

Universidad Autónoma de Madrid

Programa de doctorado en Medicina y Cirugía



Micro-ARNs en el diagnóstico del asma: Estabilidad y cambios tras tratamiento biológico

Manuel Jorge Rial Prado

Madrid, 2020

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Micro-ARNs en el diagnóstico del asma: Estabilidad y cambios tras tratamiento biológico

Manuel Jorge Rial Prado

Licenciado en Medicina

Directores de tesis Victoria del Pozo y Joaquín Sastre Domínguez

Madrid 2020

Certificado del director de tesis:

Doña **María Victoria del Pozo Abejón**, Doctora en Ciencias Biológicas y Adjunta del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y **Don Joaquín Sastre Domínguez**, Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe de Servicio Alergología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN: Que **Don Manuel Jorge Rial Prado**, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado “**Micro-ARNs en el diagnóstico del asma: Estabilidad y cambios tras tratamiento biológico**”, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a mi juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

Para que conste y a los efectos oportunos, firmo la presente en Madrid a 15 de diciembre de 2020.

Fdo: Doña María Victoria del Pozo Abejón y Don Joaquín Sastre Domínguez (Se adjunta certificado firmado)

INDICE:

• Agradecimientos	10
• Clave de Abreviaturas	13
• Resumen en español	16
• Resumen en inglés	18
• Introducción	20
• Asma, enfermedad de la vía aérea	22
• Los eosinófilos en el asma	23
• MicroARNs en la patología asmática	24
• Importancia de un buen biomarcador en el asma	27
• MicroARNs como biomarcadores en el asma	28
• Antecedentes	29
• Estabilidad en el tiempo de los miARNs y respuesta al tratamiento	30
• Hipótesis de trabajo	36
• Objetivos	40
• Objetivos principales	42
• Objetivos secundarios	42
• Materiales y Métodos	44
• Descripción del estudio y del proyecto MEGA	46
• Estudio de estabilidad de los Micro-ARNs	47
• Estudio de reproducibilidad	49
• Estudio de cambios en Micro-ARNs tras tratamiento biológico	49
• Procesamiento de las muestras	50
• Análisis estadístico	53
• Consideraciones ético-legales	54
• Resultados	56
• Características basales pacientes proyecto MEGA	58
• Estabilidad miARNs	64
• Estudio del perfil de miARNs en la muestra de estudio	68
• Resultados de cambio tras tratamiento biológico	69
• Análisis de las vías reguladas por miR-338-39	78
• Discusión	81
• Caracterización de los pacientes incluidos en el proyecto MEGA	82
• Estudio de estabilidad de los MiARNs a lo largo del tiempo	85
• Estudio de la expresión de miARNs entre sanos y asmáticos	86
• Estudio de cambios en miARNs tras tratamiento biológico	88
• Conclusiones	95
• Bibliografía	99

AGRADECIMIENTOS:

Quiero empezar este documento dando las gracias a las dos personas más influyentes en esta obra. La primera de ellas es Victoria del Pozo, directora de tesis y apoyo incombustible para que esta tesis vea la luz, sus ideas, su apoyo incondicional, sus consejos y generosidad han sido determinantes para conseguir esta meta, por todo ello gracias una y mil veces. La segunda es Joaquín Sastre, co-director, tutor, profesor, maestro, padrino, compañero y amigo, una referencia vital y profesional determinante que supuso un antes y un después en mi vida, sin la cual esta obra nunca hubiese visto la luz, gracias de corazón.

Hay otras tres personas que han sido muy responsables de esta obra, de ellas es más de media tesis, me han ilustrado, aconsejado, apoyado e instruido desde mis torpes inicios hasta que finalmente han conseguido que tuviese suficientes habilidades para completar los experimentos. Bea, Jose, Toño... habéis sido absolutamente determinantes en un plano profesional y desde luego en el personal, esta experiencia habría sido muy distinta sin vosotros, desde luego mucho más difícil, pero sabéis que también menos entretenida.

Quiero agradecer también a los vecinos de laboratorio por ayudarme siempre que ha sido necesario y por facilitar siempre la tarea. Blanca siempre con una sonrisa en las largas tardes en el laboratorio, Carlos siempre dispuesto a aconsejar y ayudar, Vanesa un espejo en el que mirarse. No me olvido de Emilio, Alma, Selene y demás compañeros de los laboratorios de inmunología, siempre he encontrado en vosotros a un amigo y compañero en la batalla de la investigación.

No puedo olvidarme de mis compañeros en el Servicio de Alergia muy responsables de esta obra. Manolo y Javier, dos de mis seres humanos favoritos, todo un lujo haber compartido cada día laboral con vosotros, no hubiera encontrado nunca mejores

referentes profesionales o personales a imitar, cada día era un aprendizaje constante en esos desayunos y comidas que valían su peso en oro por la calidad de las conversaciones. Adelaida mi segunda madre que me acogió con amor infinito, Manoliy Erika dos profesionales excepcionales que hacen que trabajar sea un placer y se ganan un hueco en el corazón de todo el que las conoce. Julia, corazón de oro, Adri trabajadora infatigable, Pilar experta consejera. A Mar y Lourdes por ayudarme con su experiencia en el día a día. Por supuesto a las resis (Victoria, Diana, Alicia Cosgaya, Aida, Laura, Leyre, Bea, Alicia) un motivo para sonreír cada día y un aliciente para ser mejor médico. Cómo no Marcelita, tu inquietud es contagiosa, eres un ejemplo a seguir y te has ganado un puesto bien merecido en esta lista.

Quería agradecer a Santiago Quirce su impulso, consejo y apoyo, un auténtico facilitador del camino sin el que nunca me habría embarcado en esta aventura.

Quiero agradecer también a mis compañeros en A Coruña Antonio, Beatriz, Charo, Clara, Angeles y Leticia sin vuestra formación y pasión, no hubiese llegado a adquirir la curiosidad para dar el paso y atreverme a este proyecto.

A mi familia, gracias por el apoyo incondicional y especialmente a ti, Marta por facilitarme esta tarea y la comprensión puesta cada día para poder terminar este proyecto.

A mi hija Carmela.

CLAVE DE ABREVIATURAS:

ACT: Test de control de asma

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AQLQ: Cuestionario de calidad de vida en asma

ARN: Acido ribonucleico

ARNm: Acido Ribonucleico mensajero

CD: Célula dendrítica

CT: Ciclo Umbral

CVF: Capacidad Vital Forzada

DE: Desviación estándar

ICS/LABA: Corticosteroide inhalado y Beta agonista de acción prolongada

IL: Interleucina

LBA: Lavado broncoalveolar

LT: Linfocitos T

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

miARNs: Micro ARN

NGS: Secuenciación de próxima generación

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RA: Rinitis alérgica

STAT-5: Activador de la transcripción 5

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

Th2: linfocito T colaborador de clase 2

TSLP: Linfopoyetina del estroma tímico

UTR: Región no traducida

VEMS: Volumen Espiratorio Máximo en el primer Segundo

SNOT-22: Test de valoración nasosinusal 22

VR: Volumen residual

TLC: Capacidad pulmonar total

DLCO: Capacidad de difusión pulmonar.

RESUMEN EN ESPAÑOL:

Existe actualmente evidencia suficiente para pensar que los biomarcadores tienen un papel en diversos puntos clave del asma: incluyendo el diagnóstico, la gravedad de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento. Las células liberan al espacio extracelular diferentes tipos de vesículas de doble membrana lipídica, entre las que se encuentran los exosomas, que funcionan como elementos muy importantes en la comunicación intercelular, puesto que son capaces de distribuir material genético, ARNm, ADN mitocondrial y microARNs (miARNs).

Los miARNs son una familia de pequeñas moléculas de ARN no codificantes, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Actúan como reguladores de la expresión génica, lo que resulta en la inhibición de la traducción de proteínas o degradación de ARNm. Una de las características únicas de los miARNs es que se secretan al medio extracelular (plasma, BAL, esputo etc) y que son resistentes a la degradación por nucleasas, a la temperatura y a otras condiciones extremas, haciendo de ellos unos biomarcadores muy prometedores y estables. En este trabajo se estudia por primera vez la estabilidad de los microARNs en el paciente asmático a lo largo de todo un año, demostrándose que no hay cambios importantes en la medición de los microARNs en el tiempo cuando la enfermedad permanece estable y no se modifica el tratamiento. Además, se demuestra que existen diferencias en la expresión de ciertos miARNs tras la introducción de un tratamiento biológico en asma grave no controlada. La expresión de miR-338-3p cambia después del tratamiento, lo que podría ser un biomarcador de respuesta temprana a un fármaco biológico anti-IL-5, este cambio de expresión no se correlaciona con la mejoría obtenida en la función pulmonar.

RESUMEN EN INGLES:

There is currently enough evidence to think that biomarkers play a role in several key points in asthma: including diagnosis, severity of the disease, and response to treatment. Cells release different types of lipid double membrane vesicles into the extracellular space, including exosomes, which function as very important elements in intercellular communication, since they are capable of distributing genetic material, mRNA, mitochondrial DNA and microRNAs (miRNAs).

MiRNAs are a family of small non-coding RNA molecules, approximately 22 nucleotides in length. They act as regulators of gene expression, resulting in inhibition of protein translation or mRNA degradation. One of the unique characteristics of miRNAs is that they are secreted into the extracellular environment (plasma, BAL, sputum, etc.) and that they are resistant to degradation by nucleases, temperature and other extreme conditions, making them very promising and stable biomarkers. This work studies for the first time the stability of microRNAs in asthmatic patients throughout a year, showing that there are no important changes in the measurement of microRNAs over time when the disease remains stable and the treatment is not modified. Furthermore, it is shown that there are differences in the expression of certain miRNAs after the introduction of a biological treatment in severe uncontrolled asthma. The expression of miR-338-3p changes after treatment, which could be a biomarker of early response to an anti-IL-5 biological drug, without being associated with the improvement obtained in lung function.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN:

Asma, enfermedad de la vía aérea

La definición más consensuada de la enfermedad asmática se debe a la iniciativa GINA (*Global Initiative for Asthma*) (1), considerando las características clínicas, fisiológicas y patológicas de la enfermedad la definen de la siguiente manera:

“El asma es una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por la inflamación crónica de las vías respiratorias. Está definida por la historia de los síntomas respiratorios como sibilancias, falta de aire, opresión torácica y tos, que varían en el tiempo y en intensidad, junto con la obstrucción variable del flujo pulmonar”.

El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes a nivel mundial, en el 2016 se calculó que existían por encima de los 339 millones de personas afectadas en el mundo (2) y causó en todo el mundo 417.918 fallecimientos provocando la pérdida de 24,8 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad (3). Su alta prevalencia, entorno al 20% en los países más industrializados, y su morbilidad (4), junto con la dificultad de conseguir un adecuado control en muchos casos, nos lleva a pensar que pese al gran conocimiento actual acerca de esta patología y del desarrollo de nuevos tratamientos, conocemos solo parcialmente la enfermedad. De hecho, a pesar de la ingente investigación que se realiza sobre la patología asmática, aún existen lagunas, e ideas que cambian, a veces sustancialmente, con la evolución del conocimiento científico.

Una de las características intrínsecas del asma es su variabilidad. Esta heterogeneidad que rodea a la enfermedad asmática ha conducido a dividir esta patología en diferentes fenotipos (5) en los que se agrupan los pacientes en función de los siguientes

parámetros: las características clínicas y fisiopatológicas, la historia natural, los marcadores asociados, y por último, la respuesta al tratamiento.

De hecho, recientemente se ha incluido el concepto de *endotipo* (6), definido como un subtipo, que se define funcional y patológicamente por determinados mecanismos moleculares o por una respuesta a tratamiento. La ventaja de definir los endotipos, es que estos podrían permitir una aproximación terapéutica más personalizada.

Los eosinófilos en el asma

En general, la enfermedad asmática se orchestra mediante la respuesta inmunitaria de tipo 2 (T2), típica de enfermedades inflamatorias de tipo alérgico. El modelo de asma actual se muestra en la Figura 1; el daño epitelial causado por factores ambientales y / o infecciosos es beneficioso para la migración de células dendríticas (CD). En la etapa de sensibilización, las CD procesan antígenos (o alérgenos) y migran a los ganglios linfáticos locales, donde interactúan con linfocitos T (LT) inmaduros para inducir la diferenciación de células T, principalmente células T colaboradoras 2 (Th2) (7). Diferentes citocinas y quimiocinas afectan la activación de las CD y la maduración de los linfocitos Th2, así como su migración a la mucosa epitelial. Las citocinas producidas por los linfocitos Th2 inducen la producción de IgE y otros cambios asociados con el asma, como la eosinofilia de las vías respiratorias, la linfocitosis pulmonar y el aumento en el número de mastocitos (8). Cuando se produce una nueva exposición alérgica, se desencadena una respuesta donde la IgE, unida a la superficie de los mastocitos, tiene un papel clave al inducir la secreción de mediadores que activan, a su vez, a las células del sistema inmune innato, entre las que se encuentran los eosinófilos y las células del sistema inmune adaptativo, principalmente, células Th2, perpetuando así la respuesta inflamatoria en el asma (7).

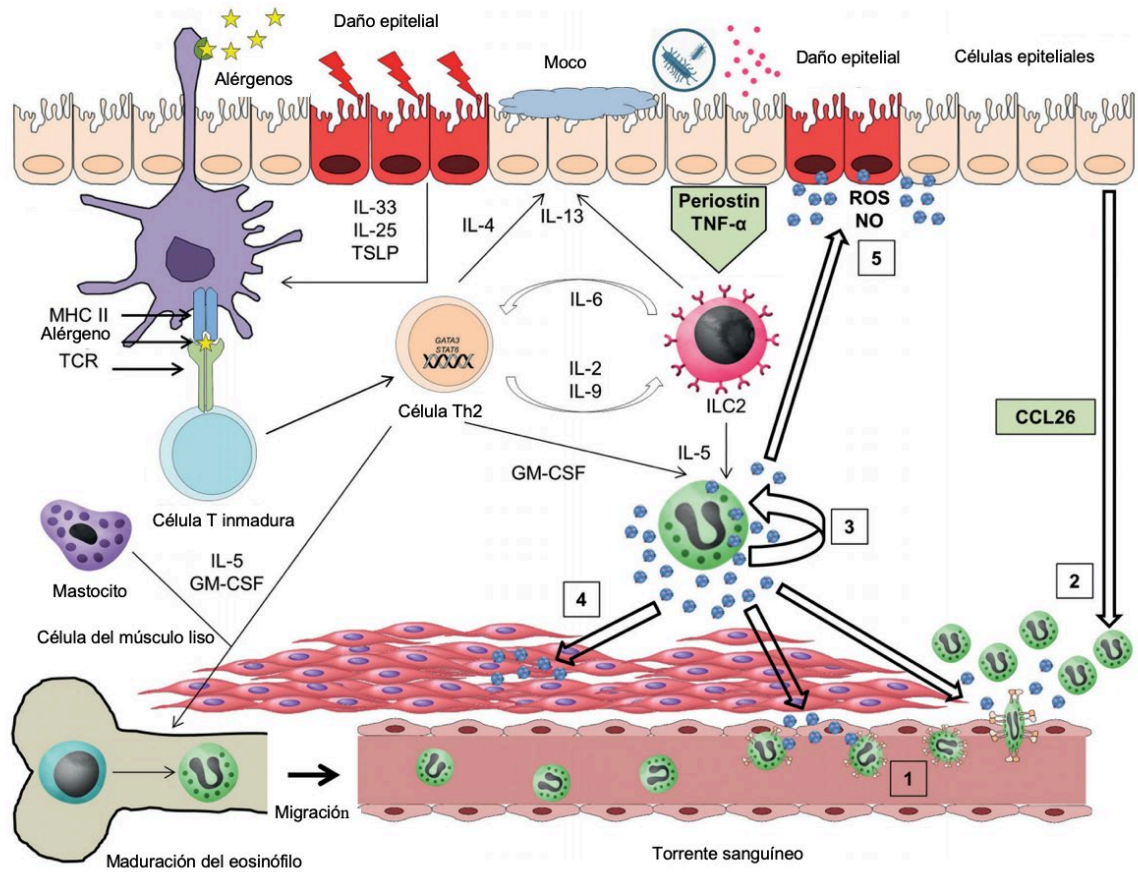


Figura 1: Los eosinófilos realizan sus funciones efectoras cuando se orquesta una respuesta inmune. Los alérgenos activan el epitelio de las vías respiratorias que secretan citocinas como IL-33, IL25 o TSLP, que activarán ILC2 para secretar moléculas de reclutamiento proeosinofílicas como IL-4-IL5 e IL-13. Las células dendríticas procesan el alérgeno y activan las células TH2 CD4 + que promueven el reclutamiento de eosinófilos a través de la producción de IL-4, IL-5, GM-CSF e IL-13. El reclutamiento de eosinófilos también se promueve directamente en el epitelio por las células endoteliales, las células epiteliales y los fibroblastos, así como por la secreción de moléculas como la periostina y la eotaxina. Una vez reclutados y activados, los eosinófilos se dirigen a las vías respiratorias y secretan el contenido tóxico y enzimático de sus gránulos (ECP, MPB, NO, ROS, MMP9), causando daño epitelial. Modificado de Sastre B y cols *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018; Vol. 28(5): 289-04.

Una de las células principales en este tipo de respuesta inmune es el eosinófilo (8). Los eosinófilos forman parte de una compleja red de interacciones que implican a un gran número de células inmunocompetentes y no inmunocompetentes, así como tejidos.

De todas las células integrantes de la respuesta inmune de tipo 2, los eosinófilos son decisivos en la propagación y el mantenimiento del estado inflamatorio, pero su carácter pleiotrópico los sitúa en muchos otros escenarios siempre relacionados con este tipo de respuesta, lo que sugiere una gran importancia de estas células en la coordinación

de la inmunidad de tipo 2. En procesos alérgicos y en el asma, estas células son reclutadas a la vía respiratoria desde la médula ósea a través del torrente sanguíneo (8). Una vez en las vías respiratorias, los eosinófilos liberan proteínas catiónicas, citoquinas, quimiocinas y mediadores lipídicos contenidos en sus gránulos citoplásmicos (9). Estas moléculas pueden actuar sobre otras células y sobre los propios eosinófilos, y puede contribuir a la perpetuación de la inflamación y el daño tisular (10). Estos procesos pueden visulizarse en la Figura 1.

Estudios recientes están redefiniendo el papel de los eosinófilos, y se han demostrado nuevas funciones inmunoreguladoras y reparadoras en el pulmón (10). Así, los eosinófilos participarían:

1. En la fase de iniciación de los eventos que conducen a la polarización Th2.
2. En la supresión de las vías Th1/Th17 en los nodulos linfáticos pulmonares.
3. En el reclutamiento de células Th2 en el pulmón.
4. En los mecanismos de resolución de la inflamación que restablecen la homeostasis pulmonar.

Todo ello ha hecho que los eosinófilos cobren de nuevo un papel muy importante en el asma, no solo como biomarcador de gravedad y/o control de síntomas del asma sino:

1. Como regulador de múltiples funciones y una de las posibles formas de hacerlo sería mediante la liberación de exosomas permitiendo la comunicación intercelular.

2. Como diana terapéutica, de hecho actualmente existe un importante desarrollo terapéutico en marcha con biológicos cuya diana es el eosinófilo de forma directa [anti-IL5R α , benralizumab (11)] o indirecta [anti-IL-5, mepolizumab (12) y reslizumab (13)].

Los eosinófilos pueden liberar exosomas que contienen una gran cantidad de proteínas y microARNs (miARNs) que podrán ser transferidos a las células receptoras.

De esta manera los eosinófilos pueden transportar miARNs a otras células y tejidos y ejercer diferentes funciones (14).

MicroARNs

Los miARNs son secuencias de ARN de cadena simple de 19-24 nucleótidos de longitud que no se traducen en proteínas. Actúan como reguladores de la expresión génica al unirse a la región 3' no traducida (UTR) del ARNm diana, lo que produce la inhibición de la traducción de proteínas o la degradación de ARNm (Figura 2). Los miARNs tienen diferentes perfiles de expresión dependiendo del tipo de célula y estado de la enfermedad.

Los miARNs presentes en suero son muy estables y resistentes a las ARNasas sanguíneas y se ha descrito que algunos están diferencialmente expresados en varias patologías respiratorias (15). Todas estas características hacen a los miARNs un campo emergente en el asma alérgica, concretamente como posibles biomarcadores.

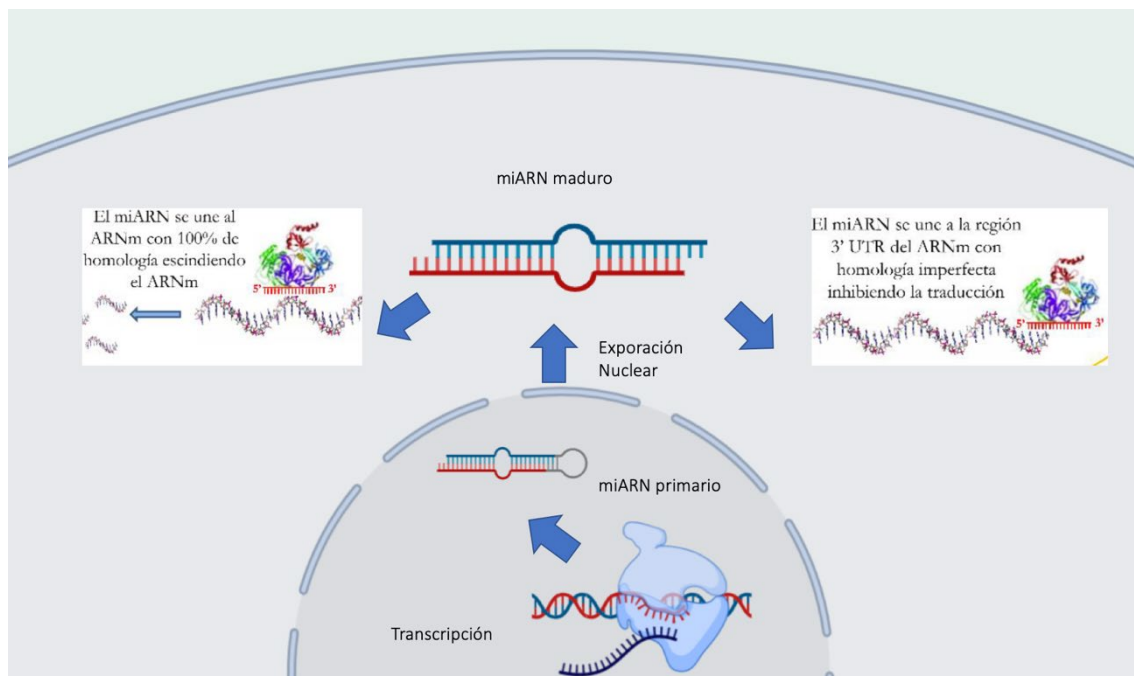


Figura 2: La biogénesis de los miARN comienza con la transcripción del miARN primario por la ARN polimerasa II. El miARN primario es escindido por el complejo microprocesador Drosha/DGCR8 para generar el pre-miARN el cual es transportado al citoplasma mediante el complejo EXP5. Allí es procesado por el complejo Dicer-TRBP para generar el dúplex miARN-miARN. El miARN maduro se une al ARNm para regular su expresión. Imagen realizada con BioRender®.

Importancia de un buen biomarcador en el asma

El coste anual total del asma en España se estima en 1480 millones de euros (IC del 95%, 382- 2565 millones de euros) para los pacientes con hiperreactividad bronquial demostrada y 3022 millones de euros (IC del 95%, 2472-3535 millones de euros) en pacientes diagnosticados únicamente por síntomas compatibles (16), esto hace que sea de gran utilidad y necesario encontrar un biomarcador diagnóstico con una elevada sensibilidad y especificidad para poder disminuir el sobre tratamiento y el sobre diagnóstico. Es importante destacar que ningún test diagnóstico disponible actualmente para el asma es infalible. El test diagnóstico más sensible es la provocación bronquial inespecífica con metacolina, con una sensibilidad del 96% y una especificidad del 78% y los más específicos son: la variabilidad diaria en el PEF, con una sensibilidad del 61%, una especificidad del 81% y la prueba broncodilatadora en la espirometría, con una sensibilidad del 31% y una especificidad del 95% (17). Con estos datos de sensibilidad y especificidad diagnóstica parece claro que puedan ser necesarias herramientas complementarias para ayudar en el diagnóstico. En algunos casos de asma leve persistente, y en prácticamente todos los pacientes con asma leve intermitente, no es fácil demostrar alteraciones funcionales. Las herramientas diagnósticas que pueden ayudarnos en estas situaciones son las dirigidas a monitorizar la inflamación de las vías respiratorias. Es posible que la inflamación asmática pueda ser mantenida como consecuencia de perfiles alterados de expresión de miARNs que estén regulando las complejas condiciones inflamatorias que ocurren en el asma (14).

MicroARNs como biomarcadores en el asma

La expresión diferencial de miARNs en fluidos biológicos entre pacientes con asma y controles, al igual que su papel en los subconjuntos de células inmunitarias ha sido investigado en diversos estudios (18-19). En estos estudios, se ha abordado el desarrollo de miARNs como marcadores de respuesta al tratamiento (18). Entre otros, el miARN-146a se ha implicado en la inflamación de las vías respiratorias (19) y el miARN-155 en el desarrollo de la atopia (18). Estos hallazgos adelantan que los miARNs pueden tener un papel potencial como biomarcadores del estado de la enfermedad o como respuesta al tratamiento. El uso de los miARNs como terapia para el asma quedaría por determinar y su uso como dianas terapéuticas en el pulmón no está claro actualmente.

Los estudios más recientes indican que los miARNs y ciertos biomarcadores como el FENO y la periostina pueden ser importantes en el control de la respuesta inmune de los individuos con asma, sin embargo, siguen existiendo muchos interrogantes sin respuesta (20). No está claro, por ejemplo, si deben medirse por separado o es por el contrario más importante medir un grupo de ellos que actúen de manera coordinada o si son estables a lo largo del tiempo. Hay evidencia suficiente para pensar que los biomarcadores tienen un papel en diversos puntos clave del asma: incluyendo el diagnóstico, la gravedad de la enfermedad y posiblemente también en la respuesta al tratamiento. Sin embargo, la correlación de los distintos biomarcadores con la respuesta clínica y funcional tras la instauración del tratamiento farmacológico no está bien establecida.

Recientemente, como trabajo previo a la realización de esta tesis doctoral, se ha publicado un trabajo realizado por el grupo de Inmunología y Alergia del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (21).

Antecedentes

Para identificar las diferencias de miARN en eosinófilos de sujetos asmáticos y sanos, analizaron el miARNoma en 6 muestras de eosinófilos de asmáticos y 4 muestras de individuos sanos. Los investigadores observaron 539 miARNs maduros en eosinófilos y 24 de ellos se expresaron diferencialmente entre ambos tipos de eosinófilos (sanos y asmáticos). De estos, 14 estaban sobreexpresados en eosinófilos de asmáticos y los otros 10 estaban regulados a la baja. Estos resultados obtenidos por la técnica de secuenciación de próxima generación (NGS) fue validada por PCR cuantitativa (qPCR).

Para evaluar si la firma de MiARNs podría usarse como un biomarcador, analizaron si se conservaba en suero. Analizaron los 14 miARNs en sueros de 138 pacientes asmáticos y 39 sujetos sanos. De los 14 miARNs, miR-1246, miR144-5p, miR-320a, miR-185-5p y miR-21-5p se encontraron regulados al alza en los sueros de pacientes asmáticos en comparación con los controles sanos. El miR-185-5p demostró en esta población tener un mejor rendimiento diagnóstico que la periostina sérica, un biomarcador descrito anteriormente. Además, los autores encontraron que había dos miARNs (miR 185-5p y miR 1246) que se relacionaban con la gravedad, ya que la sobreexpresión era mayor en los asmáticos intermitentes y leves en comparación con los controles, e incluso ligeramente mayor en los asmáticos persistentes moderados y severos. Otro hallazgo interesante que encontraron los autores fue una correlación significativa entre la expresión de algunos miARNs y valores espirométricos como la capacidad vital forzada (CVF) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEMS). La expresión de MiR-144-3p, miR-1246, miR320a, miR-21-5p y miR-629-5p se correlacionó negativamente con los valores de CVF en asmáticos. La expresión de MiR-629-5p se correlacionó negativamente con los valores de VEMS en los asmáticos.

Estos resultados podrían sugerir que a una mayor expresión de estos miARNs habría un mayor empeoramiento de los valores espirométricos.

Para una mejor discriminación entre asmáticos y sanos, los autores crearon un modelo de regresión logística multivariable con una sensibilidad de 0,89 y una especificidad de 0,77. También crearon dos modelos de Random Forest, un método de aprendizaje automático supervisado utilizado para la clasificación de muestras según un conjunto de variables, en este caso la expresión de los miARNs en suero. El primer modelo se ejecutó para discriminar entre el estado de salud y el de asma, y el segundo para crear un modelo predictivo para clasificar a los sujetos en función de la gravedad de la enfermedad asmática (intermitente, leve persistente, persistente moderada y persistente grave). Los autores fueron capaces de clasificar a los sujetos en asmáticos o sanos con una sensibilidad y especificidad de 0.75. En resumen, este es el primer estudio que muestra el perfil de expresión diferencial de miARNs asociados con la patología del asma. Además, algunos de estos miARNs se encontraban en el suero y se podrían integrar en modelos estadísticos para el diagnóstico de asma.

Estabilidad en el tiempo de los miARNs y respuesta al tratamiento

La utilidad de los miARNs como marcadores de la respuesta terapéutica al tratamiento inhalado se ha explorado en la literatura por otros grupos de trabajo (22). Hasta la fecha, se ha identificado que los pacientes asmáticos tienen una expresión diferencial de más de 100 microARNs en comparación con sujetos sanos (22). También se ha demostrado que el pulmón tiene un perfil de expresión de miARNs muy específico, que se conserva en todas las especies de mamíferos, y que los miARNs son importantes para el desarrollo pulmonar y el mantenimiento de la homeostasis pulmonar (23,24). El perfil de expresión de miARNs específicos en biopsias de las vías respiratorias humanas

y en los tipos de células comúnmente asociados con las vías respiratorias y el pulmón, parece que se mantiene en los pacientes con asma leve (25). Este estudio comparó el perfil de expresión de miARN entre muestras de biopsias de las vías respiratorias de pacientes asmáticos antes y después del tratamiento con budesonida. De los 227 miARN medidos usando PCR en tiempo real, no encontraron una alteración en el perfil de expresión de miARN, a pesar de un régimen de budesonida de 4 semanas de duración (25). En la tabla 1 se puede observar un resumen de los miARN enumerados en estas líneas y su relación con el asma.

MIARN	ASOCIACIÓN CON EL ASMA	ESTUDIO
MIR-146A	Mediador de inflamación en músculo liso	Comer BS et al (19)
MIR-155	Desarrollo de la atopia	Perry MM et al (18)
MIR-1246	Marcador de asma, marcador de gravedad en asma, relación negativa con CVF.	Rodrigo-Muñoz JM et al (21)
MIR144-5P	Marcador de asma	Rodrigo-Muñoz JM et al (21)
MIR-320A	Marcador de asma, relación negativa con CVF.	Rodrigo-Muñoz JM et al (21)
MIR-185-5P	Marcador de asma, marcador de gravedad en asma	Rodrigo-Muñoz JM et al (21)
MIR-21-5P	Marcador de asma, relación negativa con CVF	Rodrigo-Muñoz JM et al (21)
MIR-144-3P	Relación negativa con la CVF.	Rodrigo-Muñoz JM et al (21)
MIR 629-5P	Relación negativa con la CVF y el VEMS	Rodrigo-Muñoz JM et al (21)

Tabla 1: MiARN enumerados en estas líneas y su relación con el asma.

En cuanto al asma más grave sabemos que en el asma de origen alérgico, las ILC2 son una potente fuente de citocinas distintivas de tipo 2, IL-13 e IL-5, que provocan la inflamación. Las ILC2 pueden contribuir a una respuesta Th2 a través de la secreción de citocinas, pero también pueden influenciar a otras células directa o indirectamente a través de su efecto en células accesorias o mediante contacto directo célula-célula, liberando señales del sistema inmunitario adaptativo (26). Además, las ILC2 pueden contribuir al mantenimiento de los eosinófilos y afectar a la función de basófilos, macrófagos, células dendríticas y de mastocitos, los cuales a su vez pueden activar también a las ILC2 o suprimir su actividad (26,27). Las ILC2 podrían inducir un fenotipo resistente a los esteroides cuando se activan mediante la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) a través de la vía de señalización del transductor de señal y el activador de la transcripción 5 (STAT5), como se demuestra en el asma grave (28). Los miARNs son capaces de regular la función ILC-2 pulmonar en un modelo de ratón de inflamación alérgica de las vías respiratorias y están implicados en la patogenia del asma grave en humanos (29). El miARNoma ILC-2 comparte características con las células Th2, en las que el grupo miR1792 es necesario para la expansión de ILC2 y la promoción de la producción de IL-5 e IL-13 (29).

El concepto de que los miARNs son fundamentales para la patogénesis del asma grave a través de la inflamación de las vías respiratorias y las reacciones de hipersensibilidad ahora está ampliamente aceptado y está respaldado por una gran cantidad de datos. Aunque los diversos miARNs, más que un único miARN, son claves para la disfunción biológica subyacente al asma grave, priorizar la importancia de los miARN individuales es importante en el contexto del asma grave y la búsqueda asociada de los mejores inhibidores de miARNs, como agentes terapéuticos novedosos para el

asma grave. Un área importante de investigación en el futuro, ahora posible gracias a los avances en las tecnologías genómicas, será probar la eficacia terapéutica de los antagoniR apropiados para silenciar la expresión de miARNs.

Estos hallazgos sugieren que la expresión de estos miARNs tras la instauración de un tratamiento biológico anti IL-5 (mepolizumab, reslizumab) podrían verse alterados y quizás podrían servir como marcadores de respuesta al tratamiento, en una fase más temprana que la mejoría clínica, pudiendo ser utilizados para monitorizar la respuesta terapéutica en el asma grave y ahorrar así recursos económicos, además que permitiría asignar a cada paciente un fenotipo o endotipo y recibir el tratamiento de forma personalizada.

Tras el trabajo previamente descrito (21) se inician los experimentos de los que deriva esta tesis doctoral, puesto que todavía existían una serie de preguntas que necesitaban respuesta: en primer lugar se desconocía si los resultados que se encontraron en una cohorte concreta de pacientes asmáticos, podrían ser reproducibles si se realizasen los mismos experimentos a otra cohorte distinta, dando así mayor validez y aplicabilidad a los resultados obtenidos; también se desconocía si los miARNs permanecían estables en el tiempo en un mismo paciente cuando su enfermedad permanecía estable, dado que al funcionar como reguladores de la expresión génica podrían verse afectados por multitud de factores o enfermedades distintas al asma y por tanto perder valor como biomarcador y no menos importante, también se desconocía el efecto en la expresión de estos miARNs con la introducción de ciertos tratamientos como los fármacos biológicos, que han supuesto el mayor avance terapéutico en el asma desde la aparición de los inhaladores con combinación de corticoide y broncodilatador de acción larga.

En esta tesis doctoral se estudia la estabilidad a lo largo del tiempo de los microARNs miR-320-a, miR-144-5p, miR-1246, miR-21-5p y miR-185-5p en pacientes con asma y en controles sanos. Estos miARNs se seleccionaron porque previamente fue demostrado que pueden usarse como un biomarcador sérico de asma (21). También se estudia la diferencia de expresión entre pacientes sanos y asmáticos para intentar reproducir los resultados obtenidos en el trabajo previo (21) y por último, se estudia la diferencia de expresión de miARNs en suero, en pacientes tratados con reslizumab y mepolizumab (fármacos biológicos anti IL-5) tras 8 semanas de tratamiento.

Es muy importante, por tanto, destinar tiempo y recursos a esta área de investigación, para descubrir mecanismos aún desconocidos en la patogénesis del asma y poder predecir analizando biomarcadores, la respuesta terapéutica a fármacos biológicos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

La hipótesis de esta tesis sostiene que existen perfiles alterados de miARNs que están implicados en el mantenimiento de la inflamación asmática y que pueden tener un valor como biomarcadores, para lo cual estos perfiles de microARNs deben permanecer estables a lo largo del tiempo cuando la enfermedad asmática permanece estable y no se realizan modificaciones en el tratamiento.

Además, el perfil de miARNs resultante de la inflamación asmática, podría modificarse tras la instauración de un tratamiento antiinflamatorio para el asma, incluyendo los nuevos tratamientos biológicos disponibles para el asma grave eosinófilica con efecto anti-IL-5. El posible cambio en la expresión del perfil de miARNs tras el tratamiento con fármacos biológicos con efecto anti-IL-5, podría interpretarse como respuesta positiva al tratamiento previo a los cambios clínicos en el paciente.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Los objetivos generales del presente trabajo son evaluar a lo largo del tiempo la estabilidad de un perfil de miARNs en el suero de pacientes asmáticos y sanos; así como estudiar si existe una expresión diferente de ciertos miARNs en pacientes con asma grave tratados con fármacos biológicos anti-IL-5.

• Objetivos principales:

1. Estudiar la estabilidad de un perfil de miARNs (miR-320-a, miR-144-5p, miR-1246, miR-21-5p y miR-185-5p) en el suero, de pacientes asmáticos y en individuos sanos sin asma y sin atopia tras un año de seguimiento.
2. Estudiar la diferencia de expresión de miARNs en suero tras 8 semanas de la instauración de un tratamiento biológico anti IL-5 en pacientes con asma grave no controlada.

• Objetivos secundarios:

1. Estudiar el perfil diferencial de miARNs (miR-320-a, miR-144-5p, miR-1246, miR-21-5p y miR-185-5p) en el suero entre pacientes con asma de la cohorte de pacientes MEGA y sujetos sin asma y sin atopia.
2. Describir las características basales de los adultos asmáticos participantes en el proyecto MEGA en términos de sus características clínicas, frecuencia de multimorbilidades, características funcionales y biomarcadores inflamatorios, para comprender mejor la historia natural del asma en pacientes con diferentes niveles de gravedad.
3. Intentar establecer asociaciones entre los posibles cambios hallados en la expresión de miARNs al instaurar un tratamiento biológico y parámetros clínicos
4. Estudiar las vías/rutas de actuación de los miARNs alterados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos:

Sujetos de Estudio

Se han utilizado pacientes asmáticos, pertenecientes al proyecto MEGA: En el marco del Cíber de enfermedades respiratorias (CIBERES), 8 hospitales universitarios de distintos puntos de la geografía española han generado una cohorte que engloba la posibilidad de acceder a datos clínicos, fisiológicos, moleculares y genéticos en pacientes con distintos grados de gravedad del asma y con un seguimiento de 5 años (30). Los pacientes firmaron tanto el CI para participar en el registro y el consentimiento de biobanco. Los voluntarios sanos se reclutaron de los trabajadores del servicio de alergia de la FJD y del IIS-FJD.

Descripción proyecto MEGA

El proyecto MEGA es un estudio observacional multicéntrico, de carácter prospectivo en el que se incluyen a 512 pacientes asmáticos. La gravedad del asma se ha determinado de acuerdo con la clasificación de la Iniciativa Global para el Asma (GINA) (1). El diagnóstico de asma (basado en las guías de la GINA) precedió a la inclusión de pacientes por al menos un año. Se completó una historia clínica estandarizada para cada paciente y se administraron versiones en español validadas de los siguientes cuestionarios: Prueba de control del asma (ACT) (31), test de adherencia a los inhaladores (test TAI) (32), cuestionario de calidad de vida para el asma (mini AQLQ) (33), el test de resultado Sino-Nasal 22 (SNOT-22) (34) y la escala hospitalaria de ansiedad y depresión (HADS) (35). Todos los sujetos del estudio se sometieron a un examen clínico detallado, que incluye el índice de masa corporal y las pruebas de función respiratoria (espirometría forzada, prueba broncodilatadora, medición del volumen pulmonar por pletismografía, fracción de óxido nítrico exhalado [FeNO], prueba de provocación bronquial inespecífica

con metacolina y prueba de transferencia de CO [DLCO]), siguiendo las recomendaciones de la academia europea de respiratorio (ERS) (36,37,38).

La provocación bronquial inespecífica con metacolina (38) y el esputo inducido se realizaron al inicio del estudio y posteriormente cada 24 meses. Al comienzo del estudio se realizaron tomografía computarizada (TC) de tórax y pruebas cutáneas con aeroalergenos comunes. Las pruebas cutáneas (SPT) se consideraron positivas con un diámetro de pápula de al menos 3 mm en comparación con el control negativo (solución salina); Se utilizó histamina (10 mg / ml) como control positivo. La atopia se definió como la presencia de al menos un SPT positivo o IgE específica de aeroalergeno en suero. El ADN, el suero, el condensado de aire exhalado y los sobrenadantes de esputo se almacenaron a -80 ° C en cada uno de los centros de reclutamiento para su posterior análisis.

Estudio de estabilidad de los Micro-ARNs

Para establecer si la expresión de miARNs permanece estable a lo largo del tiempo en pacientes asmáticos, cuando su enfermedad permanece clínicamente estable, se realizó un reclutamiento consecutivo (no seleccionado) de pacientes de la cohorte nacional (proyecto MEGA) (30). Se seleccionaron aleatoriamente 20 pacientes incluidos en dicha cohorte por el hospital universitario fundación Jiménez Díaz. Todos los pacientes elegidos presentaron un diagnóstico confirmado de asma con una mejoría superior al 12% en el VEMS 15 minutos después de la administración de salbutamol inhalado (400 µg) o tenían hiperreactividad de las vías respiratorias a la metacolina (metacolina PC20 <16 mg / ml) (30). Todos estos pacientes tenían asma persistente moderada y fueron tratados con una combinación de ICS / LABA a dosis medias (400 µg de budesonida y 12 µg de formoterol fumarato dihidrato al día o equivalente). No se realizaron cambios en el

tratamiento recibido para el asma durante el período de estudio, desde el inicio y durante las visitas de seguimiento. Los miARNs que se han analizado en el estudio de estabilidad son los siguientes: miR-320-a, miR-144-5p, miR-1246, miR-21-5p y miR-185-5p.

El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre (recogida en tubos sin anticoagulante, la cual se centrifugó a 3000 rpm 4°C 10 minutos) y se almacenó a -80°C antes del análisis por un período de tiempo menor a dos años. Los sueros que se utilizaron de los 20 pacientes incluidos en este estudio fueron los correspondientes a la visita basal y a la primera visita de seguimiento que tuvo lugar en un periodo comprendido entre seis y 12 meses tras la visita basal. A continuación, se describen los criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

- Aceptación a participar.
- Diagnóstico objetivo de Asma según criterios GINA 2019 (1)
- Edad comprendida entre 18-75 años.
- Seguir revisiones clínicas frecuentes.
- Estar diagnosticado de asma persistente moderada y estar tratados con una combinación de ICS / LABA a dosis medias (400 microgramos de budesonida y 12 microgramos de formoterolfumaratodihidrato al día o equivalente).

Criterios de exclusión:

- Patología psiquiátrica que impida el entendimiento y aceptación del estudio.
- Neoplasia pulmonar.
- Enfermedad de transmisión sanguínea

Estudio de reproducibilidad

Para intentar reproducir los resultados obtenidos entre sueros de pacientes asmáticos y sueros de pacientes sanos en el trabajo previo a esta tesis doctoral (21) se analizaron los miARNs: miR-1246, miR-144-3p, miR-144-5p, miR-320-a, miR-320-b, miR-185-5p, miR-21-5p, miR-486-5p, en 20 sueros de pacientes sanos (no asmáticos, no atópicos) y en los 20 sueros de pacientes asmáticos de la visita basal del estudio anterior. Esto se realizó dado que las muestras que se utilizan para esta tesis doctoral son las de una cohorte diferente (proyecto MEGA), sin embargo, las muestras utilizadas en el trabajo previo (21) son de otra población de asmáticos (red Respira).

Estudio de cambios en Micro-ARNs tras tratamiento biológico

Se incluyeron sueros de dieciséis pacientes con asma grave eosinofílica tratados con fármacos anti-IL-5. Los pacientes fueron reclutados en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid a través de la cohorte del proyecto MEGA (30). La captación se realizó de forma consecutiva, no seleccionada. En este estudio no hay un proceso de aleatorización, los pacientes fueron seguidos tras el tratamiento instaurado por su médico que es diferente al médico que hace la evaluación de la respuesta. Cada paciente incluido en el estudio recibe el tratamiento que su médico previamente le había asignado antes de entrar en el estudio. La inclusión en este estudio no implica ningún cambio en el tratamiento que el paciente habitualmente recibe. El periodo del estudio estuvo comprendido entre marzo 2018 y marzo 2019. Seis de los pacientes fueron tratados con mepolizumab y el resto con reslizumab. El nombre comercial y las dosis utilizadas de los tratamientos pueden observarse en la tabla I.

El diagnóstico y el tratamiento del asma se han realizado de acuerdo con las directrices de la GINA (1). El criterio de inclusión de pacientes para la administración de mepolizumab y reslizumab fue la presencia de más de 300 y 400 eosinófilos/ μ L en sangre periférica, respectivamente (12,13). Los pacientes recibieron toda la información necesaria y firmaron el consentimiento informado por escrito para participar. El estudio se realizó siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de ética de la fundación Jiménez Díaz. Los criterios de inclusión y de exclusión se definen a continuación.

Criterios de inclusión:

- Aceptación a participar.
- Diagnóstico objetivo de Asma según criterios GINA 2019 (1)
- Edad comprendida entre 18-75 años.
- Seguir revisiones clínicas frecuentes.
- Asma grave no controlada a tratamiento con anticuerpo monoclonal

Criterios de exclusión:

- Patología psiquiátrica que impida el entendimiento y aceptación del estudio.
- Neoplasia pulmonar.
- Enfermedad de transmisión sanguínea.

Fármaco	Nombre comercial	Dosis
Mepolizumab	Nucala	100 mg /4 sem
Reslizumab	Cinqair	3 mg/kg de peso/4 sem

Tabla I: Fármacos que recibían los pacientes incluidos en el estudio, principio activo, nombre comercial y dosis pautada.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre periférica se recogieron en tubos libres de anticoagulante. Las muestras de suero se obtuvieron mediante coagulación sanguínea y centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Luego, se almacenaron a -80°C hasta su uso. Tras esto se llevaron a cabo los siguientes procesamientos:

- 1- Extracción de los micro-ARNs de la muestra:** Para la extracción de miARNs del suero de los pacientes se utilizó el kit miRNeasy serum/plasma advanced kit (Exiqon, Qiagen), y se realizó la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se partió de 200 µL de muestra y se le ha añadido 1 µL del Spike In mix (*miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, RNA Spike-in kit*) en el que se encuentran tres miARNs sintéticos (UniSp2, UniSp4, UniSp5), que están a distintas concentraciones y que sirven como control de que la extracción se ha realizado correctamente. Tras la extracción se dispone de 50 µL de ARN (enriquecido en miARNs), que se almacenaron a -80°C hasta su utilización en el siguiente paso.
- 2- Retrotranscripción a cADN:** La retrotranscripción a cADN se realizó mediante el sistema *Universal cADN Synthesis kit II* (Bionova, Exiqon, Copenhague, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem, Warrington, Reino Unido). Se añadió un control de la correcta realización de la retrotranscripción, el utilizado fue el *synthetic ARN spike in* (Sp6). El volumen final de muestra de suero utilizado fue de 2 µL. Tras la retrotranscripción se almacenan las muestras a -20 °C hasta su utilización en el último paso de procesado de muestra.

3- Análisis de la expresión de miARN por qPCR en tiempo real: Se midieron MiR-451a y miR-23a-3p para calcular el índice hemolítico en suero (no hay hemólisis si $[miR-23a-3p - miR-451a] < 7$). Previamente, el ADNc de los sueros se diluyó 40 veces con agua libre de nucleasas y se utilizaron 2 μ l en cada reacción. Cada muestra se analizó por triplicado. Se utilizó un programa de dos pasos de la siguiente manera: 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 1 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Light Cycler 96* (Roche, Basilea, Suiza). Los datos del umbral de ciclo (Ct) se tomaron en el último paso del ciclo de fusión de forma continua. Los resultados se analizaron con el software *LightCycler® 96 SW 1.1* (Roche, Basilea, Suiza). Como controles endógenos, se utilizan los miARNs recomendados por el fabricante: hsa-miR-103a-3p y hsa-miR-191-5p. La expresión génica de cada miARN se analizó para cada muestra usando el valor de umbral de ciclo obtenido de la qPCR. Los resultados de expresión de los controles endógenos obtenidos mediante qPCR se muestran en umbral de ciclos (Ct), que se requieren para llegar a una determinada fluorescencia, dada por la cantidad de cADN en ese ciclo. La expresión génica relativa se calcula de la siguiente manera: $2^{-\Delta Ct}$; donde $\Delta Ct = Ct_{miARN} - Ct_{control\ endógeno}$. (40)

Para el estudio de cambios tras tratamiento biológico fueron necesarios pasos adicionales:

Panel de PCR de miARNs en suero: Para realizar un cribado de miARNs en suero de pacientes asmáticos, se utilizaron paneles de PCR de miARNs en suero / plasma (Qiagen) para evaluar 179 miARNs. Además, el panel de PCR contiene varios controles para el aislamiento de ARN (UniSp2, UniSp4 y UniSp5), para

monitorizar la síntesis de ADNc (UniSp6 y cel-miR-39-3p) y verificar que la reacción fue exitosa (UniSp3). Además, este panel incluye miR-451 y miR-23a que se utilizaron como marcadores de hemólisis. Se analizaron nueve muestras de suero de pacientes con asma grave eosinofílica y tratados con biológicos, cinco con mepolizumab y cuatro con reslizumab. Inmediatamente después de la síntesis de ADNc, se diluyó 1:30 en agua libre de ARNasa y la reacción se realizó en un termociclador *Light Cycler® 96* (Roche). El programa de incubación se realizó por 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 1 min. La fusión del ADN se realizó calentando a 95°C durante 5 segundos, luego a 65°C durante 1 min y finalmente a 97°C durante 1 segundo. Las muestras se enfriaron durante 10 segundos a 40°C. Los datos del umbral de ciclo se tomaron en el último paso del ciclo de fusión de forma continua.

Análisis del enriquecimiento de vías

Con el fin de encontrar las vías específicas y las funciones biológicas en las que está involucrado el miR-338-3p, se realizó un estudio *in silico* de análisis de enriquecimiento con este miARN utilizando DIANA-mirPath v3 y la base de datos TarBase v7.0 i (41). Se escogieron las vías de KEGG con un valor de p y un FDR menor de 0,05.

Análisis estadístico

Las variables continuas fueron divididas entre normales y no normales. Las variables con una distribución normal se analizaron mediante pruebas paramétricas. La comparación entre grupos se realizó utilizando la prueba t de dos colas pareada para datos paramétricos y con la prueba pareada de Wilcoxon para muestras no gaussianas. Se realizaron pruebas pareadas para las comparaciones entre visita basal y visita de

seguimiento. Los grupos no pareados se compararon mediante la prueba t de Student de dos colas para muestras gaussianas y la prueba U de Mann-Whitney para muestras no gaussianas. La normalidad se estableció mediante la prueba de Saphiro-Wilk o de Kolgomorov-Smirnov. Para el análisis de variables cualitativas se ha utilizado la prueba exacta de Fischer. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Los cálculos estadísticos y gráficos se realizaron con GraphPadPrism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Tamaño de la muestra del estudio de estabilidad: La elección de la “n” a 20 pacientes, no fue precedida de un cálculo de tamaño muestral, puesto que se trataba de una prueba de concepto y no existía bibliografía previa en la que apoyar dichos cálculos.

Consideraciones ético-legales

Este estudio se ha ceñido estrictamente a la declaración de Helsinki y a las leyes de protección de datos (Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal) y de protección de los derechos de los pacientes (Ley 41/2002). Además, se ha obtenido el consentimiento informado de todos los participantes, se ha mantenido el anonimato de los mismos mediante la asignación de un número aleatorio y no consecutivo para codificar las muestras. El presente estudio ha sido evaluado y aprobado por el CEIC del instituto de investigación sanitaria del hospital universitario fundación Jiménez Díaz de Madrid.

RESULTADOS

RESULTADOS:

Características basales de los pacientes del proyecto MEGA

Las características funcionales y clínicas de los pacientes incluidos en el proyecto MEGA en la visita basal pueden observarse en la tabla II.

Se incluyeron en el estudio un total de 512 pacientes (66% mujeres). La mayoría de los pacientes eran caucásicos (92%). La obesidad, se encontró en el 25% de los pacientes (n=124); de estos, el 84% (n=104) tenía asma persistente grave y el 16% (n=20) asma intermitente o persistente leve. En cuanto al tabaquismo, el 53,4% de los pacientes eran no fumadores, el 31% exfumadores, el 8,2% fumadores y el 7% fumadores pasivos.

		N	Media ±DE	Intermitente	Leve	Moderada	Grave	
Datos demográficos	Edad	522	47,3±13	44,08±13,71	42,90±11,3	46,97±12,1	50,50±13	
	doctoral (%)	511	Manuel Jorge Rial Prado					
	Etia	499						
	Asiático (%)		0,002				0,5	
	Negro (%)		0,002				0,5	
	Caucásico (%)		91,99	100	82,2	92,4	94,5	
	Hispano (%)		6,8		16,6	6,4	3,9	
	Otros (%)		0,78		1,2	1,2	0,5	
	Mascotas en domicilio (%)	463	51	58,3	60,23	48,2	50,26	
	Edad de inicio del asma	470						
	<12 años (%)		41,4	30,4	28,7	23,8	28	
	12-40 años		20,1	30,4	52,8	46,9	50,1	
	>40 años		38,5	39,2	13,5	27,3	21,2	
	IMC	496	27,01±5	26,5±5	26,15±4,4	27,35±5,7	27,35±5,4	
	Hábito tabáquico	486						
	Nunca fumador		53,2	76,9	71,9	48,2	44,8	
	Fumador pasivo		7,5		3,4	7,6	10,4	
	Ex-fumador		30,8	19,2	19,1	31,8	37,.	
	Fumador		8,5	3,8	5,6	12,4	7	
	(Media ±DE paquetes-año)		35,68±92,5	12	9,75±6,2	57,5±128,1	15,9±15,2	
Consumo de alcohol (%)	482	23,3	12	23,9	31,5	17,4		
Características inflamatorias	Atopia	481	76,9	76,9	89,9	74,6	73,1	
	IgE Total	458	419,1±824	214,4±232,4	30,4±439	427,6±924	492±914	
	Eosinófilos (cells/mm3)	489	336±327	252±174,3	272,5±183	329,4±220	390±444	
	Eosinófilos en esputo (%)	212	10,49±19	4,72±3,17	6,49±10,7	8,8±16,7	14,11±22,9	
	FENO	340	41,82±37	56,63±48,17	42,48±37	36,84±29,6	46±40	
Parámetros funcionales	PC20 metacolina	198	4,63±10	8,025±12,14	3,073±6	3,72±12,9	4,66±6,3	
	VR%	222	123±44	123,2±47,54	132,8±42,5	113,2±42,6	129,4±45,18	
	TLC%	227	108±56	95,07±33,66	97,8±28,45	118,2±84,72	104,6±20,32	
	VEMS Pre-BD (%)	493	85,71±21	102,5±15,8	97,09±15,65	88,18±17,3	75,5±21,8	
	VEMS Post-BD (%)	365	86,06±3	108,9±16,7	100±26,82	81,92±37,88	81,1±29,3	
	CVF Pre-BD (%)	493	100,1±46	108,9±13,5	107±16,53	101,7±18,48	93,9±68,4	
	CVF Post-BD (%)	364	95,41±59	112,3±12,9	105±28,28	89,5±42,37	94,5±80,3	
	VEMS/CVF Pre-BD	474	71,81±37	112,9±168,6	86,75±97,8	70,16±14,13	67,73±11,70	
	VEMS/CVF Post-BD	333	76,68±65	128,2±198,6	95,96±116,7	72,70±13,3	71,33±12,44	
DLCO	201	95,9±22	91,44±14,83	97,8±19,33	96,5±22,35	95,22±23,11		
Cuestionarios	ACT	471	20,27±5	23,70±1,845	21,89±3,74	21,70±3,68	17,97±5,4	
	AQLQ	444	5,48±1,38	6±0,84	5,83±1,33	5,87±1,17	4,92±1,45	
	SNOT-22	416	29,5±19,97	25,22±1,57	24,4±16,84	26±18,9	35,21±21	

Tabla II: Características demográficas, inflamatorias, funcionales y resultados de cuestionarios de los pacinetes incluidos en la visita basal del proyecto MEGA. VR: Volumen residual, TLC: Capacidad pulmonar total, DLCO: Capacidad de difusión pulmonar.

En cuanto a la gravedad del asma, el 5% de los pacientes tenían asma intermitente (n=26), el 17% asma leve (n=90), el 33,4% asma moderada (n=171) y el 39,6% asma grave (n=203) (Figura 3). Un total de 22 pacientes (4,3%) no pudieron ser correctamente clasificados por falta de información en el registro electrónico. Las bronquiectasias estuvieron presentes en el 7% de los pacientes (n=36), y el 67% de ellos (n=24) experimentaron asma grave persistente. La edad de los pacientes graves es significativamente mayor que la de los de menor gravedad.

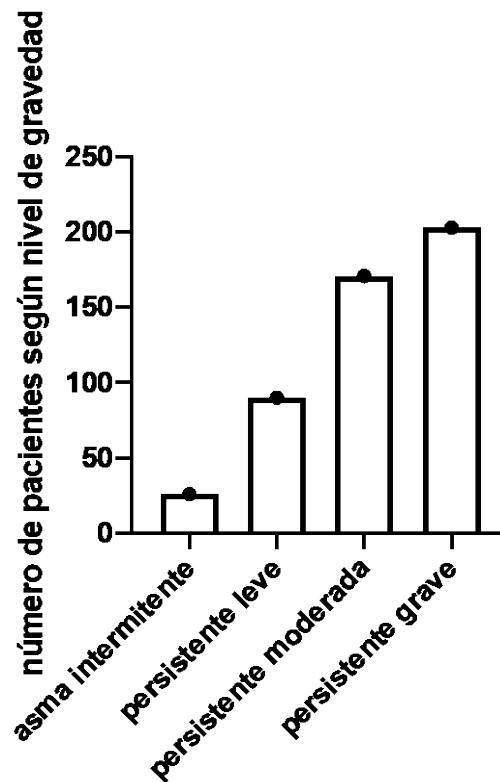


Figura 3: Distribución de los pacientes según niveles de gravedad del asma.

Durante el año anterior, el 15,5% de los pacientes habían desarrollado más de 3 exacerbaciones y solo el 1,4% no presentó ninguna exacerbación en ese período. Del total de pacientes que experimentaron exacerbaciones, el 18,6% requirió ingreso hospitalario durante el último año y el 9,8% requirió al menos 1 ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI)

Entre los pacientes estudiados, el 72,3% (n=370) tenía al menos 1 prueba cutánea positiva al aeroalergeno testado. El nivel de IgE fue $419,1 \pm 824$ kU/L y tendió a aumentar en mayores grados de gravedad.

Además, el 52% de los pacientes (n=266) tenían rinitis alérgica, el 10% (n=52) dermatitis atópica, el 18% (n=90) conjuntivitis alérgica, el 29% (n=148) tenían poliposis nasal, el 14,5% (n=74) mostraron hipersensibilidad a los AINE y el 4,7% (n=24) fueron diagnosticados de alergia alimentaria (Figura 4).

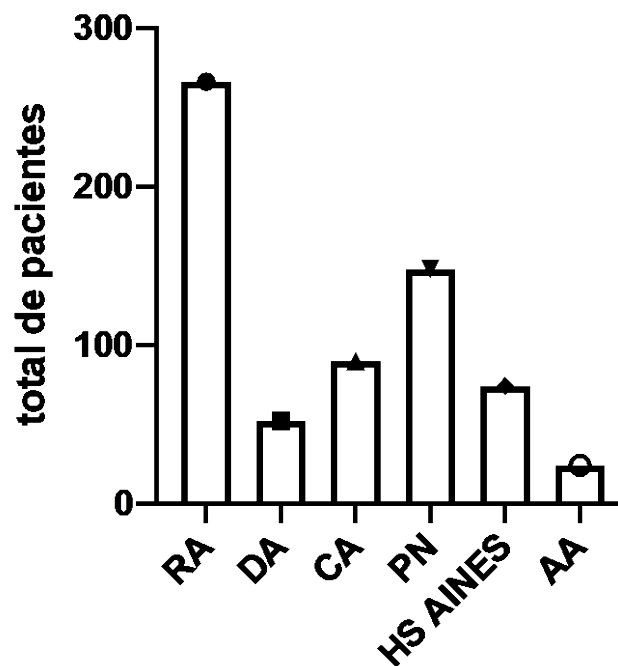


Figura 4: Comorbilidades de los pacientes incluidos. RA: Rinitis alérgica, DA: dermatitis atópica, CA: Conjuntivitis alérgica, PN: poliposis nasal, HS AINES: Hipersensibilidad a AINES, AA: Alergia alimentaria.

Se midió la eosinofilia en sangre periférica en todos los pacientes al inicio del estudio. El 80% de los pacientes (n = 409) tenían un recuento de eosinófilos en sangre periférica de ≥ 150 células/ μ L, el 53,3% (n=273) tenían un recuento igual o superior a 300 células/ μ L, el 38,8% (n=197) tenía un recuento de ≥ 400 células/ μ L, y el 28,3% (n= 145) tenían niveles superiores a 500 células/ μ L (Figura 5).

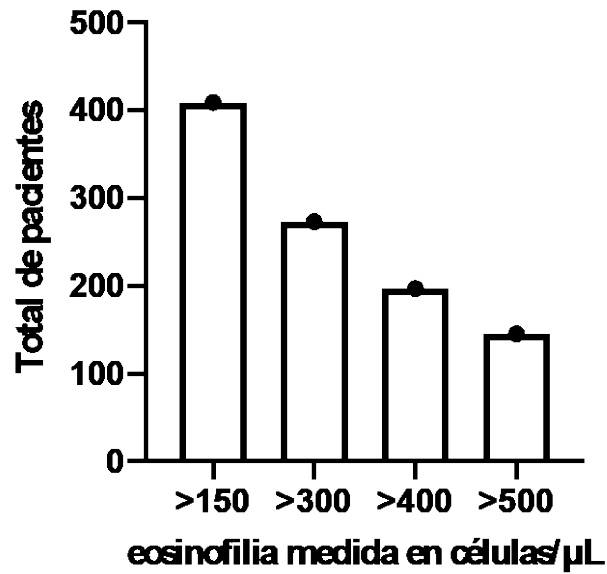


Figura 5: Clasificación de pacientes según eosinófilos (células/μL) en sangre periférica.

Se dispuso de esputo inducido para 212 pacientes. Se encontró un perfil inflamatorio eosinofílico (definido como $>3\%$ de eosinófilos y $<61\%$ de neutrófilos) en 64 pacientes (30,2%), un perfil neutrofílico ($<3\%$ de eosinófilos y $>61\%$ de neutrófilos) en 25 pacientes (11,8%), un patrón paucigranulocítico (definido como $<61\%$ de neutrófilos y $<3\%$ de eosinófilos) en 52 pacientes (24,5%), y se observó un patrón mixto ($>3\%$ de eosinófilos y $>61\%$ de neutrófilos) en 64 pacientes (30,2%) (Figura 6).

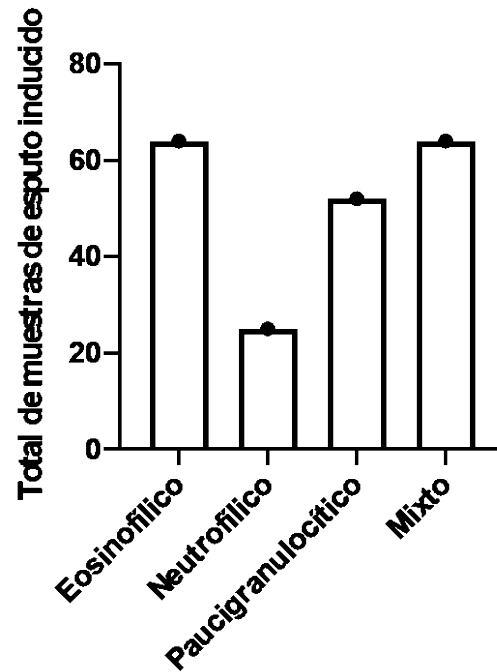


Figura 6: Clasificación de los patrones inflamatorios de esputo inducido.

Se registraron puntuaciones de ACT < 20 para el 34,5% de los pacientes (n=134). El cuestionario miniAQLQ mostró una puntuación media de $5,48 \pm 1,38$ unidades arbitrarias. Un breve esquema con algunas de las características de los pacientes puede observarse en la figura 7.

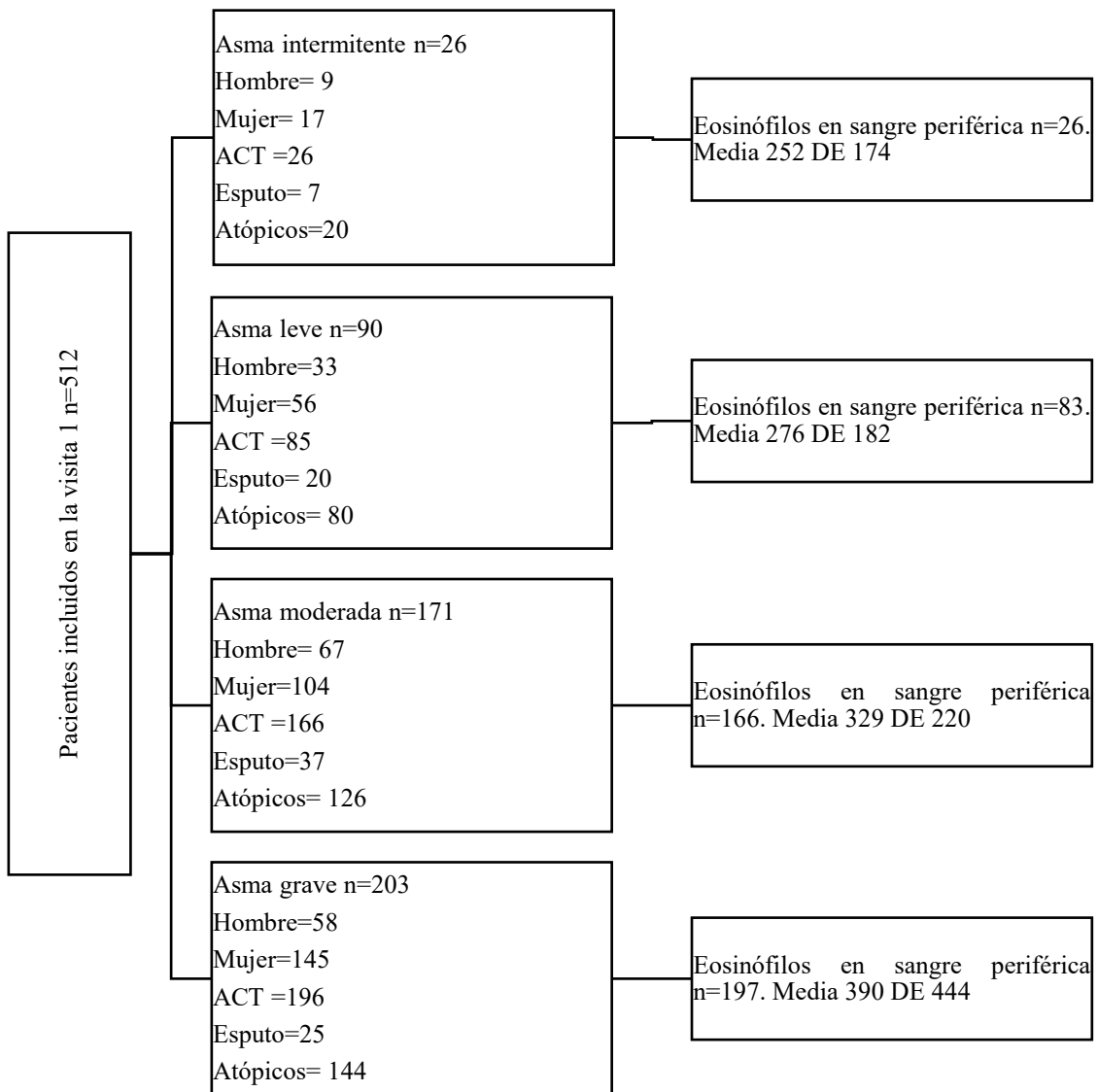


Figura 7: Resumen de características de los pacientes incluidos en el proyecto MEGA.

Estabilidad de los miARNs

Lo primero que había que garantizar al estudiar las muestras en dos períodos de tiempo, (visita basal y visita de seguimiento) era que la enfermedad hubiese permanecido estable en el tiempo y no se hubiesen producido cambios clínicos ni terapéuticos en ese periodo. El control de la enfermedad se evaluó mediante el test ACT y la función

pulmonar fue medida mediante espirometría forzada. La ausencia de cambios terapéuticos fue comprobada en el CRD electrónico de los pacientes incluidos. Las características clínicas (Figuras 8 y 9) se mantuvieron estables en el tiempo, en términos de resultado del ACT $21,1 \pm 3,7$ vs $20,8 \pm 3,1$ unidades arbitrarias ($p > 0,05$) y función pulmonar (VEMS%) $97,7 \pm 12,9$ vs $97,5 \pm 13,9$ ($p > 0,05$).

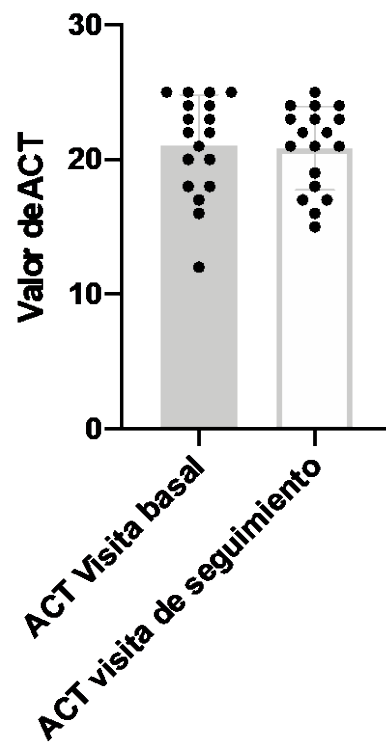


Figura 8: Valores de ACT de los pacientes incluidos, en la visita basal y en la de seguimiento.

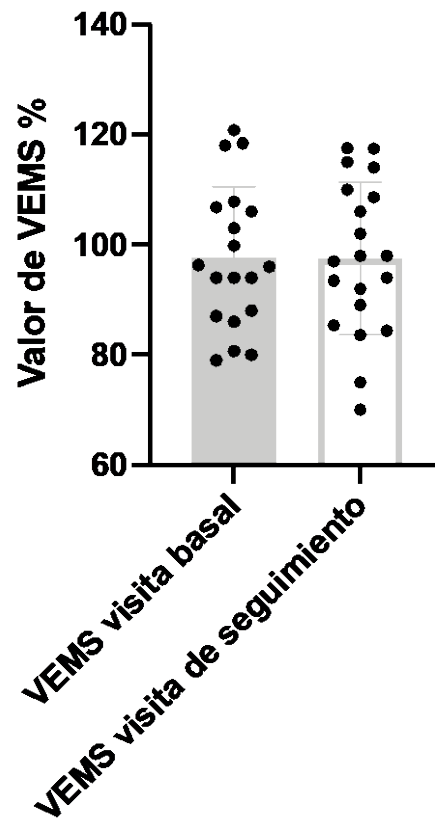


Figura 9: VEMS% de los pacientes incluidos, en la visita basal frente a la visita de seguimiento

La expresión de miARNs se evaluó usando una PCR cuantitativa (qPCR) en las muestras de la visita basal y en las muestras recogidas entre 6 y 12 meses después en las visitas de seguimiento. Los miARNs que se han analizado en el estudio de estabilidad son los siguientes: miR-320-a, miR-144-5p, miR-1246, miR-21-5p y miR-185-5p. Estos miARN han sido seleccionados, porque en una publicación anterior (21) se encontró que el perfil de estos miARN de eosinófilos, se puede utilizar como biomarcador de diagnóstico de asma en suero.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los resultados obtenidos en asmáticos en las visitas basales y de seguimiento en ninguno de los miARN analizados (Figura 10).

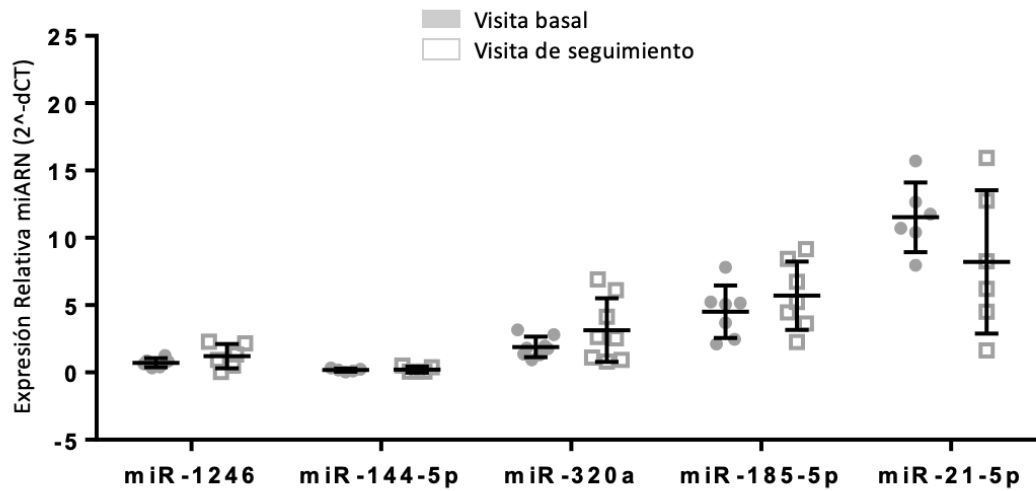


Figura 10: Expresión de miARNs por qPCR en las visitas basales y de seguimiento. La expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$) se muestra como la media \pm DE (Desviación estándar).

Para miR-1246, la expresión basal ($2^{-\Delta Ct}$) fue $0,72 \pm 0,33$ y la expresión en visita de seguimiento fue $1,21 \pm 0,89$ ($P = 0,34$); para miR-144-5p, la expresión basal fue de $0,18 \pm 0,11$ frente a $0,22 \pm 0,22$ ($P = 0,70$); para miR-320a, la expresión en visita basal fue $1,89 \pm 0,75$ frente a $3,14 \pm 2,30$ ($P = 0,22$); La expresión basal de miR-185-5p fue de $4,50 \pm 1,95$ frente a $5,70 \pm 2,53$ ($P = 0,34$) y, finalmente, la expresión basal de miR-21-5p fue de $11,53 \pm 2,59$ frente a $8,22 \pm 5,32$ en la visita de seguimiento ($P = 0,19$) como se muestra en la Figura 10.

Esto implica que no existen diferencias de expresión estadísticamente significativas a lo largo del tiempo en los miARNs medidos, cuando la enfermedad permanece estable y no se realizan cambios terapéuticos.

Estudio del perfil de miARNs en la muestra de estudio

Para conocer el perfil de miARNs diferencial entre pacientes asmáticos y sanos, en la cohorte de este estudio, se analizaron los miARNs: miR-1246, miR-144-3p, miR-144-5p, miR-320-a, miR-320-b, miR-185-5p, miR-21-5p, miR-486-5p, en 20 sueros de pacientes sanos (no asmáticos, no atópicos) y en los 20 sueros de pacientes asmáticos de la visita basal del estudio anterior. Estos miARNs fueron seleccionados por la experiencia previa obtenida en sueros de pacientes asmáticos (21) en el laboratorio de inmunología y alergia del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Al comparar datos en pacientes sanos (no asmáticos, no atópicos) frente a pacientes asmáticos en la visita basal, se encontró una sobreexpresión estadísticamente significativa ($p < 0,001$) de miR-1246 y una expresión significativamente mayor ($p < 0,005$) de miARN miR-320-a y miR-320-b en pacientes asmáticos como se puede apreciar en la Figura 11.

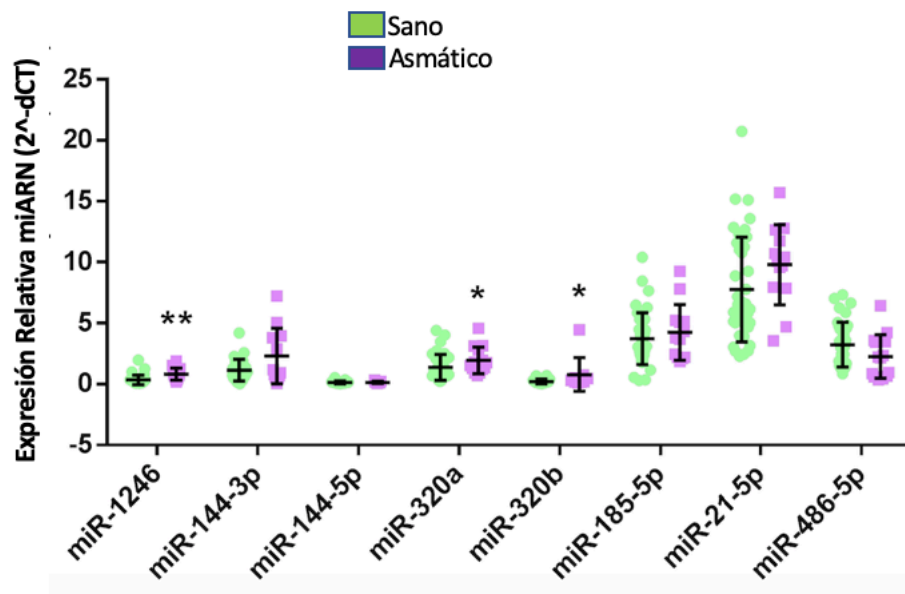


Figura 11: Expresión de miARNs por qPCR en pacientes sanos frente a asmáticos (* $p < 0,005$ ** $p < 0,001$). Se encontró una sobreexpresión estadísticamente significativa de miR-1246 ($p < 0,001$) y de miR-320-a y miR-320-b ($p < 0,005$) en pacientes asmáticos frente a pacientes sanos.

Resultados de cambio tras tratamiento biológico

Debido a la variabilidad de perfiles de miARNs derivados de la variabilidad de la patología asmática, para realizar el estudio de cambios de miARNs tras el tratamiento con biológicos se realizó una búsqueda de miARNs en suero de pacientes asmáticos, utilizando paneles de PCR de miARNs en suero/plasma (Qiagen) evaluando 179 miARNs.

Los resultados demuestran que la expresión tanto del miR-195-5p como del miR-27b-3p están regulados a la baja ($p < 0,05$) tras 8 semanas de tratamiento con los biológicos anti-IL-5, mientras que la expresión del miR-1260a ($p < 0,05$), miR-423-3p ($p < 0,05$), miR-338-3p ($p < 0,05$) y miR-193a-5p ($p < 0,01$) se encuentran incrementadas tras 8 semanas de tratamiento (Figura 12).

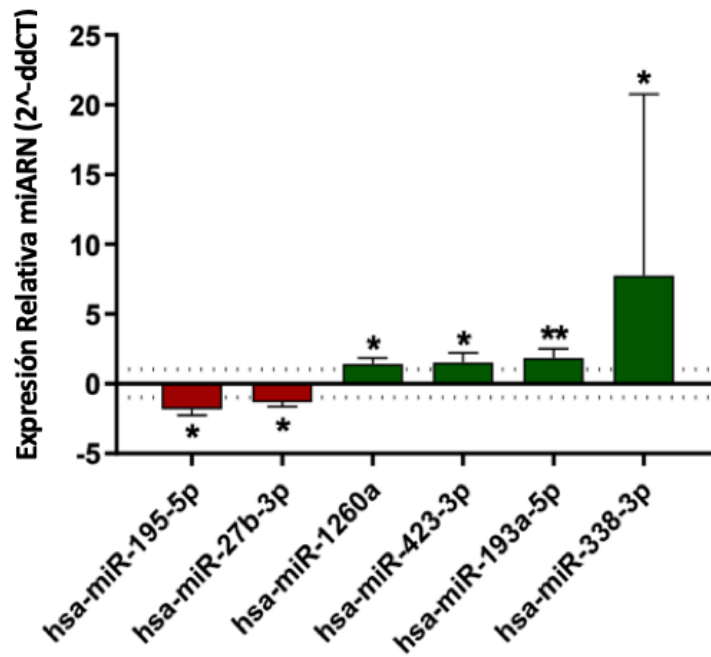


Figura 12: En los paneles de PCR se ha encontrado una expresión alterada de miR-195-5p, miR-27b-3p, miR-1260a, miR-423-3p, miR-193a-5p y miR-338 después de 8 semanas de tratamiento con anti-IL-5. La expresión relativa de miARN se expresa como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Los resultados individualizados de todo el panel pueden observarse en las tablas III y IV. Los experimentos fueron realizados por triplicado y se calcula para cada valor de miARN el valor medio de los tres experimentos

miARN	Promedio (2 ⁻ DDCq)	Desv. Est.	p-valor
hsa-miR-195-5p	-1,84	0,42	P<0,05
hsa-miR-27b-3p	-1,35	0,32	P<0,05
hsa-let-7b-3p	-1,32	0,46	N.S.
hsa-miR-125b-5p	-1,28	0,47	N.S.
hsa-miR-93-3p	-1,28	0,58	N.S.
hsa-miR-30b-5p	-1,28	0,33	N.S.
hsa-miR-122-5p	-1,20	0,33	N.S.
hsa-miR-342-3p	-1,18	0,31	N.S.
hsa-miR-27a-3p	-1,18	0,42	N.S.
hsa-miR-590-5p	-1,18	0,36	N.S.
hsa-miR-144-5p	-1,17	0,23	N.S.
hsa-miR-139-5p	-1,16	0,69	N.S.
hsa-miR-10b-5p	-1,16	0,42	N.S.
hsa-miR-23a-3p	-1,16	0,25	N.S.
hsa-miR-150-5p	-1,15	0,28	N.S.
hsa-miR-223-3p	-1,14	0,37	N.S.
hsa-miR-125a-5p	-1,12	0,43	N.S.
hsa-miR-409-3p	-1,12	0,77	N.S.
hsa-miR-151a-5p	-1,11	0,35	N.S.
hsa-miR-24-3p	-1,11	0,35	N.S.
hsa-miR-335-3p	-1,10	0,63	N.S.
hsa-miR-28-3p	-1,09	0,36	N.S.
hsa-miR-375	-1,08	0,62	N.S.
hsa-miR-26a-5p	-1,07	0,31	N.S.
hsa-miR-505-3p	-1,07	0,57	N.S.
hsa-miR-23b-3p	-1,06	0,33	N.S.
hsa-miR-301a-3p	-1,03	0,21	N.S.
hsa-miR-126-3p	-1,03	0,73	N.S.
hsa-miR-146a-5p	-1,03	0,38	N.S.
hsa-miR-339-3p	-1,02	0,20	N.S.
hsa-miR-30a-5p	-1,01	0,61	N.S.

Tabla III: Panel de miARNs con expresión negativo. *p< 0,05. NS: No significativo.

hsa-miR-145-5p	1,00	0,35	N.S.
hsa-miR-197-3p	1,00	0,45	N.S.
hsa-miR-328-3p	1,00	0,34	N.S.
hsa-miR-376c-3p	1,01	0,56	N.S.
hsa-miR-766-3p	1,01	0,59	N.S.
hsa-miR-28-5p	1,01	0,39	N.S.
hsa-miR-99b-5p	1,01	0,78	N.S.
hsa-let-7f-5p	1,01	0,50	N.S.
hsa-miR-199a-3p	1,03	0,40	N.S.
hsa-miR-320b	1,05	0,68	N.S.
hsa-miR-2110	1,07	0,84	N.S.
hsa-miR-574-3p	1,07	0,66	N.S.
hsa-miR-132-3p	1,07	0,38	N.S.
hsa-miR-374b-5p	1,08	0,63	N.S.
hsa-miR-320a	1,08	0,81	N.S.
hsa-miR-152-3p	1,09	0,63	N.S.
hsa-miR-30d-5p	1,09	0,71	N.S.
hsa-miR-146b-5p	1,11	0,40	N.S.
hsa-miR-532-3p	1,12	1,33	N.S.
hsa-miR-18b-5p	1,13	0,91	N.S.
hsa-miR-361-5p	1,13	0,52	N.S.
hsa-let-7d-5p	1,14	0,39	N.S.
hsa-miR-200a-3p	1,16	0,71	N.S.
hsa-miR-885-5p	1,17	0,89	N.S.
hsa-miR-21-5p	1,17	0,28	N.S.
hsa-miR-320d	1,19	1,45	N.S.
hsa-miR-454-3p	1,19	0,47	N.S.
hsa-miR-30c-5p	1,20	0,99	N.S.
hsa-miR-126-5p	1,21	1,43	N.S.
hsa-let-7c-5p	1,22	0,42	N.S.
hsa-miR-19a-3p	1,22	1,51	N.S.
hsa-miR-19b-3p	1,22	1,32	N.S.
hsa-miR-200c-3p	1,23	0,62	N.S.
hsa-miR-335-5p	1,24	1,08	N.S.
hsa-miR-543	1,25	0,94	N.S.
mmu-miR-378a-3p	1,26	0,75	N.S.
hsa-miR-382-5p	1,26	0,94	N.S.
hsa-miR-376a-3p	1,26	0,81	N.S.
hsa-miR-99a-5p	1,27	0,65	N.S.
hsa-miR-181a-5p	1,28	0,66	N.S.
hsa-miR-215-5p	1,28	1,39	N.S.

hsa-miR-141-3p	1,28	0,69	N.S.
hsa-let-7d-3p	1,28	1,12	N.S.
hsa-miR-148b-3p	1,28	0,73	N.S.
hsa-miR-106b-3p	1,31	0,85	N.S.
hsa-miR-26b-5p	1,33	0,95	N.S.
hsa-miR-425-3p	1,34	0,56	N.S.
hsa-miR-29a-3p	1,34	1,25	N.S.
hsa-miR-30e-5p	1,35	0,72	N.S.
hsa-miR-485-3p	1,37	1,35	N.S.
hsa-miR-155-5p	1,38	1,16	N.S.
hsa-miR-30e-3p	1,40	0,58	N.S.
hsa-miR-194-5p	1,40	1,63	N.S.
hsa-miR-339-5p	1,41	0,56	N.S.
hsa-miR-223-5p	1,42	0,75	N.S.
hsa-miR-374a-5p	1,42	1,44	N.S.
hsa-miR-1260a	1,42	0,43	p<0,05
hsa-miR-185-5p	1,43	1,55	N.S.
hsa-miR-15b-5p	1,48	0,81	N.S.
hsa-let-7g-5p	1,49	1,38	N.S.
hsa-miR-423-3p	1,51	0,70	P<0,05
hsa-miR-151a-3p	1,51	2,01	N.S.
hsa-miR-128-3p	1,51	1,68	N.S.
hsa-miR-501-3p	1,52	1,33	N.S.
hsa-miR-421	1,56	1,04	N.S.
hsa-miR-154-5p	1,57	0,92	N.S.
hsa-miR-186-5p	1,57	1,80	N.S.
hsa-miR-17-5p	1,58	1,76	N.S.
hsa-miR-320c	1,58	1,90	N.S.
hsa-miR-148a-3p	1,59	1,61	N.S.
hsa-miR-365a-3p	1,59	1,44	N.S.
hsa-miR-140-3p	1,60	1,65	N.S.
hsa-miR-92b-3p	1,61	1,87	N.S.
hsa-miR-100-5p	1,61	1,54	N.S.
hsa-miR-222-3p	1,63	0,88	N.S.
hsa-miR-143-3p	1,64	1,08	N.S.
hsa-miR-140-5p	1,64	1,46	N.S.
hsa-miR-106a-5p	1,65	1,86	N.S.
hsa-miR-103a-3p	1,65	1,28	N.S.
hsa-miR-142-3p	1,67	1,20	N.S.
hsa-miR-324-5p	1,67	0,95	N.S.
hsa-miR-495-3p	1,71	2,22	N.S.
hsa-miR-101-3p	1,71	2,21	N.S.
hsa-miR-18a-5p	1,72	1,44	N.S.
hsa-miR-652-3p	1,74	1,31	N.S.

hsa-miR-1	1,76	1,72	N.S.
hsa-miR-192-5p	1,81	2,69	N.S.
hsa-let-7e-5p	1,84	2,47	N.S.
hsa-miR-193a-5p	1,84	0,68	P<0,01
hsa-miR-20a-5p	1,91	2,37	N.S.
hsa-miR-205-5p	1,96	2,43	N.S.
hsa-miR-107	1,96	1,47	N.S.
hsa-miR-584-5p	2,01	3,50	N.S.
hsa-miR-136-3p	2,04	2,00	N.S.
hsa-miR-25-3p	2,11	3,18	N.S.
hsa-miR-127-3p	2,11	1,39	N.S.
hsa-miR-7-5p	2,11	2,63	N.S.
hsa-miR-15b-3p	2,20	2,88	N.S.
hsa-miR-425-5p	2,20	2,62	N.S.
hsa-miR-532-5p	2,20	2,59	N.S.
hsa-miR-93-5p	2,22	3,22	N.S.
hsa-miR-106b-5p	2,27	3,20	N.S.
hsa-miR-502-3p	2,31	3,22	N.S.
hsa-miR-484	2,34	3,47	N.S.
hsa-miR-133a-3p	2,39	2,59	N.S.
hsa-miR-133b	2,52	2,22	N.S.
hsa-miR-22-5p	2,55	2,16	N.S.
hsa-miR-142-5p	2,55	3,13	N.S.
hsa-miR-423-5p	2,57	2,89	N.S.
hsa-miR-29c-3p	2,63	3,14	N.S.
hsa-miR-130a-3p	2,77	3,16	N.S.
hsa-miR-221-3p	2,83	2,72	N.S.
hsa-miR-92a-3p	2,83	3,85	N.S.
hsa-miR-22-3p	2,86	4,37	N.S.
hsa-let-7b-5p	2,92	4,45	N.S.
hsa-miR-34a-5p	3,01	3,81	N.S.
hsa-miR-16-5p	3,02	5,52	N.S.
hsa-let-7i-5p	3,09	4,02	N.S.
hsa-miR-324-3p	3,13	4,83	N.S.
hsa-miR-424-5p	3,19	5,08	N.S.
hsa-miR-660-5p	3,32	6,14	N.S.
hsa-miR-331-3p	3,36	4,01	N.S.
hsa-miR-629-5p	3,49	5,33	N.S.
hsa-miR-130b-3p	3,59	4,91	N.S.
hsa-miR-199a-5p	3,68	4,88	N.S.
hsa-miR-326	3,74	4,58	N.S.
hsa-miR-486-5p	3,83	7,31	N.S.
hsa-miR-362-3p	4,05	6,06	N.S.
hsa-miR-15a-5p	4,09	7,13	N.S.

hsa-miR-29b-3p	4,30	7,88	N.S.
hsa-miR-210-3p	4,60	8,20	N.S.
hsa-miR-363-3p	4,99	8,90	N.S.
hsa-miR-7-1-3p	5,32	12,51	N.S.
hsa-miR-33a-5p	6,15	8,82	N.S.
hsa-miR-451a	6,90	15,10	N.S.
hsa-miR-20b-5p	7,04	14,43	N.S.
hsa-miR-32-5p	7,60	12,64	N.S.
hsa-miR-338-3p	7,75	13,01	P<0,05
hsa-miR-16-2-3p	7,77	12,73	N.S.
hsa-miR-144-3p	11,24	26,20	N.S.
hsa-miR-874-3p	16,08	25,29	N.S.
hsa-miR-877-5p	18,27	48,83	N.S.
hsa-miR-497-5p	21,73	50,58	N.S.
hsa-miR-483-5p	27,44	63,52	N.S.
hsa-miR-136-5p	208,76	574,03	N.S.

Tabla IV: Panel de miARNs con resultado de expresión positivo. *p< 0,05. **p<0,01. NS: No significativo.

Los resultados previamente obtenidos mediante placas de PCR, es necesario que sean validados mediante una técnica diferente y en una cohorte de pacientes diferente, por ello se evaluaron los miARNs: miR-195-5p, miR-27b-3p, miR-1260a, miR-423-3p, miR193a-3p y miR-338-3p, mediante la técnica de PCR en tiempo real, confirmándose que el miR-338-3p está regulado al alza de manera significativa en estos pacientes después de 8 semanas de tratamiento, como se observa en la figura 13.

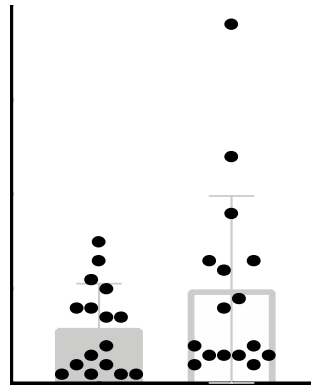


Figura 13: Se muestra la variación individual de miR-338-3p después de 8 semanas de tratamiento mediante validación por qPCR. * $p < 0,05$. La expresión relativa de miARN se expresa como $2^{-\Delta C_t}$.

Con la intención de evaluar si los niveles de miR-338-3-p se correlacionan (medida como $2^{-\Delta C_t}$) con la función pulmonar, se midió la variación (basal frente a 8 semanas) en el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEMS) entre los dos grupos (visita basal y visita 8 semanas) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. ($p > 0,05$; $r = 0,138$; Figura 14).

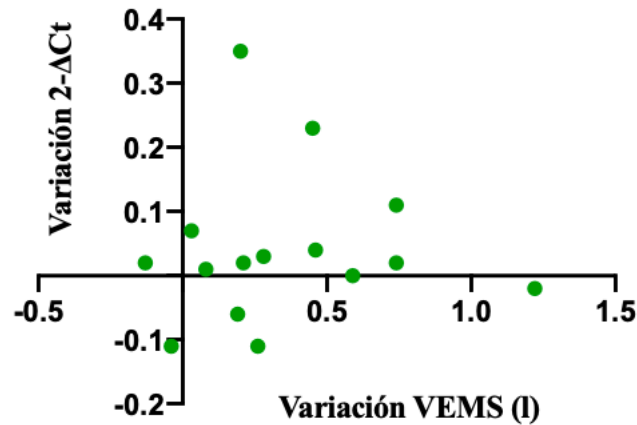


Figura 14: Análisis de correlación de la función pulmonar en los pacientes incluidos en el estudio con la variación en el parámetro $2^{-\Delta Ct}$ en el miR-338-3p, donde no se aprecia correlación. ($p > 0,05$; $r = 0,138$)

Se realizó el test exacto de Fischer para calcular el riesgo relativo (RR). El punto de corte utilizado es la variación del 20% del VEMS y el cambio de Fold de 1 para la expresión de miR-338-3p. No se encontró que el aumento o ausencia de aumento en el parámetro $2^{-\Delta Ct}$ a las ocho semanas del miR-338-3p pudiera estar relacionado con una variación de al menos el 20% del VEMS a las 8 semanas (RR = 1; 95 % IC 0,42-2,11; $p > 0,05$). No obstante, en el grupo de pacientes tratados se observó una importante y significativa mejoría en el VEMS con una media de 330 ml (Tabla V).

PACIENTE	VEMS (L) VISITA BASAL	VEMS (L) VISITA 8 SEMANAS
1	1,29	1,5
2	1,58	1,61
3	1,91	1,78
4	0,92	1,38
5	1,61	2,35
6	3,33	3,61
7	1,48	1,93
8	1,93	2,01
9	1,26	2
10	1,71	1,91
11	1,6	2,19
12	1,02	1,21
13	0,63	0,59
14	3,35	3,61
15	1,46	2,68
16	3,91	3,92
MEDIA+/- DE	1,81+/- 0,93	2,14+/-0,92

Tabla V: Valores de función pulmonar (VEMS L) en la visita basal y en la visita a las 8 semanas de los pacientes incluidos en el estudio

Análisis de las vías reguladas por miR-338-3p

Se realizó un análisis *in silico* con DIANA-mirPath (41) para obtener los genes diana probables de miR-338-3p y las vías alteradas. Se observaron algunos genes diana y vías relacionadas con varias funciones y procesos en el asma, como la vía de señalización de MAPK, la vía de señalización de TGF-beta y la biosíntesis/degradación de glucanos ($p < 0,05$). En la vía de señalización de MAPK se encontraron 20 genes diana, en la vía de señalización de TGF-beta se encontraron 6 genes diana y en la biosíntesis/degradación de glucanos 2 genes diana.

Estos resultados están resumidos en la tabla VI.

Vía de señalización KEGG	p-valor	Genes diana
Biosíntesis de ácidos grasos	2,42 ⁻²⁹	<i>FASN</i>
Metabolismo de ácidos grasos	5,22 ⁻⁰⁷	<i>FASN</i>
Otros tipos de biosíntesis de O-glucanos	1,49 ⁻⁰⁶	<i>OGT, POMT2, EOGT, POFUT1</i>
Vía de señalización MAPK	0,015	<i>FOS, CACNG8, DUSP2, ELK4, CDC25B, TAOK2, MAP4K3, MAP2K3, RASA1, ZAK, RAPGEF2, NFKB2, MAPKAP3, HSPA48, CACNA1H, MAP3K2, DUSP5, RPSKA4, NFATC3, DUSP1</i>
Otras vías de degradación de glucanos	0,026	<i>NEU3</i>
Vía de señalización TGF-beta	0,029	<i>SKP1, DCN, SMAD4, SMAD5, SP1, BAMBI</i>
Metabolismo del glutatión	0,031	<i>SRM, CDC1, GSTP1, GGT6, RRM1</i>
Ciclo celular	0,032	<i>YWHAH, CCNBI, CDC25B, MCM4, BUB3, SKP1, CCND1, SMAD4, CDC14B, PRKDC, MDM2, MCM3, CDC25A</i>
Biosíntesis de mucina tipo O-Glucano	0,036	<i>GALNT7, GALNT16</i>

Tabla VI: Vías de señalización significativamente alteradas por miR-338-3p.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN:

De acuerdo con la definición de la guía GEMA 5.0 (39), el asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias en la que están implicadas varios tipos de células y mediadores inflamatorios. El enfoque de tratamiento actual consiste en estratificar a los pacientes por fenotipos (clínico, inflamatorio y molecular) (5), pero también por endotipos (6) (asma alérgica, enfermedad respiratoria exacerbada por antiinflamatorios, asma eosinofílica de inicio tardío), una estrategia conocida como "fenoendotipado". Los medicamentos que se utilizan actualmente para tratar el asma reducen la inflamación de las vías respiratorias y alivian el broncoespasmo, pero los síntomas reaparecen al suspender el tratamiento. Estudios recientes muestran que más del 50% de los pacientes con asma no están controlados (43,44), lo que indica la necesidad de terapias alternativas. Los tratamientos biológicos para el asma grave no controlada, introducidos en los últimos años, dirigidos contra las citocinas de tipo 2, son prometedores (11,12,13), sin embargo, la selección de los pacientes con más probabilidades de respuesta a estos tratamientos continúa obstaculizada en muchas ocasiones, por una comprensión inadecuada de los mecanismos fisiopatológicos y moleculares heterogéneos subyacentes (5).

Los proyectos de investigación actuales y futuros, deben intentar identificar los fenotipos del asma utilizando datos recopilados de múltiples estudios de cohortes con tamaños de muestra suficientemente grandes, integrando datos de la enfermedad medidos a lo largo del tiempo. Con este objetivo nace el proyecto MEGA, estudio que sirve de base para esta tesis doctoral. En esta tesis se estudia el papel de los miARNs como biomarcadores de diagnóstico y de respuesta a tratamiento biológico en asma, para ello se llevan a cabo unas fases bien establecidas:

1. Caracterización de los pacientes incluidos en el proyecto MEGA
2. Estudio de estabilidad de los MiARNs a lo largo del tiempo
3. Estudio de la expresión diferencial de miARNs entre sanos y asmáticos
4. Estudio de cambios en miARNs tras tratamiento biológico

Caracterización de los pacientes incluidos en el proyecto MEGA

Los pacientes incluidos en el proyecto MEGA, mostraron una asociación claramente significativa entre asma grave y aumento de síntomas y exacerbaciones, menor control de la enfermedad, mayor obstrucción al flujo aéreo y mayor frecuencia de poliposis nasal, rinitis severa, ansiedad y depresión, reflujo gastroesofágico y bronquiectasias en comparación con pacientes con enfermedad más leve (pendiente de publicación). Se encontraron asociaciones significativas entre la obstrucción del flujo de aire y diversas características demográficas y clínicas, como la edad, la duración del asma y la presencia de poliposis nasal. Estos datos contrastan con los de otras cohortes, en las que se encontró una fuerte asociación con el sexo femenino, el IMC y la presencia de atopia (42).

En esta cohorte, el 53,3% de los pacientes presentaban eosinofilia en sangre periférica con valores medios superiores a 300 células / μL , y el 28,3% de los pacientes tenían niveles superiores a 500 eosinófilos/ μL . La evaluación de la inflamación eosinofílica basada en el recuento diferencial de células en muestras de esputo inducido reveló que el 73% de los pacientes presentaban $> 2\%$ de eosinófilos, lo que indica niveles superiores a otras cohortes descritas en la bibliografía (43,44,45). Esto último puede deberse a la alta proporción de pacientes con poliposis nasal (29%) y atopia incluidos en

la muestra (71%). Es importante señalar que, en esta cohorte, los niveles de eosinófilos no están asociados con el control del asma o la edad al inicio de la enfermedad.

Estudio de estabilidad de los microARNs

Para la viabilidad de los resultados había que garantizar, al estudiar las muestras en dos periodos de tiempo (visita basal y de seguimiento), que la enfermedad asmática hubiese permanecido estable en el tiempo y que no se hubiesen producido cambios terapéuticos en ese período. Para ello se midió el ACT y la función pulmonar, en concreto el VEMS mediante espirometría forzada y se comprobó la medicación en el CRD electrónico. Tal como puede observarse en las figuras 5 y 6 las características clínicas de los pacientes se mantuvieron estables en el tiempo, en términos de resultado del ACT ($21,1 \pm 3,7$ vs $20,8 \pm 3,1$ unidades arbitrarias) y VEMS% ($97,7 \pm 12,9$ vs $97,5 \pm 13,9$) lo que permite asumir estabilización clínica en los dos periodos de tiempo medidos.

La falta de diferencias significativas entre las visitas basales y de seguimiento en pacientes asmáticos (en los que no se realizaron cambios terapéuticos) significa que los miARNs permanecen estables en el tiempo en el mismo paciente, cuando no se realizan cambios en el tratamiento y la patología asmática permanece estable, además de que también se comprobó mediante el CRD electrónico que no existiese ningún cambio reseñable entre las visitas basal y de seguimiento en el estado de salud de los pacientes. Esto podría significar que los posibles cambios en la expresión de los miARNs en el mismo individuo a lo largo del tiempo podrían deberse a modificaciones en el estado de salud del paciente de forma espontánea o a modificaciones terapéuticas. Dado que en pacientes clínicamente estables los miARNs relacionados con el asma se mantienen inalterados cuando no se cambia el tratamiento, puede implicar que estos miARNs pueden ser medidos sin importar el momento en que se obtengan, por tanto, podrían utilizarse

como herramienta diagnóstica en diferentes momentos de la enfermedad. Esta característica unida a que se secretan al medio extracelular (plasma, LBA, esputo etc) y que son resistentes a la degradación por nucleasas, a la temperatura y a otras condiciones extremas (15), hacen de ellos unos biomarcadores muy prometedores para diferentes enfermedades, incluida el asma (22).

Hasta donde se conoce, este es el primer estudio que muestra la estabilidad de los miARNs a lo largo del tiempo en sujetos asmáticos en los que no se realizaron cambios en su tratamiento y no se observaron cambios clínicos.

Estudio de expresión de micro-ARNs entre sanos y asmáticos

Estudiando la expresión de miARNs en pacientes asmáticos y en pacientes sanos (no asmáticos y no atópicos), se ha encontrado una sobreexpresión en pacientes asmáticos en los miARNs miR-1246, miR-320-a y miR-320-b, por lo que podrían tener un papel como biomarcadores de diagnóstico en el asma. Un aspecto importante de este hallazgo es que la cohorte de pacientes asmáticos en la que se han medido estos miARNs es diferente de la descrita por Rodrigo-Muñoz et al (21). En dicho estudio, los autores también encontraron a los miARNs miR-320-a y miR-1246, sobreexpresados en pacientes asmáticos en comparación con individuos sanos con un área bajo la curva de 0,72 y 0,70, respectivamente. La ratificación de los hallazgos en otra cohorte hace que estos resultados sean reproducibles y refuercen el papel de los miARNs miR-1246 y miR-320a como biomarcadores de diagnóstico del asma. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el resto de miARNs medidos (miR-144-3p, miR-144-5p, miR-185-5p, miR-21-5p, miR-486-5p), esto puede deberse a las posibles diferencias entre las cohortes estudiadas y a la diferencia en el número de pacientes analizados. Los 20 pacientes

incluidos en este estudio se corresponden a pacientes con asma persistente moderada, mientras que en el estudio de Rodrigo-Muñoz et al. incluye diferentes niveles de gravedad, por lo que podría existir un diferente perfil de miARNs entre diferentes niveles de gravedad del asma.

Existen otros estudios que abordan si los miARNs pueden servir como biomarcadores no invasivos para identificar subconjuntos de personas con asma (46,47,48,49), el primero que logró resultados exitosos en plasma (50) evaluó los niveles de expresión de 135 miARNs en 12 pacientes con asma alérgica y 12 sujetos sanos, encontrando 30 miARNs expresados diferencialmente. En este estudio los 6 mejores miARNs predictivos fueron: miR-125b, miR-16, miR-299-5p, miR-126, miR-206 y miR-133b. Con estas sondas y utilizando algoritmos de aprendizaje automático, los autores fueron capaces de clasificar correctamente con precisión si el 92,4% de los sujetos estaban sanos, tenían RA o padecían asma. Sin embargo, estos resultados no parecen haber sido reproducidos en otras cohortes de pacientes (47,48,49), como si ocurre en esta tesis doctoral con los miR-1246 y miR-320-a en suero. Es por esta capacidad diagnóstica predictiva que parecen tener los microARNs en pacientes asmáticos con diferentes niveles de gravedad y de cohortes diferenciadas que era muy importante poder dar a conocer si presentaban estabilidad en el tiempo, como se ha demostrado en este trabajo.

Si bien es cierto que los microARNs que se utilizan en estos trabajos de investigación como posible herramienta diagnóstica en asmáticos frente a sanos son diferentes; todos ellos, tanto los que se describen en este último artículo comentado, como en el trabajo de Rodrigo-Muñoz y cols y los que se describen en esta tesis, regulan vías de señalización inflamatoria. Es la inflamación en el asma, la que permite diferenciar a través de estos biomarcadores a los pacientes asmáticos de los sanos. El asma es una

enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias por lo que gran parte de las terapias actualmente dirigidas a esta enfermedad se ocupan de disminuir o incluso hacer desaparecer dicha inflamación (11,12,13).

Estudio de cambios en micro-ARNs tras tratamiento biológico

Desde un punto de vista teórico parece lógico pensar que la instauración de un tratamiento antiinflamatorio en asma cambiaría la expresión de miARNs que se ocupan de vías de señalización del proceso inflamatorio. Esto abre la puerta a una serie de preguntas clave para futuras investigaciones. Por ejemplo, ¿Se pueden usar miARNs para predecir la resistencia a los medicamentos o la capacidad de respuesta a corticoides? ¿Se pueden usar miARNs para identificar a pacientes corticodependientes o pacientes corticorresistentes? ¿Se puede comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad a través de medir ciertos miARNs? o la pregunta en la que se ha centrado esta investigación ¿Se produce un cambio de expresión en microARNs tras la instauración de un fármaco biológico para el asma grave eosinofílica? Responder algunas de estas preguntas puede allanar el camino para el desarrollo de biomarcadores, pero es en esta última en la que se centra este trabajo.

Existen trabajos que analizan perfiles de miARNs en respuesta a tratamientos para el asma (52,-,56), sin embargo, suelen centrarse en el efecto terapéutico de los corticoides y no en los fármacos anti-IL-5 o anti-IL-5R α que existen actualmente para el tratamiento del asma grave eosinofílica mal controlada. Uno de estos trabajos (53) estudia la posibilidad para utilizar terapia de reemplazo de miR-146a como una nueva estrategia para potenciar los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides en pacientes asmáticos corticosensibles. En otro trabajo (56) identificaron los miARNs: hsa-miR-155-

5p, hsa-miR-4433b-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-345-5p, hsa-miR-652-3p, hsa-miR-126-3p y hsa-miR-335-5p; significativamente asociados con el cambio de VEMS%, de los cuales hsa-miR-155-5p y hsa-miR-532-5p se asociaron significativamente con cambios en la transrepresión inducida por dexametasona de NF- κ B. Estos dos miARNs combinados fueron predictores de respuesta a ICS durante el transcurso del ensayo clínico. Si bien es cierto, que los resultados obtenidos por estos autores son diferentes a los obtenidos en esta tesis, no deja de ser hasta cierto punto esperable, dado que estos autores estudiaron el cambio de expresión de miARNs tras tratamiento con corticoides inhalados, mientras que esta tesis se centra en buscar diferencias en el perfil de miARNs tras instaurar un tratamiento biológico anti-IL-5 para asma grave eosinofílica, por lo que las diferencias existentes entre los dos trabajos son comprensibles. En esta tesis doctoral se analiza la alteración del miARNoma sérico en pacientes tratados con reslizumab y mepolizumab (fármacos biológicos anti IL-5) tras 8 semanas de tratamiento. Los resultados mostraron que miR-195-5p y miR-27b-3p estaban regulados negativamnete ($p < 0.05$), mientras que miR-1260a ($p < 0.05$), miR-193a-5p ($p < 0.01$) y miR-338-3p ($p < 0,05$) se regularon al alza a las 8 semanas de tratamiento. Se utilizó una técnica diferente para validar estos resultados y se confirmó que solo miR-338-3p fue regulado al alza de manera significativa en estos pacientes después de 8 semanas de tratamiento.

Se ha descrito que el miR-338 regula la diferenciación, la apoptosis y probablemente la degeneración tisular (57). Otros autores especulan que la inflamación y la proliferación celular en la base de los procesos de remodelación pueden ser promovidas por la activación de miR-338 (58). Estos datos sugieren que podría esperarse que los cambios en la expresión de miR 338-3p pudieran traducirse en cambios significativos en la función pulmonar. En la mayoría de los pacientes incluidos en nuestro estudio se puede

observar una gran mejoría del VEMS a las 8 semanas de la introducción del fármaco anti-IL-5 (Tabla V); sin embargo, esta mejora en la función pulmonar parece comportarse independientemente de la variación de miR-338 a las ocho semanas en esta población. Esto podría deberse al tamaño de la población elegida, ya que una diferencia relativamente grande puede no alcanzar significación estadística si la variabilidad es grande, debido a un tamaño muestral pequeño, sin embargo, también podría deberse a que el VEMS no es el mejor parámetro que traduce la expresión clínica de miR-338-3p, ni es el parámetro que más cambia con el tratamiento, frente a otros parámetros como la calidad de vida o reducción de corticosteroides orales. Por tanto, estos resultados muestran esperanzas de que miR-338-3p pueda ser utilizado como un marcador de respuesta temprana a un fármaco biológico en asma grave, dado que en la actualidad deben esperarse al menos seis meses antes de plantearse un fallo en la respuesta a un fármaco anti-IL-5 (59), sin embargo, parece que este cambio de expresión no puede justificarse por las mejoras en la función pulmonar. Sería muy interesante poder encontrar un biomarcador que pudiera predecir una buena respuesta clínica a un fármaco biológico en un corto período de tiempo, ya que esto ahorraría tiempo y dinero a los profesionales sanitarios en el campo del asma grave.

Para indagar más en el papel que juega el miR-338-3p en el asma y poder explicar a qué se debe el cambio de expresión observado tras la introducción de los fármacos biológicos anti IL-5, se realizó un análisis *in silico* con DIANA-mirPath para obtener los genes diana probables de miR-338-3p y las vías alteradas. Se observaron algunos genes diana y vías relacionadas con varias funciones y procesos en el asma, como la vía de señalización de MAPK, la vía de señalización de TGF- β y la biosíntesis / degradación de glucanos. La vía de señalización de MAPK está relacionada con la producción de factores

inflamatorios (60). El aumento de la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) en los macrófagos alveolares de pacientes con asma grave se ha asociado con una inhibición reducida de la liberación de citocinas por la dexametasona (60). La insensibilidad a los corticosteroides en pacientes con asma grave puede mejorar con inhibidores de p38 MAPK. Esto podría explicar las diferencias de expresión de miR-338-3p encontradas, dado que los pacientes a tratamiento con un fármaco anti IL-5 reducen el consumo de corticoides, entre otras cosas por una mayor respuesta a los mismos (61, 62).

La vía de señalización del TGF- β ha sido un punto de investigación de gran importancia en el campo del asma grave como molécula mediadora y efectora en la cascada inmune impulsada por Th2. Producida por numerosos tipos de células, incluidas células epiteliales, eosinófilos, macrófagos y fibroblastos, participa en la remodelación del músculo liso de las vías respiratorias, en la transformación epitelial, también en la fibrosis subepitelial y en la producción de moco y en los cambios microvasculares (63,64). La comprensión de los mecanismos de la señalización de TGF- β proporciona información sobre las vías de activación, la señalización T-reguladora (Treg) y las interacciones de las células inmunes. El TGF- β regula a la baja el proceso inflamatorio a través de la inducción de Treg inmunosupresoras, también inicia la remodelación estructural. Un delicado equilibrio entre estos fenómenos define el papel preciso del TGF- β en los fenotipos clínicos y fisiopatológicos observados en el asma grave. La modulación de TGF- β es potencialmente útil en la inmunosupresión, mientras que la inhibición global pura puede tener efectos antifibróticos (65).

Las diferencias de expresión encontradas de miR-338-3p podrían también deberse a este efecto antiinflamatorio del TGF- β dado que la introducción de un fármaco

anti IL-5 reduce la inflamación eosinofílica en el asma grave (66). Es difícil averiguar las rutas o motivos concretos del cambio de expresión encontrado en el miR-338-3p dada la complejidad inmunológica que presenta la enfermedad asmática, pero parece que el proceso inflamatorio es el nexo común entre esta enfermedad y las dianas del miR-338-3p. Es por esto último que no parece haberse encontrado una relación con la función pulmonar y es posible que los resultados hubiesen sido diferentes en el caso de investigar su relación con la reducción del uso de corticoides tras la instauración del fármaco anti IL-5 o con la calidad de vida, sin embargo, estos eran datos que no estaban disponibles en todos los pacientes incluidos en todas las visitas por lo que finalmente no pudieron ser analizados. Otra de las debilidades de este estudio es que no se ha contado con un grupo control al que no se le hubiese administrado el fármaco anti-IL5, sin embargo como vimos en los resultados de estabilidad, los miARNs no parecen modificarse en el tiempo cuando la enfermedad permanece estable y no se modifica el tratamiento, por lo que no parece demasiado probable que las diferencias de expresión encontradas puedan deberse a otros factores distintos de la inclusión del tratamiento anti-IL-5, sin embargo el miR-338-3p no fue incluido en el estudio de estabilidad puesto que no había sido una de las sondas que se encontrasen diferencialmente expresadas entre sanos y asmáticos en el trabajo previo a esta tesis doctoral (21).

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que muestra que existen diferencias en la expresión de ciertos miARNs después de la introducción de un tratamiento biológico. En nuestro estudio, la expresión de miR-338-3p se modifica después del tratamiento, por lo que podría ser un biomarcador de respuesta temprana a un fármaco biológico anti-IL-5. Se necesitan más estudios para poder establecer estos

cambios con la mejoría clínica observada después de ocho semanas de tratamiento con un fármaco anti-IL-5 en pacientes con asma grave eosinofílica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

Los micro-RNAs permanecen estables en suero a lo largo del tiempo cuando la enfermedad asmática permanece clínicamente estable y no hay modificaciones terapéuticas.

Existe una firma diferencial de micro-RNAs entre pacientes sanos y asmáticos y se modifica al instaurar un tratamiento biológico anti-IL-5, estas conclusiones principales se sustentan en las siguientes conclusiones parciales:

- 1- Entre los pacientes con asma incluidos en la cohorte proyecto MEGA, el asma eosinofílica fue el fenotipo predominante y dentro de este el del asma alérgica eosinofílica.
- 2- Los miARNs: miR-320-a, miR-144-5p, miR-1246, miR-21-5p y miR-185-5p, en suero de pacientes asmáticos, permanecen estables en el tiempo, cuando el asma permanece estable y no se producen cambios en el tratamiento.
- 3- Los miARNs: miR-1246, miR-320-a y miR-320-b, permiten diferenciar entre pacientes asmáticos y pacientes sin asma.
- 4- La expresión de miARNs en suero al instaurar un tratamiento biológico anti IL-5 en pacientes con asma grave no controlada, se modifica tras 8 semanas de tratamiento.
- 5- El miR-338-3p se encuentra regulado al alza de manera significativa en pacientes con asma grave no controlada tras 8 semanas de tratamiento con un fármaco biológico anti IL-5 independientemente del cambio en el VEMS.
- 6- Los genes diana y las vías de señalización de miR-338-3p están relacionadas con varias funciones y procesos en el asma, como la vía de señalización de MAPK, la vía de señalización de TGF- β y la biosíntesis / degradación de glucanos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

1. GINA. Global strategy for asthma management and prevention. Update from NHBL/WHO Workshop Report 1995. Revisada 2019.
2. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2017; 390: 1211–59.
3. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018.
4. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018.
5. Sterk PJ, Lutter R. Asthma phenotyping: TH2-high, TH2-low, and beyond. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;133(2):395-96
6. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF Jr, Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Feb;127(2):355-60
7. Balzar S, Strand M, Rhodes D, Wenzel SE. IgE expression pattern in lung: relation to systemic IgE and asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):855-62
8. Johansson MW. Eosinophil Activation Status in Separate Compartments and Association with Asthma. *Front Med* 2017; 4:75.
9. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2012; 13:9-22.

10. Melo RCN, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* 2013; 68:274-84.
11. Saco TV, Pepper AN, Lockey RF. Benralizumab for the treatment of asthma. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017 May;13(5):405-13
12. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, Humbert M, Katz LE, Keene ON, Yancey SW, Chanez P; MENSA Investigators. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N Engl J Med.* 2014 Sep 25;371(13):1198-07
13. Castro M, Zangrilli J, Wechsler ME, Bateman ED, Brusselle GG, Bardin P, Murphy K, Maspero JF, O'Brien C, Korn S. Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *Lancet Respir Med.* 2015 May;3(5):355-66.
14. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease-master regulators or target practice? *Respir Res.* 2010 Oct 28; 11:148.
15. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105:10513-18.
16. Martínez-Moragón E, Serra-Batlles J, De Diego A, Palop M, Casan P, Rubio-Terrés C et al. Economic cost of treating the patient with asthma in Spain: the AsmaCost study. *Arch Bronconeumol.* 2009 Oct;45(10):481-6.
17. Yurdakul A, Dursun B, Canbakan S, Cakaloglu A, Capan N. The Assessment of Validity of Different Asthma Diagnostic Tools in Adults. *Journal of Asthma* 2005, 42: 843-46.

18. Perry MM, Adcock IM, Chung KF. Role of microRNAs in allergic asthma: present and future. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015 Apr;15(2):156-62
19. Comer BS, Camoretti-Mercado B, Kogut PC, Halayko AJ, Solway J, Gerthoffer WT. MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Nov 1;307(9): L727-34.
20. Mansur AH, Srivastava S, Sahal A. Disconnect of type 2 biomarkers in severe asthma; dominated by FeNO as a predictor of exacerbations and periostin as predictor of reduced lung function. *RespirMed*. 2018 Oct; 143:31-38.
21. Rodrigo-Muñoz JM, Cañas JA, Sastre B, et al. Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy*. 2019 Mar;74(3):507-17.
22. Mousavi SR, Ahmadi A, Jamalkandi SA, Salimian J. Involvement of microRNAs in physiological and pathological processes in asthma. *J Cell Physiol*. 2019; 234(12):21547-59.
23. Williams AE, Moschos SA, Perry MM, Barnes PJ, Lindsay MA (2006) Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. *Dev Dyn* 2006; 236: 572–80.
24. Williams AE, Perry MM, Moschos SA, Lindsay MA. MicroRNA expression in the aging mouse lung. *BMC Genomics*2007; 8: 172.
25. Xu L, Yi M, Tan Y, Yi Z, Zhang Y. A comprehensive analysis of microRNAs as diagnostic biomarkers for asthma. *Ther Adv Respir Dis*. 2020 Jan-Dec; 14:1753466620981863
26. Scanlon ST, McKenzie AN. Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. *Curr Opin Immunol* 2012; 24:707–12.

27. Liu S, Verma M, Michalec L, Liu W, Sripada A, Rollins D, et al. Steroid resistance of airway type 2 innate lymphoid cells from patients with severe asthma: the role of thymic stromal lymphopoietin. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141:257–68.
28. Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, et al. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells during airway inflammation. *Nat Commun* 2013; 4:2675.
29. Singh PB, Pua HH, Happ HC, Schneider C, von Moltke J, Locksley RM, Baumjohann D, Ansel KM. MicroRNA regulation of type 2 innate lymphoid cell homeostasis and function in allergic inflammation. *J Exp Med*. 2017 Dec 4;214(12):3627-43.
30. Muñoz X, Álvarez-Puebla MJ, Arismendi E, Arochena L, Ausín MDP, Barranco P et al. The MEGA Project: A Study of the Mechanisms Involved in the Genesis and Disease Course of Asthma. *Asthma Cohort Creation and Long-Term Follow-Up*. *Arch Bronconeumol*. 2018; 54 : 378-85
31. Vega JM, Badia X, Badiola C, López-Viña A, Olaguíbel, JM, Picado C, et al. Covalair Investigator Group. Validation of the Spanish version of the Asthma Control Test (ACT). *J Asthma*. 2007; 44:867–72.
32. Plaza V, López-Viña A, Cosío BG. Test of Adherence to Inhalers. *ArchBronconeumol*. 2017 Jul;53(7):360-61.
33. Perpiñá M, Belloch A, Pascual LM, de Diego A, Compte L. Calidad de vida en el asma: validación del cuestionario AQLQ para su utilización en población española. *Arch Bronconeumol*. 1995; 31:211–8.

34. De los Santos G, Reyes P, del Castillo R, Fragola C, Royuela A. Cross-cultural adaptation and validation of the sino-nasal outcome test (SNOT-22) for Spanish speaking patients. *EurArchOtorhinolaryngol*. 2015; 272:3335–40.
35. Terol MC, López-Roig S, Rodríguez-Marín J, Martín-Aragón M, Pastor MA, Reig MT. Propiedades psicométricas de la Escala hospitalaria de ansiedad y estrés (HAD) en población española. *Ansiedad y Estrés*. 2007; 13:163–76.
36. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, del Campo F, Galdiz JB, et al. Espirometría. *Arch Bronconeumol*. 2013; 49:388–01.
37. MacIntyre N, Crapo RO, Viegi G, Johnson DC, van der Grinten CP, Brusasco V, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J*. 2005; 26:720–35.
38. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161:309–29.
39. Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA). Versión 5.0. Disponible en: www.gemasma.com. Ultimo acceso 22-11-2020.
40. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; 25:402-8.
41. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jul 1;43(W1): W460-6.

42. Pretolani M, Soussan D, Poirier I, Thabut G, Aubier M. Clinical and biological characteristics of the French COBRA cohort of adult subjects with asthma. *Eur Respir J*. 2017 Aug 24;50(2).
43. Shaw DE, Sousa AR, Fowler SJ, Fleming LJ, Roberts G, Corfield J, et al. U-BIOPRED Study Group. Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. *Eur Respir J*. 2015 Nov;46(5):1308-21
44. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med* 2013; 13: 11.
45. McGrath KW, Icitovic N, Boushey HA, Lazarus SC, Sutherland ER, Chinchilli VM, et al. A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 612–19.
46. Maes T, Cobos FA, Schleich F, Sorbello V, Henket M, De Preter K, Bracke KR, Conickx G, Mesnil C, Vandesompele J, Lahousse L, Bureau F, Mestdagh P, Joos GF, Ricciardolo FL, Brusselle GG, Louis R. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 May;137(5):1433-46
47. Feketea G, Bocsan CI, Popescu C, Gaman M, Stanciu LA, Zdrengea MT. A Review of Macrophage MicroRNAs' Role in Human Asthma. *Cells*. 2019 May 8;8(5):420.
48. Kärner J, Wawrzyniak M, Tankov S, Runnel T, Aints A, Kisand K, Altraja A, Kingo K, Akdis CA, Akdis M, Rebane A. Increased microRNA-323-3p in IL-22/IL-17-producing T cells and asthma: a role in the regulation of the TGF- β pathway and IL-22 production. *Allergy*. 2017 Jan;72(1):55-65.

49. Pattarayan D, Thimmulappa RK, Ravikumar V, Rajasekaran S. Diagnostic Potential of Extracellular MicroRNA in Respiratory Diseases. *ClinRevAllergyImmunol*. 2018 Jun;54(3):480-92.
50. Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A, Ishmael FT. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J AllergyClinImmunol*. 2016 May;137(5):1423-32
51. Ariel Munitz, Danielle Karo-Atar, Paul S. Foster. Asthma diagnosis: MicroRNAs to the rescue. *J Allergy Clin Immunol*. 2016, May; 137 (5): 1447-48
52. Elbehidy RM, Youssef DM, El-Shal AS, Shalaby SM, Sherbiny HS, Sherief LM, Akeel NE. MicroRNA-21 as a novel biomarker in diagnosis and response to therapy in asthmatic children. *Mol Immunol*. 2016 Mar; 71:107-14.
53. Lambert KA, Roff AN, Panganiban RP, Douglas S, Ishmael FT. MicroRNA-146a is induced by inflammatory stimuli in airway epithelial cells and augments the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *PLoS One*. 2018;13(10): e0205434.
54. Williams AE, Larner-Svensson H, Perry MM, Campbell GA, Herrick SE, Adcock IM, Erjefalt JS, Chung KF, Lindsay MA. MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy. *PLoS One*. 2009 Jun 12;4(6): e5889
55. Li J, Panganiban R, Kho AT, McGeachie MJ, Farnam L, Chase RP, Weiss ST, Lu Q, Tantisira KG. Circulating MicroRNAs and Treatment Response in Childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jul 1;202(1):65-72
56. Faiz A, Steiling K, Roffel MP, Postma DS, Spira A, Lenburg ME, Borggrewe M, Eijgenraam TR, Jonker MR, Koppelman GH, Pouwels SD, Liu G, Alekseyev YO, Lam S, Hiemstra PS, Sterk PJ, Timens W, Brandsma CA, Heijink IH, van den

- Berge M. Effect of long-term corticosteroid treatment on microRNA and gene-expression profiles in COPD. *EurRespir J*. 2019 Apr 25;53(4):1801202
57. Kos A, OldeLoohuis NF, Wieczorek ML, et al. A potential regulatory role for intronic microRNA-338-3p for its host gene encoding apoptosis-associated tyrosine kinase. *PLoSOne*. 2012;7(2): e31022
58. Lacedonia D, Palladino GP, Foschino-Barbaro MP, Scioscia G, Carpagnano GE. Expression profiling of miRNA-145 and miRNA-338 in serum and sputum of patients with COPD, asthma, and asthma-COPD overlap syndrome phenotype. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017; 12:1811-17
59. Patel SS, Casale TB, Cardet JC. Biological therapies for eosinophilic asthma. *Expert Opin Biol Ther*. 2018 Jul;18(7):747-54.
60. Bhavsar P, Khorasani N, Hew M, Johnson M, Chung KF. Effect of p38 MAPK inhibition on corticosteroid suppression of cytokine release in severe asthma. *EurRespir J*. 2010 Apr;35(4):750-6.
61. Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, Ortega HG, Pavord ID; SIRIUS Investigators. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *N Engl J Med*. 2014 Sep 25;371(13):1189-9
62. Bourdin A, Husereau D, Molinari N, Golam S, Siddiqui MK, Lindner L, Xu X. Matching-adjusted comparison of oral corticosteroid reduction in asthma: Systematic review of biologics. *Clin Exp Allergy*. 2020 Apr;50(4):442-52.
63. Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ. Expression of growth factors and remodelling of the airway wall in bronchial asthma. *Thorax* 1998; 53:21-7.

64. Balzar S, Chu HW, Silkoff P, Cundall M, Trudeau JB, Strand M, Wenzel S. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):110-7.
65. Nelson RK, Bush A, Stokes J, Nair P, Akuthota P. Eosinophilic Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Feb;8(2):465-73.
66. Al-Alawi M, Hassan T, Chotirmall SH. Transforming growth factor β and severe asthma: a perfect storm. *Respir Med*. 2014 Oct;108(10):1409-23.
67. Ortega HG, Yancey SW, Mayer B, Gunsoy NB, Keene ON, Bleecker ER, Brightling CE, Pavord ID. Severe eosinophilic asthma treated with mepolizumab stratified by baseline eosinophil thresholds: a secondary analysis of the DREAM and MENSA studies. *Lancet Respir Med*. 2016 Jul;4(7):549-56.
68. Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet LP, Xie F, Young J, Wilkins HJ, Henkel T, Nair P; Res-5-0010 Study Group. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Nov 15;184(10):1125-32.
69. Bjermer L, Lemiere C, Maspero J, Weiss S, Zangrilli J, Germinaro M. Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma with Elevated Blood Eosinophil Levels: A Randomized Phase 3 Study. *Chest*. 2016 Oct;150(4):789-98.
70. Cañas JA, Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, Del Pozo V. Exosomes: A new approach to asthma pathology. *Clin Chim Acta*. 2019 Aug; 495:139-47.
71. Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, Garcia-Sanchez DA, Cañas JA, Del Pozo V. Eosinophils: Old Players in a New Game. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(5):289-04.

72. Sastre B, Cañas JA, Rodrigo-Muñoz JM, Del Pozo V. Novel Modulators of Asthma and Allergy: Exosomes and MicroRNAs. *Front Immunol.* 2017 Jul 21; 8:826.
73. Cañas JA, Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, Fernández-Nieto M, Barranco P, Quirce S, Sastre J, Del Pozo V. Eosinophil-derive dexosomes contribute to asthma remodelling by activating structural lung cells. *Clin Exp Allergy.* 2018 Sep;48(9):1173-85.
74. Cañas JA, Sastre B, Mazzeo C, Fernández-Nieto M, Rodrigo-Muñoz JM, González-Guerra A, Izquierdo M, Barranco P, Quirce S, Sastre J, Del Pozo V. Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *J Leukoc Biol.* 2017 May;101(5):1191-99.
75. Perez-Garcia J, Hernández-Pérez JM, González-Pérez R, Sardón O, Martin-Gonzalez E, et al. The Genomics and Metagenomics of Asthma Severity (GEMAS) Study: Rationale and Design. *J Pers Med.* 2020 Sep 11;10(3):123.
76. Mazzeo C, Cañas JA, Zafra MP, Rojas Marco A, Fernández-Nieto M, Sanz V, Mittelbrunn M, Izquierdo M, Baixauli F, Sastre J, Del Pozo V. Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Jun;135(6):1603-13.

Trabajos directamente derivados de esta tesis doctoral:

- 1- Rial MJ, Rodrigo Muñoz JM, Sastre B, Sastre J, Del Pozo V. Stability of Asthma Control Implies No Changes in microRNAs Expression. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2019; 29(5):388-89.
- 2- Rial MJ, Álvarez-Puebla MJ, MD, Arismendi E, Caballero ML, Cañas JA, Cruz MJ, et al. "Clinical and inflammatory characteristics of patients with asthma in the Spanish MEGA cohort". Aceptado, in press. CATL-D-20-00133.
- 3- Rial MJ, Cañas JA, Rodrigo-Muñoz JM, Valverde-Monge M, Sastre B, Sastre J et al. Changes of serum microRNAs after anti-IL-5 biological treatment in severe asthma. *JIACI*. En proceso de revisión.
- 4- Muñoz X, Álvarez-Puebla MJ, Arismendi E, Arochena L, Ausín MDP, Barranco P et al. The MEGA Project: A Study of the Mechanisms Involved in the Genesis and Disease Course of Asthma. *Asthma Cohort Creation and Long-Term Follow-Up*. *Arch Bronconeumol*. 2018 Mar 19. pii: S0300-2896(18)30009-7. doi: 10.1016/j.arbres.2017.12.012.

Trabajos publicados durante la realización de esta tesis doctoral:

- 1- Sánchez-García S, Rial MJ, Domínguez-Ortega J. Long and winding road: from infant wheeze to adult asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2020 Jan;26(1):3-9.

- 2- Sastre J, Crespo A, Fernandez-Sanchez A, Rial M, Plaza V; investigators of the CONCORD Study Group. Anxiety, Depression, and Asthma Control: Changes After Standardized Treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018 Nov-Dec;6(6):1953-59.
- 3- Ponsford MJ, Klocperk A, Pulvirenti F, Dalm VASH, Milota T, Cinetto F, Chovancova Z, Rial MJ, Sediva A, Litzman J, Agostini C, van Hagen M, Quinti I, Jolles S. Hyper-IgE in the allergy clinic--when is it primary immunodeficiency? *Allergy.* 2018 Nov;73(11):2122-36.
- 4- Rial MJ, Barroso B, Sastre J. Dupilumab for treatment of food allergy. *J AllergyClinImmunolPract.* 2019 Feb;7(2):673-74.
- 5- Rial MJ, Sastre J. Food Allergies Caused by Allergenic Lipid Transfer Proteins: What Is behind the Geographic Restriction? *CurrAllergyAsthma Rep.* 2018 Sep 11;18(11):56.
- 6- Villalobos V, Rial MJ, Pastor-Vargas C, Esteban I, Cuesta J, Sastre J. Occupational Asthma and Rhinitis due to Yellow and Red Henna in a Hairdresser. *J InvestigAllergolClinImmunol.* 2020 Apr 24;30(2):133-34.
- 7- Rial MJ, Valverde-Monge M, Gómez-Cardenosa A, Vera-Berrios R, Pastor-Vargas C, Cuesta-Herranz J. Desensitization to cross-reacting allergen in egg yolk and chicken meat. *J AllergyClinImmunolPract.* 2019 Feb;7(2):696-97.
- 8- Barroso-García B, Rial MJ, Molina A, Sastre J. Alopecia Areata in Severe Atopic Dermatitis Treated With Dupilumab. *J InvestigAllergolClinImmunol.* 2018 Dec;28(6):420-21.
- 9- Rial MJ, Fernández-Nieto M, Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, Sastre J, Del Pozo V. Doxylamine Allergy in a Pregnant Woman: Suitability of the

- Basophil Activation Test. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018 Dec;28(6):433-34.
- 10- Rial MJ, Barroso B, Rodríguez-Bermejo C, Sastre J. Letter regarding "Conjunctivitis occurring in atopic dermatitis patients treated with dupilumab-clinical characteristics and treatment". *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Feb;7(2):753.
- 11- Rial MJ, Valverde M, Del Pozo V, González-Barcala FJ, Martínez-Rivera C, Muñoz X, Olaguibel JM, Plaza V, Curto E, Quirce S, Barranco P, Domínguez-Ortega J, Mullol J, Picado C, Valero A, Bobolea I, Arismendi E, Ribó P, Sastre J. Clinical characteristics in 545 patients with severe asthma on biological treatment during the COVID-19 outbreak. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Oct 9:S2213-2198(20)31100-4.
- 12- Suarhana E, Taghiakbari M, Saha-Chaudhuri P, Riffart C, Suojalehto H, Hölttä P, Walusiak-Skorupa J, Wiszniewska M, Muñoz X, Romero-Mesones C, Sastre J, Rial MJ, Henneberger PK, Vandenplas O. The validity of the Canadian clinical scores for occupational asthma in European populations. *Allergy*. 2020 Aug;75(8):2124-26.
- 13- Calzada D, Cremades-Jimeno L, Pedro MÁ, Baos S, Rial M, Sastre J, Quiralte J, Florido F, Lahoz C, Cárdbaba B. Therapeutic potential of peptides from Ole e 1 in olive-pollen allergy. *Sci Rep*. 2019 Nov 4;9(1):15942
- 14- Posadas Miranda T, Rial Prado MJ, Meiji de Calderón A, Fernández de Alba Porcel I, Zambrano Ibarra G; commission of young allergists and MIR (CAJMIR) of Spanish Society of Allergology and Immunology

(SEAIC). Descriptive study of job opportunities in the allergy field. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020 Jul 21:0. doi: 10.18176/jiaci.0631. Epubahead of print.

- 15- Rodrigo-Muñoz JM, Rial MJ, Sastre B, Cañas JA, Mahillo-Fernández I, Quirce S, Sastre J, Cosío BG, Del Pozo V. Circulating miRNAs as diagnostic tool for discrimination of respiratory disease: Asthma, asthma-chronic obstructive pulmonary disease (COPD) overlap and COPD. *Allergy*. 2019 Dec;74(12):2491-94.