SpA, se llevaron a cabo experimentos independientes, basados en las mismas condiciones, con células de línea BEAS-2B, que se utilizaron como control basal de estimulación, y células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA.

Tras distintos tiempos de estimulación (2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas), se determinó la concentración de citoquinas (IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-5, IL-33 e IL-8) con Luminex® en los sobrenadantes de cultivo celular, conteniendo α -hemolisina (1 μ g/ml), SpA (1 μ g/ml) y medio BEBM sin estímulo, obteniéndose las cinéticas de liberación descritas a continuación y representadas en las Figuras 31 y 32. Los resultados obtenidos en cada tiempo fueron expresados como media [SD]. Las curvas de calibración para cada una de las citoquinas se muestran en el Anexo V.

En esta fase del estudio se emplearon un total de 36 muestras de pólipos nasales procedentes de 36 pacientes con EREA. Sin embargo, únicamente se pudo realizar la etapa final de estimulación celular *in vitro* con tres muestras.

2.1. Cinética de liberación de citoquinas en células BEAS-2B

Los resultados obtenidos tras la estimulación *in vitro* de células BEAS-2B con las proteínas de *S. aureus*, α -hemolisina y proteína A (SpA), se detallan en la Figura 31.

La estimulación con α -hemolisina provocó la liberación de IL-8, pero no la de IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-13, IL-21, IL-5 e IL-33. Del mismo modo, la respuesta a SpA fue limitada en las células BEAS-2B, dando lugar a un aumento discreto de los niveles de IFN- γ , IL-17A e IL-8, pero no de IL-10, IL-13, IL-21, IL-5 e IL-33.

En respuesta a α -hemolisina, la producción de IL-8 en las células BEAS-2B fue intensa y caracterizada por una cinética tiempo-dependiente (Fig. 31 H). El aumento de la concentración se detectó tras 8 horas de estimulación, siendo muy superior en comparación con BEBM (sin estímulo) a las 12 horas (7786,90 [333,70] pg/ml α -hemolisina vs 1637,39 [137,43] pg/ml BEBM) y a las 24 horas (9576,05 [251,20] pg/ml α -hemolisina vs 2043,03 [134,29] pg/ml BEBM). Por el contrario, los niveles de IL-8 tras la estimulación con SpA (Fig. 31 H) fueron bajos e incluso inferiores a los obtenidos en las células con BEBM, independientemente del tiempo (a las 24 horas: 1863,61 [139,14] pg/ml SpA vs 2043,03 [134,29] pg/ml BEBM).

La estimulación de las células BEAS-2B con SpA dio lugar a un aumento moderado de IFN- γ (Fig. 31 A) e IL-17A (Fig. 31 D). En ambos casos, los niveles se mantuvieron muy estables en el tiempo y las concentraciones fueron más altas entre las 4 y 12 horas, exceptuando el descenso marcado en la concentración de IFN- γ a las 8 horas.

2.2. Cinética de liberación de citoquinas en CEPN de pacientes con EREA

Los resultados obtenidos tras la estimulación *in vitro* de las CEPN con las proteínas de *S. aureus*, α -hemolisina y proteína A (SpA), se detallan en la Figura 32.

α -hemolisina indujo un efecto muy leve, dando lugar a un aumento discreto de los niveles de IL-13, IL-21 e IL-8, pero sin provocar ninguna respuesta en la liberación de IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-21, IL-5 e IL-33. Por el contrario, la estimulación con SpA indujo la liberación de todas las citoquinas analizadas, excepto de IL-33 e IL-5.

El incremento de IL-13 (Fig. 32 C) e IL-21 (Fig. 32 E) en respuesta a α -hemolisina fue leve y corto en el tiempo; los niveles aumentaron a las 2 horas y disminuyeron rápidamente a las 4 horas, alcanzando niveles similares o incluso inferiores a las células con BEBM (IL-13 a las 2 horas: 171,50 [5,75] pg/ml α -hemolisina vs 88,45 [5,23] pg/ml BEBM; IL-13 a las 4 horas: 91,88

[7,04] pg/ml α -hemolisina vs 86,57 [5,31] pg/ml BEBM; IL-21 a las 2 horas: 172,78 [17,82] pg/ml α -hemolisina vs 90,29 [17,48] pg/ml BEBM; IL-21 a las 4 horas: 17,84 [12,06] pg/ml α -hemolisina vs 57,73 [10,39] pg/ml BEBM).

A diferencia de lo observado en las células BEAS-2B, la estimulación de las CEPN con α -hemolisina no provocó un incremento significativo de IL-8 con el tiempo de exposición y los niveles fueron muy inferiores a los obtenidos en ausencia de estímulo (Fig. 32 H) (a las 24 horas de estimulación: 1159,45 [143,13] pg/ml α -hemolisina vs 11599,76 [283,25] pg/ml BEBM).

En respuesta a SpA, las CEPN liberaron IFN- γ , IL-17A e IL-21, alcanzando niveles muy superiores a los obtenidos en las células con BEBM, independientemente del tiempo de estimulación (Fig. 32 A, Fig. 32 D y Fig. 32 E, respectivamente). El perfil de liberación de las tres citoquinas se caracterizó por presentar niveles máximos a tiempos cortos de exposición al estímulo, con una tendencia descendente a partir de las 12 horas en IFN- γ e IL-17A, y a partir de las 8 horas en IL-21.

La liberación de IL-10 en células estimuladas con SpA, representada en la Fig. 32 B, fue intensa tras 12 horas de exposición al estímulo, aumentando de 33,70 [7,40] pg/ml a las 8 horas hasta los 183,92 [10,49] pg/ml a las 12 horas. A las 24 horas, los niveles de IL-10 disminuyeron hasta los 32,45 [6,53] pg/ml.

A su vez, la producción de IL-13 en células estimuladas con SpA, se caracterizó por ser más elevada a tiempos cortos (Fig. 32 C), al igual que lo observado con α -hemolisina. El patrón también fue similar, pero con niveles más altos a las 8 horas (76,83 [11,74] pg/ml SpA vs 46,75 [5,01] pg/ml α -hemolisina) y a las 12 horas (48,50 [6,08] pg/ml SpA vs 6,79 [2,50] pg/ml α -hemolisina).

Por último, en cuanto a la producción de IL-8 en las CEPN (Fig. 32 H), se observó un incremento de la concentración con el tiempo de estimulación. Sin embargo, los niveles de IL-8 fueron muy superiores en las células sin estímulo (BEBM) en comparación con SpA, principalmente a las 12 y 24 horas (a las 12 horas: 8607,36 [138,37] pg/ml con BEBM vs 5345,12 [202,70] pg/ml con SpA; a las 24 horas: 11599,76 [283,25] pg/ml con BEBM vs 7880,61 [153,85] pg/ml con SpA).

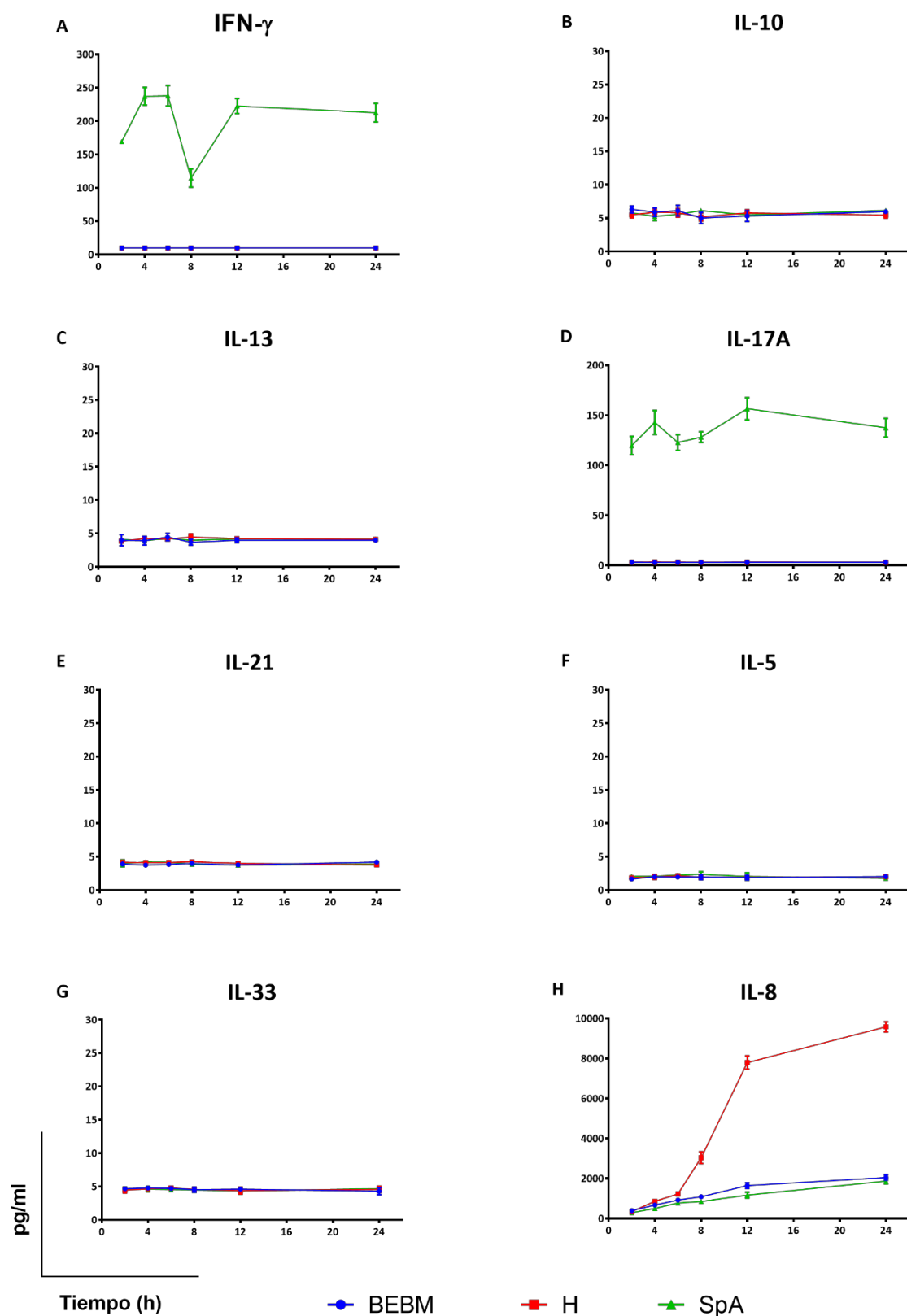


Figura 31. Patrón de liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D), IL-21 (E), IL-5 (F), IL-33 (G) e IL-8 (H), en cultivos celulares de línea BEAS-2B (n= 3) tras la estimulación con α -hemolisina y SpA.

La concentración de citoquinas (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo celular, conteniendo 1 μ g/ml de α -hemolisina, 1 μ g/ml de SpA y medio BEBM sin estímulo, fue determinada con Luminex® a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Los resultados se expresan como media [SD]. BEBM, medio de crecimiento para epitelio bronquial; H, α -hemolisina; SpA, proteína A.

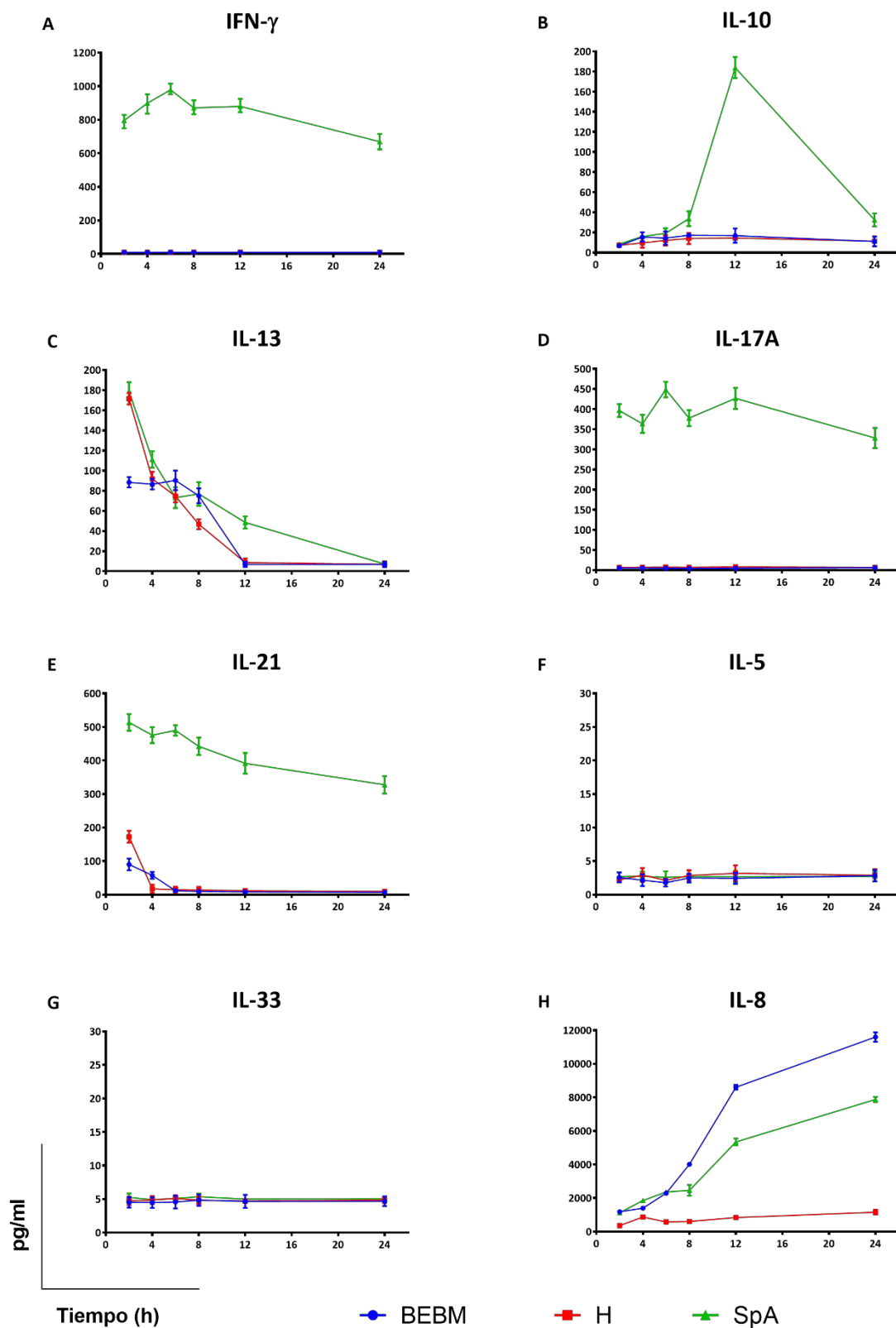


Figura 32. Patrón de liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D), IL-21 (E), IL-5 (F), IL-33 (G) e IL-8 (H), en cultivos primarios de células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n= 3), tras la estimulación con α -hemolisina y SpA.

La concentración de citocinas (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo celular, conteniendo 1 μ g/ml de α -hemolisina, 1 μ g/ml de SpA y medio BEBM sin estímulo, fue determinada con Luminex® a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Los resultados se expresan como media [SD]. BEBM, medio de crecimiento para epitelio bronquial; H, α -hemolisina; SpA, proteína A.

2.3. Selección de las condiciones experimentales

Las condiciones de estimulación para los experimentos posteriores se establecieron en función de las cinéticas de liberación de citoquinas en las células BEAS-2B y en las CEPN de pacientes con EREA. Debido al mayor efecto de la proteína A de *S. aureus* sobre las CEPN se seleccionó esta proteína como estímulo a una concentración de 1 µg/ml.

En cuanto al tiempo de estimulación, al observarse diferencias de tendencia en las citoquinas analizadas, se consideraron diferentes tiempos, concretamente 2, 6 y 12 horas.

Se decidió excluir la proteína estafilocócica α-hemolisina (1 µg/ml), debido a la limitada respuesta de las CEPN, en relación con las citoquinas analizadas durante el tiempo de exposición al estímulo.

3. LIBERACIÓN DE CITOQUINAS INDUCIDA POR SpA EN CÉLULAS EPITELIALES DE PÓLIPOS NASALES

Para determinar el efecto de SpA en la producción de citoquinas por parte de las CEPN de pacientes con EREA, se llevó a cabo un experimento de estimulación celular *in vitro*. Las condiciones de estimulación se establecieron en función de los resultados obtenidos en el estudio inicial (ver apartado 2).

En esta fase del estudio se emplearon 20 muestras de pólipos nasales de 20 pacientes con EREA, realizándose la etapa final de estimulación con SpA en 14 de ellas. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 13.

Tras 2, 6 y 12 horas de estimulación con SpA (1 µg/ml), se determinó la concentración de citoquinas (IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-5, IL-33 e IL-8) con Luminex® en los sobrenadantes de cultivo celular en presencia y ausencia de estímulo (BEBM).

La estimulación con SpA indujo cambios en la concentración de todas las citoquinas analizadas, excepto en IL-10 (a las 2 y 6 horas), IL-5 e IL-33. Por el contrario, en las células tratadas con BEBM, solo se observó producción de IL-8 y, muy discretamente, de IL-13 e IL-10 (a las 12 horas). Las curvas de calibración y los resultados obtenidos para cada una de las citoquinas analizadas se muestran en los Anexos VI y VII, respectivamente. Las cinéticas de liberación de las citoquinas producidas en respuesta a SpA se muestran en las Figuras 33-36 y se describen a continuación.

Tabla 13. Características demográficas y clínicas de los pacientes con EREA en los que se ha realizado el experimento de estimulación celular *in vitro* con SpA.

No.	Edad/Sexo	Alergias	Microbiología (Exudado nasal)	Eosinofilia tisular (Eos/HPF)	IgE total suero (kUA/l)
1	63/F	Polen Gramíneas Ciprés	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	60	373
2	71/M	Ácaros Olivo Pelo gato	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. hominis</i>	110	452
3	50/F	Polen	<i>S. aureus</i> <i>S. hominis</i>	70	208
4	41/F	No	<i>C. parapsilosis</i> ECN diferentes	50	425
5	67/F	No	<i>P. mirabilis</i> <i>S. epidermidis</i>	60	382
6	51/M	Ácaros Pelo gato y perro	<i>S. pyogenes</i> <i>S. epidermidis</i>	100	586
7	62/M	Olivo Gramíneas	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	50	426
8	51/M	No	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. capitis</i>	90	465
9	88/M	Ácaros Polen	<i>C. parapsilosis</i> ECN diferentes	100	763
10	49/M	No	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	40	774
11	43/M	Ácaros Pelo gato	<i>S. aureus</i> <i>A. niger</i> <i>S. epidermidis</i>	60	286
12	52/F	Ácaros Polen Pelo perro	<i>M. catarrhalis</i> <i>S. epidermidis</i>	30	262
13	47/M	No	<i>S. lugdunensis</i> Otros ECN diferentes	80	139
14	68/M	No	<i>S. aureus</i> <i>Corynebacterium spp</i>	50	385

En la tabla se especifican alérgenos biológicos, no químicos. El número de eosinófilos presentes en el pólipio nasal se determinó como número de eosinófilos/HPF o campo de alta potencia (10 x 40). F, femenino; M, masculino; ECN, estafilococos coagulasa-negativos; SD, sin datos; HPF, *high power field*; kUA, kilounidades.

3.1. SpA induce la liberación de IFN- γ , IL-21 e IL-17A

En las CEPN de pacientes con EREA, la estimulación con SpA (1 μ g/ml) durante 2, 6 horas y 12 horas, provocó un aumento significativo de IFN- γ , IL-21 e IL-17A en comparación con BEBM ($P < 0,0001$) (Figura 33). En el caso de IFN- γ (Fig. 33 A) e IL-17A (Fig. 33 C), la concentración fue

significativamente superior a las 6 y 12 horas, en comparación con las 2 horas (IFN- γ : $P=0,0006$ y $P=0,008$ a las 6 y 12 horas, respectivamente; IL-17A $P=0,0002$ y $P=0,002$ a las 6 y 12 horas, respectivamente). En cambio, la producción de IL-21 en respuesta a SpA (Fig. 33 B), fue más intensa y estadísticamente significativa a las 2 y 6 horas, en comparación con las 12 horas ($P=0,007$ y $P=0,0004$ a las 2 y 6, respectivamente).

3.2. SpA induce la liberación de IL-10

En las CEPN de pacientes con EREA, la producción de IL-10 fue nula a las 2 y 6 horas, tanto en células con SpA como en células no estimuladas (BEBM). Por el contrario, a las 12 horas, se observó un aumento moderado de IL-10 en presencia de SpA (1 $\mu\text{g/ml}$), estadísticamente significativo en comparación con BEBM ($P<0,001$) (Figura 34).

3.3. SpA induce la liberación de IL-13

En las CEPN de pacientes con EREA, la estimulación con SpA (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 2, 6 horas y 12 horas, provocó un aumento significativo de IL-13 en comparación con BEBM (2 horas: $P<0,001$; 6 horas: $P=0,004$; 12 horas: $P=0,017$). El incremento de IL-13 fue mayor a las 2 horas y estadísticamente significativo en relación con la concentración alcanzada a las 6 y 12 horas ($P<0,001$) (Figura 35).

3.4. SpA reduce la producción basal de IL-8

En las CEPN de pacientes con EREA, la concentración de IL-8 aumentó de forma significativa en función del tiempo, tanto en células estimuladas con SpA como en las células sin estímulo ($P<0,001$), alcanzando niveles muy elevados a las 12 horas. Curiosamente, la concentración de IL-8 fue significativamente más baja en las células estimuladas con SpA en comparación con las células sin estímulo, conteniendo únicamente BEBM ($P<0,001$) (Figura 36).

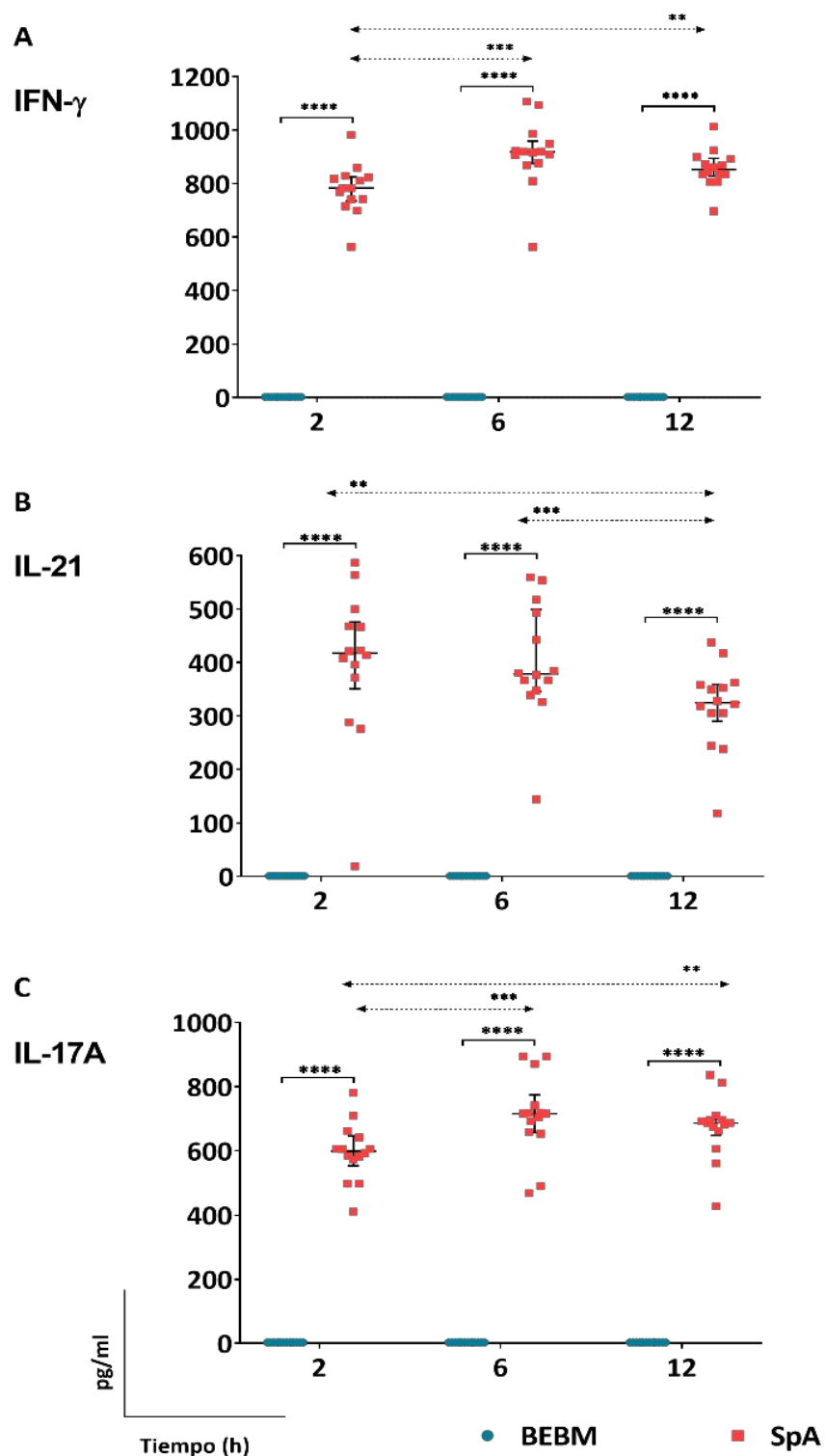


Figura 33. Efecto de SpA (1 μ g/ml) en la liberación de IFN- γ (A), IL-21 (B) e IL-17A (C) por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). Se compararon los niveles de citoquinas en los diferentes tiempos entre las células estimuladas con SpA y las células sin estímulo (BEBM). También se determinaron las diferencias entre los tiempos (líneas discontinuas). La significación estadística (P valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon. ** P <0,01; *** P <0,001; **** P <0,0001

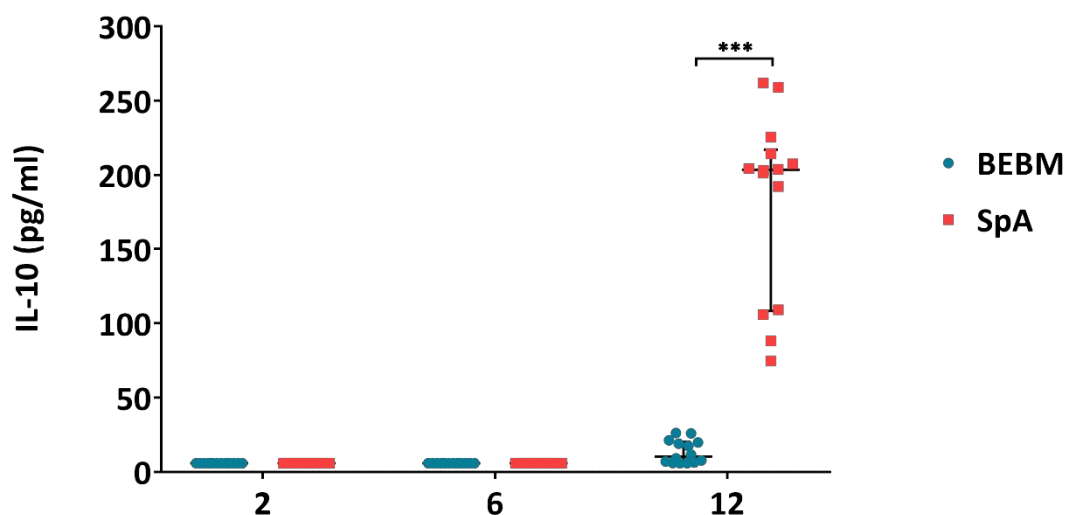


Figura 34. Efecto de SpA en la liberación de IL-10 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). Se compararon los niveles de citoquinas a las 12 horas, entre las células estimuladas con SpA y las células sin estímulo (BEBM). La significación estadística (*P* valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon. ****P* <0,001

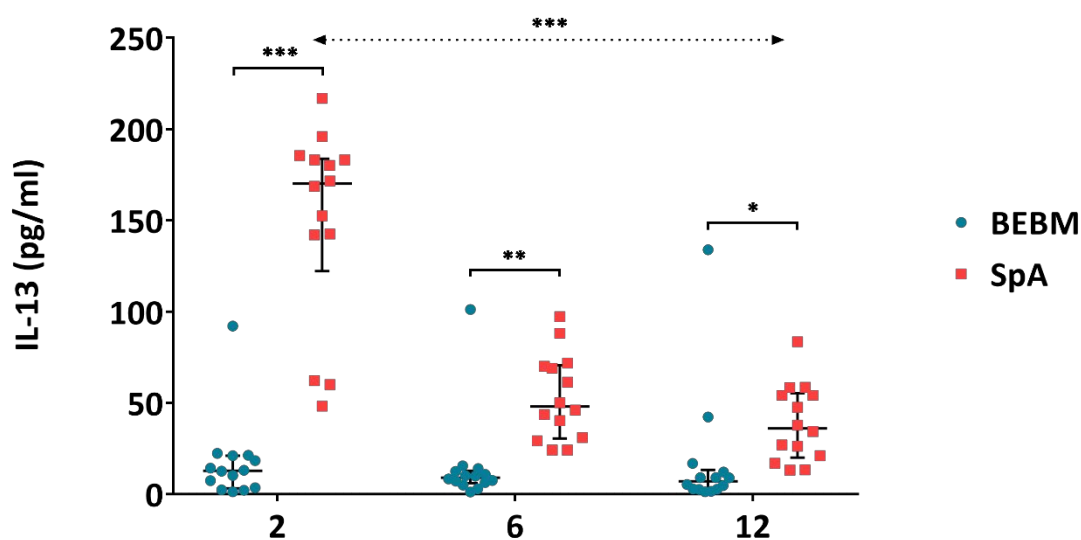


Figura 35. Efecto de SpA (1 µg/ml) en la liberación de IL-13 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). Se compararon los niveles de IL-13 en los diferentes tiempos entre las células estimuladas con SpA y las células sin estímulo (BEBM). También se determinaron las diferencias entre los tiempos (líneas discontinuas). La significación estadística (*P* valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon. **P* <0,05; ***P* <0,01; ****P* <0,001

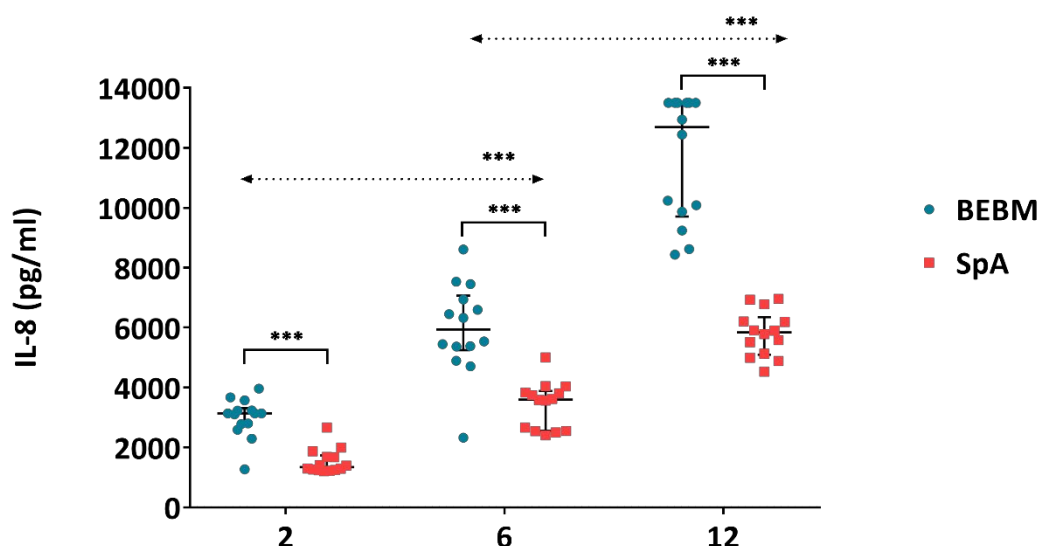


Figura 36. Efecto de SpA (1 µg/ml) en la producción de IL-8 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) a las 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). Se compararon los niveles de IL-8 en los diferentes tiempos entre las células estimuladas con SpA y las células sin estímulo (BEBM). También se determinaron las diferencias entre los tiempos (líneas discontinuas). La significación estadística (*P* valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon. ****P* <0,001.

4. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS INDUCIDA POR SpA EN CULTIVOS CELULARES DE LOS GRUPOS EREA Y CONTROL

Para determinar si la proteína A de *S. aureus* es capaz de influir en la respuesta inflamatoria típica de la EREA, el modelo experimental de estimulación celular con SpA se realizó de forma simultánea, empleando las mismas condiciones, con células epiteliales de biopsias del cornete medio (CECNM) de pacientes sin patología inflamatoria nasosinusal (grupo control).

Los cultivos celulares primarios se realizaron en 20 muestras de biopsias del cornete medio de 20 pacientes incluidos en el grupo control, 70% hombres y 30% mujeres. La mediana $\pm$ s (IQR) de la edad fue de $27 \pm 11,6$ (25-39) años. De estas 20 muestras, se pudo realizar la etapa final de estimulación con SpA en 6 de ellas.

Tras 2, 6 y 12 horas de estimulación con SpA (1 µg/ml) se determinó la concentración de citoquinas (IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-5, IL-33 e IL-8) con Luminex® en los sobrenadantes de cultivo celular en presencia y ausencia de estímulo (BEBM).

La estimulación con SpA provocó un aumento de la concentración de todas las citoquinas analizadas en las CECNM de pacientes control, excepto de IL-10 (a las 2 y 6 horas), IL-13, IL-5 e

IL-33. Sin embargo, como se muestra en las Figuras 37-39, la respuesta fue más leve que la obtenida en las CEPN de pacientes con EREA. En el caso de las CECNM tratadas únicamente con BEBM, solo se observaron cambios en la concentración de IL-8 y, muy levemente, de IL-10 (a las 12 horas). Las curvas de calibración y los resultados obtenidos para cada una de las citoquinas analizadas se muestran en los Anexos VI y VIII, respectivamente.

4.1. Comparación de la producción de IFN- γ , IL-21 e IL-17A

La estimulación con 1 $\mu\text{g/ml}$ de SpA indujo la liberación de IFN- γ , IL-21 e IL-17A, tanto en CEPN de pacientes con EREA como en CECNM del grupo control. Sin embargo, en las CEPN, el incremento fue muy elevado y estadísticamente significativo en comparación con las células del grupo control (IFN- γ : $P < 0,0001$ a las 2, 6 y 12 horas; IL-21: $P = 0,003$, $P = 0,0003$ y $P = 0,0001$ a las 2, 6 y 12 horas, respectivamente; IL-17A: $P = 0,014$, $P = 0,0006$ y $P = 0,0002$ a las 2, 6 y 12 horas, respectivamente) (Figura 37).

Las cinéticas de liberación de IFN- γ , IL-21 e IL-17A inducidas por SpA en las CECNM, siguieron un perfil similar al observado en las CEPN. Sin embargo, en las CECNM no se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de las citoquinas, al comparar entre los tiempos de estimulación, exceptuando un ligero incremento de IFN- γ a las 6 horas (Fig. 37 A) y de IL-21 a las 2 horas (Fig. 37 B).

4.2. Comparación de la producción de IL-10

La estimulación con SpA (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 12 horas dio lugar a un incremento significativo de IL-10 en las CEPN de pacientes con EREA, en comparación con las CECNM del grupo control ($P = 0,003$). Por el contrario, tanto en las CEPN como en las CECNM, no se observó ningún efecto en la liberación de IL-10 a las 2 y 6 horas de estimulación con SpA (Figura 38).

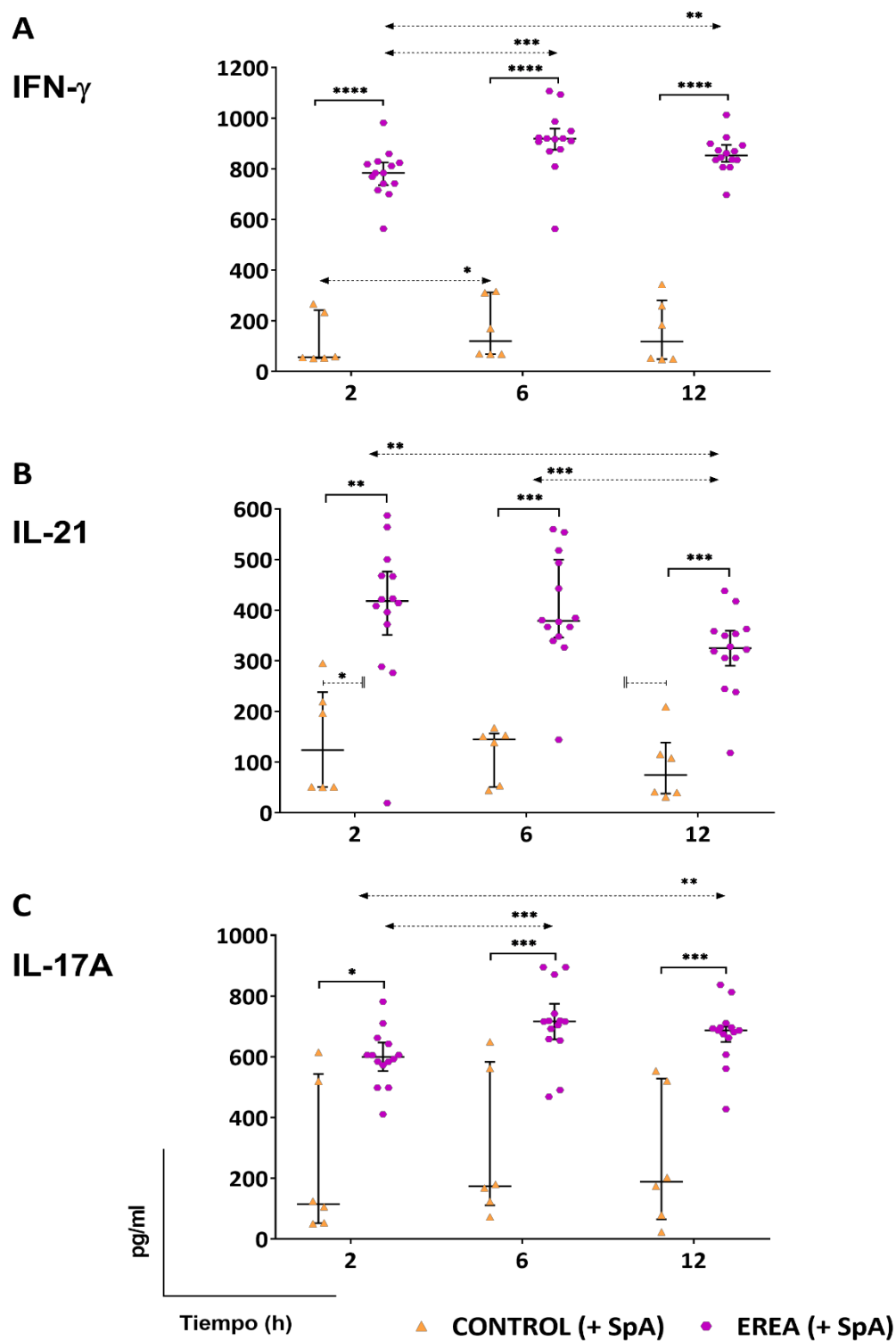


Figura 37. Efecto de SpA en la liberación de IFN- γ (A), IL-21 (B) e IL-17A (C) por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA ($n=14$) y células epiteliales de biopsias del cornete medio de pacientes control ($n=6$), tras 2, 6 y 12 horas de estimulación.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). Se compararon los niveles de citoquinas en los diferentes tiempos entre cada grupo tras la estimulación con SpA. También se determinaron las diferencias entre los tiempos (líneas discontinuas). La significación estadística (P valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon y mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

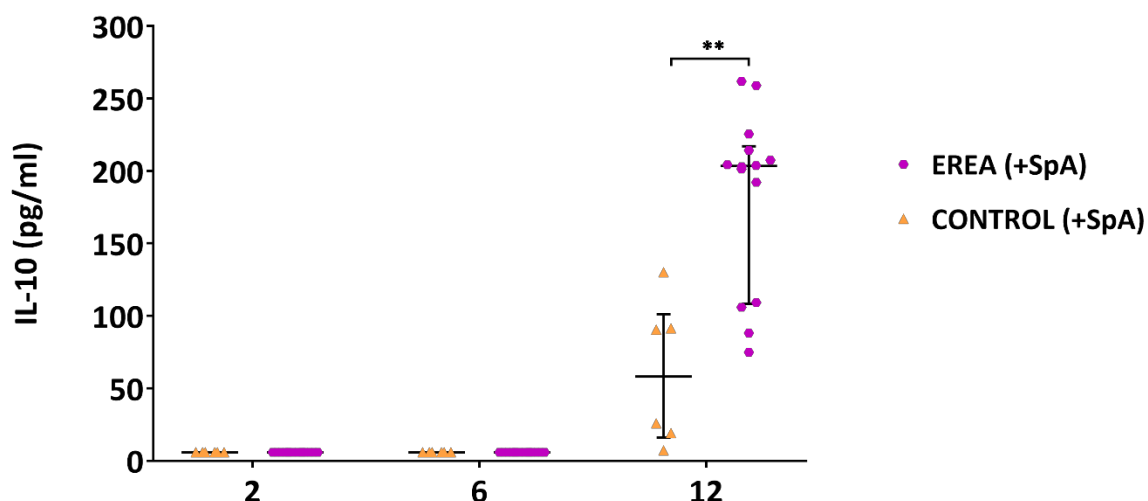


Figura 38. Efecto de SpA en la liberación de IL-10 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14) y células epiteliales de biopsia del cornete medio de pacientes control (n= 6).

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). Se comparó la respuesta a SpA en la producción de IL-10 entre las CEPN de pacientes con EREA y las CECNM del grupo control. La significación estadística (P valor) fue determinada mediante la prueba U de Mann-Whitney. ** $P < 0,01$

4.3. Comparación de la producción de IL-8

La liberación de IL-8 inducida por SpA (1 $\mu\text{g/ml}$), tanto en CEPN de pacientes con EREA como en CECNM del grupo control, se caracterizó por ser tiempo-dependiente. Sin embargo, en las CEPN los niveles de IL-8 a las 2, 6 y 12 horas de estimulación con SpA fueron muy superiores ($P < 0,0001$), así como los incrementos de concentración entre cada tiempo (EREA, $P < 0,001$; CONTROL, $P < 0,05$) (Figura 39).

Con respecto al incremento observado en el grupo control, la concentración de IL-8 fue ligeramente superior en las células estimuladas con SpA en comparación con las células sin estímulo (BEBM), con diferencias estadísticamente significativas solo a las 6 horas ($P = 0,031$) (Anexo VIII). Este comportamiento difiere de lo observado en las CEPN de pacientes con EREA (descrito en el apartado 3.4), pero es similar al encontrado en las células BEAS-2B (Figura 31). Estos resultados permitieron reforzar el empleo de esta línea celular para el diseño experimental, así como las condiciones de estimulación con SpA, en cuanto a las concentraciones y tiempos de exposición empleados.

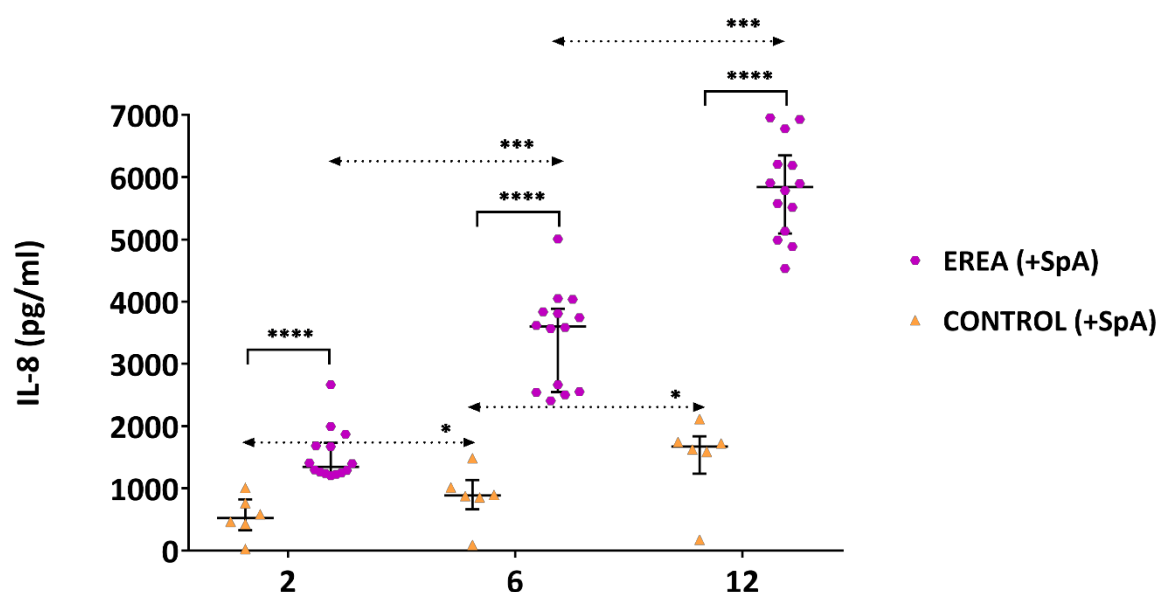


Figura 39. Efecto de SpA en la liberación de IL-8 por células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n=14) y células epiteliales de biopsia del cornete medio de pacientes control (n= 6).

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). Se comparó la respuesta a SpA en la producción de IL-8 entre las CEPN de pacientes con EREA y las CECNM del grupo control. También se determinaron las diferencias entre los tiempos (líneas discontinuas). La significación estadística (P valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon y la prueba U de Mann-Whitney. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. **** $P < 0,0001$

5. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO EN PACIENTES DEL GRUPO EREA

5.1. Microorganismos aislados en muestras de exudado nasal

El cultivo bacteriológico fue realizado en todos los pacientes con EREA incluidos en el estudio (n= 56). De estos, el 76,8% (n= 43) se consideraron *cultivos positivos* al aislarse una o más especies microbianas, mientras que el 23,2% (n= 13) se consideraron *negativos*, debido a la ausencia de crecimiento bacteriano y/o fúngico durante el tiempo de incubación establecido. De los cultivos positivos, el 83,7% (n= 36) fueron polimicrobianos, con una media de 2,2 aislados diferentes por paciente, mientras que el 16,3% (n= 7) restante, fueron monomicrobianos, con crecimiento de un único microorganismo diferenciado a nivel de género y especie. En estos casos se aisló *S. aureus* (n= 4), *P. aeruginosa* (n= 2) y *A. niger* (n= 1).

En total se aislaron 86 microorganismos en los 43 cultivos positivos (Tabla 14). El grupo mayoritario fue el constituido por bacterias grampositivas, representando el 79,1% de los aislamientos. De estos, los estafilococos coagulasa-negativos (51,2%), con *S. epidermidis* como principal representante del grupo, y *S. aureus* (22,1%) fueron los más frecuentes. Entre las bacterias gramnegativas, destacó *P. aeruginosa* (5,8%).

5.2. Detección de *S. aureus* por PCR Real-Time en muestras de exudado nasal

La detección de *S. aureus* por PCR Real-Time en la plataforma BDMAX™ (Becton Dickinson®) fue realizada en el 71,43% de los pacientes con EREA incluidos en el estudio (n=40). En todos los ensayos se comprobó la amplificación del control interno, considerando válidos todos los procesos y resultados.

La PCR se consideró positiva para *S. aureus* en 18 de las 40 muestras procesadas, no detectándose en ningún caso la amplificación de los genes específicos asociados con resistencia a meticilina (*mecA/mecC*). La concordancia entre el cultivo y la PCR para la detección de *S. aureus* fue buena, detectándose únicamente un caso con PCR positiva (CT 33,5) y cultivo negativo. Hubo una muestra con cultivo positivo para *S. aureus* en la que no se realizó la PCR y, en las 17 muestras restantes en las que se aisló *S. aureus* en cultivo, la PCR también fue positiva.

Tabla 14. Microorganismos aislados de las muestras de exudado nasal de pacientes con EREA.

Microorganismos	n	% total microorganismos (n= 86)
Gram positivos	68	79,1%
Estafilococos coagulasa-negativos (ECN)	44	51,2%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29	33,7%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3	3,5%
Otras especies de ECN	12	14,0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	22,1%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	2,3%
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	2,3%
<i>Bacillus cereus</i>	1	1,2%
Gram negativos	14	16,3%
Enterobacterales	4	4,7%
No fermentadores	6	7,0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5,8%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1,2%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	4	4,7%
Hongos	4	4,7%
<i>Candida albicans</i>	1	1,2%
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1,2%
<i>Aspergillus niger</i>	2	2,3%

Los microorganismos se han clasificado por categorías y grupos. El porcentaje se ha calculado sobre el total de microorganismos. Los números se expresan en números absolutos (n) y porcentajes (%).

5.3. Caracterización de las cepas de *S. aureus*

5.3.1. Sensibilidad antibiótica

Tras el estudio de sensibilidad antibiótica de las 19 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA, se encontraron 5 patrones diferentes, los cuales se muestran en la Tabla 15. Únicamente un aislado fue sensible a todos los antibióticos estudiados, incluido penicilina, pero ninguno fue resistente a más de dos familias de antibióticos diferentes. Todos los aislamientos se clasificaron como SASM, presentando CMI de cefoxitina y oxacilina ≤ 4 mg/L y $\leq 0,25$ mg/L, respectivamente, coincidiendo así con la ausencia de detección de los genes *mecA/mecC* por PCR. La resistencia a penicilina fue la más frecuente, presentándose en el 84,2% de las cepas ($n=16$); en el 52,6% ($n=10$) como resistencia única y constituyendo el fenotipo más habitual, y en el 31,6% ($n=6$) asociada a otros antibióticos. De los 6 aislados resistentes a eritromicina y/o clindamicina, 3 mostraron el fenotipo inducible (iMLS_B). Todos los aislados fueron sensibles a vancomicina y teicoplanina, con CMIs ≤ 2 mg/L para ambos antibióticos.

Tabla 15. Perfil de sensibilidad antibiótica de las 19 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA.

PATRONES DE SENSIBILIDAD	n	%
Sensible a todos los antibióticos	1	5,3%
Resistente a:		
P	10	52,6%
P + E	2	10,5%
P + E + CC	4	21,1%
E + CC	2	10,5%

P, penicilina; E, eritromicina; CC, clindamicina.

5.3.2. Caracterización genotípica

a) Electroforesis de campo pulsado

Se analizaron por PFGE las 19 cepas de *S. aureus* obtenidas de 19 pacientes con EREA. En total se identificaron 15 pulsotipos diferentes (PFGE tipo) clasificados en 13 grupos genómicos (PFGE grupo), a los que se les asignó una letra de la A a la M (Tabla 16; Figura 40). Se identificaron 6 PFGE grupos constituidos, cada uno, por dos cepas estrechamente relacionadas (D y H) o indistinguibles entre sí (A, B, I y L), con un porcentaje de similitud entre el 80% y el 100%, respectivamente.

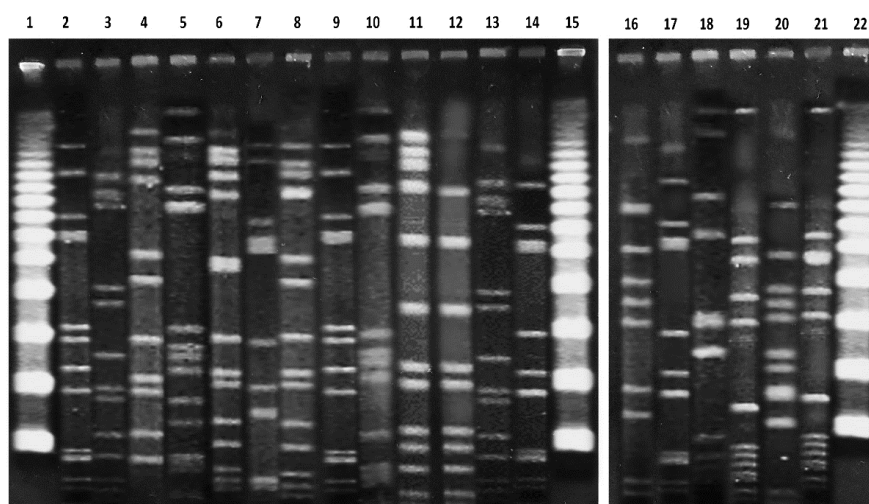


Figura 40. Patrones de PFGE de las 19 cepas de *S. aureus* obtenidas de pacientes con EREA.

Líneas 2-14 y 19: cepas de pacientes atendidos en el CHGUV. Líneas 16-18 y 20,21: cepas de pacientes atendidos en el HUP La Fe. Líneas 2 y 9, PFGE tipo A; líneas 3 y 13, PFGE tipo B; líneas 5 y 10, PFGE tipo D (D1 y D2, respectivamente); líneas 11 y 12, PFGE tipo H (H1 y H2, respectivamente); líneas 14 y 17, PFGE tipo I; líneas 19 y 21, PFGE tipo L; líneas 4, 6, 7, 8, 16, 18 y 20, PFGE tipos C, E, F, G, J, K, M, respectivamente. Líneas 1, 15, 22: marcador de peso molecular λ Ladder.

En el dendrograma obtenido a partir de los patrones de restricción del enzima *Sma* se observaron dos *clusters* principales, A y B (Figura 41), conteniendo 7 (A, C, E, F, G, H e I) y 6 (B, D, J, K, L y M) PFGE grupos diferentes, respectivamente. El número de cepas en cada *cluster* fue similar, con 10 cepas en el *cluster* A y 9 en el *cluster* B.

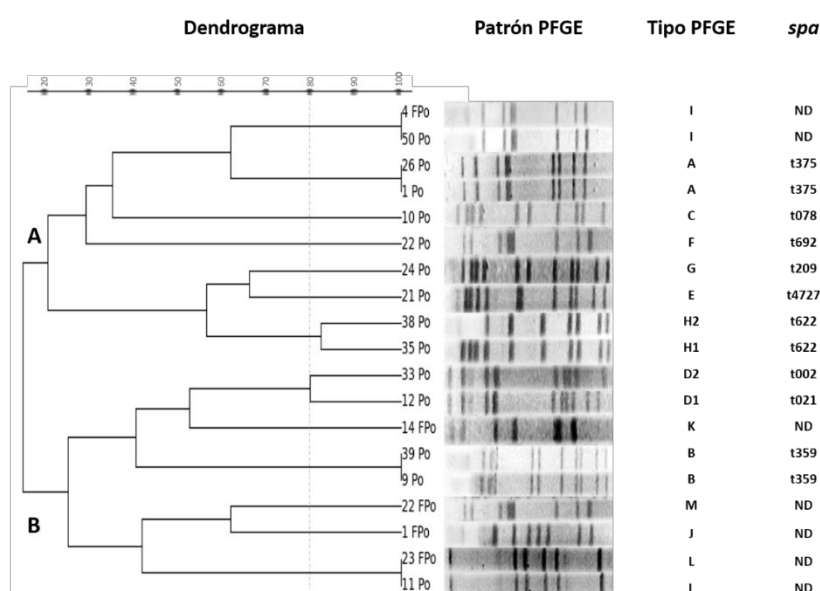


Figura 41. Dendrograma de similitud genotípica entre las 19 cepas de *S. aureus*, obtenido mediante el algoritmo UPGMA.

ND, no datos

b) *spa*-typing

Se analizaron por *spa*-typing las 19 cepas de *S. aureus* obtenidas de 19 pacientes con EREA. En el 63% (n= 12) de las cepas, se obtuvo un perfil coincidente con un tipo de *spa* en la base de datos, quedando sin asignación las 7 restantes (Tabla 16; Figura 41). En total se obtuvieron 9 *spa* tipos diferentes, de los cuales 6 estuvieron representados por una única cepa. Cada uno de los 3 *spa* tipos restantes (t375, t359 y t622) fueron coincidentes en dos cepas de *S. aureus*, las cuales, en todos los casos, fueron aisladas de dos pacientes distintos. Las cepas que presentaron el mismo *spa* tipo tenían también el mismo PFGE grupo (letras A, B y H) y perfil de resistencia antibiótica (Tabla 16).

Tabla 16. Características de las 19 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA.

NUM CEPA	CENTRO	FECHA MUESTRA	PATRÓN PFGE	<i>spa</i>	PERFIL <i>spa</i>	RESISTENCIA ANTIBIÓTICA
1	CHGUV	20/10/2016	A	t375	r49-r13-r23-r05-r17-r34-r33-r34	P + E + CC
2	CHGUV	16/05/2017	B	t359	r07-r23-r12-r21-r17-r34-r34-r33-r34	P
3	CHGUV	05/12/2016	C	t078	r04-r21-r12-r41-r20-r17-r12-r12-r17	P
4	CHGUV	17/05/2017	D1	t021	r15-r12-r16-r02-r16-r02-r25-r17-r24	P + E
5	CHGUV	25/04/2017	E	t4727	r07-r23-r12-r21-r17-r12-r12-r12-r17	P
6	CHGUV	25/04/2017	F	t692	r07-r12-r21-r17-r34-r34-r34-r34-r33-r34	P
7	CHGUV	26/04/2017	G	t209	r07-r16-r12-r23-r34	P + E
8	CHGUV	26/04/2017	A	t375	r49-r13-r23-r05-r17-r34-r33-r34	P + E + CC
9	CHGUV	06/09/2017	D2	t002	r26-r23-r17-r34-r17-r20-r17-r12-r17-r16	P
10	CHGUV	23/05/2017	H1	t622	r11-r19-r12-r21-r17-r34-r22-r25	P
11	CHGUV	31/05/2017	H2	t622	r11-r19-r12-r21-r17-r34-r22-r25	P
12	CHGUV	07/06/2017	B	t359	r07-r23-r12-r21-r17-r34-r34-r33-r34	P
13	CHGUV	19/12/2017	I	ND	ND	P
14	HUP La Fe	15/05/2018	J	ND	ND	E + CC
15	HUP La Fe	15/05/2018	I	ND	ND	E + CC
16	HUP La Fe	13/11/2018	K	ND	ND	P
17	CHGUV	02/02/2017	L	ND	ND	P + E + CC
18	HUP La Fe	03/06/2019	M	ND	ND	SENSIBLE
19	HUP La Fe	04/11/2019	L	ND	ND	P + E + CC

ND, no datos; P, penicilina; E, eritromicina; CC, clindamicina.

6. ASOCIACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CITOQUINAS Y PARÁMETROS FISIOPATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Se analizaron las correlaciones entre la concentración de citoquinas en el sobrenadante de las CEPN, y el recuento de eosinófilos tisulares y la concentración de IgE en sangre periférica de pacientes con EREA. También se determinó la influencia de la colonización nasal por *S. aureus* en la liberación de citoquinas.

Para ello, fueron seleccionadas las citoquinas liberadas por SpA en su pico máximo de concentración, es decir, IFN- γ e IL-17A a las 6 horas, IL-10 a las 12 horas, e IL-13 e IL-21 a las 2 horas. En el caso de IL-8, la respuesta de las CEPN fue diferente a la observada en el resto de las citoquinas: la concentración aumentó siguiendo una cinética tiempo-dependiente y fue significativamente más alta en las células con BEBM, mientras que, tras la estimulación con SpA, se observó una reducción de esta, siendo la media $\pm$ s (IQR) del 50% $\pm$ 7,0% (46,0% - 57,0%). Por este motivo, para estudiar las asociaciones descritas, se tuvo en cuenta la concentración de IL-8 a las 24 horas en las CEPN no estimuladas.

La producción de IFN- γ ($\rho = 0,422$; $P = 0,134$), IL-13 ($\rho = 0,573$; $P = 0,035$), IL-17A ($\rho = 0,462$; $P = 0,097$) e IL-21 ($\rho = 0,524$; $P = 0,057$) se correlacionaron positivamente con la infiltración de eosinófilos en el tejido polipoide, mientras que la liberación de IL-10 ($\rho = -0,602$; $P = 0,025$) se correlacionó negativamente (Figura 42). Las diferencias fueron estadísticamente significativas en el caso de IL-13 e IL-10. No se observó correlación entre la producción de IL-8 y el recuento de eosinófilos en el tejido polipoide. En ningún caso, la concentración de citoquinas se correlacionó con la concentración de IgE total en sangre periférica (Tabla 17).

Tabla 17. Correlación entre la liberación de citoquinas inducida por SpA en las CEPN de pacientes con EREA (n= 14) y parámetros fisiopatológicos.

	EOSINOFILIA PÓLIPO NASAL (EOSINÓFILOS/HPF)		IgE TOTAL SUERO (KAU/L)	
	ρ (IC 95%)	P	ρ (IC 95%)	P
IFN-γ	0,422 (-0,157 – 0,785)	0,134	-0,235 (-0,690 – 0,353)	0,418
IL-10	-0,602 (-0,863 – -0,087)	0,025	-0,103 (-0,612 – 0,466)	0,727
IL-13	0,573 (0,044 – 0,851)	0,035	0,222 (-0,365 – 0,683)	0,442
IL-17A	0,462 (-0,108 – 0,804)	0,097	-0,295 (-0,722 – 0,296)	0,304
IL-21	0,524 (-0,027 – 0,831)	0,057	0,103 (-0,466 – 0,612)	0,727
IL-8	0,158 (-0,421 – 0,646)	0,584	0,137 (-0,438 – 0,633)	0,637

El cálculo de ρ y P (significación estadística, $P < 0,05$) se realizó con el método de correlación de rangos de Spearman.

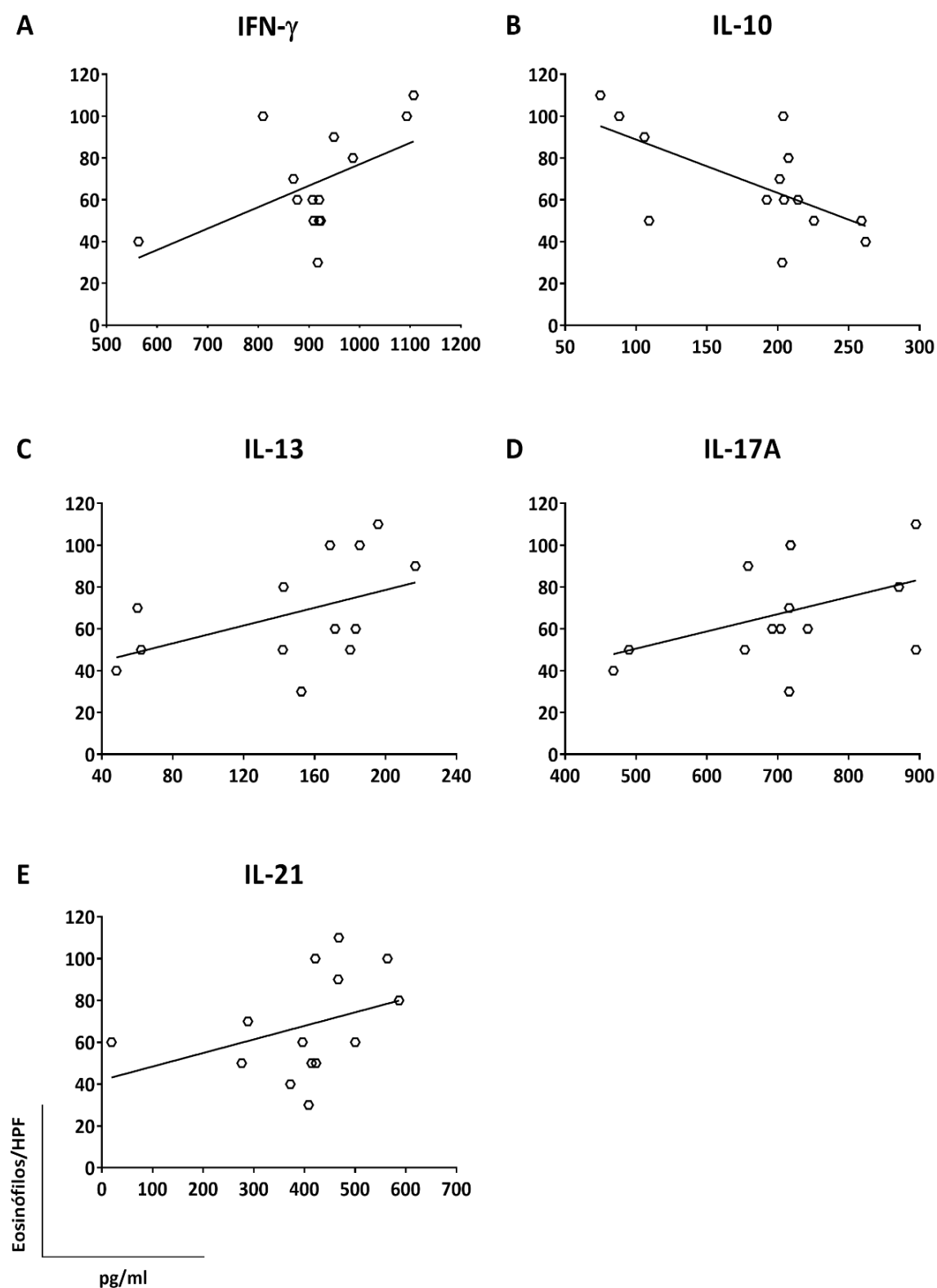


Figura 42. Relación entre el número de eosinófilos en los pólipos nasales y la liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D), IL-21 (E) inducida por SpA en las CEPN de pacientes con EREA (n= 14).

La expresión de citoquinas inducida por SpA en las CEPN fue similar en pacientes con cultivos nasales positivos y negativos para *S. aureus*, a excepción de IL-10, cuya concentración fue significativamente superior en pacientes colonizados ($P=0,008$) (Figura 43, Anexo IX).

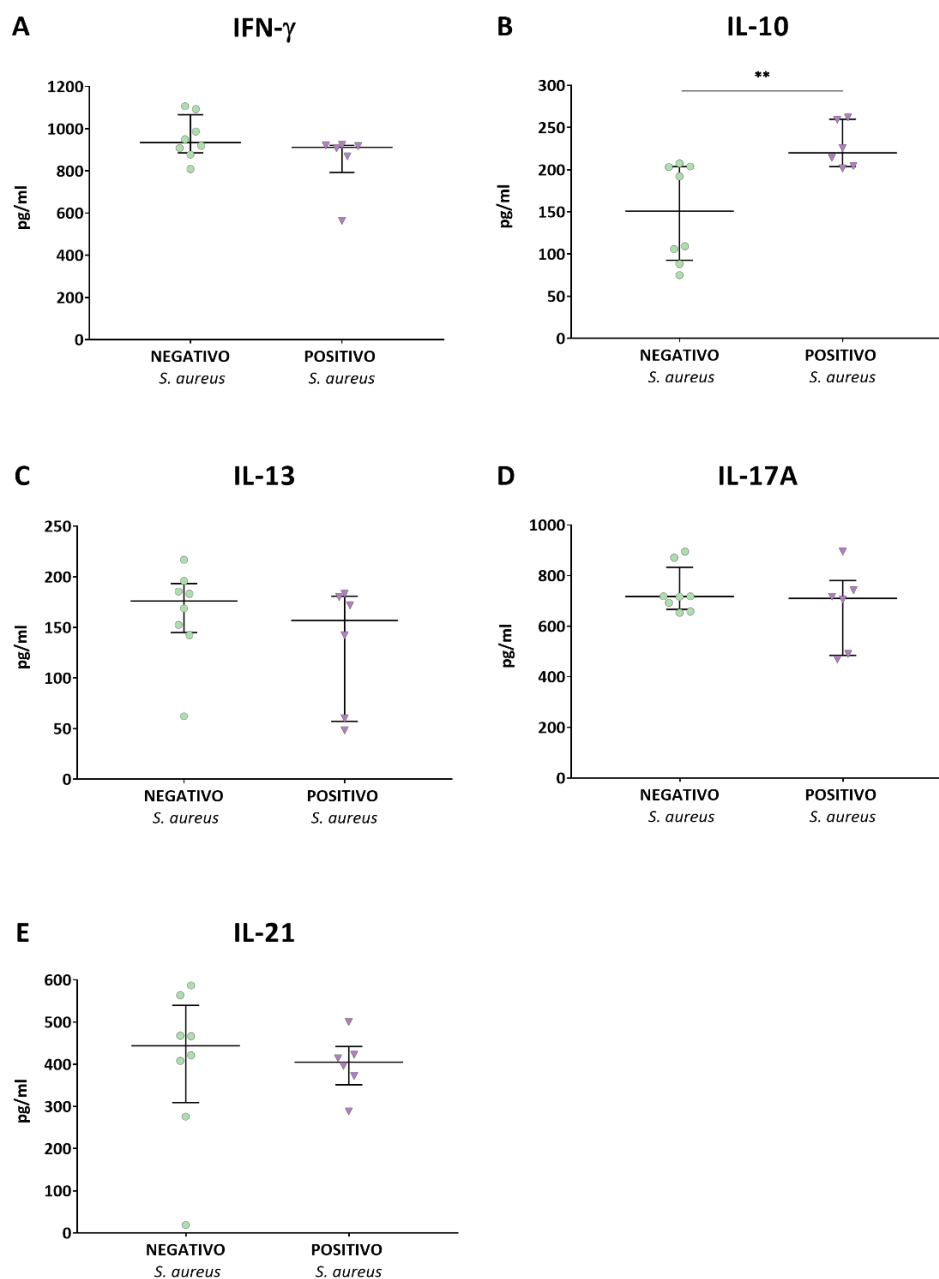


Figura 43. Comparación de la liberación de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-13 (C), IL-17A (D) e IL-21 (E) inducida por SpA, en las CEPN de pacientes con EREA con cultivos de colonización nasal positivos (n= 6) y negativos (n= 8) para *S. aureus*.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). La significación estadística (P valor) fue determinada mediante la prueba U de Mann-Whitney. ** $P < 0,01$

Al contrario que lo observado en IL-10, la concentración de IL-8 fue significativamente más alta en las células sin estímulo (BEBM) de pacientes con cultivos negativos para *S. aureus* ($P=0,025$). Tras la estimulación con SpA, los niveles de IL-8 fueron ligeramente más altos en pacientes con cultivos negativos, pero sin diferencias significativas (Tabla 18, Figura 44).

Tabla 18. Influencia de la colonización nasal por *S. aureus* en la liberación de IL-8 por las CEPN de pacientes con EREA, en presencia o ausencia de SpA.

	CULTIVO POSITIVO <i>S. aureus</i>	CULTIVO NEGATIVO <i>S. aureus</i>	<i>P</i> valor
BEBM	9661,453 (8576,134 – 11052,690)	13500,000 (1265,800 – 13500,000)	0,025
SpA (1 µg/ml)	5545,182 (4961,967 – 5813,064)	6196,674 (5323,971 – 6891,969)	0,142

La concentración de citoquinas (pg/ml) se expresa como mediana (rango intercuartílico). La significación estadística (*P* valor) fue determinada mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

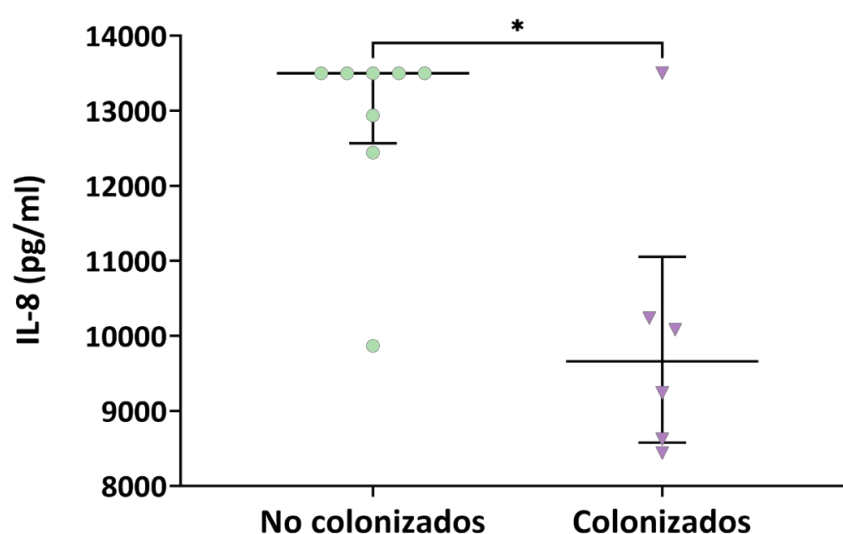


Figura 44. Liberación de IL-8 en las CEPN no estimuladas obtenidas de pacientes con EREA con cultivos de colonización nasal positivos (n= 6) y negativos (n= 8) para *S. aureus*.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). La significación estadística (*P* valor) fue determinada mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $P < 0,05$

DISCUSIÓN

En este estudio se proporcionan nuevas evidencias acerca de la influencia de *S. aureus* en la respuesta inmunitaria innata de pacientes con EREA. Para ello, se ha llevado a cabo la estandarización de un modelo experimental de estimulación celular *in vitro* con cultivos primarios de células epiteliales de pólipos nasales, caracterizándose la cinética de liberación de citoquinas inducida por las proteínas de *S. aureus*: α -hemolisina y SpA. Además, se ha investigado la relación entre la liberación de citoquinas y parámetros fisiopatológicos, como la infiltración de eosinófilos en el tejido polipoide y la producción de IgE en sangre periférica. Por último, dadas las altas tasas de colonización nasal por *S. aureus* reportadas previamente en los pacientes con EREA, se ha realizado la búsqueda y aislamiento de dicho microorganismo, con el objetivo de correlacionar su presencia con la producción de citoquinas, así como caracterizar las cepas genotípicamente y en base su sensibilidad antibiótica.

1. SELECCIÓN DE PACIENTES

La mayor parte de los estudios publicados acerca del papel de *S. aureus* en la fisiopatología de la RSCcPN, suelen comparar los resultados entre los dos grupos fenotípicos clásicos de RSC, RSCcPN y RSCsPN, pudiendo englobar en un mismo grupo pacientes caracterizados por presentar diferentes perfiles inflamatorios o endotipos de RSC. Este hecho podría explicar la variabilidad encontrada entre los estudios publicados, así como la dificultad para realizar comparaciones entre ellos.

Para la realización de este estudio, con el objetivo de reducir dicha variabilidad y obtener resultados más específicos, se han seleccionado únicamente pacientes con EREA, englobados comúnmente dentro del conjunto de RSCcPN. La elección de este grupo se ha realizado teniendo en cuenta las altas tasas de colonización nasal por *S. aureus*, así como la gravedad de la patología y su impacto en la calidad de vida.

La selección de los pacientes con EREA se realizó de forma aleatoria, siguiendo el calendario de las consultas externas o intervenciones quirúrgicas programadas de polipsectomías. Este procedimiento, a pesar de ser el más utilizado en los estudios consultados (252,270,271), puede influir en el reclutamiento de pacientes con mayor grado de poliposis o recurrencias, en los que es necesaria la aplicación de CENS para lograr un mejor control de la enfermedad. De hecho, en nuestra cohorte, el 86% (n =48) de los pacientes se clasificaron en grado 2/3 y sólo en el 28,6% (n= 16) no se había realizado ninguna polipsectomía previa.

La mediana de la edad de los pacientes incluidos en el grupo EREA fue de 55,5 años, siendo el rango etario de los 50-59 años el más numeroso (41,1%). Entre los 40 y 69 años se englobaron el 87,5% de los pacientes. No hubo diferencias en cuanto al número de hombres y mujeres, pero sí en la distribución de la población según el sexo y la edad. Observamos una clara predominancia de mujeres en mayores de 50 años (90% mujeres vs 61,5% hombres) y, por el contrario, de hombres en menores de 50 años (38,5% hombres vs 10% mujeres).

En la mayoría de los estudios realizados en pacientes con EREA, el número de mujeres es superior al de hombres y el rango de edad predominante se sitúa en los 40-50 años (92,272). Estos datos son coincidentes con estudios de prevalencia, en los que se ha descrito que el diagnóstico de EREA se suele establecer entre los 30 y 40 años, con mayor incidencia en mujeres, las cuales desarrollan cuadros clínicos más severos (32). Por tanto, las diferencias de nuestra población en comparación con otros estudios publicados, podría estar asociada con la inclusión de pacientes que presentan una mayor progresión de la enfermedad y peor control de los síntomas.

En este sentido, los pacientes con EREA incluidos en nuestro estudio se caracterizaron por presentar un mayor grado de poliposis (86% con grado 2/3) y elevadas tasas de recurrencias tras la cirugía (71,4% con 1 o más episodios previos de CENS), así como una mayor incidencia de síntomas relacionados con una importante disminución de la calidad de vida como, por ejemplo, la obstrucción/bloqueo/congestión nasal y el dolor/presión facial, que fueron reportados por el 80% y el 50% de los pacientes, respectivamente.

Otro de los aspectos indicativos de una mayor gravedad y progresión de la PN en nuestra cohorte se relaciona con el manejo farmacológico. Así, en un elevado porcentaje de los pacientes estudiados se habían pautado corticoides orales (64%), los cuales se emplean en casos más severos (EVA 3-7) cuando no se observa una mejoría con corticoides tópicos. Además, la mayoría de ellos había recibido tratamiento antibiótico previo (sin tener en cuenta los tres meses antes de la inclusión en el estudio), con múltiples pautas en más de la mitad de los casos. Únicamente en el 20% de los pacientes no se encontraron datos en relación con la prescripción o toma de antibióticos durante el curso de la enfermedad. Actualmente, en el tratamiento de la RSCcPN, los antimicrobianos se recomiendan en asociación a corticoides intranasales, en casos de exacerbaciones o infecciones agudas de repetición. Por tanto, el uso frecuente de antibióticos en nuestra población, principalmente claritromicina, es indicativo de episodios recurrentes caracterizados por el incremento de la inflamación a nivel local y el predominio de sintomatología obstructiva o rinorrea mucopurulenta.

En este contexto, también consideramos relevante el porcentaje de pacientes tratados o candidatos a tratamiento con omalizumab, que fue del 16%, 9% (n= 5) y 7% (n= 4), respectivamente. Omalizumab es un anticuerpo monoclonal anti-IgE indicado como tratamiento adicional a corticoides intranasales en pacientes adultos con RSCcPN grave o mal controlada. En el momento de la inclusión de los pacientes en el estudio, la experiencia clínica con el uso de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de la RSCcPN era reducida, por lo que el porcentaje anteriormente indicado, es un reflejo de las características de nuestra población, así como de la gravedad de la EREA dentro del conjunto de entidades englobadas en la RSC, donde es necesaria la intervención médica periódica para la modificación de los tratamientos farmacológicos como consecuencia de la falta de respuesta a las terapias disponibles.

La eficacia de omalizumab ha sido demostrada en la EREA, aunque la evidencia es menor en comparación con la RSCcPN y/o con el asma. En 2013, Gevaert *et al* (273) publicaron un ensayo realizado en 24 pacientes con RSCcPN y asma comórbida, de los cuales 12 tenían antecedentes de reacciones de hipersensibilidad a la aspirina, aunque sin un diagnóstico definitivo de EREA. Demostraron que omalizumab disminuyó significativamente el tamaño de los pólipos y los *scores* de la TC, así como la mejora de los síntomas nasales, con la misma eficacia en pacientes alérgicos y no alérgicos. En otro estudio, aunque no aleatorizado ni controlado con placebo, Hiyashi *et al* (274), mostraron que la administración de omalizumab en pacientes con EREA provoca una reducción significativa del LTE4 urinario y un metabolito de PGD₂, lo cual se correlacionó con una mejora de los síntomas debido a la reducción de la actividad de los mastocitos.

En cuanto al grupo control, se han incluido pacientes sanos sin patología inflamatoria nasosinusal con indicación quirúrgica de septoplastia, en los que se han tomado muestras de biopsias de la mucosa del cornete medio. Estos criterios de selección justifican la diferencia de edad entre los grupos EREA y control (55,5 años vs 27,0 años, respectivamente), pero también son los empleados en estudios similares, los cuales, en comparación con nuestro estudio, difieren en el procedimiento realizado para la extracción de las biopsias, siendo más frecuente el empleo de biopsias de la mucosa del cornete inferior al ser una zona de mayor accesibilidad durante la cirugía (230,252,275).

En este aspecto, es importante tener en cuenta que la composición de la cavidad nasal anterior y de la parte interna no es la misma. Por ello, el uso de muestras de diferente localización ha sido cuestionado por algunos autores. A nivel histológico, la cavidad nasal anterior o vestíbulo nasal está constituida por un epitelio escamoso no ciliado estratificado

queratinizado, mientras que la parte interna, está revestida por un epitelio cilíndrico ciliado, pudiendo influir en el comportamiento del tejido frente a diferentes estímulos. Por ejemplo, Pezato *et al* (276), determinaron la respuesta frente a la presión hidrostática intersticial, obteniendo diferencias significativas entre la mucosa del cornete medio y del cornete inferior, por lo que no recomiendan el uso de muestras del meato inferior en estudios de poliposis nasal por la posibilidad de obtener resultados no comparables. En cambio, Van Crombruggen *et al* (277), defienden la toma de biopsias del meato inferior en los controles, justificada por la presencia de mediadores inflamatorios tipo 2, característicos de la RSCcPN. En nuestro caso, consideramos que el uso de biopsias del meato medio en los controles pudiera dar lugar a la obtención de resultados más representativos, debido a las características del epitelio, ser la localización anatómica en la que se originan los pólipos y caracterizarse por una mayor riqueza del microbioma, incluyendo *S. aureus* (278).

La inclusión de pacientes procedentes de dos centros hospitalarios diferentes permitió reclutar un número elevado, 56 pacientes con EREA y 20 controles. Sin embargo, para los experimentos de estimulación celular *in vitro* con SpA, el tamaño muestral quedó reducido a 14 pacientes con EREA y 6 controles. A pesar de ello, fue similar al de otros estudios que investigan el papel de *S. aureus* en la respuesta inflamatoria asociada a la poliposis nasal. De hecho, en los trabajos que diferencian los pacientes con EREA del resto de pacientes con RSCcPN, el tamaño muestral correspondiente al grupo EREA suele ser inferior. Por ejemplo, en los trabajos realizados por Sachse *et al* (214) y Pérez-Novo *et al* (57), fueron analizados 6 y 13 pacientes con EREA, respectivamente. El tamaño de la muestra también es similar en trabajos que comparan RSCcPN con RSCsPN y/o controles sanos; desde 12 pacientes con RSCcPN y 13 controles en el estudio de Patou *et al* (252) hasta 52 pacientes con RSCcPN y 11 con RSCsPN en el realizado por Okano *et al* (251).

A pesar de contar con un tamaño muestral pequeño, seleccionar pacientes con EREA de forma independiente al conjunto de pacientes con RSCcPN, constituye una de las características más relevantes de nuestro estudio, ya que nos ha permitido caracterizar de un modo más preciso el efecto de los antígenos estafilocócicos en la liberación de las citoquinas seleccionadas, disminuyendo la variabilidad debida a la participación de mecanismos inflamatorios subyacentes específicos de los distintos tipos de RSC.

2. DISEÑO DEL MODELO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS

En este trabajo se diseñó un modelo de estimulación celular, con el fin de aportar nuevas evidencias acerca de la influencia de determinados componentes antigénicos de *S. aureus* en la respuesta inmunitaria innata de la RSCcPN.

Los trabajos realizados por otros autores difieren en las metodologías y condiciones empleadas (cultivos celulares, estímulos y concentración, tiempos de incubación, métodos analíticos para la cuantificación de analitos, etc.), lo cual dificulta la posibilidad de realizar comparaciones entre ellos en relación con las moléculas analizadas, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, por el espectro variable de analitos y por las concentraciones obtenidas, respectivamente (Tabla 19). El diseño experimental propuesto se fundamenta en una metodología sencilla y específica, con el fin de obtener resultados más reproducibles.

2.1. Cultivos celulares

En los modelos experimentales similares al propuesto, es común el empleo de tejido polipoide para la estimulación de las células presentes en el mismo, entre ellas macrófagos, eosinófilos, mastocitos, linfocitos B, linfocitos T, células epiteliales, etc. Esto puede suponer una limitación y sesgo en los resultados, ya que los pólipos nasales no son homogéneos y la composición celular puede ser diferente entre los pacientes incluidos o entre los distintos grupos de RSC. Del mismo modo, en el caso del grupo control, la estimulación de homogenizados tisulares obtenidos de los cornetes nasales, los cuales están constituidos por diferentes células y en diferentes proporciones, puede dar lugar a la obtención de resultados con mucha variabilidad y poco reproducibles.

Con base en lo expuesto anteriormente, consideramos que seleccionar un tipo celular concreto puede ofrecer información más precisa acerca de los mecanismos específicos frente a un estímulo determinado. Así, en este estudio se utilizaron cultivos celulares primarios de CEPN de pacientes con EREA, y de CECNM de controles sanos. Previamente, en el ensayo para la estandarización del modelo experimental, se utilizaron cultivos celulares de la línea inmortalizada BEAS-2B como control basal de estimulación. El efecto observado en las células BEAS-2B fue muy similar al de las células epiteliales del grupo control, lo que demuestra la validez de esta línea celular para el diseño y selección de las condiciones del modelo *in vitro*.

Las células epiteliales son componente fundamental de la respuesta inmunitaria innata; forman parte del epitelio, el cual constituye la primera línea de defensa física frente a patógenos u otras moléculas inhaladas. Estudios previos han demostrado que la enterotoxina B de *S. aureus* es capaz de modular la respuesta inmunitaria innata al interactuar con las células epiteliales nasosinusales (279,280), las cuales liberan citoquinas y otros mediadores de la inflamación, fundamentales en el inicio de la respuesta inflamatoria Th2. Sin embargo, no hay estudios que evalúen el efecto de α -hemolisina y SpA en cultivos primarios de células epiteliales de pólipos nasales en la RSC.

La experiencia con la línea celular BEAS-2B es amplia en diseños experimentales para el estudio de mecanismos celulares y moleculares involucrados, por ejemplo, en la carcinogénesis pulmonar (281) o en las infecciones neumocócicas (282). Sin embargo, es muy escasa en estudios de RSC basados en modelos de estimulación celular con antígenos microbianos. Únicamente hemos encontrado un estudio en la literatura, publicado en 2018 por Lan *et al* (230), en el que se emplean células BEAS-2B para la optimización del modelo de estimulación celular con cepas de *S. aureus* no productoras de enterotoxinas. En dicho estudio, obtuvieron un incremento de IL-33 y TSLP en células BEAS-2B estimuladas, así como la activación de vías de señalización mediadas NF- κ B. Adicionalmente, la incubación con un antagonista del receptor *Toll-like* 2 (TLR2) redujo significativamente la liberación de TSLP e IL-33, y la actividad de NF- κ B en las células BEAS-2B estimuladas.

Una de las principales diferencias entre los cultivos celulares primarios y los cultivos de una línea celular inmortalizada es que, en el caso de los primeros, el periodo de vida es limitado. Es decir, las células crecen durante un cierto número de pases que depende, sobre todo, del tipo celular y condiciones de cultivo. Al alcanzar la fase de senescencia, las células acumulan numerosas anormalidades y se pierden las funciones especializadas, lo que conduce a la muerte celular. En la fase inicial del estudio era imprescindible disponer de una concentración muy elevada de células epiteliales, por lo que esta limitación fue crucial en el proceso y el motivo por el cual tuvimos que recurrir al empleo de la línea celular inmortalizada, ya que con las muestras de pacientes control no se logró alcanzar la concentración mínima requerida. En el caso de las muestras de pólipos nasales, aunque se invirtió un número muy alto (36 muestras en total), se logró llegar al final del proceso con 3 muestras, lo cual fue importante para poder establecer las condiciones de estimulación y simplificar el proceso para los estudios posteriores. Así, en las fases sucesivas, de 20 muestras de pólipos nasales utilizadas, sólo se perdieron 6 de ellas.

Además del proceso de senescencia, otros factores fueron determinantes en la pérdida de rendimiento del cultivo celular primario en la fase inicial. La realización de tantos pases sucesivos incrementó el riesgo de contaminación, observándose la presencia de bacterias en el medio líquido, así como el desplazamiento de las células epiteliales por fibroblastos a partir del tercer o cuarto subcultivo (Figura 45). A pesar de emplear un medio selectivo de células epiteliales bronquiales (BEBM), caracterizado por la ausencia de suero, la inhibición de los fibroblastos pudiera no ser completa invadiendo el cultivo celular al presentar una mayor tasa de crecimiento.

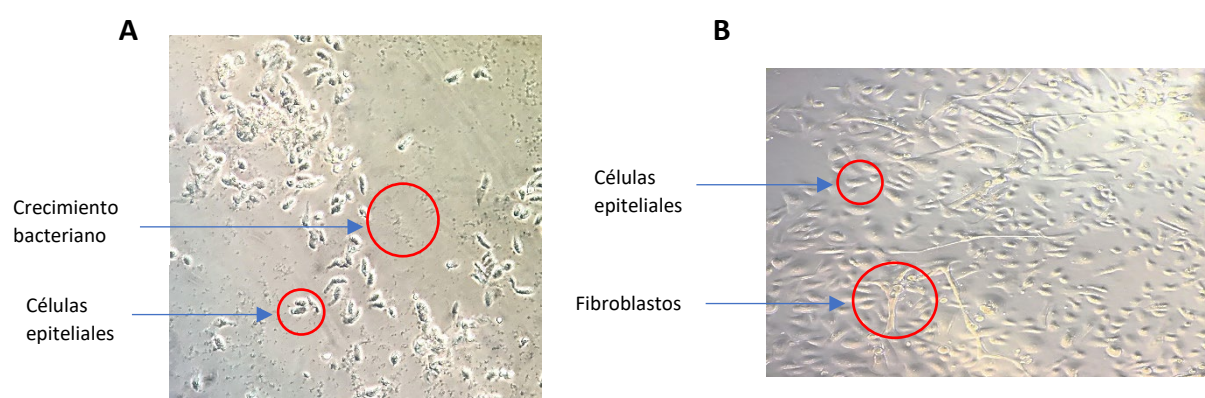


Figura 45. Limitaciones encontradas en la realización de los cultivos celulares primarios de células epiteliales. A) Contaminación bacteriana. B) Crecimiento de fibroblastos.

2.2. Selección de las proteínas de *S. aureus*

La influencia de *S. aureus* en la patogénesis de la RSCcPN se ha relacionado más frecuentemente con las enterotoxinas estafilocócicas, debido, en gran medida, a sus propiedades superantigénicas. De todas ellas, SEB ha sido la más comúnmente estudiada. Sin embargo, cepas de *S. aureus* no productoras de enterotoxinas también han demostrado la inducción de reacciones inflamatorias, por lo que la presencia de otras proteínas también podría desempeñar un papel clave en la patogénesis de la RSCcPN (230).

En nuestro modelo experimental, los estímulos utilizados fueron las proteínas de *S. aureus* α -hemolisina y SpA. Ambas son capaces de inducir la activación de respuestas celulares mediante la liberación de mediadores inflamatorios e incluso, SpA, presenta actividad superantigénica (162,163,165,167–171). A pesar de ello, han sido muy poco estudiadas en el contexto de la RSCcPN, sin evidencias de su efecto en células epiteliales de pólipos nasales, pero sí en el conjunto de células presentes en estos tejidos, con resultados que demuestran su participación en la respuesta inflamatoria (247,251,252,283). Los principales hallazgos se desarrollan en el apartado 3 y se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Estudios experimentales en RSC con determinantes antigénicos de *S. aureus*: características metodológicas y principales hallazgos.

Referencia Año, país	Pacientes (n)	Cultivo celular RSCcPN	Estímulo (concentración) Tiempo	Mediadores diana (Método cuantificación)	Principales hallazgos
Calus <i>et al</i> (284) 2017, Bélgica	RSCcPN (35)	Tejido PN homogeneizado	SEB (0,5 µg/mL); 24 horas	IL-21 (ELISA)	SEB aumenta los niveles de IL-21 y de las células T CD4+ IL21+ en la RSCcPN.
Noyama <i>et al</i> (283) 2017, Japón	RSCcPN (22) Control (8)	Células PN	SEB y α-hemolisina (1,0 ng/ml); 72 horas	IL-22 (ELISA)	SEB y α-hemolisina aumentan IL-22 en la PN. Lo correlacionan con la mayor expresión de MUC1.
Patou <i>et al</i> (252) 2008, Bélgica	RSCcPN (12) Control (13)	Células PN	SEB (0,5 µg/mL), SpA (10 µg/mL), ALT (10 µg/mL); 0,5 y 24 horas	IFN-γ IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13... (Multi-spot assays). TGF-β1, PGD2, histamina... (ELISA)	SEB aumenta IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 en la PN. SpA aumenta IL-5, histamina, PGD2 y leucotrienos en la PN.
Okano <i>et al</i> (247) 2014, Japón	RSCcPN (22) RSCsPN (9)	Células PN	α-hemolisina (0,01, 0,1 y 1,0 ng/ml); 24 y 72 horas. SEB (1,0 ng/ml); 72 horas	IL-5, IL-13, IL-10, IFN-γ, IL-17A (ELISA)	α-hemolisina aumenta todas las citoquinas en las células de PN, de forma comparable a SEB en IL-5, IL-13 e IL-10. Menor liberación de IL-10 inducida por α-hemolisina en asmáticos.
Damm <i>et al</i> (279) 2006, Alemania	RSC (14) Control (11)	Células epiteliales	SEB (10 ng/ml); 0 y 24 horas	IL-1β, IL-6, IL-8 (ELISA)	SEB aumenta IL-6 pero no IL-8; ambos más elevados en pacientes control.
Okano <i>et al</i> (251) 2015, Japón	RSCcPN (52) RSCsPN (11)	Células PN	SpA (0,1, 1,0, 10 µg/mL); 24 y 72 horas	IL-5, IL-13, IL17A, IFN-γ, IL-10, IL-12 p70. (ELISA)	SpA incrementa IL-13, IL-17A e IL-10 en la PN. Demuestran sus efectos proinflamatorio/regulador.
Biggs <i>et al</i> (285) 2019, Inglaterra	RSCcPN (10) Control (5)	Células PN	SEB (10 ng/ml); 24 horas	IFN-γ, IL-5, IL-17A (Luminex®)	SEB aumenta IFN-γ, IL-5 e IL-17A en los PN, compatible con una respuesta inflamatoria sesgada hacia Th2/Th17.
Lan <i>et al</i> (230) 2018, Bélgica	RSCcPN (20) Control (21)	Células PN	S. aureus no enterotoxigénico (2,0 x 10 ⁷ UFC/pocillo); 24 y 48 horas	IL-4, IL-5, IL-13, TSLP, IL-33 (Luminex®)	S. aureus induce un aumento de TSLP, IL-33 e IL-5 en las células de PN.

PN, poliposis nasal; SEB, enterotoxina B de *S. aureus*; ALT, ácido lipoteicoico

2.3. Metodología para la cuantificación de citoquinas

Para una mayor comprensión de los mecanismos inflamatorios y/o de los procesos de activación de la respuesta inmunitaria innata del epitelio sinusal frente a patógenos, es esencial la determinación de múltiples citoquinas. Estos procedimientos suelen ser complejos y lograr una cuantificación precisa supone un verdadero desafío, al estar condicionada por las características de dichas moléculas, como los bajos niveles de producción (rango pg), los procesos dinámicos de secreción y la vida media corta.

Las técnicas multiplex, como las basadas en Luminex o citometría de flujo, están siendo cada vez más utilizadas. En comparación con el ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), método más comúnmente empleado, permiten la cuantificación de múltiples citoquinas en un volumen pequeño de muestra, presentando un rango de detección más amplio para cada uno de los analitos.

Debido a las ventajas anteriormente mencionadas, y dado que en el presente trabajo se determinó la concentración de 8 citoquinas diferentes en 50 µl de sobrenadante de cultivo celular, se seleccionó Luminex® Xmap® como método de cuantificación.

2.4. Selección de las citoquinas analizadas

La función de numerosas citoquinas y mediadores inflamatorios ha sido objeto de numerosas investigaciones, principalmente en la RSCcPN y RSCsPN, pero también en la EREA (Tabla 20). Las respuestas mediadas por citoquinas Th2, como IL-4, IL-5 o IL-13, así como el incremento de la eosinofilia tisular, han sido clásicamente relacionados con la fisiopatología de la PN (79). Sin embargo, estudios realizados en homogeneizados tisulares de pacientes con RSC han demostrado una amplia variedad de perfiles inflamatorios, con participación de otros subtipos celulares, como Th1 y Th17, e incluso, la expresión simultánea de diferentes tipos de respuesta en un mismo tejido (4). Del mismo modo, en la EREA se ha demostrado que, además de la inflamación Th2 predominante, las respuestas tipo 1 y tipo 3 juegan un papel importante, siendo muy característica la mayor expresión de IFN- γ (citoquina Th1) en comparación con pacientes tolerantes (286).

Con base en estos hallazgos, consideramos esencial incluir en nuestro estudio citoquinas relacionadas con diferentes tipos de respuesta y efectos tisulares. Así, analizamos citoquinas representativas de la respuesta inmunitaria tipo 1 (IFN- γ e IL-21), tipo 2 (IL-5, IL-13, IL-8, IL-10 e IL-33) y tipo 3 (IL-17A).

Tabla 20. Principales citoquinas relacionadas con la patogénesis de la RSCcPN y la EREA.

Citoquinas	Respuesta inflamatoria	Células que las producen	Probable papel en la RSCcPN y/o EREA. Otras funciones biológicas (Referencias)
IFN- γ	Tipo 1	Linfocitos Th1, células NK	Marcador típico de EREA (y RSCcPN). Induce el aumento Cys-LTs y la expresión de sus receptores , así como la diferenciación de eosinófilos , por lo que favorece la inflamación . Disminuye las células Th2 y la IgE, y promueve la activación de células epiteliales, endoteliales y macrófagos (95,286).
IL-21	Tipo 1	Linfocitos T colaboradores foliculares	Escasa evidencia. Promueve la diferenciación, activación y proliferación de linfocitos T CD4+ y linfocitos B, la producción de anticuerpos y el cambio de clase de Ig. Promueve la actividad citotóxica de células T CD8+ y NK (1,284).
IL-4	Tipo 2	Linfocitos Th2, ILC2, mastocitos, eosinófilos	Marcador importante en RSCcPN y EREA. Favorece la respuesta Th2 , el reclutamiento de eosinófilos y la inducción del cambio de clase a IgE . Induce la activación de macrófagos (1,92).
IL-5	Tipo 2	Linfocitos Th2, ILC2, mastocitos, eosinófilos	Marcador típico de RSCcPN y EREA. Potente activador de eosinófilos . (1,287).
IL-13	Tipo 2	Linfocitos Th2, ILC2, mastocitos, eosinófilos	Marcador importante en RSCcPN y EREA. Favorece la respuesta Th2 , el reclutamiento de eosinófilos y la inducción del cambio de clase a IgE . Induce el acúmulo de fibrina en el epitelio, favoreciendo el crecimiento de los pólipos . Efecto inhibitor sobre monocitos/macrófagos (1,92).
IL-8	Tipo 2	Monocitos/macrófagos, células epiteliales	Escasa evidencia en EREA, aunque se han reportado niveles incrementados (marcador importante en la PN-FQ). Potente efecto proinflamatorio y quimioatrayente de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T CD8+ (82,288).
IL-10	Tipo 2	Linfocitos Th2, macrófagos, NK	Escasa evidencia. Se ha relacionado con alteraciones de la barrera epitelial y con respuestas a alérgenos y microorganismos . Efecto antiinflamatorio : disminuye las citoquinas Th2 y la activación de células Th1 y Th2 (92,289).
IL-25	Tipo 2	Linfocitos Th2, células epiteliales	Se han reportado niveles incrementados en la RSCcPN y la EREA, donde potencia la respuesta inflamatoria Th2 , al inducir la liberación de IL-4, IL-5 e IL-13 por las ILC2 (1,228).
IL-33	Tipo 2	Linfocitos Th2, células epiteliales	No se han reportado niveles incrementados en la RSCcPN ni en la EREA, pero se ha relacionado con su patogénesis al inducir la producción de citoquinas Th2 y el reclutamiento de eosinófilos (1,92,228).
IL-17A	Tipo 3	Linfocitos Th17	Se han reportado niveles incrementados en la RSCcPN y la EREA. Aumenta la liberación de IL-6 y GM-CSF tisular, favoreciendo la inflamación eosinofílica persistente (290).

3. RESPUESTA INDUCIDA POR α -hemolisina y SpA

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas α -hemolisina y SpA son capaces de inducir la liberación de mediadores por varias células diana en pacientes con RSCcPN. Además, su efecto también ha sido demostrado en el estudio de otras patologías con marcado componente inflamatorio, como la dermatitis atópica (171), así como en otras células epiteliales de línea diferentes de BEAS-2B (168,291). Sin embargo, sus efectos en las células BEAS-2B y en cultivos primarios de CEPN ha sido muy poco estudiado.

En el modelo de estimulación propuesto, α -hemolisina y SpA provocaron diferentes efectos en las células. α -hemolisina (1 μ g/ml) únicamente destacó por inducir la liberación de elevadas concentraciones de IL-8 en células BEAS-2B, mientras que la respuesta fue muy discreta en las CEPN. Por el contrario, SpA (1 μ g/ml) indujo la liberación de todas las citoquinas analizadas en las CEPN, excepto IL-5 e IL-33, provocando un aumento discreto de IFN- γ e IL-17A en las células BEAS-2B.

3.1. α -hemolisina

En células epiteliales de línea, α -hemolisina (40 – 2000 ng/ml) es capaz de inducir la producción de elevadas concentraciones de IL-8 e IL-6, pero no de otras citoquinas, como IL-4, IL-5, IL-10 o IFN- γ (168,291). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro modelo, donde la liberación de IL-8 inducida por α -hemolisina (1 μ g/ml) en células BEAS-2B, se caracterizó por su intensidad y cinética tiempo-dependiente.

Pero en contra de lo esperado, α -hemolisina no indujo el mismo efecto en las CEPN de pacientes con EREA. Estudios previos, como el realizado por Okano *et al* (247), han demostrado que las células de pólipos nasales de pacientes con RSCcPN, son capaces de liberar IL-5, IL-13, IFN- γ , IL-17A e IL-10, al ser estimuladas con concentraciones bajas de α -hemolisina (0,01, 0,1 y 1,0 ng/ml) durante tiempos prolongados, concretamente 24 y 72 horas. En consonancia, estudios realizados en pacientes con dermatitis atópica, han demostrado que la estimulación de células T con diferentes concentraciones de α -hemolisina ($\leq$ 100 ng/ml), provocan la liberación de IFN- γ (169), IL-22 (170) e IL-17 (171).

Es conocida la participación de α -hemolisina en diferentes vías de señalización intracelular, donde concentraciones elevadas pueden desencadenar fenómenos de apoptosis con distintas susceptibilidades en función del tipo celular (166). En nuestro estudio, se empleó una concentración única de 1 μ g/ml y no se realizaron ensayos de citotoxicidad a diferentes

concentraciones. Aunque desconocemos el efecto en células epiteliales nasales, esta concentración ha demostrado ser capaz de inducir la muerte celular de linfocitos T con tan solo 30 minutos de exposición (169).

Por ello, antes de afirmar que α -hemolisina no induce la liberación de citoquinas en las CEPN de pacientes con EREA, sería necesario realizar ensayos de estimulación adicionales, empleando concentraciones sublétricas de toxina (≤ 100 ng/ml) y considerando también su estudio en tiempos más cortos (1 hora y/o 30 minutos).

3.2. SpA

En nuestro estudio encontramos que la respuesta a la estimulación con SpA de las células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA, indujo la liberación de IFN- γ , IL-21, IL-17A, IL-10, IL-13 e IL-8, con niveles significativamente más elevados en comparación con las células sin estímulo, excepto en IL-8, cuyos niveles fueron significativamente más altos en las células no estimuladas con SpA, conteniendo medio de cultivo BEBM. Las cinéticas de liberación y niveles de expresión siguieron un patrón similar en IFN- γ , IL-21 e IL-17A, mientras que para IL-8, IL-10 e IL-13 fueron muy diferentes a las anteriores y entre sí.

Estas citoquinas se relacionan con diferentes respuestas inflamatorias y funciones celulares. De esta forma IFN- γ , IL-17A e IL-13 son importantes marcadores proinflamatorios reconocidos, especialmente relacionados con el reclutamiento y diferenciación de eosinófilos, promoviendo la inflamación eosinofílica persistente en pacientes con RSCcPN y/o EREA. Sin embargo, difieren en su origen y respuestas inflamatorias, favoreciendo la actividad Th1, Th17 y Th2, respectivamente. Por otro lado, hasta nuestro estudio, no se ha descrito una relación significativa con respecto a la presencia de las citoquinas IL-21, IL-8 e IL-10 en los pacientes con EREA.

De todas las citoquinas mencionadas, especialmente observamos diferencias significativas al estudiar la IL-8, potente citoquina proinflamatoria y quimioatrayente de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T. Su producción siguió una cinética tiempo-dependiente, mostrando un incremento elevado a partir de las 8 horas y llegando a alcanzar concentraciones superiores a los 6.000 pg/ml en las CEPN estimuladas con SpA y a los 10.000 pg/ml en las células sin estímulo.

Estos resultados demuestran que SpA es capaz de ejercer una regulación negativa en la producción basal de IL-8 por las CEPN, y desempeñar un papel regulador en la respuesta

inmunitaria innata de pacientes con EREA. Kohanski *et al* (270), determinaron la respuesta de las células epiteliales sinusales a diferentes inóculos de *S. aureus*, y obtuvieron una menor liberación de IL-8 en las células de pacientes con RSCcPN en comparación con su población control. También, Damm *et al* (279) demostraron una mayor producción de IL-8 en células epiteliales de controles estimuladas con SEB. Aunque son necesarios estudios adicionales para determinar el efecto de *S. aureus* o las proteínas estafilocócicas en la producción de IL-8 por células epiteliales nasosinusales, estos resultados sustentan la hipótesis de que *S. aureus* podría influir en la atenuación de la respuesta inflamatoria innata en la PN, creando un entorno que predispone a la colonización nasal persistente.

IL-10 es una citoquina antiinflamatoria con importantes funciones en la respuesta del epitelio de las vías respiratorias tras la interacción de agentes patógenos, dando lugar a una reducción en la síntesis de citoquinas Th1 y Th2 (289). La liberación de IL-10 inducida por SpA en las CEPN de pacientes con EREA muestra un aumento significativo con respecto al grupo control a las 12 horas de estimulación, mostrando una cinética muy diferente a la del resto de citoquinas.

Estudios basados en la estimulación de monocitos humanos con lipopolisacárido bacteriano, han demostrado que la producción de IL-10 ocurre más tarde en comparación con otras citoquinas con potencial efecto proinflamatorio, alcanzando el máximo a las 24-48 horas (292). Por tanto, nuestros resultados podrían respaldar la hipótesis de que IL-10 participa en las últimas fases de la respuesta inmunitaria innata, disminuyendo el efecto inducido por la liberación temprana de citoquinas proinflamatorias tras la exposición al estímulo.

También, cabe destacar, la elevada expresión de IFN- γ detectada en las CEPN estimuladas con SpA, con valores entre 7,2 y 13,9 veces superiores, dependiendo del tiempo de exposición, en comparación con el grupo control. Como se ha mencionado anteriormente, IFN- γ es una citoquina Th1 relacionada con la patogénesis de la RSCsPN. Pero además, constituye un marcador típico de EREA, donde se ha relacionado con la activación de eosinófilos, siendo estas células una fuente importante de IFN- γ (286). En la misma dirección, Hu *et al* (293) demostraron que SpA es capaz de inducir la expresión de IFGR1 y pJAK-2 en células epiteliales nasales de pacientes con RSC, activando las vías de señalización mediadas por IFN- γ .

Del mismo modo, los eosinófilos y las células ILC2 se han relacionado con la producción de IL-13, importante citoquina Th2, la cual participa en el reclutamiento y activación de los eosinófilos, y promueve la inflamación a nivel local (92). En nuestro estudio, las concentraciones de IL-13 inducidas por SpA en las CEPN no fueron elevadas, detectándose un mayor incremento

a las 2 horas de estimulación, lo que pudiera estar en asociación con una respuesta rápida al estímulo.

En cuanto al papel de IL-17A en la RSCcPN, existen diversos estudios, como el realizado por Mikiyara *et al* (290) en modelos de estimulación del tejido polipoide *in vivo* y *ex vivo* con SEB, en el que se demuestra que el aumento de los niveles de IL-17A está directamente relacionado con una mayor inflamación eosinofílica. Los resultados obtenidos en nuestro estudio también ponen de manifiesto un incremento significativo de IL-17A en comparación con el grupo control, con una concentración media 4,3 veces superior en el grupo EREA, independientemente del tiempo de exposición.

En resumen, estos resultados demuestran que SpA puede ejercer un efecto dual en las células epiteliales nasales, induciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, con el objetivo de modular la respuesta inmunitaria innata de pacientes con EREA. Además, es capaz de ejercer una regulación negativa en la liberación de IL-8, potente citoquina proinflamatoria con niveles de expresión muy elevados en las CEPN no estimuladas. Todo ello, sustenta la hipótesis de que *S. aureus* podría influir en la atenuación de la respuesta inflamatoria innata en la PN, creando un entorno que predispone a la colonización nasal persistente.

4. CARACTERÍSTICAS DE *S. aureus*

4.1. Cultivo bacteriológico de las muestras de exudado nasal

Como ya se ha comentado previamente, la colonización nasal por determinados microorganismos ha sido relacionada con el desarrollo y gravedad de la RSCcPN, lo que ha conducido a la realización de numerosos estudios para determinar la composición y diversidad de la microbiota nasal en los diferentes tipos de RSC.

En nuestro estudio, las muestras nasales tomadas con hisopo de los pacientes con EREA, fueron cultivadas con el objetivo de identificar la colonización por *S. aureus* y proceder al aislamiento de estas cepas para su caracterización microbiológica. Por tanto, las condiciones de cultivo fueron seleccionadas en base a dicho propósito, impidiendo el aislamiento de microorganismos de difícil crecimiento, crecimiento lento o requerimientos nutricionales específicos, como *Haemophilus* spp., hongos filamentosos o bacterias anaerobias. Así mismo, para una mayor comprensión de las características de la población estudiada, se decidió realizar

un análisis descriptivo mediante la identificación de todos los microorganismos aislados en el cultivo bacteriológico.

De los cultivos con crecimiento (76,8%), la mayoría fueron polimicrobianos (83,7%), con una media de 2,2 aislamientos diferentes por paciente. En total se identificaron 86 especies bacterianas y fúngicas diferentes. La más predominante fue *S. epidermidis*, representando el 33,7% de los aislamientos, seguido de *S. aureus* en el 22,1%. De hecho, el grupo correspondiente a los gram positivos fue mucho más numeroso en comparación con las bacterias gram negativas y hongos.

Estudios realizados mediante técnicas basadas en cultivo describen una distribución microbiana diversa en pacientes con RSC, con algunas discrepancias en las especies reportadas, principalmente en relación con bacilos gram negativos y anaerobios. No obstante, la mayoría de ellos demuestran una mayor tasa de ECN, *S. aureus*, *Streptococcus* spp. y *H. influenzae*, entre las bacterias aerobias/anaerobias facultativas, y de *Prevotella* spp. y *Peptostreptococcus* spp., entre las bacterias anaerobias estrictas (119,120,217). Aunque la variabilidad encontrada podría ser debida a las diferencias interindividuales, las características metodológicas juegan un papel muy importante. Entre ellas destacan la selección de los métodos de muestreo (lavado, biopsia, frotis, etc.), las regiones anatómicas muestreadas (cavidad nasal o senos paranasales), los procedimientos de cultivo (con o sin medios específicos) o tiempos de incubación, los criterios de selección de pacientes (diferenciación entre los distintos tipos de RSC, edad, asma concomitante, gravedad, etc.) y el consumo de antibióticos previo a la toma de la muestra.

De todas estas causas de variabilidad, nos parece de suma importancia la zona de muestreo, ya que no todas las regiones de la cavidad nasal están igualmente involucradas en la patogénesis de la RSCcPN ni contienen los mismos microorganismos, los cuales, a su vez, podrían influir en el desarrollo y agravamiento del cuadro clínico. Puesto que el meato medio es la zona en la que se originan los pólipos y comunica con la cavidad nasal anterior, la cual constituye el nicho ecológico principal de *S. aureus* en humanos (210), esta localización debería ser considerada de elección en estudios de este tipo.

En los últimos años, el estudio del microbioma ha adquirido especial interés motivado, principalmente, por el desarrollo de técnicas de genómica o metagenómica, como la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA o la secuenciación del genoma completo, las cuales permiten caracterizar de forma más precisa la composición y diversidad de las comunidades microbianas. De un modo general, han reemplazado a los métodos convencionales de cultivo, los cuales, debido a sus limitaciones, se han considerado subóptimos para este tipo de estudios.

Los métodos de secuenciación, además de presentar una mayor sensibilidad y rendimiento, proporcionan más información al detectar microorganismos no cultivables o difícilmente cultivables. Entre las limitaciones destacan la detección de microorganismos no viables, el elevado coste y la escasa aplicabilidad en la práctica clínica de determinados procesos.

Cabe destacar que la aplicación de las técnicas de secuenciación del gen 16S rRNA en estudios de microbioma en RSCcPN, ha permitido demostrar una menor diversidad bacteriana, así como una reducción en la uniformidad de especies (294,295). En la RSCcPN, la reducción de riqueza del microbioma pudiera favorecer la colonización por un determinado microorganismo y el incremento de su concentración en la cavidad nasal como, por ejemplo, de *S. aureus*.

En cuanto a la composición bacteriana de la microbiota, al igual que con los métodos basados en cultivo, se han encontrado diferencias entre los diferentes estudios. Así mismo, en términos generales, las especies más prevalentes en RSCcPN son *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* o *Propionibacterium (Cutibacterium) acnes*, entre otros (120,296). En esta variabilidad también pudiera influir el uso previo de antibióticos, así como, las diferencias en las zonas de muestreo.

Actualmente, en el contexto de la RSCcPN, las técnicas de secuenciación no se aplican en la práctica clínica diaria, pero si son ampliamente utilizadas en estudios de investigación, fundamentales para esclarecer el papel del microbioma en su patogénesis y determinar las medidas terapéuticas o preventivas que pudieran suponer una mejora para el control de la enfermedad.

Aunque faltan evidencias científicas para determinar con exactitud la influencia de los microorganismos en la RSCcPN y, por tanto, en la EREA, la aplicación de estrategias de diagnóstico microbiológico podría ser coste-efectiva y de gran utilidad. Por ejemplo, podría fundamentarse en el empleo de PCRs multiplex o microarrays dirigidos frente a patógenos específicos relacionados con infecciones agudas o con participación en el agravamiento de la RSCcPN, seguidas del cultivo bacteriológico para el aislamiento y estudio de sensibilidad de los patógenos detectados. Además, probablemente, la aplicación de estas técnicas podría favorecer la optimización y reducción del consumo de antibióticos en pacientes con EREA.

4.2. Colonización nasal por *S. aureus* en pacientes con EREA

En nuestra serie, *S. aureus* fue aislado en el 34% (n= 19) de los pacientes con EREA incluidos en el estudio (n= 56). El cultivo bacteriológico fue realizado a partir de muestras nasales

tomadas con hisopo, obteniendo un elevado porcentaje de cultivos estériles (23,2%, n= 13), por lo que consideramos que la tasa de colonización obtenida pudiera estar infraestimada.

La ausencia de crecimiento microbiano en los cultivos fue detectada únicamente en las fases más iniciales del proyecto, siendo atribuidos al empleo de alguna sustancia inhibidora del crecimiento bacteriano previo a la toma de la muestra. Este resultado no pudo ser cotejado con las muestras de tejido (pólipos nasales) recogidas simultáneamente, puesto que, debido al tamaño de los pólipos y sobre todo a las limitaciones intrínsecas de la propia técnica, se destinaron íntegramente al cultivo primario de células epiteliales.

Además, la infraestimación de la prevalencia en nuestra cohorte se sustenta por el hecho de ser muy inferior a la reportada por otros autores en pacientes con EREA. Por ejemplo, Van Zele *et al* (211), obtuvieron porcentajes superiores al 65% en el grupo de PN y asma, y del 85% en el grupo de PN e hipersensibilidad a la aspirina, aunque con un tamaño muestral reducido (n= 18 y n= 8, respectivamente). Navalpotro *et al* (5), incluyeron en su estudio 28 pacientes con EREA, siendo detectada la presencia de *S. aureus* en el 68%. Sin embargo, no es frecuente encontrar una diferenciación del grupo EREA en estudios de RSCcPN y colonización por *S. aureus*, por lo que no disponemos de información extensa y contrastada en la literatura. En pacientes con RSCcPN se han realizado más estudios, generalmente comparando entre RSCsPN y controles sanos, con porcentajes de prevalencia de *S. aureus* que oscilan entre el 24% y el 63% (211,218), valores más próximos a los obtenidos en la población estudiada.

Como se puede observar en estas cifras, los datos de prevalencia de *S. aureus* publicados en la literatura son muy variables entre los diferentes estudios, tanto en la EREA como en la RSCcPN. También, en la población adulta general existe una variación global de la prevalencia de portadores nasales de *S. aureus* entre estudios, siendo aproximadamente del 50%, con diferenciación entre individuos con colonización persistente (20%) o intermitente (30%) (118).

En línea con los puntos anteriormente descritos, las causas metodológicas juegan un importante papel en la variabilidad de los resultados. En este sentido, destacan las técnicas empleadas para la detección de *S. aureus* (cultivo bacteriológico o técnicas moleculares) y los procedimientos de toma de muestra (lavado nasal o hisopo) o la inclusión de muestras de pólipos nasales. En este último caso, se esperaría obtener un mayor rendimiento al poder recuperar microorganismos adheridos al tejido o formando parte de biofilms mediante un proceso previo de sonicación. Sin embargo, se trata de una muestra extraída mediante un procedimiento invasivo, cuya realización no está justificada en la totalidad de los casos.

En cuanto a los procedimientos utilizados para la detección de *S. aureus*, el cultivo bacteriológico es el procedimiento más comúnmente utilizado. Sin embargo, en comparación con las técnicas moleculares presenta menor sensibilidad. Por ello, estudios basados únicamente en técnicas tradicionales de cultivo, podrían proporcionar datos infraestimados de colonización nasal en la población general (296), lo cual también podría extrapolarse a los estudios de RSCcPN o EREA. Además, la sensibilidad se reduce significativamente si el cultivo se realiza directamente en placa, sin la aplicación previa de un medio líquido de enriquecimiento. Por ejemplo, en el estudio realizado por Tsang *et al* (297), en el que se incluyeron 257 pacientes sanos prequirúrgicos (artroplastia articular), se obtuvieron porcentajes de colonización nasal por *S. aureus* del 37,9% (IC 95%: 32,0 – 44,0) y del 33,7% (IC 95%: 24,2 – 44,3) con PCR (Xpert *S. aureus* Nasal Complete Assay, GeneXpert instrument, Cepheid) y cultivo pre-enriquecido con un medio líquido (Sigma Tryptic Soy broth), respectivamente, mientras que el porcentaje se redujo significativamente hasta el 23,6% (IC 95%: 17,4 – 30,9) con el cultivo directo en placa.

En nuestro trabajo, la detección de *S. aureus* en los hisopos tomados de pacientes con EREA se realizó mediante ambos procedimientos, el cultivo bacteriológico en sus dos modalidades (directamente en placa y con pre-enriquecimiento en medio líquido) y por PCR Real-Time en la plataforma BD MAX™ (Becton Dickinson). Ambos métodos se aplicaron sobre la misma muestra, primero el cultivo e inmediatamente después la PCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Únicamente se detectó un caso discordante, positivo para *S. aureus* por PCR y negativo por cultivo, lo que podría explicarse por la baja carga bacteriana presente en la muestra (CT 33,5), por la detección de DNA de cepas no viables o por el crecimiento abundante de otros microorganismos identificados que podrían afectar al crecimiento de *S. aureus*, entre ellos, *P. mirabilis*, *S. epidermidis* y *S. hominis*. Aunque la concordancia entre ambos métodos fue óptima, debemos tener en cuenta que la PCR sólo se realizó en el 71,4% de los pacientes (n= 40), en los que la muestra fue remitida en el medio de transporte Stuart Amies líquido. El empleo de un único hisopo recogido en un medio de transporte con gel para la realización de ambas técnicas podría dar lugar a la obtención de resultados falsos negativos por PCR en muestras con baja carga bacteriana, al realizar una primera descarga en los medios de cultivo, entre los que incluimos el medio de enriquecimiento líquido BHI.

En el caso de *S. aureus*, es importante tener en cuenta otras causas que podrían justificar la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares con respecto al cultivo, como la presencia de biofilms bacterianos y la formación de variantes de colonia pequeña, debido a la reducida actividad metabólica, lento crecimiento y dificultad de aislamiento de las bacterias embebidas

en el interior del biofilm por su menor capacidad de dispersión en los medios de cultivo. Además, los biofilms permanecen adheridos a la superficie tisular, lo que dificulta y reduce la carga bacteriana, principalmente si el muestreo se realiza con un escobillón.

Por último, en pacientes con RSCcPN se ha demostrado que *S. aureus* es capaz de invadir el epitelio y penetrar en el interior de las células epiteliales de la mucosa nasal (214). Por tanto, la presencia de formas intracelulares también podría influir en el menor aislamiento y detección del microorganismo mediante procedimientos dependientes de cultivo.

4.3. Sensibilidad antibiótica y caracterización genotípica de *S. aureus*

Las 19 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA se caracterizaron por presentar altos porcentajes de sensibilidad a la mayoría de los antibióticos estudiados, con perfiles muy similares entre ellas. No se detectó ningún aislado resistente a meticilina por métodos fenotípicos ni genotípicos (detección gen *mecA/mecC* por PCR Real-Time), por lo que el 100% fueron clasificados como SASM. La mayoría de las cepas se caracterizaron por ser resistentes a penicilina, detectándose únicamente 3 aislados sensibles, uno de ellos pansensible y dos resistentes a eritromicina y clindamicina. Al tratarse de cepas con elevada sensibilidad a penicilina (CMI $\leq 0,3$ $\mu\text{g/ml}$), se descartó la presencia de betalactamasas mediadas por el gen *blaZ* (298) sin la realización de estudios genotípicos adicionales. Aunque la resistencia a penicilina en *S. aureus* constituye un fenotipo frecuente y ampliamente distribuido a nivel mundial, estudios recientes han demostrado un incremento de la sensibilidad global a penicilina en aislados de *S. aureus* de diversas muestras clínicas (299), lo que pudiera ser debido a una menor presión selectiva como consecuencia de su uso reducido en la práctica clínica.

Sin embargo, lo realmente destacado en cuanto al estudio de sensibilidad realizado en nuestras cepas, fue el alto porcentaje de resistencia a macrólidos y lincosamidas (42,1%, n= 8), grupos similares en cuanto a mecanismo de acción y resistencias antimicrobianas, representados por eritromicina y clindamicina, respectivamente, en los estudios de sensibilidad realizados. De las 8 cepas resistentes, 3 presentaron el fenotipo iMLSB (resistencia inducible), mientras que 2 fueron resistentes a eritromicina, pero sensibles a clindamicina (fenotipo M).

En el contexto de la RSC, hay muy pocos estudios que determinen la sensibilidad antibiótica de los microorganismos aislados en cultivo, limitándose a un número reducido de aislamientos correspondientes a una única especie bacteriana. Por lo general, al igual que lo observado en nuestro trabajo, otros autores obtienen bajas tasas de resistencia en *S. aureus*,

con porcentajes más elevados en el caso de penicilina y macrólidos, principalmente eritromicina, pero reportes anecdóticos de SARM (119,212,217). Estos resultados difieren de los obtenidos en aislamientos invasivos, cuyos patrones de susceptibilidad antibiótica han sido ampliamente estudiados. Generalmente, estas cepas son obtenidas de pacientes hospitalizados con bacteriemia o infecciones asociadas a dispositivos biomédicos como, por ejemplo, infecciones protésicas o endovasculares. En este contexto, la resistencia a meticilina ha adquirido especial protagonismo, debido a la elevada tasa de mortalidad y coste económico asociados. Los datos reportados han mostrado un incremento de SARM en las últimas décadas, alcanzando una incidencia del 20-30% en Europa (300). Con frecuencia, estas cepas adquieren otros mecanismos de resistencia que afectan a otras clases de antimicrobianos. Por ejemplo, en el caso de los macrólidos, un estudio realizado por Schmitz *et al* (301) en el que incluyeron cepas de *S. aureus* procedentes de 24 hospitales europeos, la sensibilidad a eritromicina en los aislados SASM fue 20 veces superior en comparación con los SARM.

En *S. aureus*, así como en otras especies bacterianas, la presión antibiótica se ha relacionado con la selección de cepas resistentes durante el tratamiento. Esto puede ser debido a la adquisición de mutaciones y/o elementos genéticos por parte del microorganismo, al sobrecrecimiento bacteriano de poblaciones resistentes o a la colonización/infección por otras cepas resistentes desde un foco secundario o fuente externa. Así, la menor sensibilidad observada en eritromicina y clindamicina con respecto al resto de los antibióticos estudiados podría ser debida a la exposición previa a macrólidos, concretamente claritromicina y azitromicina. Como se ha detallado previamente, éstos fueron los antibióticos más comúnmente prescritos en los pacientes con EREA incluidos en el estudio, los cuales, con frecuencia, habían recibido varias pautas de tratamiento antibiótico durante el curso de la enfermedad. En este sentido, cabe destacar, que en el 68,4% (n= 13) de los pacientes colonizados por *S. aureus* (n= 19) el último tratamiento antibiótico pautado fue claritromicina (> 3 meses previos a su inclusión en el estudio). De las cepas aisladas en estos 13 pacientes, el 53,8% (n=7) y el 38,5% (n= 5) fueron resistentes a eritromicina y clindamicina, respectivamente (datos no mostrados).

En pacientes con RSC, la influencia del tratamiento antibiótico en el desarrollo de resistencias ha sido documentada previamente. En un estudio realizado por Drilling *et al* (212), en el que se incluyeron 34 pacientes con RSC colonizados por *S. aureus* en 2-4 ocasiones diferentes durante un periodo de 13 meses, encuentran variaciones del perfil de sensibilidad de las cepas en el 21% (n= 7) de los pacientes. A pesar de estas diferencias, en 4 pacientes se demostró que se trataba de la misma cepa (idéntico PFGE tipo), mientras que, en los 3 casos restantes, los pacientes se recolonizaron por cepas de *S. aureus* diferentes (distinto PFGE tipo).

Los antibióticos con variación de la sensibilidad, en la mayor parte de los casos, fueron penicilina, eritromicina y clindamicina. Independientemente de la sensibilidad antibiótica, el 79% de los pacientes presentaron la misma cepa a lo largo del tiempo (mismo PFGE tipo), a pesar de haber recibido un tratamiento antibiótico oral y/o tópico.

La persistencia de *S. aureus* en la cavidad nasal de pacientes con RSC, así como en pacientes con EREA, podría estar muy relacionada con la formación de biofilms. Estas estructuras actúan como reservorios que permiten la recolonización y protegen al microorganismo de la acción de los antimicrobianos, lo cual también explicaría la mayor sensibilidad encontrada en nuestra cohorte a pesar de las pautas frecuentes de tratamiento antibiótico. Otros factores detallados previamente, como la presencia de variantes de colonia pequeña y formas intracelulares, también podrían contribuir a una mayor persistencia de *S. aureus* en la cavidad nasal.

Mención especial merece la gran diversidad genética encontrada entre las 19 cepas de *S. aureus* analizadas en nuestro estudio, clasificadas en 13 grupos genómicos diferentes (PFGE grupos A-M). Al tratarse de individuos estrechamente vinculados en cuanto al tipo y frecuencia de la asistencia sanitaria recibida, cabría esperar un porcentaje de similitud genotípica superior entre ellas. Además, algunos pacientes tenían historial médico en ambos centros hospitalarios, tanto en el CHGUV como en el HUP La Fe, donde habían sido atendidos durante diferentes episodios. A pesar de ello, la variabilidad encontrada sumada a los perfiles de sensibilidad antibiótica obtenidos y previamente detallados, sugieren que otros factores independientes de la relación con el entorno hospitalario, pudieran ser de mayor relevancia en el proceso de colonización por *S. aureus* en pacientes con EREA. Además, en estos pacientes las revisiones e intervenciones médico-quirúrgicas suelen ser cortas y realizadas de forma ambulatoria, sin necesidad de ingreso hospitalario con estancia prolongada, factor de riesgo relacionado con la colonización nasal por *S. aureus* y, especialmente, por SARM (210). Esta diversidad es coincidente con la descrita por Drilling *et al* (212) en el estudio anteriormente citado, en el que obtienen 16 pulsotipos diferentes en las cepas de *S. aureus* aisladas de 34 pacientes con RSC atendidos en el mismo centro sanitario.

En cuanto a la caracterización por *spa-typing*, aunque los datos quedaron limitados a 12 aislamientos, se obtuvieron hasta 9 *spa-types* distintos, 6 representados por una única cepa. En un número elevado de aislamientos no se obtuvieron secuencias con los *primers* empleados, lo que pudiera indicar la presencia de reordenamientos en la región del gen donde se produce el alineamiento del *primer forward* (F). Esta es una limitación reconocida de la propia técnica de

tipificación molecular, aunque estudios previos reportan un porcentaje de cepas no tipables muy inferior, en torno al 1-3% (302,303).

Los métodos de PFGE y *spa-typing* han sido ampliamente utilizados para la tipificación molecular de SARM, con el objetivo de estudiar la propagación y evolución de clones epidemiológicos. Con frecuencia, estas técnicas se realizan en combinación con otros métodos moleculares, como el MLST y/o la tipificación del cromosoma *mec* del casete estafilocócico (SCCmec). De todos ellos, el método PFGE es considerado el *gold standard* por su alto poder de discriminación. Sin embargo, debido a la falta de reproducibilidad entre laboratorios, normalmente se complementa con otras técnicas más reproducibles, pero con menor poder de discriminación, como las basadas en secuencias, MLST y *spa-typing* (304). Como consecuencia de las limitaciones mencionadas, así como por el empleo combinado de varias técnicas de tipado, lo cual supone un aumento del coste económico y de la tecnificación de los procesos, los métodos tradicionalmente empleados están siendo desplazados por técnicas de secuenciación del genoma completo (305).

5. ASOCIACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CITOQUINAS Y PARÁMETROS FISIOPATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Las citoquinas juegan un papel fundamental en el inicio y persistencia de la respuesta inflamatoria eosinofílica característica de la EREA. Sin embargo, los factores desencadenantes o que conducen a su regulación no se conocen con exactitud.

Estudios previos en RSCcPN, han demostrado que tanto las enterotoxinas estafilocócicas como las respuestas mediadas por SE-IgE, pueden resultar en la regulación positiva de las citoquinas producidas por eosinófilos, linfocitos y macrófagos, las cuales, a su vez, interaccionan e intervienen en algunas de las funciones desempeñadas por estas células. Asimismo, los niveles de SE-IgE se han relacionado con el aumento de IgE total y la inflamación eosinofílica persistente en la cavidad nasal (93), pudiendo existir una correlación entre estos parámetros y la concentración de citoquinas liberadas por estímulos estafilocócicos. Tanto el aumento de IgE específica como de IgE total a nivel local pudieran suponer un aumento de los niveles en sangre periférica, lo cual podría representar un marcador de inflamación nasal (98).

Con base en lo expuesto anteriormente y, de un modo general, determinamos la asociación existente entre la producción de citoquinas en los sobrenadantes de las CEPN, y el

grado de eosinofilia en el tejido polipoide y la concentración de IgE total en suero. También, se estudió la influencia entre el estado de portador nasal de *S. aureus* y la producción de citoquinas.

Uno de los hallazgos más relevantes en este contexto, fue la correlación negativa y significativa entre la concentración de IL-10 y la eosinofilia tisular ($\rho = -0,602$; $P = 0,025$). Este resultado es coincidente con el reportado en otros estudios de RSCcPN como, por ejemplo, el realizado por Okano *et al* (247), quienes obtuvieron una correlación negativa fuerte ($P = 0,009$) entre la eosinofilia tisular y los niveles de IL-10 inducidos por α -hemolisina (1 ng/ml) en células de pólipos nasales.

Se sabe que IL-10 juega un papel fundamental en el control de la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias, así como en la respuesta a alérgenos y microorganismos. Además, en la RSCcPN, IL-10 se ha relacionado con la disminución de citoquinas Th2, como IL-4 e IL-5, las cuales participan en el reclutamiento y activación de eosinófilos (289). Sin embargo, hay pocas evidencias acerca del efecto celular *in vitro* de los antígenos estafilocócicos y su posible asociación con el grado de eosinofilia en el tejido polipoide. Así, estos resultados contribuyen a reforzar el posible papel modulador de *S. aureus* sobre la respuesta inmunitaria innata y, en este caso, a través del aumento de IL-10, favorecer el efecto protector frente a la inflamación eosinofílica persistente en pacientes con EREA.

También, en cuanto a la liberación de IL-10, observamos un aumento ligero pero significativo en pacientes colonizados por *S. aureus* en comparación con los no colonizados. Este resultado está en línea con lo mencionado anteriormente, ya que la presencia de *S. aureus* en la cavidad nasal podría favorecer la producción de IL-10 inducida por SpA y contrarrestar el efecto proinflamatorio de otras citoquinas elevadas en la EREA, como IFN- γ e IL-8, favoreciendo así la creación de un entorno inflamatorio favorable para la proliferación bacteriana persistente.

Otro de los hallazgos de nuestro estudio que podrían justificar este efecto regulador (“atenuador”) de *S. aureus* sobre la respuesta inflamatoria típica de la EREA, se relaciona con la liberación de IL-8, potente citoquina quimiotáctica proinflamatoria. Encontramos que la presencia de *S. aureus* en la cavidad nasal, podría influir negativamente en la concentración de IL-8 en los sobrenadantes de las células no estimuladas, con concentraciones significativamente más bajas en comparación con los pacientes no colonizados. Además, estos resultados respaldarían el efecto reductor de SpA sobre la concentración de IL-8 en estas células. Sin embargo, estas aproximaciones están basadas en modelos *in vitro* y no hay publicaciones que constaten estas asociaciones. Por tanto, son necesarios estudios adicionales que demuestren la relación entre la colonización nasal por *S. aureus* en la EREA y la concentración de IL-8.

Por otro lado, también hay que destacar la correlación positiva y significativa encontrada entre la concentración de IL-13 inducida por SpA y la eosinofilia tisular ($\rho = 0,573$; $P = 0,035$). IL-13, al igual que otras citoquinas tipo 2, como IL-4 e IL-5, ha sido clásicamente involucrada en la patogénesis de la EREA y otras entidades clínicas con mecanismos fisiopatológicos comunes, como el asma o la dermatitis atópica. Estas citoquinas participan en el reclutamiento y activación de los eosinófilos, favoreciendo el mantenimiento de la respuesta inflamatoria eosinofílica Th2. No hemos encontrado estudios que determinen una correlación directa entre la producción de IL-13 y la eosinofilia tisular en la EREA. Sin embargo, en pacientes asmáticos, se ha demostrado una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de eosinófilos en las vías respiratorias, y el aumento de la expresión de ARNm para la síntesis de IL-13 en muestras de esputo y mucosa bronquial (306).

En nuestro estudio, la producción de IFN- γ , IL-17A e IL-21 inducida por SpA no se correlacionó significativamente con el grado de eosinofilia tisular, pero con las tres citoquinas se observó una tendencia positiva muy marcada. Con respecto a IFN- γ e IL-17A, la asociación con la respuesta inflamatoria eosinofílica en pacientes con EREA (IFN- γ) y RSCcPN (IL-17A) se ha detallado con anterioridad, en el apartado 3.2 de la discusión, mientras que con IL-21 la evidencia es escasa y no hemos encontrado estudios previos que demuestren su asociación con el grado de eosinofilia en el tejido polipoide de pacientes con RSCcPN.

Dado que IFN- γ constituye un marcador distintivo de EREA, consideramos importante recalcar que dicha correlación no ha sido descrita en pacientes tolerantes con PN, donde, al contrario que lo obtenido en nuestros resultados, otros autores describen una correlación negativa y significativa ($P = 0,048$) entre la producción de IFN- γ y la eosinofilia tisular (247).

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este trabajo de tesis doctoral se caracterizó por el desarrollo de un modelo experimental de estimulación celular *in vitro*, cuyos resultados se complementaron con otros estudios microbiológicos y clínicos. La selección propia de las variables (grupo de pacientes, tipos celulares, estímulos, etc.), las cuales constituyen pilares fundamentales para definir el modelo de estimulación, confieren al estudio originalidad y exclusividad. Sin embargo, no carece de limitaciones importantes.

La principal limitación fue el tamaño muestral, el cual se redujo todavía más en los ensayos de estimulación celular con SpA, como consecuencia de la inversión inicial necesaria

para la estandarización del modelo. Al incluirse únicamente pacientes con EREA, la dificultad para aumentar el tamaño muestral fue debida a la propia prevalencia de la enfermedad. En nuestro caso, para disponer de una “n” mayor se podrían haber incluido pacientes de más centros hospitalarios. Sin embargo, la necesidad de realizar el procesado inmediato de las muestras para la obtención de células epiteliales a partir de cultivos primarios podría haber condicionado la obtención de resultados favorables.

Por otro lado, al incluirse únicamente pacientes con EREA candidatos a CENS y/o con pólipos de tamaño suficiente para tomar muestras biópsicas, podría haberse introducido algún sesgo de selección, ya que pudiera no estar representada la totalidad de la población. Además, al no haber estudiado pacientes con RSCcPN tolerantes a la aspirina o no asmáticos y/o pacientes con RSCsPN, no podemos concluir que los hallazgos encontrados sean exclusivos de la EREA.

Otra de las limitaciones importantes en este tipo de estudios, es la heterogeneidad de las muestras utilizadas y de la respuesta inmunitaria. La composición del tejido polipoide, así como la respuesta celular a determinados estímulos, se caracteriza por una enorme variabilidad interindividual. Al seleccionar únicamente células epiteliales se trató de reducir dicha variabilidad. Sin embargo, la presencia exclusiva de estas células solo fue confirmada visualmente, por lo que no se puede asegurar con certeza la eliminación completa de otros tipos celulares, principalmente fibroblastos. Además, para determinar con una mayor exactitud el papel de SpA en la patogénesis de la EREA, sería recomendable determinar su efecto sobre otros tipos celulares esenciales en la liberación de citoquinas como son, por ejemplo, los eosinófilos.

Finalmente, en nuestro estudio, se ha determinado la expresión de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo celular, pero no los niveles de genes codificantes de dichas citoquinas. Así, los resultados obtenidos *in vitro* podrían no reflejar lo que ocurre *in vivo*, donde pueden participar mecanismos tanto sinérgicos como antagónicos, dando lugar a diferencias en la expresión de citoquinas.

CONCLUSIONES

1. El modelo de estimulación *in vitro* sobre cultivos primarios de células epiteliales de pólipos nasales basado en el medio de crecimiento BEBM y la técnica de inmunoensayo Luminex®, ha permitido cuantificar la producción de citoquinas relacionadas con la respuesta inmunitaria innata en pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs.
2. La proteína A de *S. aureus* es capaz de interaccionar con las células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA, e inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-13 e IL-17A) y antiinflamatorias (IL-10), provocando un efecto regulador en la respuesta inmunitaria innata.
3. La liberación de IFN- γ , IL-13 e IL-17A inducida por la proteína A de *S. aureus*, puede contribuir al mantenimiento de la respuesta inflamatoria crónica a nivel local, al mostrar una relación positiva con el grado de eosinofilia en el tejido polipoide de pacientes con EREA.
4. La proteína A de *S. aureus* reduce la liberación de IL-8 e induce un aumento de IL-10 en las células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA, pudiendo ejercer un efecto antiinflamatorio y atenuar la intensidad de la respuesta inflamatoria, lo que favorece la creación de un entorno que predispone a la colonización nasal persistente.
5. La variedad de pulsotipos y *spa*-types obtenidos en las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con EREA, son indicativos de la gran diversidad genética existente entre ellas, así como de la ausencia de diseminación clonal entre los pacientes incluidos en el estudio.
6. La inclusión de pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por AINEs en programas de cribado de colonización nasal por *S. aureus*, podría contribuir a un mejor control y manejo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bachert C, Marple B, Schlosser RJ, Hopkins C, Schleimer RP, Lambrecht BN, *et al.* Adult chronic rhinosinusitis. *Nat Rev Dis Prim.* 2020;6(1):86.
2. Kowalski ML, Agache I, Bavbek S, Bakirtas A, Blanca M, Bochenek G, *et al.* Diagnosis and management of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (N-ERD)-a EAACI position paper. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2019;74(1):28–39.
3. Kowalski ML, Asero R, Bavbek S, Blanca M, Blanca-Lopez N, Bochenek G, *et al.* Classification and practical approach to the diagnosis and management of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2013;68(10):1219–32.
4. 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):1449-1456.e4.
5. Navalpotro D, Armengot M (dir. tes.), Gimeno C (dir. tes.). Implicación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en las poliposis nasales. [Tesis Doctoral]. Valencia: Universidad de Valencia; 2016. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=75672>.
6. Alobid I, Antón E, Armengot M, Chao J, Colás C, del Cuvillo A, *et al.* SEAIC-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011;21 Suppl 1:1–58.
7. Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl.* 2007;20:1–136.
8. Wensing M, Vingerhoets E, Grol R. Functional status, health problems, age and comorbidity in primary care patients. *Qual Life Res.* 2001;10(2):141–8.
9. Gliklich RE, Metson R. The health impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113(1):104–9.
10. Vento SI, Ertama LO, Hytönen ML, Wolff CH, Malmberg CH. Nasal polyposis: clinical course during 20 years. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000;85(3):209–14.
11. Bhattacharyya N, Orlandi RR, Grebner J, Martinson M. Cost burden of chronic rhinosinusitis: a claims-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;144(3):440–5.
12. Alobid I, Bernal-Sprekelsen M, Mullol J. Chronic rhinosinusitis and nasal polyps: the role of generic and specific questionnaires on assessing its impact on patient's quality of life.

- Allergy. 2008;63(10):1267–79.
13. Collins JG. Prevalence of selected chronic conditions: United States, 1990-1992. *Vital Health Stat 10*. 1997;(194):1–89.
 14. Blackwell DL, Collins JG, Coles R. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 1997. *Vital Health Stat 10*. 2002;(205):1–109.
 15. Bhattacharyya N. Clinical and symptom criteria for the accurate diagnosis of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2006 Jul;116(7 Pt 2 Suppl 110):1–22.
 16. Tomassen P, Newson RB, Hoffmans R, Lötvall J, Cardell LO, Gunnbjörnsdóttir M, *et al*. Reliability of EP3OS symptom criteria and nasal endoscopy in the assessment of chronic rhinosinusitis - A GA(2)LEN study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2011;66(4):556–61.
 17. 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 Eur J Allergy Clin Immunol*. 2011;66(9):1216–23.
 18. Shi JB, Fu QL, Zhang H, Cheng L, Wang YJ, Zhu DD, *et al*. Epidemiology of chronic rhinosinusitis: results from a cross-sectional survey in seven Chinese cities. *Allergy*. 2015;70(5):533–9.
 19. Ostovar A, Fokkens WJ, Vahdat K, Raeisi A, Mallahzadeh A, Farrokhi S. Epidemiology of chronic rhinosinusitis in Bushehr, southwestern region of Iran: a GA2LEN study. *Rhinology*. 2019;57(1):43–8.
 20. Hirsch AG, Stewart WF, Sundaresan AS, Young AJ, Kennedy TL, Scott Greene J, *et al*. Nasal and sinus symptoms and chronic rhinosinusitis in a population-based sample. *Allergy*. 2017;72(2):274–81.
 21. Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melén I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skövde population-based study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112(7):625–9.
 22. Khan A, Vandeplas G, Huynh TMT, Joish VN, Mannent L, Tomassen P, *et al*. The Global Allergy and Asthma European Network (GALEN) rhinosinusitis cohort: a large European cross-sectional study of chronic rhinosinusitis patients with and without nasal polyps. *Rhinology*. 2019;57(1):32–42.
 23. Alobid I, Cardelus S, Benítez P, Guilemany JM, Roca-Ferrer J, Picado C, *et al*. Persistent

- asthma has an accumulative impact on the loss of smell in patients with nasal polyposis. *Rhinology*. 2011;49(5):519–24.
24. Mullol J, Picado C. Rhinosinusitis and nasal polyps in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2013;33(2):163–76.
 25. Ragab A, Clement P, Vincken W. Objective assessment of lower airway involvement in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*. 2004;18(1):15–21.
 26. Widal F, Abrami P, Lermoyez J. First complete description of the aspirin idiosyncrasy-asthma-nasal polyposis syndrome (plus urticaria)--1922 (with a note on aspirin desensitization). *J Asthma*. 1987;24(5):297–300.
 27. Max Samter, Ray F JR Beers J. Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis. *Ann Intern Med*. 1968;68(5):975–83.
 28. Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czaizniawska-Mysik G. Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. *Br Med J*. 1975;1(5949):67–9.
 29. Makowska JS, Burney P, Jarvis D, Keil T, Tomassen P, Bislimovska J, *et al*. Respiratory hypersensitivity reactions to NSAIDs in Europe: the global allergy and asthma network (GA2LEN) survey. *Allergy*. 2016;71(11):1603–11.
 30. Poposki JA, Klingler AI, Tan BK, Soroosh P, Banie H, Lewis G, *et al*. Group 2 innate lymphoid cells are elevated and activated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Immunity, Inflamm Dis*. 2017;5(3):233–43.
 31. Rajan JP, Wineinger NE, Stevenson DD, White AA. Prevalence of aspirin-exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: A meta-analysis of the literature. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):676-81.e1.
 32. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIAANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J*. 2000 Sep;16(3):432–6.
 33. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J*. 2004;24(5):758–64.
 34. 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.
35. Krause HF. Allergy and chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;128(1):14–6.
 36. Wilson KF, McMains KC, Orlandi RR. The association between allergy and chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: an evidence-based review with recommendations. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014;4(2):93–103.
 37. Emanuel IA, Shah SB. Chronic rhinosinusitis: allergy and sinus computed tomography relationships. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;123(6):687–91.
 38. Gutman M, Torres A, Keen KJ, Houser SM. Prevalence of allergy in patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(5):545–52.
 39. Marcus S, Schertzer J, Roland LT, Wise SK, Levy JM, DelGaudio JM. Central compartment atopic disease: prevalence of allergy and asthma compared with other subtypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020;10(2):183–9.
 40. DelGaudio JM, Levy JM, Wise SK. Central compartment involvement in aspirin-exacerbated respiratory disease: the role of allergy and previous sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019;9(9):1017–22.
 41. Tan BK, Zirkle W, Chandra RK, Lin D, Conley DB, Peters AT, *et al.* Atopic profile of patients failing medical therapy for chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2011;1(2):88–94.
 42. Ramadan HH, Fornelli R, Ortiz AO, Rodman S. Correlation of allergy and severity of sinus disease. *Am J Rhinol.* 1999;13(5):345–7.
 43. Pant H, Ferguson BJ, Macardle PJ. The role of allergy in rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;17(3):232–8.
 44. Braunstahl GJ, Kleinjan A, Overbeek SE, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Segmental bronchial provocation induces nasal inflammation in allergic rhinitis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(6):2051–7.
 45. Gaga M, Lambrou P, Papageorgiou N, Koulouris NG, Kosmas E, Fragakis S, *et al.* Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(5):663–9.

46. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 8:8–160.
47. Langdon C, Mullol J. Nasal polyps in patients with asthma: prevalence, impact, and management challenges. *J Asthma Allergy*. 2016;9:45–53.
48. Philpott CM, Erskine S, Hopkins C, Kumar N, Anari S, Kara N, *et al.* Prevalence of asthma, aspirin sensitivity and allergy in chronic rhinosinusitis: data from the UK National Chronic Rhinosinusitis Epidemiology Study. *Respir Res*. 2018;19(1):129.
49. Jarvis D, Newson R, Lotvall J, Hastan D, Tomassen P, Keil T, *et al.* Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy*. 2012;67(1):91–8.
50. Castillo JA, Plaza V, Rodrigo G, Julia B, Mullol J. Chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps and rhinitis in adult asthma. Frequency distribution and relationship with asthma control and severity (the IRIS-ASMA study). *Eur Respir J*. 2013;42(Suppl 57).
51. Lehrer E, Mullol J, Agredo F, Alobid I. Management of chronic rhinosinusitis in asthma patients: is there still a debate? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(6):440.
52. Batra PS, Tong L, Citardi MJ. Analysis of comorbidities and objective parameters in refractory chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2013;123 Suppl:S1-11.
53. Alobid I, Benítez P, Bernal-Sprekelsen M, Roca J, Alonso J, Picado C, *et al.* Nasal polyposis and its impact on quality of life: comparison between the effects of medical and surgical treatments. *Allergy*. 2005;60(4):452–8.
54. Mullol J, Boyce J, Dahlén S-E, Dahlén B, Picado C, Bobolea I. Eicosanoid dysregulation and type 2 inflammation in AERD. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(5):1157–60.
55. Zhang N, Gevaert P, van Zele T, Perez-Novo C, Patou J, Holtappels G, *et al.* An update on the impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. *Rhinology*. 2005;43(3):162–8.
56. Li KL, Lee AY, Abuzeid WM. Aspirin Exacerbated Respiratory Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Med Sci (Basel)*. 2019;7(3):45.
57. Pérez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, Van Cauwenberge P, Bachert C. Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal

- polyposis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(6):1189–96.
58. McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(2):F189-201.
 59. Narayanankutty A, Reséndiz-Hernández JM, Falfán-Valencia R, Teran LM. Biochemical pathogenesis of aspirin exacerbated respiratory disease (AERD). *Clin Biochem*. 2013;46(7–8):566–78.
 60. Laidlaw TM, Kidder MS, Bhattacharyya N, Xing W, Shen S, Milne GL, *et al*. Cysteinyl leukotriene overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease is driven by platelet-adherent leukocytes. *Blood*. 2012;119(16):3790–8.
 61. Taniguchi M, Mitsui C, Hayashi H, Ono E, Kajiwarra K, Mita H, *et al*. Aspirin-exacerbated respiratory disease (AERD): Current understanding of AERD. *Allergol Int*. 2019;68(3):289–95.
 62. Cavagnero K, Doherty TA. Cytokine and lipid mediator regulation of Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2s) in human allergic airway disease. *J cytokine Biol*. 2017;2(2). doi: 10.4172/2576-3881.1000116.
 63. Eastman JJ, Cavagnero KJ, Deconde AS, Kim AS, Karta MR, Broide DH, *et al*. Group 2 innate lymphoid cells are recruited to the nasal mucosa in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):101-108.e3.
 64. Buchheit KM, Cahill KN, Katz HR, Murphy KC, Feng C, Lee-Sarwar K, *et al*. Thymic stromal lymphopoietin controls prostaglandin D2 generation in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1566-1576.e5.
 65. Rugina M, Serrano E, Klossek JM, Crampette L, Stoll D, Bebear JP, *et al*. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. *Rhinology*. 2002;40(2):75–9.
 66. Greisner WA 3rd, Settipane GA. Hereditary factor for nasal polyps. *Allergy asthma Proc*. 1996;17(5):283–6.
 67. Mfuna-Endam L, Zhang Y, Desrosiers MY. Genetics of rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11(3):236–46.
 68. Bernstein JM, Anon JB, Rontal M, Conroy J, Wang C, Sucheston L. Genetic polymorphisms in chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2009;119(7):1258–

- 64.
69. Mfuno Endam L, Cormier C, Bossé Y, Filali-Mouhim A, Desrosiers M. Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(2):187–92.
70. Luxenberger W, Posch U, Berghold A, Hofmann T, Lang-Loidolt D. HLA patterns in patients with nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2000;257(3):137–9.
71. Fajardo-Dolci G, Solorio-Abreu J, Romero-Alvarez JC, Zavaleta-Villa B, Cerezo-Camacho O, Jiménez-Lucio R, et al. DQA1 and DQB1 association and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;135(2):243–7.
72. Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 genotypes in patients with nasal polyposis. *Laryngoscope.* 2000;110(3 Pt 1):422–5.
73. Hutson K, Clark A, Hopkins C, Ahmed S, Kumar N, Carrie S, et al. Evaluation of smoking as a modifying factor in chronic rhinosinusitis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2021;147(2):159–65.
74. Min YG, Jung HW, Kim HS, Park SK, Yoo KY. Prevalence and risk factors of chronic sinusitis in Korea: results of a nationwide survey. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 1996;253(7):435–9.
75. Alexiou A, Sourtzi P, Dimakopoulou K, Manolis E, Velonakis E. Nasal polyps: heredity, allergies, and environmental and occupational exposure. *J Otolaryngol - head neck Surg.* 2011;40(1):58–63.
76. Leland EM, Zhang Z, Kelly KM, Ramanathan MJ. Role of Environmental Air Pollution in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2021;21(8):42.
77. Hox V, Delrue S, Scheers H, Adams E, Keirsbilck S, Jorissen M, et al. Negative impact of occupational exposure on surgical outcome in patients with rhinosinusitis. *Allergy.* 2012;67(4):560–5.
78. Kim J, Hanley JA. The role of woodstoves in the etiology of nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(6):682–6.
79. Bachert C, Akdis CA. Phenotypes and Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016;4(4):621–8.

80. Akdis CA, Bachert C, Cingi C, Dykewicz MS, Hellings PW, Naclerio RM, *et al.* Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(6):1479–90.
81. Jankowski R. Eosinophils in the pathophysiology of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol.* 1996;116(2):160–3.
82. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, *et al.* Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy.* 2006;61(11):1280–9.
83. Jankowski R, Bouchoua F, Coffinet L, Vignaud JM. Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps. *Rhinology.* 2002;40(4):173–8.
84. Polzehl D, Moeller P, Riechelmann H, Perner S. Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy.* 2006;61(11):1275–9.
85. Cao P-P, Li H-B, Wang B-F, Wang S-B, You X-J, Cui Y-H, *et al.* Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(3):478–84, 484.e1-2.
86. Zhang N, Holtappels G, Claeys C, Huang G, van Cauwenberge P, Bachert C. Pattern of inflammation and impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyps from southern China. *Am J Rhinol.* 2006;20(4):445–50.
87. Soler ZM, Sauer D, Mace J, Smith TL. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;142(1):64–71.
88. Vlamincx S, Vauterin T, Hellings PW, Jorissen M, Acke F, Van Cauwenberge P, *et al.* The importance of local eosinophilia in the surgical outcome of chronic rhinosinusitis: a 3-year prospective observational study. *Am J Rhinol Allergy.* 2014;28(3):260–4.
89. Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol.* 1997;158(8):3902–8.
90. Vanderhaegen T, Gengler I, Dendooven A, Chenivesse C, Lefèvre G, Mortuaire G. Eosinophils in the field of nasal polyposis: towards a better understanding of biologic

- therapies. Clin Rev Allergy Immunol. 2022;62(1):90–102.
91. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, *et al.* Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. J Exp Med. 1994;179(3):881–7.
 92. Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, Sakashita M, Mahdavinia M, Suh L, *et al.* Cytokines in Chronic Rhinosinusitis. Role in Eosinophilia and Aspirin-exacerbated Respiratory Disease. Am J Respir Crit Care Med. 2015;192(6):682–94.
 93. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SGO, Van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(4):607–14.
 94. Krysko O, Holtappels G, Zhang N, Kubica M, Deswarte K, Derycke L, *et al.* Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. Allergy. 2011;66(3):396–403.
 95. Kato A. Immunopathology of chronic rhinosinusitis. Allergol Int. 2015 Apr;64(2):121–30.
 96. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens. Clin Exp Allergy. 2007;37(12):1840–7.
 97. Kato A, Peters A, Suh L, Carter R, Harris KE, Chandra R, *et al.* Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2008;121(6):1385–92, 1392.e1-2.
 98. Bernstein JM, Allen C, Rich G, Dryja D, Bina P, Reiser R, *et al.* Further observations on the role of *Staphylococcus aureus* exotoxins and IgE in the pathogenesis of nasal polyposis. Laryngoscope. 2011;121(3):647–55.
 99. Collins SA, Gove K, Walker W, Lucas JSA. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. Eur Respir J. 2014;44(6):1589–99.
 100. Colantonio D, Brouillette L, Parikh A, Scadding GK. Paradoxical low nasal nitric oxide in nasal polyposis. Clin Exp Allergy. 2002;32(5):698–701.
 101. Jeong JH, Yoo HS, Lee SH, Kim KR, Yoon HJ, Kim SH. Nasal and exhaled nitric oxide in chronic rhinosinusitis with polyps. Am J Rhinol Allergy. 2014;28(1):e11-6.

102. Liu C, Zheng M, He F, Wang X, Zhang L. Role of exhaled nasal nitric oxide in distinguishing between chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Am J Rhinol Allergy*. 2017;31(6):389–94.
103. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(3):451–4.
104. Samitas K, Carter A, Kariyawasam HH, Xanthou G. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited. *Allergy*. 2018;73(5):993–1002.
105. Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, *et al*. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):253–9.
106. Tong J, Gu Q. Expression and clinical significance of mucin gene in chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2020;20(11):63.
107. Liu L, Yan C, Tao S. Association of MUC2, MUC5AC and MUC5B genes with the recurrence of nasal polyps. *Exp Ther Med*. 2020;20(2):1808–14.
108. Milara J, Morell A, Ballester B, Armengot M, Morcillo E, Cortijo J. MUC4 impairs the anti-inflammatory effects of corticosteroids in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(3):855–62.
109. Saito DM, Innes AL, Pletcher SD. Rheologic properties of sinonasal mucus in patients with chronic sinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;24(1):1–5.
110. Zuckerman JD, Lee WY, DelGaudio JM, Moore CE, Nava P, Nusrat A, *et al*. Pathophysiology of nasal polyposis: the role of desmosomal junctions. *Am J Rhinol*. 2008;22(6):589–97.
111. Dejima K, Randell SH, Stutts MJ, Senior BA, Boucher RC. Potential role of abnormal ion transport in the pathogenesis of chronic sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132(12):1352–62.
112. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(3):358–64.
113. Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):711–20.

114. Ramanathan MJ, Lee W-K, Spannhake EW, Lane AP. Th2 cytokines associated with chronic rhinosinusitis with polyps down-regulate the antimicrobial immune function of human sinonasal epithelial cells. *Am J Rhinol.* 2008;22(2):115–21.
115. Lane AP, Truong-Tran QA, Schleimer RP. Altered expression of genes associated with innate immunity and inflammation in recalcitrant rhinosinusitis with polyps. *Am J Rhinol.* 2006;20(2):138–44.
116. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, *et al.* Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010;5(1):e8578. doi: 10.1371/journal.pone.0008578.
117. Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch S V, Kolter R. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *MBio.* 2010;1(3):e00129-10. doi: 10.1128/mBio.00129-10.
118. Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PLoS One.* 2010;5(5):e10598. doi: 10.1371/journal.pone.0010598.
119. Araujo E, Palombini BC, Cantarelli V, Pereira A, Mariante A. Microbiology of middle meatus in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol.* 2003;17(1):9–15.
120. Mahdavinia M, Keshavarzian A, Tobin MC, Landay AL, Schleimer RP. A comprehensive review of the nasal microbiome in chronic rhinosinusitis (CRS). *Clin Exp Allergy.* 2016;46(1):21–41.
121. Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;134(6):991–6.
122. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, *et al.* EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology.* 2012;50(1):1–12.
123. Lildholdt T, Rundcrantz H, Bende M, Larsen K. Glucocorticoid treatment for nasal polyps. The use of topical budesonide powder, intramuscular betamethasone, and surgical treatment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123(6):595–600.

124. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitis. *Rhinology*. 1993;31(4):183–4.
125. Metson R, Gliklich RE, Stankiewicz JA, Kennedy DW, Duncavage JA, Hoffman SR, *et al*. Comparison of sinus computed tomography staging systems. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;117(4):372–9.
126. Szczeklik A, Nizankowska E. Clinical features and diagnosis of aspirin induced asthma. *Thorax*. 2000;55 Suppl 2(Suppl 2):S42–4.
127. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(5):913–21.
128. White AA, Stevenson DD. Aspirin-exacerbated respiratory disease: update on pathogenesis and desensitization. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(6):588–94.
129. Naclerio R, Baroody F, Bachert C, Bleier B, Borish L, Brittain E, *et al*. Clinical Research Needs for the Management of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in the New Era of Biologics: A National Institute of Allergy and Infectious Diseases Workshop. *J allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(5):1532-1549.e1.
130. Stjärne P, Mösges R, Jorissen M, Passali D, Bellussi L, Staudinger H, *et al*. A randomized controlled trial of mometasone furoate nasal spray for the treatment of nasal polyposis. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2006;132(2):179–85.
131. Chong LY, Head K, Hopkins C, Philpott C, Schilder AGM, Burton MJ. Intranasal steroids versus placebo or no intervention for chronic rhinosinusitis. *Cochrane database Syst Rev*. 2016;4(4). doi: 10.1002/14651858.CD011996.pub2.
132. Vaidyanathan S, Barnes M, Williamson P, Hopkinson P, Donnan PT, Lipworth B. Treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis with oral steroids followed by topical steroids: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2011;154(5):293–302.
133. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, Beule A, Wormald PJ, Mayr S, *et al*. Oral steroids and doxycycline: two different approaches to treat nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1069-1076.e4.
134. Zhang Y, Wang C, Huang Y, Lou H, Zhang L. Efficacy of short-term systemic corticosteroid therapy in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a meta-analysis of randomized controlled trials and systematic review. *Am J Rhinol Allergy*. 2019;33(5):567–76.
135. Varvyanskaya A, Lopatin A. Efficacy of long-term low-dose macrolide therapy in

- preventing early recurrence of nasal polyps after endoscopic sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014;4(7):533–41.
136. Brožek 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.
 137. Smith TL, Sautter NB. Is montelukast indicated for treatment of chronic rhinosinusitis with polyposis? *Laryngoscope.* 2014;124(8):1735–6.
 138. Ragab S, Parikh A, Darby YC, Scadding GK. An open audit of montelukast, a leukotriene receptor antagonist, in nasal polyposis associated with asthma. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(9):1385–91.
 139. Lourijssen ES, Reitsma S, Vleming M, Hannink G, Adriaensen GFJPM, Cornet ME, *et al.* Endoscopic sinus surgery with medical therapy versus medical therapy for chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a multicentre, randomised, controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2022;10(4):337–46.
 140. Loftus CA, Soler ZM, Koochakzadeh S, Desiato VM, Yoo F, Nguyen SA, *et al.* Revision surgery rates in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: meta-analysis of risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2020;10(2):199–207.
 141. Gooderham MJ, Hong HC-H, Eshtiaghi P, Papp KA. Dupilumab: A review of its use in the treatment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78(3 Suppl 1):S28–36.
 142. McGregor MC, Krings JG, Nair P, Castro M. Role of Biologics in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199(4):433–45.
 143. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, Hellings PW, Amin N, Lee SE, *et al.* Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet.* 2019;394(10209):1638–50.
 144. Gevaert P, Omachi TA, Corren J, Mullol J, Han J, Lee SE, *et al.* Efficacy and safety of omalizumab in nasal polyposis: 2 randomized phase 3 trials. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(3):595–605.
 145. Han JK, Bachert C, Fokkens W, Desrosiers M, Wagenmann M, Lee SE, *et al.* Mepolizumab

- for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (SYNAPSE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2021;9(10):1141–53.
146. Gevaert P, Lang-Loidolt D, Lackner A, Stammberger H, Staudinger H, Van Zele T, *et al*. Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(5):1133–41.
 147. Bachert C, Han JK, Desrosiers MY, Gevaert P, Heffler E, Hopkins C, *et al*. Efficacy and safety of benralizumab in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: A randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(4):1309-1317.e12.
 148. Classics in infectious diseases. ‘On abscesses’. Alexander Ogston (1844-1929). *Rev Infect Dis*. 1984;6(1):122–8.
 149. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 1995;20(1):95–102.
 150. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care*. 2017;21(1):211.
 151. Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. 2003;49(2):93–105.
 152. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol*. 2015;6:1174.
 153. Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol*. 1985;22(5):828–34.
 154. Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, Ng J, Fink PS, Hawkins J, *et al*. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(3):480–7.
 155. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167–93.
 156. Sobral R, Tomasz A. The Staphylococcal Cell Wall. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0068-2019.

157. Shimada T, Park BG, Wolf AJ, Brikos C, Goodridge HS, Becker CA, *et al.* *Staphylococcus aureus* evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1 β secretion. *Cell Host Microbe*. 2010;7(1):38–49.
158. van Dalen R, Peschel A, van Sorge NM. Wall Teichoic Acid in *Staphylococcus aureus* Host Interaction. *Trends Microbiol*. 2020;28(12):985–98.
159. Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 1998;6(12):484–8.
160. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):49–62.
161. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins. *Eur J Cell Biol*. 2000;79(10):672–9.
162. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, *et al.* *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med*. 2004;10(8):842–8.
163. Kobayashi SD, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. *MBio*. 2013;4(5):e00764-13. doi: 10.1128/mBio.00764-13.
164. Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, *et al.* Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*. 2000;96(6):2149–56.
165. Silverman GJ, Goodyear CS. Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(6):465–75.
166. Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*. 1991;55(4):733–51.
167. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, *et al.* *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One*. 2009;4(10):e7446. doi: 10.1371/journal.pone.0007446.
168. Dragneva Y, Anuradha CD, Valeva A, Hoffmann A, Bhakdi S, Husmann M. Subcytotoxic

- attack by staphylococcal alpha-toxin activates NF-kappaB and induces interleukin-8 production. *Infect Immun*. 2001;69(4):2630–5.
169. Breuer K, Wittmann M, Kempe K, Kapp A, Mai U, Dittrich-Breiholz O, *et al*. Alpha-toxin is produced by skin colonizing *Staphylococcus aureus* and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(8):1088–95.
 170. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1176-83.e4.
 171. Niebuhr M, Gathmann M, Scharonow H, Mamerow D, Mommert S, Balaji H, *et al*. Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. *Infect Immun*. 2011;79(4):1615–22.
 172. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, *et al*. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2007;189(23):8719–26.
 173. Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, *et al*. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14407–12.
 174. Salgado-Pabón W, Herrera A, Vu BG, Stach CS, Merriman JA, Spaulding AR, *et al*. *Staphylococcus aureus* β -toxin production is common in strains with the β -toxin gene inactivated by bacteriophage. *J Infect Dis*. 2014;210(5):784–92.
 175. Ferreras M, Höper F, Dalla Serra M, Colin DA, Prévost G, Menestrina G. The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1414(1–2):108–26.
 176. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, *et al*. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359(9308):753–9.
 177. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, *et al*. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1128–32.
 178. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, *et al*. Community-

- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(8):978–84.
179. Kerr ID, Doak DG, Sankararamakrishnan R, Breed J, Sansom MS. Molecular modelling of Staphylococcal delta-toxin ion channels by restrained molecular dynamics. *Protein Eng*. 1996;9(2):161–71.
 180. Mellor IR, Thomas DH, Sansom MS. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim Biophys Acta*. 1988;942(2):280–94.
 181. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(10):667–73.
 182. Janzon L, Löfdahl S, Arvidson S. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*. 1989;219(3):480–5.
 183. Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:435–66.
 184. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)*. 2010;2(5):1148–65.
 185. Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Nakasone K, Ohnishi M, Nakayama K, *et al*. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2000;38(4):694–705.
 186. Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, *et al*. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect Immun*. 2001;69(12):7760–71.
 187. Monday SR, Vath GM, Ferens WA, Deobald C, Rago J V, Gahr PJ, *et al*. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. *J Immunol*. 1999;162(8):4550–9.
 188. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):16–34.
 189. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2010;2(7):1751–73.

190. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 1998;29(2):527–43.
191. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet*. 1978;2(8100):1116–8.
192. Schlievert PM, Davis CC. Device-Associated Menstrual Toxic Shock Syndrome. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3):e00032-19. doi: 10.1128/CMR.00032-19.
193. Friedrich R, Panizzi P, Fuentes-Prior P, Richter K, Verhamme I, Anderson PJ, *et al*. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*. 2003;425(6957):535–9.
194. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog*. 2010;6(8):e1001036. doi: 10.1371/journal.ppat.1001036.
195. Ibberson CB, Jones CL, Singh S, Wise MC, Hart ME, Zurawski D V, *et al*. *Staphylococcus aureus* hyaluronidase is a CodY-regulated virulence factor. *Infect Immun*. 2014;82(10):4253–64.
196. Collen D. Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent. *Nat Med*. 1998;4(3):279–84.
197. Kwiecinski J, Peetermans M, Liesenborghs L, Na M, Björnsdóttir H, Zhu X, *et al*. Staphylokinase Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Detachment Through Host Plasminogen Activation. *J Infect Dis*. 2016;213(1):139–48.
198. Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol*. 2004;172(2):1169–76.
199. Chung M, Antignac A, Kim C, Tomasz A. Comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2709–17.
200. Saravolatz LD, Stein GE, Johnson LB. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2011;52(9):1156–63.

201. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(5):1062–6.
202. Shore AC, Brennan OM, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S, Slickers P, *et al.* Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfr* in a Pantón-Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4978–84.
203. Takenouchi T, Tabata F, Iwata Y, Hanzawa H, Sugawara M, Ohya S. Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1835–42.
204. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2014;124(7):2836–40.
205. Patel JB, Gorwitz RJ, Jernigan JA. Mupirocin resistance. *Clin Infect Dis.* 2009;49(6):935–41.
206. Schmitz FJ, Krey A, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit AC. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47(2):239–40.
207. Flamm RK, Mendes RE, Hogan PA, Streit JM, Ross JE, Jones RN. Linezolid Surveillance Results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014). *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2273–80.
208. Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Venkataraman L, DeGirolami PC, *et al.* Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis.* 2004;190(2):311–7.
209. Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(11):2329–35.
210. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(12):751–62.

211. Van Zele T, Gevaert P, Watelet J-B, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, *et al.* *Staphylococcus aureus* colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(4):981–3.
212. Drilling A, Coombs GW, Tan H, Pearson JC, Boase S, Psaltis A, *et al.* Cousins, siblings, or copies: the genomics of recurrent *Staphylococcus aureus* infections in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014;4(12):953–60.
213. Corriveau M-N, Zhang N, Holtappels G, Van Roy N, Bachert C. Detection of *Staphylococcus aureus* in nasal tissue with peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23(5):461–5.
214. Sachse F, Becker K, Von Eiff C, Metze D, Rudack C. *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2010;65(11):1430–7.
215. Tan NCW, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Tran H, Wormald PJ. The multiplicity of *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis: Correlating surface biofilm and intracellular residence. *Laryngoscope.* 2012;122(8):1655–60.
216. Jervis-Bardy J, Foreman A, Field J, Wormald PJ. Impaired mucosal healing and infection associated with *Staphylococcus aureus* after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23(5):549–52.
217. Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2012;122(2):467–72.
218. Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(2):334-42.e1.
219. Ramakrishnan VR, Feazel LM, Abrass LJ, Frank DN. Prevalence and abundance of *Staphylococcus aureus* in the middle meatus of patients with chronic rhinosinusitis, nasal polyps, and asthma. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2013;3(4):267–71.
220. Abreu NA, Nagalingam NA, Song Y, Roediger FC, Pletcher SD, Goldberg AN, *et al.* Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostrictum* enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci Transl Med.* 2012;4(151):151ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.3003783.

221. Braun H, Buzina W, Freudenschuss K, Beham A, Stammberger H. 'Eosinophilic fungal rhinosinusitis': a common disorder in Europe? *Laryngoscope*. 2003;113(2):264–9.
222. Davis LJB, Kita H. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: role of airborne fungi and bacteria. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24(1):59–73.
223. Shin S-H, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, *et al*. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(6):1369–75.
224. Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, *et al*. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol*. 2008;22(6):549–59.
225. Altunbulakli C, Costa R, Lan F, Zhang N, Akdis M, Bachert C, *et al*. *Staphylococcus aureus* enhances the tight junction barrier integrity in healthy nasal tissue, but not in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(2):665-668.e8
226. Valera FCP, Ruffin M, Adam D, Maillé É, Ibrahim B, Berube J, *et al*. *Staphylococcus aureus* impairs sinonasal epithelial repair: Effects in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and control subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(2):591-603.e3.
227. Nagarkar DR, Poposki JA, Tan BK, Comeau MR, Peters AT, Hulse KE, *et al*. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):593-600.e12.
228. Kouzaki H, Matsumoto K, Kato T, Tojima I, Shimizu S, Shimizu T. Epithelial Cell-Derived Cytokines Contribute to the Pathophysiology of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. *J Interferon Cytokine Res*. 2016;36(3):169–79.
229. De Schryver E, Devuyst L, Derycke L, Dullaers M, Van Zele T, Bachert C, *et al*. Local immunoglobulin E in the nasal mucosa: clinical implications. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7(4):321–31.
230. Lan F, Zhang N, Holtappels G, De Ruyck N, Krysko O, Van Crombruggen K, *et al*. *Staphylococcus aureus* induces a mucosal type 2 immune response via epithelial cell-derived cytokines. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(4):452–63.
231. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(1):48–56.

232. Arild Danielsen K, Eskeland Ø, Fridrich-Aas K, Cecilie Orszagh V, Bachmann-Harildstad G, Burum-Auensen E. Bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis; distribution and prevalence. *Acta Otolaryngol.* 2016;136(1):109–12.
233. Foreman A, Jervis-Bardy J, Wormald P-J. Do biofilms contribute to the initiation and recalcitrance of chronic rhinosinusitis? *Laryngoscope.* 2011;121(5):1085–91.
234. Palmer JN. Bacterial biofilms: do they play a role in chronic sinusitis? *Otolaryngol Clin North Am.* 2005;38(6):1193–201.
235. Foreman A, Holtappels G, Psaltis AJ, Jervis-Bardy J, Field J, Wormald P-J, *et al.* Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy.* 2011;66(11):1449–56.
236. Arjomandi H, Gilde J, Zhu S, Delaney S, Hochstim C, Mazhar K, *et al.* Relationship of eosinophils and plasma cells to biofilm in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2013;27(4):e85-90. doi: 10.2500/ajra.2013.27.3917.
237. Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Muñoz-Planillo R, Hasegawa M, *et al.* *Staphylococcus* δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature.* 2013;503(21):397–401.
238. O'Brien GJ, Riddell G, Elborn JS, Ennis M, Skibinski G. *Staphylococcus aureus* enterotoxins induce IL-8 secretion by human nasal epithelial cells. *Respir Res.* 2006;7(1):115.
239. Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(1):34–8.
240. Huvenne W, Hellings PW, Bachert C. Role of staphylococcal superantigens in airway disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161(4):304–14.
241. Wang M, Shi P, Yue Z, Chen B, Zhang H, Zhang D, *et al.* Superantigens and the expression of T-cell receptor repertoire in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Acta Otolaryngol.* 2008;128(8):901–8.
242. Tripathi A, Conley DB, Grammer LC, Ditto AM, Lowery MM, Seiberling KA, *et al.* Immunoglobulin E to staphylococcal and streptococcal toxins in patients with chronic sinusitis/nasal polyposis. *Laryngoscope.* 2004;114(10):1822–6.
243. Conley DB, Tripathi A, Seiberling KA, Suh LA, Harris KE, Paniagua MC, *et al.* Superantigens and chronic rhinosinusitis II: analysis of T-cell receptor V beta domains in nasal polyps.

- Am J Rhinol. 2006;20(4):451–5.
244. Conley DB, Tripathi A, Seiberling KA, Schleimer RP, Suh LA, Harris K, et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: skewing of T-cell receptor V beta-distributions in polyp-derived CD4+ and CD8+ T cells. Am J Rhinol. 2006;20(5):534–9.
245. Bernstein JM, Ballow M, Schlievert PM, Rich G, Allen C, Dryja D. A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. Am J Rhinol. 2003;17(6):321–6.
246. Pérez-Novo CA, Claeys C, Van Zele T, Holtapples G, Van Cauwenberge P, Bachert C. Eicosanoid metabolism and eosinophilic inflammation in nasal polyp patients with immune response to *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Am J Rhinol. 2006;20(4):456–60.
247. Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Higaki T, Haruna T, Matsushita O, et al. Cellular responses to *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Allergol Int. 2014;63(4):563–73.
248. Bhakdi S, Muhly M, Korom S, Hugo F. Release of interleukin-1 beta associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. Infect Immun. 1989;57(11):3512–9.
249. Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, Gao X, Broglie PM, Hall JD, et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. J Infect Dis. 2012;205(5):807–17.
250. Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Microbiol. 2012;15(1):92–9.
251. Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Haruna T, Higaki T, Noyama Y, et al. Staphylococcal protein A-formulated immune complexes suppress enterotoxin-induced cellular responses in nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2015;136(2):343-50.e8.
252. Patou J, Gevaert P, Van Zele T, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2008;121(1):110–5.
253. Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Informe anual 2019 [Internet]. [Consultado el 21 de marzo de 2022]. Disponible en:

- <https://chguv.san.gva.es/documents/10184/81032/Informe+Anual+2019>
254. Departament de Salut València La Fe. Memoria de actividad 2019 [Internet]. [Consultado el 21 de marzo de 2022]. Disponible en: http://www.lafe.san.gva.es/ca/c/document_library/get_file?uuid=4e204b8d-72b1-4964-8e8e-87a7ea98810d&groupId=18
 255. Capalbo FJ, Bénilan Y, Yelle RV, Koskinen TT. Manual Nacional de Abordaje del Tabaquismo. WHO Framework convention on Tobacco Control. 2015. [Internet]. [Consultado el 23 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-nacional-abordaje-tabaquismo-primer-nivel-atencion>.
 256. 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;58(Suppl S29):1–464.
 257. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, *et al.* Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res*. 1988;48(7):1904–9.
 258. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
 259. Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1995;33(3):551–5.
 260. Bens CCPM, Voss A, Klaassen CHW. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1875–6.
 261. Rasschaert G, Vanderhaeghen W, Dewaele I, Janez N, Huijsdens X, Butaye P, *et al.* Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3313–22.
 262. Bosch T, de Neeling AJ, Schouls LM, van der Zwaluw KW, Kluytmans JAJW, Grundmann H, *et al.* PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. *BMC Microbiol*. 2010;10:40. doi: 10.1186/1471-2180-10-40.

263. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, *et al.* Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spre. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1574–85.
264. Pavel AB, Vasile CI. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. BMC Bioinformatics. 2012;13:9. doi: 10.1186/1471-2105-13-9.
265. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233–9.
266. Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Maes N, Serruys E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1992;30(10):2599–605.
267. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, *et al.* Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996;15(1):60–4.
268. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, *et al.* Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5442–8.
269. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 1999;37(11):3556–63.
270. Kohanski MA, Lane AP. Sinonasal epithelial cell response to *Staphylococcus aureus* burden in chronic sinusitis. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2015;141(4):341–9.
271. Bachert C, Zhang N, Holtappels G, De Lobel L, Van Cauwenberge P, Liu S, *et al.* Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. J Allergy Clin Immunol. 2010;126(5):962–8.
272. Schneider S, Champion NJ, Villazala-Merino S, Liu DT, Bartosik T, Landegger LD, *et al.* Associations between the quality of life and nasal polyp size in patients suffering from

- chronic rhinosinusitis without nasal polyps, with nasal polyps or aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Clin Med*. 2020;9(4):925.
273. Gevaert P, Calus L, Van Zele T, Blomme K, De Ruyck N, Bauters W, *et al*. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(1):110-6.e1.
 274. Hayashi H, Mitsui C, Nakatani E, Fukutomi Y, Kajiwaru K, Watai K, *et al*. Omalizumab reduces cysteinyl leukotriene and 9 α ,11 β -prostaglandin F₂ overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1585-87.
 275. Huvenne W, Callebaut I, Reekmans K, Hens G, Bobic S, Jorissen M, *et al*. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B augments granulocyte migration and survival via airway epithelial cell activation. *Allergy*. 2010;65(8):1013–20.
 276. Pezato R, Voegels RL, Stamm AC, Gregório LC. Why we should avoid using inferior turbinate tissue as control to Nasal Polyposis studies. *Acta Otolaryngol*. 2016;136(9):973–5.
 277. Van Crombruggen K, Van Bruaene N, Holtappels G, Bachert C. Chronic sinusitis and rhinitis: clinical terminology ‘Chronic Rhinosinusitis’ further supported. *Rhinology*. 2010;48(1):54–8.
 278. Ramakrishnan VR, Feazel LM, Gitomer SA, Ir D, Robertson CE, Frank DN. The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PLoS One*. 2013;8(12):e85507. doi: 10.1371/journal.pone.0085507.
 279. Damm M, Quante G, Rosenbohm J, Rieckmann R. Proinflammatory effects of *Staphylococcus aureus* exotoxin B on nasal epithelial cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(2):245–9.
 280. Yu R-L, Dong Z. Proinflammatory impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on human nasal epithelial cells and inhibition by dexamethasone. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(1):15–20.
 281. Park Y-H, Kim D, Dai J, Zhang Z. Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, an appropriate in vitro model to study heavy metals induced carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;287(3):240–5.
 282. Zou J, Zhou L, Hu C, Jing P, Guo X, Liu S, *et al*. IL-8 and IP-10 expression from human

- bronchial epithelial cells BEAS-2B are promoted by *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO). BMC Microbiol. 2017;17(1):187.
283. Noyama Y, Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Higaki T, Haruna T, *et al.* IL-22/IL-22R1 signaling regulates the pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps via alteration of MUC1 expression. Allergol Int. 2017;66(1):42–51.
 284. Calus L, Derycke L, Dullaers M, Van Zele T, De Ruyck N, Pérez-Novo C, *et al.* IL-21 Is Increased in Nasal Polyposis and after Stimulation with *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B. Int Arch Allergy Immunol. 2017;174(3–4):161–9.
 285. Biggs TC, Hayes SM, Harries PG, Allan RN, Walls AF, Pender SLF, *et al.* Immunological profiling of key inflammatory drivers of nasal polyp formation and growth in chronic rhinosinusitis. Rhinology. 2019;57(5):336–42.
 286. Steinke JW, Liu L, Huyett P, Negri J, Payne SC, Borish L. Prominent role of IFN- γ in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. J Allergy Clin Immunol. 2013;132(4):856–65.e1–3.
 287. Derycke L, Eyerich S, Van Crombruggen K, Pérez-Novo C, Holtappels G, Deruyck N, *et al.* Mixed T helper cell signatures in chronic rhinosinusitis with and without polyps. PLoS One. 2014;9(6):e97581. doi: 10.1371/journal.pone.0097581.
 288. Pezato R, Świerczyńska-Krępa M, Niżankowska-Mogilnicka E, Holtappels G, De Ruyck N, Sanak M, *et al.* Systemic expression of inflammatory mediators in patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps with and without Aspirin Exacerbated Respiratory Disease. Cytokine. 2016;77:157–67. doi: 10.1016/j.cyto.2015.10.011.
 289. Xuan L, Zhang N, Wang X, Zhang L, Bachert C. IL-10 family cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: From experiments to the clinic. Front Immunol. 2022;13:947983. doi: 10.3389/fimmu.2022.947983.
 290. Makihara S, Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Noda Y, Higaki T, *et al.* Regulation and characterization of IL-17A expression in patients with chronic rhinosinusitis and its relationship with eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2010;126(2):397–400.
 291. R  th S, Ziesemer S, Witte A, Konkel A, M  ller C, Hildebrandt P, *et al.* *S. aureus* haemolysin A-induced IL-8 and IL-6 release from human airway epithelial cells is mediated by activation of p38- and Erk-MAP kinases and additional, cell type-specific signalling

- mechanisms. *Cell Microbiol.* 2013;15(7):1253–65.
292. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1209–20.
 293. Hu H, Liu S, Hon K, Psaltis AJ, Wormald PJ, Vreugde S. Staphylococcal protein A modulates inflammation by inducing interferon signaling in human nasal epithelial cells. *Inflamm Res.* 2023;72(2):251–62.
 294. Cope EK, Goldberg AN, Pletcher SD, Lynch S V. Compositionally and functionally distinct sinus microbiota in chronic rhinosinusitis patients have immunological and clinically divergent consequences. *Microbiome.* 2017;5(1):53.
 295. Chalermwatanachai T, Vilchez-Vargas R, Holtappels G, Lacoere T, Jáuregui R, Kerckhof F-M, *et al.* Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is characterized by dysbacteriosis of the nasal microbiota. *Sci Rep.* 2018;8(1):7926.
 296. Wagner Mackenzie B, Baker J, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. Detection and quantification of *Staphylococcus* in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019;9(12):1462–9.
 297. Tsang STJ, McHugh MP, Guerendiain D, Gwynne PJ, Boyd J, Simpson AHRW, *et al.* Underestimation of *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) carriage associated with standard culturing techniques: One third of carriers missed. *Bone Joint Res.* 2018;7(1):79–84.
 298. Richter SS, Doern G V, Heilmann KP, Miner S, Tendolkar S, Riahi F, *et al.* Detection and Prevalence of Penicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the United States in 2013. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):812–4.
 299. Resman F, Thegerström J, Månsson F, Ahl J, Tham J, Riesbeck K. The prevalence, population structure and screening test specificity of penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Malmö, Sweden. *J Infect.* 2016;73(2):129–35.
 300. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10325):629–55.
 301. Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, *et al.* Prevalence of macrolide-

- resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. J Antimicrob Chemother. 2000;45(6):891–4.
302. Dufkova K, Bezdicek M, Cuprova K, Pantuckova D, Nykrynova M, Brhelova E, *et al.* Sequencing Independent Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates: Approach for Infection Control and Clonal Characterization. Microbiol Spectr. 2022;10(1):e0181721. doi: 10.1128/spectrum.01817-21.
303. Baum C, Haslinger-Löffler B, Westh H, Boye K, Peters G, Neumann C, *et al.* Non-spatypeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring protein A mutants. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3624–9.
304. Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. Clin Microbiol Infect. 2009;15(2):112–9.
305. Harris SR, Cartwright EJP, Török ME, Holden MTG, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, *et al.* Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2013;13(2):130–6.
306. Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, *et al.* Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. Thorax. 2006;61(3):202–8.

ANEXOS

Anexo I

Premio Fundación Investigación Hospital General Universitario 2016 por el proyecto “Estudio de la Respuesta Inmunitaria Innata del Epitelio Sinusal frente a *Staphylococcus aureus* en las Poliposis Nasales”.



Anexo II

Dictamen comité de ética CHGUV



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 23 de Febrero de 2016 el Proyecto de Investigación:

Título:	Estudio de la respuesta inmunitaria innata del epitelio sinusal frente a staphylococcus aureus en las poliposis nasales.		
I.P.:	Miniam Torrecillas Muelas	Servicio/Unidad	Microbiología

Acuerda respecto a esta documentación:

Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

COMPOSICIÓN DEL CEIm

Presidente: Dra. Elena Rubio Gomis (Unidad de Farmacología Clínica)

Vocales:

- Dra. Pilar Blasco Segura (Servicio de Farmacia)
- Dr. Ernesto Bataller Alonso (Director Económico del CHGUV)
- Dr. Enrique Ortega González (Gerente Chguv)
- Dr. Julio Cortijo Gimeno (Unidad de Docencia e Investigación)
- Dña. María Teresa Jareño (Unidad de Reanimación Cardíaca)
- Dr. Gustavo Juan Samper (Servicio de Neumología)
- D. Alejandro Moner González (Gerencia CHGUV – Asesoría Jurídica)
- Dr. Alberto Berenguer Jofresa (Servicio de Cardiología)
- Dra. Ana Blasco Cordellat (Servicio de Oncología)
- Dr. Antonio Martorell Aragonés (Unidad de Alergología)
- Dr. Aurelio Quesada Dorador (Servicio de Cardiología)
- Dña. Encarna Domingo Cebrán (Servicio de Estomatología)
- Dra. Mª José Safont Aguilera (Servicio de Oncología)

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
Comité Ético de Investigación Clínica

- Dr. Javier Miras Poyá (Farmacia)
- Dra. Goltzane Marcalda Benito (Servicio de Análisis Clínicos)
- Dr. Pedro Polo Martín (Pediatra- Atención Primaria)
- Dña. Carmen Samiento Caballeros (Miembro independiente de la organización asistencial)

Secretario: Dr. Elias Ruiz Rojo (Farmacéutico ATI Primaria)

El CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) tanto en su composición como en sus procedimientos, y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico.

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 28 de febrero de 2017

Fdo. Dra Elena Rubio González (Presidente CEIC CHGUV)


Anexo III

Dictamen comité de investigación CHGUV



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comisión de Investigación

APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 25 de Enero de 2017 el Proyecto de Investigación:

Título:	Estudio de la respuesta inmunitaria innata del epitelio sinusal frente a staphylococcus aureus en las poliposis nasales.		
I.P.:	Miriam Torrecillas Muelas	Servicio/Unidad	Microbiología

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que cumple con los requisitos exigidos por esta Comisión para su realización, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente	Ausente	Disculpa
Presidentes	Dr. José Vile Bagan Sebastián	x		
	Dr. Carlos Camps Herrero	x		
	Dña. Goitzane Marcolla Benito	x		
	Dr. Carlos Sánchez Juan	X		
	Dña. Anna Mari Monros	x		
	Dr. Emilio López Alcina		x	
	Dr. Rafael Paya Serrano	X		
	Dr. Miguel García del Toro			x
	Dr. Miguel Armengot Carceller		x	
	Dr. Jose Luis Sanchez Carazo	x		
	Dr. Francisco Roldán Soriano	X		
	Dña. Empar Lurbe Ferrer	x		
	Dª Amparo Muñoz Izquierdo	x		
	Dña. Amparo Esteban Rebol			x
Secretario	Dña. Dolores Lopez Alarcón			x

Lo que comunico a efectos oportunos a jueves,
26 de enero de 2017:

Fdo. Dr. José Vile Bagan Sebastián
Presidente de la Comisión de Investigación

[Firma manuscrita]
26 de Enero de 2017
Microbiología

Anexo IV

Materiales y reactivos utilizados

- a) Reactivos utilizados en los estudios de estimulación celular *in vitro* y cuantificación de mediadores de la inflamación (Bloque I).

Reactivo	Referencia	Casa comercial	Aplicación en el estudio
α -Hemolysin from <i>S. aureus</i>	H9395	Sigma-Aldrich	Estimulación celular <i>in vitro</i>
Airway Epithelial Cell Growth Medium	C-21060	Labclinics	Crecimiento de células epiteliales bronquiales
Fungizone (Amphotericin B) 250 ug/ml 100 ml	H317-836E	Lonza	Antifúngico- complemento medios cultivo celular
BEAS-2B Human bronchial epithelium	95102433-1VL	Sigma-Aldrich	Línea celular
BEGM Bronchial epithelial BulletKit (CC-3171_CC-4175)	H3CC-3170	Lonza	Crecimiento de células epiteliales bronquiales
Cell Culture Flask with Filter Cap,PS, 25cm ² , TC treated, Sterile to SAL10-6.	PLC70025	Labclinics	Cultivo celular
Collagen, Type I solution from rat tail	C3867	Sigma-Aldrich	Cultivo celular
Corning® Costar® Clear TC-Treated Multiple Well Plates 6 wells.	CLS3516	Sigma-Aldrich	Cultivo celular
Corning® Costar® Clear TC-Treated Multiple Well Plates 24 wells	CLS3526	Sigma-Aldrich	Cultivo celular
Corning® 75 cm ² U-Shake cell culture flask, canted neck	CLS430641U	Sigma-Aldrich	Cultivo celular
Cryo 1°C Freezing Container	5100-0001	Labclinics	Conservación células a -80°C
Dimethyl Sulfoxide Hybri-Max Sterilefilt	D2650-5X5ML	Sigma-Aldrich	Conservación celular
DPBS w/o Calcium w/o Magnesium.	L0615-500	Labclinics	Cultivo celular
FBS (South America), Premium	S181B-500	Labclinics	Cultivo celular
Kit Human Magnetic High Sensitivity T Cell Panel Mult. Assay, 7 Plex.	HSTCMAG-28SK-07	Merk	Luminex-medida citoquinas
Kit Map Human Th17 Magnetic,1 Plex.	HTH17MAG-14K-01	Merk	Luminex-medida citoquinas
Pen_Strep stock, 10K_10K 100 ml	H3DE17-602E	Lonza	Antibióticos- complemento medios cultivo celular
Protein A from <i>Staphylococcus aureus</i>	P7837	Sigma-Aldrich	Estimulación celular <i>in vitro</i>
RPMI 1640 w/ L-Glutamine	L0500-500	Labclinics	Cultivo celular
Trypan Blue 0.4% solution in 0.85% NaCl	17-942E	Lonza	Visualización microscópica células epiteliales
TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red.	12563029	ThermoFisher	Cultivo celular

DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; FBS, Fetal Bovine Serum

b) Reactivos utilizados en el estudio microbiológico y caracterización de las cepas de *S. aureus* de pacientes con EREA (Bloque II).

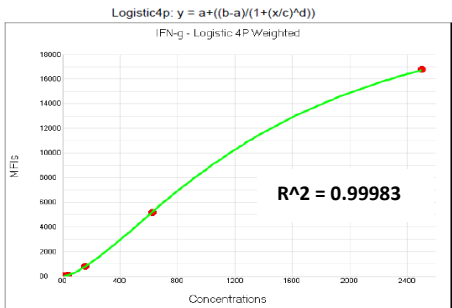
Reactivo	Referencia	Casa comercial	Aplicación en el estudio
Ácido Bórico	B6768	Sigma-Aldrich	PFGE
Agarosa	A9539	Sigma-Aldrich	PFGE
Agua tratada con DEPC	AM9906	ThermoFisher	Amplificación (<i>spa-typing</i>)
Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Master Mix	4369016	ThermoFisher	Amplificación (<i>spa-typing</i>)
BBL™ Brain Heart Infusion	221813	BD	Cultivo bacteriológico
BD MAX™ StaphSR	442999	BD	PCR Real Time para la detección de <i>S. aureus</i> y SARM
BD MAX™ PCR Cartridges	437519	BD	PCR Real Time para la detección de <i>S. aureus</i> y SARM
BD Trypticase Soy Agar II With 5% Horse Blood.	212099	BD	Cultivo bacteriológico
Brij (éter polioxietilen)	P5884	Sigma-Aldrich	PFGE
Bromuro de etidio	E1510	Sigma-Aldrich	PFGE
Crioperlas Cryoinstant™	409113/6	Deltalab	Conservación cepas bacterianas
EDTA	E5134	Sigma-Aldrich	PFGE
Lisostafina	L7386	Sigma-Aldrich	PFGE
Lisozima	L6876	Sigma-Aldrich	PFGE
MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit	07658036001	Roche	Extracción DNA <i>S. aureus</i>
Marcador de PM	SM0253	ThermoFisher	PFGE
Matriz MALDI-TOF (ácido α-ciano-4-hidroxi-trans cinámico)	1869451	Bruker-Daltonics	Identificación bacteriana
MgCl ₂	R0971	ThermoFisher	Amplificación (<i>spa-typing</i>)
NaCl	S9888	Sigma-Aldrich	PFGE
Na ⁺ desoxicolato	D6750	Sigma-Aldrich	PFGE
Pos Combo Type 31 panel Microscan Walkaway	B1016-139	Beckman-Coulter	Identificación y estudio de sensibilidad <i>S. aureus</i>
Sarcosyl (N-Lauril sarcosina)	L9150	Sigma-Aldrich	PFGE
<i>Smal</i> (10 U/μL)	ER0661	ThermoFisher	PFGE
Thermo Scientific™ Buffer Tango (10X)	BY5	ThermoFisher	PFGE
Tris-HCl	1083190100	Sigma-Aldrich	PFGE
Proteinasa K	3115879001	Roche	PFGE

PFGE, Electroforesis de campo pulsado; BD, Becton Dickinson; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; NaCl, cloruro sódico; Na, sodio; HCl, ácido clorhídrico; PM, peso molecular; MgCl₂, cloruro de magnesio.

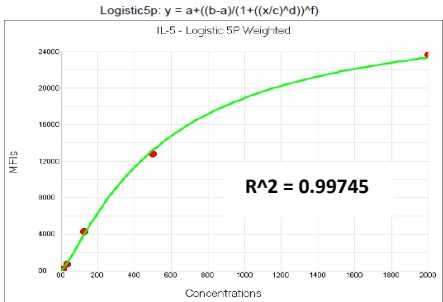
Anexo V

Curvas de calibrado para cada una de las citoquinas analizadas (Luminex®). Estudio de estimulación celular de BEAS-2B y CEPN de pacientes con EREA con α -hemolisina y SpA.

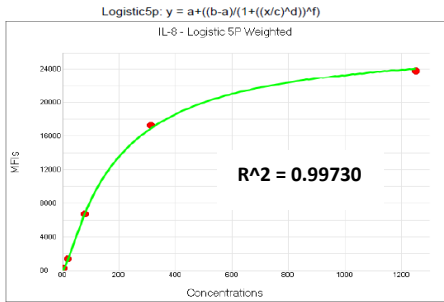
IFN- γ



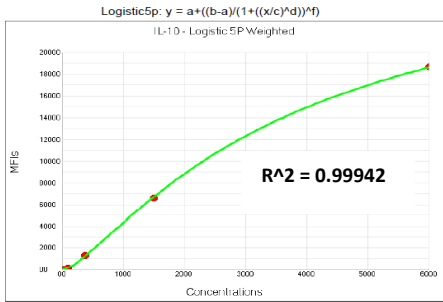
IL-5



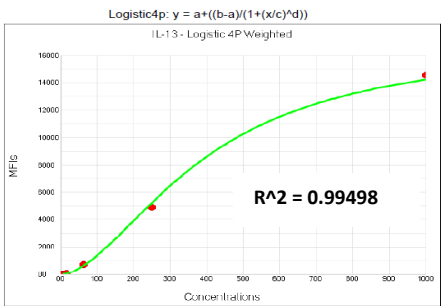
IL-8



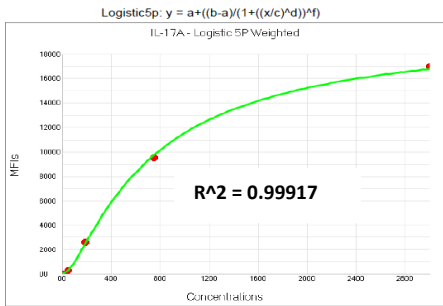
IL-10



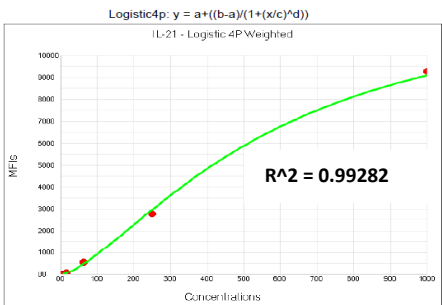
IL-13



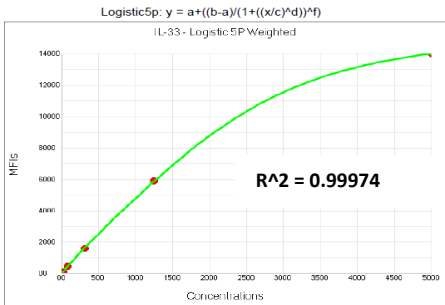
IL-17A



IL-21



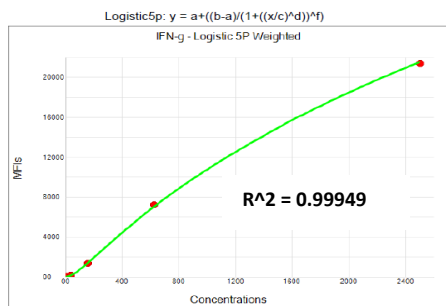
IL-33



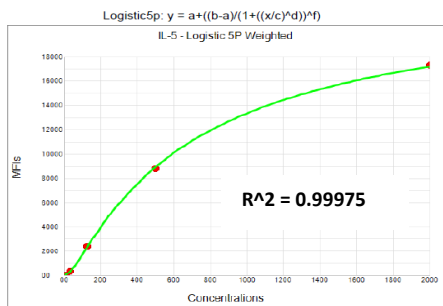
Anexo VI

Curvas de calibrado para cada una de las citoquinas analizadas. Estudio de estimulación celular de CEPN de pacientes con EREA y CECNM de pacientes control con SpA.

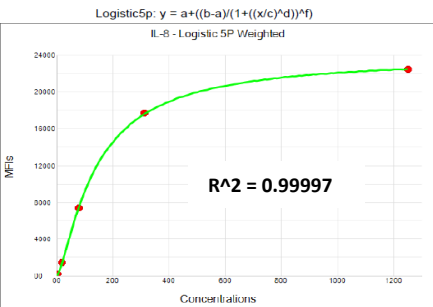
IFN- γ



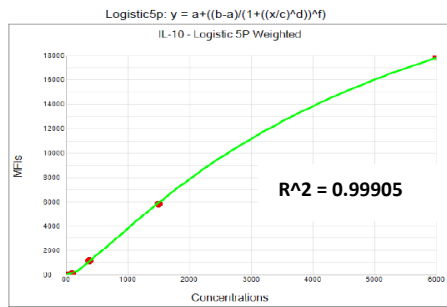
IL-5



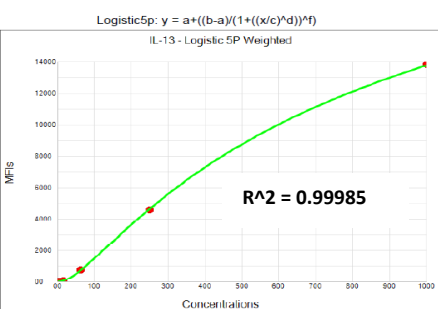
IL-8



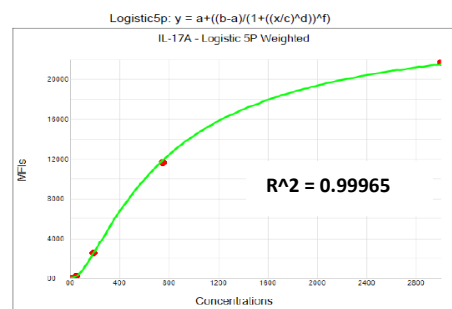
IL-10



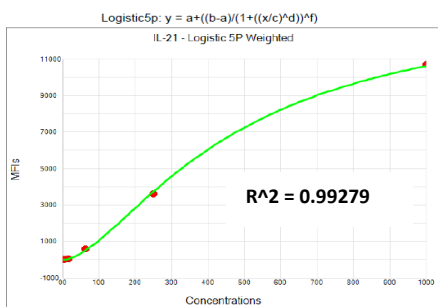
IL-13



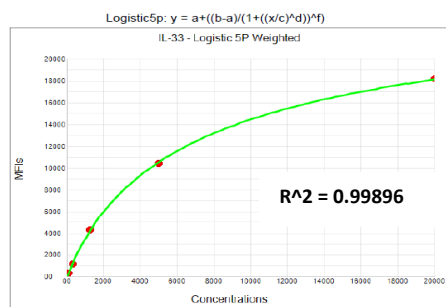
IL-17A



IL-21



IL-33



Anexo VII

Concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos primarios de células epiteliales de pólipos nasales de pacientes con EREA (n =14), en presencia de SpA o medio de cultivo BEBM a las 2, 6 y 12 horas.

ANALITO	TIEMPO (h)	SpA (1µg/ml)	BEBM	P valor
IFN-γ	2	783,78 (735,35 – 825,13)	<2,44	<0,0001
	6	918,50 (874,86 – 958,58)	<2,44	<0,0001
	12	852,99 (827,71 – 894,28)	<2,44	<0,0001
IL-10	2	<5,86	<5,86	NA
	6	<5,86	<5,86	NA
	12	203,45 (108,41 – 217,03)	10,41 (6,22 – 20,24)	<0,0001
IL-13	2	170,12 (122,06 – 183,73)	12,74 (3,17 – 21,03)	0,0001
	6	48,04 (30,50 – 70,49)	9,05 (5,98 – 12,78)	0,004
	12	36,02 (20,01 – 55,19)	7,06 (2,62 – 13,29)	0,017
IL-17A	2	599,12 (553,66 – 646,83)	<2,93	<0,0001
	6	716,11 (656,93 – 774,36)	<2,93	<0,0001
	12	686,86 (648,48 – 699,86)	<2,93	<0,0001
IL-21	2	417,79 (351,12 – 475,89)	<0,98	<0,0001
	6	378,67 (345,82 – 499,35)	<0,98	<0,0001
	12	325,14 (290,21 – 359,36)	<0,98	<0,0001
IL-5	2	<1,95	<1,95	NA
	6	<1,95	<1,95	NA
	12	<1,95	<1,95	NA
IL-33	2	<4,88	<4,88	NA
	6	<4,88	<4,88	NA
	12	<4,88	<4,88	NA
IL-8	2	1345,74 (1245,46 – 1731,29)	3138,62 (2734,07 – 3317,60)	0,0001
	6	3600,66 (2549,43 – 3885,56)	5932,82 (5249,17 – 7064,15)	0,0006
	12	5840,68 (5094,59 – 6348,43)	12690,00 (9710,45 – 13500,00)	0,0001

La concentración de citoquinas en pg/ml fue determinada con Luminex®. Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). La significación estadística (P valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$; NA, no aplicable.

Anexo VIII

Concentración de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos primarios de células epiteliales de biopsias del cornete medio de pacientes incluidos en el grupo control (n= 6), en presencia de SpA o medio de cultivo BEBM a las 2, 6 y 12 horas.

ANALITO	TIEMPO (h)	SpA (1µg/ml)	BEBM	P valor
IFN-γ	2	56,44 (52,37 – 241,54)	< 2,44	0,031
	6	119,78 (68,28 – 311,90)	< 2,44	0,031
	12	118,05 (48,59 – 280,12)	< 2,44	0,031
IL-10	2	< 5,86	< 5,86	NA
	6	< 5,86	< 5,86	NA
	12	58,18 (16,11 – 101,12)	8,76 (7,30 – 12,17)	0,031
IL-13	2	< 0,98	< 0,98	NA
	6	< 0,98	< 0,98	NA
	12	< 0,98	< 0,98	NA
IL-17A	2	114,92 (52,30 – 543,23)	< 2,93	0,031
	6	173,60 (110,87 – 583, 35)	< 2,93	0,031
	12	188,47 (64,82 – 528,23)	< 2,93	0,031
IL-21	2	123,67 (50,78 – 238,06)	< 0,98	0,031
	6	144,71 (50,70 – 156,46)	< 0,98	0,031
	12	74,46 (37,83 – 138,79)	< 0,98	0,031
IL-5	2	< 1,95	< 1,95	NA
	6	< 1,95	< 1,95	NA
	12	< 1,95	< 1,95	NA
IL-33	2	< 4,88	< 4,88	NA
	6	< 4,88	< 4,88	NA
	12	< 4,88	< 4,88	NA
IL-8	2	523,61 (326,64 – 821,44)	98,35 (54,23 – 252,89)	0,063
	6	885,92 (663,14 – 1131,93)	175,64 (63,71 – 560,77)	0,031
	12	1672,34 (1233,81 – 1836,44)	468,24 (281,63 – 922,61)	0,156

La concentración de citoquinas en pg/ml fue determinada con Luminex®. Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). La significación estadística (P valor) fue determinada mediante la prueba de Wilcoxon. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$; NA, no aplicable (ausencia de respuesta).

Anexo IX

Liberación de IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17A e IL-21 inducida por SpA, en las CEPN de pacientes con EREA colonizados (n= 6) y no colonizados (n= 8) por *S. aureus*.

ANALITO	CULTIVO POSITIVO <i>S. aureus</i>	CULTIVO NEGATIVO <i>S. aureus</i>	<i>P</i> valor
IFN- γ	912,060 (792,630 – 920,673)	934,578 (884,811 – 1066,578)	0,181
IL-10	219,858 (203,606 – 259,773)	150,713 (92,650 – 203,632)	0,008
IL-13	156,792 (57,090 – 180,816)	175,926 (144,957 – 193,254)	0,192
IL-17A	710,136 (484,689 – 780,360)	717,024 (666,585 – 832,656)	0,599
IL-21	405,132 (351,117 – 442,077)	443,994 (309,099 – 539,820)	0,573

La concentración de citoquinas en pg/ml fue determinada con Luminex®. Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico). La significación estadística (*P* valor) fue determinada mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.