

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Hacia la medicina de precisión en el asma: utilización de
microARNs circulantes**

**Towards precision medicine in asthma: use of circulating
microRNAs**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Gil Martínez

Directora

María Victoria del Pozo Abejón

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

HACIA LA MEDICINA DE PRECISIÓN EN EL ASMA:
UTILIZACIÓN DE MICROARNs CIRCULANTES

TOWARDS PRECISION MEDICINE IN ASTHMA:
USE OF CIRCULATING MICRORNAs

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

MARTA GIL MARTÍNEZ

DIRECTORA

DRA. MARÍA VICTORIA DEL POZO ABEJÓN

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina**



TESIS DOCTORAL

**HACIA LA MEDICINA DE PRECISIÓN EN EL ASMA:
UTILIZACIÓN DE MICROARNs CIRCULANTES**

**TOWARDS PRECISION MEDICINE IN ASTHMA:
USE OF CIRCULATING MICRORNAs**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR**

MARTA GIL MARTÍNEZ,

DIRECTORA

DRA. MARÍA VICTORIA DEL POZO ABEJÓN

MADRID, 2024

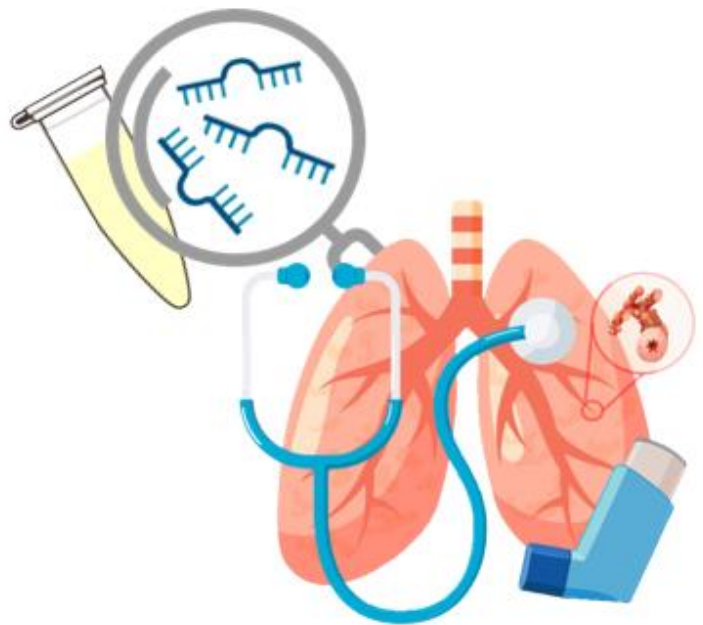
El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Laboratorio de Inmunoalergia 1 (Grupo de Alergia e Inmunología, Departamento de Inmunología, Área de Enfermedades Infecciosas, Inflamatorias y Crónicas) del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM), en Madrid (España), bajo la dirección de la Dra. María Victoria del Pozo Abejón y con la ayuda de una beca PFIS (FI19/00067) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

La investigación ha sido financiada por el ISCIII, el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

“No hay nadie más capaz en todo el universo
que tú cuando confías en ti mismo”.

- Reflexión y pensamiento.

A mis padres, por su ejemplo,
por su apoyo incondicional
y porque sin ellos nada hubiera sido posible.



Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Llegar a este punto, el final de años de arduo trabajo, dedicación y esfuerzo, en ocasiones parecía inalcanzable. Ahora, es el momento expresar mi sincero reconocimiento a todas las personas que han sido parte fundamental a lo largo de este tiempo. Aunque redactar estas palabras pueda parecer simple, encontrar las adecuadas para hacer saber mi gratitud de corazón a todos aquellos que han formado parte de mi vida, tanto en el plano profesional como personal, durante mi etapa como investigadora predoctoral y escritura de esta Tesis Doctoral, requiere reflexión y cuidado. No obstante, es para mí un privilegio y un honor poder escribir estas palabras.

La investigación que culminó en esta Tesis Doctoral se llevó a cabo en el Grupo de Alergia e Inmunología, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), bajo la dirección de la Dra. María Victoria del Pozo Abejón, conocida cariñosamente como Vito. Me gustaría expresarle mi más profundo agradecimiento por confiar en mi capacidad y brindarme la oportunidad de adentrarme en el maravilloso, aunque sacrificado, mundo de la ciencia y la investigación para llevar a cabo esta Tesis Doctoral y ser parte de su laboratorio. Vito, quiero destacar tu apoyo, tanto en el ámbito profesional como personal. Tu orientación (asistencia, guía y consejo) constante ha sido vital para llevar a buen término esta Tesis Doctoral. Estoy enormemente agradecida por tu dirección y por inculcarme la importancia del desarrollo tanto en mi formación académica como en mi trayectoria laboral, fomentando un pensamiento crítico que es esencial en el proceso científico.

A continuación, agradecer a todos los miembros del laboratorio, quienes también han sido y son mis compañeros. No podrían haber sido mejores. Gracias de todo corazón por haber estado ahí no solo en los momentos buenos, que han sido muchos, sino sobre todo en los difíciles. Esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin vuestra valiosa colaboración. Nunca olvidare todo lo que hemos compartido. Tengo la certeza de que alcanzaréis grandes logros gracias a vuestro compromiso y trabajo, porque las personas buenas como vosotros merecen triunfar.

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que han estado conmigo desde que comencé mi carrera en el grupo y en el laboratorio. Primero a quienes siguen actualmente, a quienes estuvieron y se fueron, y a quienes estuvieron, se fueron y regresaron.

José, mi mayor referencia, mi modelo a seguir. Gracias por compartir tus conocimientos, que no son pocos. Es fascinante ver cómo cada día sabes aún más. Admiro tu dedicación incesante y tu disposición para ayudar. Junto a Bea, Natalia y Toño, también claves en mis comienzos, has sido mi guía durante todos estos años. Destaco tu apoyo, tus consejos, tu impulso para alentarme a no rendirme, pero, fundamentalmente, tu infinita paciencia.

Bea, Natalia y Toño, investigadores postdoctorales, fuisteis excelentes profesores de laboratorio a pesar de haber estado menos tiempo juntos debido a vuestra partida, que fue por una buena causa. Lo que me enseñasteis al principio de estos años es lo que hoy veo reflejado en mi trabajo, gracias a mi empeño y entrega. Sois ejemplos de trabajo bien hecho y perfeccionismo. Bea, te agradezco por creer en mí y darme ánimos para llegar hasta el final, siempre con sinceridad y desde el corazón. Toño, ¡qué bien que hayas podido reincorporarte con nosotros y continuar con tu trabajo aquí! Tu sentido del humor siempre ha contribuido a hacer los buenos momentos aún más agradables. Muchas gracias a ambos.

Agradecimientos

Raquel, una técnico de laboratorio maravillosa y aún mejor persona. Fuiste indispensable para el funcionamiento del laboratorio mientras estuviste aquí. Te fuiste como compañera, pero te convertiste y has seguido siendo una amiga, lo cual es una suerte. Desde el inicio en el laboratorio, tuve la intuición de que nos llevaríamos bien, y no me equivoqué. Agradezco tu voluntad y ayuda en el laboratorio, simplificando las tareas, y por ser mi amiga fuera de él. Aprecio tu escucha, tu apoyo y tus palabras de aliento. Me alegra saber que has mejorado en el ámbito profesional, te lo has ganado.

Quiero reconocer y agradecer no solamente a quienes me acompañaron desde el principio, sino también a aquellos que se unieron al equipo más tarde, aunque algunos ya no estén. Primero, a Clara, una investigadora postdoctoral con una notable capacidad de aprendizaje. Trabajar con ella me ha permitido ampliar mis conocimientos dentro del marco de nuestra profesión. Ha sido un auténtico placer compartir contigo el laboratorio, siempre dispuesta a prestarme su colaboración. Enhorabuena por esa plaza, te lo mereces. Luego, a Miguel, un estudiante de Grado en Biología Sanitaria, que me hizo revivir la emoción y la ilusión de comenzar (en los primeros pasos de formación en el laboratorio), mostrando un interés genuino por aprender y siempre presto a cooperar. Después, a Zahara y a Sara, técnico de laboratorio y ayudante de investigación (ahora investigadora predoctoral), respectivamente. Declararles mi gratitud por su compañía invaluable, por las risas y la alegría que han llenado nuestro tiempo en el laboratorio, y por nunca negar su ayuda. Asimismo, por estar a mi lado, siendo un apoyo y dándome fortaleza, en particular en estos últimos meses. Finalmente, a Gema, una estudiante de Grado en Biotecnología, siempre demostrando un gran interés por aprender y dispuesta a participar activamente, a quien, afortunadamente, he tenido la oportunidad de transmitir mis conocimientos A todos vosotros, muchísimas gracias.

Por otro lado, me gustaría hacer mención de todas las personas que trabajan en la cuarta planta de investigación. Ha sido un verdadero gusto compartir este espacio con todos vosotros durante esta etapa como estudiante predoctoral y disfrutar de una cerveza junto a muchos de vosotros de vez en cuando. Estos científicos excepcionales, destacando aún más por su carácter noble, hacen de esta planta del IIS-FJD un lugar extraordinario para realizar nuestra labor. En especial, quiero enfocarme en los dos laboratorios que, junto al nuestro, conforman el Departamento de Inmunología: los laboratorios 2 y 4.

En el laboratorio 2, quiero reconocer a Selene, María y, principalmente, a Lucía, así como a Blanca, la jefa de grupo en este laboratorio. Agradecer la bienvenida recibida en su laboratorio, tratándome como si también fuera el mío. Lucía, mi compañera de Tesis Doctoral, con la que he vivido todo este período como investigadora predoctoral. Gracias por tu atención, compartiendo la alegría en los momentos felices y ofreciendo apoyo en los momentos difíciles, por tu disposición para ayudar y por todo lo que hemos disfrutado juntas, desde conversaciones en desayunos y comidas hasta los dos congresos a los que hemos asistido juntas, en los que fuimos compañeras de habitación. Además, mi agradecimiento a Blanca por sus palabras alentadoras y su voluntad de prestar ayuda cuando se requiere. Su actitud positiva y optimista es contagiosa.

En el laboratorio 4, quiero destacar a Emilio, Sergio, Lucía y Ariadna, con quienes compartimos espacio en el cuarto de cultivos, lo que hace que trabajar ahí sea mucho más llevadero, así como reactivos, en momentos de necesidad. Mostrar mi gratitud por siempre recibirme con una sonrisa y amablemente, su afectuoso trato, sus palabras de aliento y, su ánimo y el apoyo brindado, sobre todo, en el final de esta etapa de desarrollo de mi Tesis Doctoral. Algunos de nosotros también hemos tenido la oportunidad de asistir juntos a congresos, experiencias que siempre recordaremos como momentos especiales.

También agradezco a Carlos, aunque ya no esté, y a Vanesa, Gloria y Marta, las jefas de grupo en este laboratorio, por su acogedor recibimiento y su disposición para colaborar si era necesario. Es un privilegio formar parte de esta gran familia de Inmunología. Muchas gracias a todos.

No puedo omitir mencionar a colaboradores de esta planta de investigación, cuya contribución fue crucial en mi proyecto de Tesis Doctoral. Estoy sumamente agradecida por su valiosa asistencia, poniendo de relieve su alto nivel de profesionalismo, siempre dispuestos a compartir su experiencia y cooperar con quienes necesitamos su aporte. Me refiero al Dr. Ignacio Mahillo, Jefe de la Unidad de Epidemiología y Bioestadística, a la Dra. Lorena de la Fuente, a Gonzalo Núñez y al Dr. Pablo Mínguez, de la Unidad de Bioinformática, siendo este último el coordinador científico de dicha Unidad. Su conocimiento y competencia han sido esenciales para que esta Tesis Doctoral finalizara de manera satisfactoria.

Concluir con respecto esta planta de investigación, enfatizando la labor de nuestras auxiliares, Amelia y Julia, cuyo trabajo ha simplificado considerablemente nuestra vida en el laboratorio. Julia, te agradezco de corazón tu afectuoso trato, tu energía positiva y por estar presente, por tu escucha y tus consejos.

Por otro lado, deseo manifestar mi profunda gratitud a los Servicios de Alergología y Neumología, tanto al personal técnico, de enfermería y médicos, particularmente del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (HUFJD), como también de otros hospitales de España que participan junto con este centro en estudios multicéntricos. Su inestimable aportación al proporcionarnos muestras clínicas y su apoyo en nuestros proyectos han sido claves. Destacar de forma específica al Dr. Joaquín Sastre y a la Dra. María Jesús Rodríguez, quienes, a pesar de ser clínicos, respaldan y fomentan activamente la investigación. También quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Marcela Valverde por su disposición constante para ayudarnos, y por su contagiosa alegría y entusiasmo. Asimismo, mi reconocimiento se extiende a los residentes de Alergología que han realizado su rotación en nuestro laboratorio, tanto los del HUFJD (Diana, Laura, Carlos, Jaime y Marta, entre otros) como los de otros hospitales de España. Son personas excepcionales, ávidos de aprender de nuestra labor, aplicando la clínica al laboratorio y poniendo en común su experiencia con nosotros. Gracias por vuestro trabajo y dedicación.

Por otra parte, es importante para mí mostrar mi gratitud al IIS-FJD por haber sido mi segunda casa durante estos años, y al Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) por concederme el contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) que ha hecho posible la realización de mi Tesis Doctoral. También agradezco a otras instituciones como la Universidad Complutense de Madrid (UCM), donde llevamos a cabo una parte de nuestra investigación (estudios de proteómica [Unidad de Proteómica de la UCM]), y al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), que ha sido una fuente crucial de muestras clínicas y financiación.

Finalmente, me gustaría terminar, en el contexto académico, expresando mi agradecimiento más sentido al Dr. Jorge Bernardino por la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio en el Imperial College London (Londres, Reino Unido). La acogida y todo lo que aprendí han dejado una impresión que perdurará en mi carrera. Esta experiencia fue muy enriquecedora, tanto a nivel profesional como personal.

La última sección de agradecimientos en esta Tesis Doctoral está dedicada a las personas que están más allá del entorno ocupacional: mis amigos, mi familia y mi pareja, quienes han estado conmigo en las

Agradecimientos

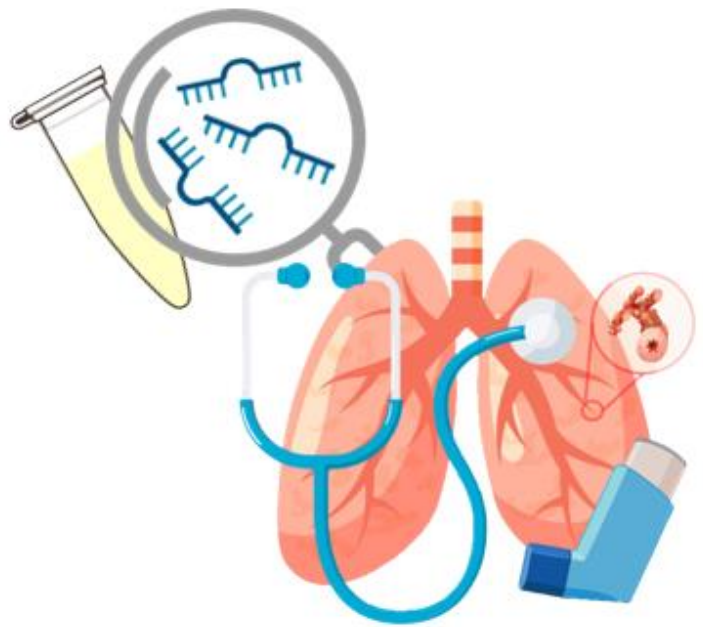
buenas y, ante todo, en las malas. Siempre han estado a mi lado, demostrándome su cariño, ofreciéndome su apoyo inquebrantable y animándome sin cesar. Han comprendido los retos que he afrontado, siendo testigos de mis logros y mi refugio en las adversidades. Por supuesto, esta Tesis Doctoral no solo es un éxito o mérito mío, sino que también es vuestro.

A mis amigos, tanto los de Madrid como los de Ocaña (Toledo), mi gratitud es inmensurable. Han sido, son y serán un pilar fundamental en mi vida. Muchas gracias por vuestra confianza en mí siempre y por ser un ejemplo de amistad verdadera. Tengo que mencionar a tres de ellos que son imprescindibles en mi vida, en mi día a día: Yoli, Víctor y Mayte. Yoli, nuestra larga historia juntas habla por sí sola sobre lo que significas para mí. Víctor, a quien tu prima Yoli me hizo conocer, es una gran persona que se ha convertido en un amigo de incalculable valor. Mayte, la persona más maravillosa que me regaló el Grado en Biología. A todos, os quiero mucho y espero que nunca me faltéis.

A mis padres, José Manuel y María Jesús, a quienes dedico esta Tesis Doctoral. Las dos personas más importantes de mi vida y los mejores padres que un hijo o una hija podría desear. Les debo todo. Sin su incansable esfuerzo por darme lo mejor y su ayuda, sin jamás esperar nada a cambio, este logro no habría sido viable. Gracias por estar siempre ahí para mí, incondicionalmente, y por ser un referente en mi vida. Gracias por apoyarme en cada paso que he dado. Gracias por enseñarme prácticamente todo lo que sé sobre la vida, por inculcarme valores sólidos, por impulsarme a superarme a mí misma, día tras día, y por nunca dejar de creer en mí. ¡No puedo imaginar mi vida sin vosotros! Os quiero inmensamente. Espero que os sintáis tan orgullosos de esto como me siento yo.

A mi abuela, María Jesús, a quien considero una segunda madre. Siempre dispuesta a lo que hiciera falta, siempre orgullosa de sus hijas y nietas, estoy segura de que de esto también te sientes así. Ojalá pudieras ser eterna. A mis abuelos Heliodoro, Porfirio y Severina, esta última a quien lamentablemente no pude conocer. Agradezco todo lo que me enseñaron y dieron, así como lo que habrían deseado enseñarme y brindarme. A mis tíos, incluyendo a aquel al que, por desgracia, no tuve la oportunidad de conocer, y a mi prima, por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo.

Por último, pero no menos importante, a José, mi copiloto en este viaje llamado vida. Muchas gracias por todo. Por haber estado a mi lado durante todo este tiempo, siendo un apoyo incondicional, compartiendo tanto mi mejor como mi peor versión, aceptando mis defectos y perdonando mis errores. Por tu paciencia, comprensión y cariño. Por darme la fuerza y el ánimo necesarios para seguir adelante cuando más lo he necesitado. Por sostenerme en las dificultades y por hacerme ver lo positivo. Por creer en mí y en nosotros, por hacerme feliz, por cuidarme y quererme tanto. Me siento muy afortunada de compartir mi vida contigo. Por construir un futuro juntos. Te quiero mucho. Espero que, al igual que me has hecho sentir orgullo, esto también te llene a ti de orgullo; mis éxitos son también tuyos. Además, mi agradecimiento a tu familia, a tus padres y a Emma, la mejor cuñada que podría tener.



Índice

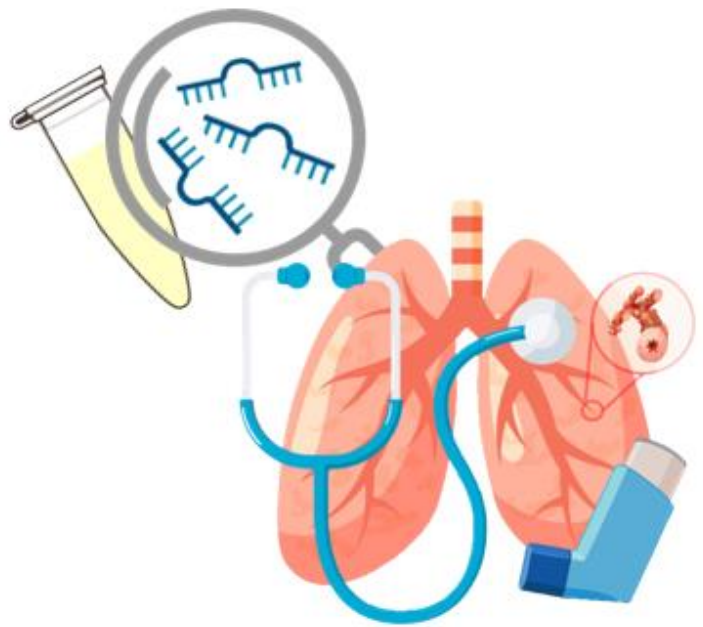
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	11
SUMMARY	13
1. ABREVIATURAS.....	17
2. INTRODUCCIÓN	27
2.1. El asma: enfermedad respiratoria crónica	27
2.1.1. Historia y epidemiología del asma	27
2.1.2. Características clínicas y sintomatología del asma	28
2.1.3. Factores de riesgo y factores desencadenantes para el desarrollo del asma	29
2.1.4. Fisiopatología del asma: elevada complejidad	31
2.1.5. Fenotipos y endotipos: heterogeneidad del asma	34
2.1.5.1. Asma grave: asma eosinofílica y asma dependiente de GCs (glucocorticoides orales [GCOs; en inglés, <i>Oral Glucocorticoids</i> u <i>Oral Corticosteroids</i> (OGCs u OCS)]).....	37
2.1.6. Comorbilidades del asma	39
2.1.6.1. Obesidad.....	39
2.1.6.1.1. Eje hormona del crecimiento (GH; del inglés, <i>Growth Hormone</i>)-factor de crecimiento similar a la insulina (IGF; del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor</i>): obesidad y asma	40
2.1.7. Tratamiento del asma.....	43
2.2. Los exosomas y los microARNs (miARNs): implicación en la fisiopatología del asma y potencial como biomarcadores de la patología asmática	44
2.2.1. Los exosomas: biogénesis, estructura y función	44
2.2.1.1. Biogénesis: origen de los exosomas.....	45
2.2.1.2. Morfología y composición molecular de los exosomas.....	46
2.2.1.3. Función de los exosomas: papel en la enfermedad asmática y uso como biomarcadores	47
2.2.2. Los miARNs: biogénesis y función.....	49
2.2.2.1. Biogénesis: origen de los miARNs	50
2.2.2.2. Función de los miARNs: papel en la patología asmática y uso como biomarcadores.....	52
2.3. Nuevas tecnologías de análisis masivo para estudiar la enfermedad asmática y uso de los miARNs circulantes para llevar a la práctica la medicina personalizada de precisión (MPP)	54
3. HIPÓTESIS	59
4. OBJETIVOS	59
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
5.1. Poblaciones de estudio: selección, obtención y procesamiento de las muestras biológicas	63
5.1.1. Criterios para la selección de los individuos	63
5.1.2. Consideraciones éticas	64
5.1.3. Población de estudio	64
5.1.4. Clasificación de las muestras biológicas.....	65

5.1.4.1. Muestras de suero	65
5.1.4.2. Muestras de biopsia pulmonar	66
5.1.4.3. Muestras de sobrenadante de esputo.....	66
5.1.5. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas.....	66
5.1.5.1. Muestras de sangre periférica	66
5.1.5.1.1. Extracción	66
5.1.5.1.2. Procesamiento	66
5.1.5.2. Muestras de biopsia pulmonar	66
5.1.5.2.1. Recepción de las muestras	66
5.1.5.2.2. Procesamiento	67
5.1.5.3. Muestras de esputo	67
5.1.5.3.1. Inducción del esputo.....	67
5.1.5.3.2. Procesamiento	67
5.2. Análisis de la expresión de los miARNs en suero y en biopsias pulmonares.....	68
5.2.1. Extracción del ácido ribonucleico (ARN) total.....	68
5.2.1.1. Descongelación de las muestras biológicas	68
5.2.1.2. Extracción del ARN total de las muestras de suero.....	68
5.2.1.3. Extracción del ARN total de las muestras de biopsia pulmonar	69
5.2.1.3.1. Determinación cuantitativa del ARN total.....	70
5.2.2. Análisis de la expresión de los miARNs en las muestras de suero y de biopsia pulmonar	70
5.2.2.1. Secuenciación de nueva generación (NGS) de los miARNs (miARNs-seq [seq; del inglés, <i>sequencing</i>])	70
5.2.2.1.1. Preparación de las librerías.....	70
5.2.2.1.2. Secuenciación de los miARNs (miARNs-seq).....	71
5.2.2.1.3. Análisis bioinformático de la expresión de los miARNs	71
5.2.2.1.3.1. Comparación de los niveles de expresión de los miARNs normalizados	72
5.2.2.1.3.2. Aplicación del análisis de componentes principales (PCA; del inglés, <i>Principal Component Analysis</i>)	72
5.2.2.2. Validación de la expresión diferencial de los miARNs en las muestras de suero y de biopsia pulmonar mediante transcripción inversa (RT; del inglés, <i>Reverse Transcription</i>) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR; del inglés, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)	73
5.2.2.2.1. RT del ARN total a ácido desoxirribonucleico complementario o copia (ADNc)	73
5.2.2.2.2. qPCR.....	74
5.2.2.3. Examen de la expresión diferencial de los miARNs, validada mediante RT-qPCR, en las muestras de suero y de biopsia pulmonar	75
5.3. Análisis de la expresión diferencial de los genes diana de los miARNs en las muestras de biopsia pulmonar mediante RT y qPCR	76
5.3.1. RT del ARN total a ADNc	76

5.3.2. qPCR	76
5.4. Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAs; del inglés, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays</i>) para medir la expresión proteica de IGFBP-3 y de IGF-1R	78
5.5. Cultivos celulares de células estructurales de pulmón: células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (SAEC; del inglés, <i>Small Airway Epithelial Cells</i>) y células musculares lisas bronquiales (BSMC; del inglés, <i>Bronchial Smooth Muscle Cells</i>)	79
5.5.1. Descongelación, siembra y mantenimiento de subcultivos de SAEC	79
5.5.2. Descongelación, siembra y mantenimiento de subcultivos de BSMC.....	80
5.6. Experimentación funcional en SAEC y en BSMC.....	80
5.6.1. Estudio del impacto de la dexametasona en la expresión de los miARNs y de los genes	80
5.6.1.1. Extracción y cuantificación del ARN total, RT del ARN total a ADNc y qPCR	81
5.7. Análisis del contenido proteico de los exosomas de las muestras de suero y de sobrenadante de esputo	82
5.7.1. Purificación de los exosomas.....	82
5.7.2. Determinación de la concentración proteica de los exosomas.....	82
5.7.3. Identificación de las proteínas de los exosomas mediante <i>Western blot</i> , que involucra la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE; del inglés, <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>) con dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>), la transferencia y la inmunodetección.....	83
5.7.4. Caracterización del perfil proteómico de los exosomas.....	85
5.7.4.1. Digestión de las proteínas	85
5.7.4.2. Separación de los péptidos mediante nano-cromatografía líquida de fase reversa y análisis por espectrometría de masas de alta resolución	85
5.7.4.3. Interpretación de los datos para la cuantificación relativa sin marcaje de las proteínas..	86
5.7.4.4. Análisis funcional de las proteínas con distinta abundancia.....	87
5.8. Uso de herramientas bioinformáticas para predecir la interacción entre los miARNs y sus genes diana	87
5.9. Análisis estadístico	88
5.9.1. Curvas ROC (características operativa del receptor, ROC; del inglés, <i>Receiver Operating Characteristic</i>) y modelos de regresión logística para examinar el potencial de los miARNs como posibles biomarcadores.....	89
6. RESULTADOS	93
6.1. Resultados logrados en el cumplimiento del objetivo parcial 1. Publicación 1	93
6.1.1. Resumen del trabajo, contribución personal de la doctoranda y presentación de la publicación	93
6.2. Resultados alcanzados en la consecución del objetivo parcial 2. Publicación 2	107
6.2.1. Resumen del trabajo, contribución personal de la doctoranda y presentación de la publicación	107
6.3. Resultados derivados de la realización del objetivo parcial 3	127
6.3.1. Características de los pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica	127

6.3.2. Determinación del perfil proteómico de los exosomas	129
6.3.2.1. Identificación de las proteínas características de los exosomas mediante <i>Western blot</i>	129
6.3.2.2. Descripción del contenido proteico de los exosomas	130
6.4. Resultados obtenidos al completar el objetivo parcial 4. Publicación 3	137
6.4.1. Resumen del trabajo, contribución personal de la doctoranda y presentación de la publicación	137
6.5. Resultados logrados del desarrollo del objetivo parcial 5	155
6.5.1. Examen de la expresión de los miARNs en suero y en tejido pulmonar.....	155
6.5.1.1. Características de los sujetos asmáticos y de los individuos sin asma incluidos en el análisis de la expresión de los miARNs en suero	155
6.5.1.2. Características de los individuos con asma y de los sujetos no asmáticos incluidos en el análisis de la expresión de los miARNs en tejido pulmonar	156
6.5.1.3. Estudio de la expresión de los miARNs en suero.....	157
6.5.1.3.1. Evaluación de hsa-miR-148b-3p como posible biomarcador del asma.....	158
6.5.1.3.1.1. Correlación de la expresión de hsa-miR-148b-3p (Δ Ct) con las variables clínicas	159
6.5.1.4. Estudio de la expresión de los miARNs en tejido pulmonar	159
6.5.1.4.1. Investigación del potencial de hsa-miR-769-5p como biomarcador	160
6.5.1.4.1.1. Correlación de la expresión de hsa-miR-769-5p (Δ Ct) con los parámetros clínicos.....	161
6.6. Resultados alcanzados de la ejecución del objetivo parcial 6.....	163
6.6.1. Estudio de la expresión de los miARNs en SAEC y BSMC.....	163
7. DISCUSIÓN.....	169
7.1. Desentrañando la complejidad del asma: en dirección a una medicina personalizada con el uso de los miARNs como biomarcadores.....	169
7.2. Perspectivas actuales en la inflamación T2 en el asma para la MPP: incorporación de los miARNs en la investigación de los fenotipos	171
7.3. Del laboratorio a la práctica médica: los miARNs como biomarcadores para el fenotipado del asma y su potencial en los tratamientos personalizados	175
7.3.1. Perfiles diferenciales de miARNs en suero y en biopsias pulmonares: los miARNs como biomarcadores específicos del asma para un fenotipado preciso. Objetivos 1, 2 y 4-6	177
7.3.1.1. Explorando las interacciones miARNs-gen(es) en biopsias pulmonares: implicación de los miARNs y sus genes diana en vías de señalización u otros procesos en el asma.....	180
7.3.1.2. Interrelación entre los miARNs, sus genes diana y las proteínas del eje IGF: efectos fenotípicos de los miARNs en la influencia de la obesidad como condición comórbida del asma	181
7.3.1.3. Correlación entre la expresión de los miARNs y las proteínas con los parámetros clínicos: vínculos de los miARNs con el asma, sus comorbilidades y las posibles implicaciones en su fisiopatología.....	182

7.3.1.4. Interpretación de las respuestas de los miARNs: importancia de los modelos celulares para entender las respuestas terapéuticas en el asma.....	183
7.4. Los exosomas y su composición proteica en el fenotipado del asma. Objetivo 3	183
7.4.1. Proteínas exosomales en el centro del escenario: papel en los procesos biológicos asociados al asma	187
Figura resumen	190
8. LIMITACIONES	193
8.1. Variabilidad en las características de los sujetos del estudio y, por ende, en sus muestras clínicas	193
8.2. Datos incompletos y aspectos clínicos no registrados de los individuos del estudio.....	195
8.3. Uso de un número reducido de muestras en la investigación.....	195
8.4. Calidad y cantidad de las muestras	195
8.5. Aspectos limitantes en la evaluación de la expresión de los miARNs	196
8.6. Incompatibilidad de los controles internos en la normalización de la expresión de los miARNs (qPCR).....	196
8.7. Uso de equipos distintos en la ultracentrifugación de las muestras de suero y de sobrenadante de esputo para la purificación de los exosomas	197
8.8. Problemas asociados a la investigación de la expresión de los miARNs y los genes <i>in vitro</i> en SAEC y BSMC.....	197
9. CONCLUSIONES	201
10. CONCLUSIONS	203
11. BIBLIOGRAFÍA	207
12. ANEXOS	243
12.1. Anexos de la sección materiales y métodos.....	243
12.2. Anexos de la sección resultados.....	244
13. PUBLICACIONES	247
13.1. Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral	247
13.2. Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.....	247



Resumen/summary

RESUMEN

Hacia la medicina de precisión en el asma: utilización de microARNs (miARNs) circulantes.

Introducción: El asma es una enfermedad respiratoria crónica caracterizada por la inflamación persistente de las vías respiratorias, la producción excesiva de moco, la obstrucción reversible y variable del flujo de aire, una hiperreactividad no específica de las vías aéreas y cambios estructurales que resultan en la aparición de síntomas y signos característicos, como sibilancias, dificultad para respirar, opresión torácica y tos. El asma se reconoce como una afección de alta complejidad en la que intervienen distintas células del sistema inmunológico, así como mediadores de la inflamación. Además, se considera una patología sumamente heterogénea debido a una marcada variabilidad en sus manifestaciones clínicas, la participación de diversos e intrincados mecanismos fisiopatológicos subyacentes y una variación considerable en las respuestas al tratamiento.

La heterogeneidad del asma ha impulsado la imperante necesidad de diferenciar entre fenotipo y endotipo y seguir su progresión, lo que ha conducido al desarrollo de una clasificación más precisa de esta condición respiratoria. La diversidad fenotípica y endotípica del asma la posiciona como una candidata idónea y, a su vez, supone un reto en el ámbito de la medicina personalizada de precisión (MPP). En este contexto, los marcadores biológicos representan una herramienta clínica de gran relevancia en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del asma. En la actualidad, los biomarcadores en el campo de la medicina del asma continúan siendo objeto de investigación dado que, lamentablemente, los que están disponibles por el momento no son lo suficientemente precisos, lo que motiva la continua búsqueda de biomarcadores más específicos. Los miARNs han emergido como una opción prometedora en múltiples afecciones, incluido el asma. Esto se debe a que, además de poder encontrarse en la circulación de forma libre o asociados a proteínas u otros componentes, son transportados protegidos en el interior de exosomas, y su expresión se ve alterada en estados patológicos, lo que sugiere que podrían ser biomarcadores excepcionales. Los miARNs son moléculas de ácido ribonucleico (ARN) no codificante (nc) de pequeño tamaño, de cadena sencilla y con una longitud aproximada de 21-25 nucleótidos. Estos tienen la capacidad de unirse al ARN mensajero (ARNm) complementario, inhibiendo la traducción a proteína, siendo elementos clave en la regulación postranscripcional.

Objetivos: El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue identificar perfiles de miARNs circulantes en sujetos asmáticos, agrupados según diferentes características clínicas. Se investigó la utilidad de estos miARNs séricos como posibles biomarcadores del asma, ayudando a caracterizar los distintos fenotipos y endotipos del asma. También, se trató de encontrar un perfil de miARNs vinculado al asma en el tejido pulmonar, que es el tejido afectado en el asma, lo que proporciona una perspectiva integral que podría conducir a una comprensión completa de los cambios moleculares en el asma. Asimismo, se examinó el contenido proteico de los exosomas presentes en el suero y en el sobrenadante de esputo de individuos con asma clasificados en base a la presencia o ausencia de eosinofilia en sangre periférica, lo que podría ofrecer información valiosa para comprender la enfermedad a nivel molecular, identificar biomarcadores y mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento.

Materiales y métodos: Para cumplir con los objetivos establecidos, se realizó un estudio de secuenciación de miARNs (miARNs-seq [seq; del inglés, *sequencing*]) séricos con la intención de detectar miARNs que

Resumen

mostrarán diferencias en su expresión entre sujetos asmáticos que exhibían diferentes particularidades clínicas, así como en tejido pulmonar entre individuos con y sin diagnóstico de asma. Estos miARNs fueron luego validados mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR; del inglés, *Reverse Transcription* y *quantitative Polymerase Chain Reaction*), y se recurrió al análisis estadístico para evaluar su viabilidad como biomarcadores y herramientas en la definición de los fenotipos y endotipos del asma. Además, se determinó la correlación entre los miARNs y las variables clínicas del asma. Se llevaron a cabo análisis *in silico* con el recurso bioinformático DIANA-miRPath v3.0 para identificar las vías de señalización y las rutas metabólicas reguladas por los miARNs alterados, con el propósito de descubrir posibles genes diana. Adicionalmente, se investigó un perfil predefinido de miARNs séricos en células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas (SAEC; del inglés, *Small Airway Epithelial Cells*) y células musculares lisas bronquiales (BSMC; del inglés, *Bronchial Smooth Muscle Cells*) con la finalidad de observar posibles modificaciones en su expresión tras el tratamiento con el glucocorticoide (GC) dexametasona. Por último, se caracterizó la composición proteica de los exosomas purificados de suero y sobrenadante de esputo.

Resultados: Este estudio ha evidenciado la existencia de dos perfiles específicos de miARNs circulantes en suero de pacientes asmáticos. Un perfil, que incluye los miARNs hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p, mostró diferencias significativas en su expresión entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como también entre estos grupos al contemplar la obesidad como comorbilidad (asma asociada y no asociada a la obesidad). El otro perfil, que comprende los miARNs hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p, exhibió diferencias significativas en su expresión entre pacientes asmáticos graves tratados y no tratados con glucocorticoides orales (GCOs). Sin embargo, estos 5 miARNs no experimentaron cambios significativos en su expresión en células estructurales del pulmón en respuesta a la dexametasona. Por otra parte, de los 7 miARNs séricos, se vieron diferencias significativas en la expresión de hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p y hsa-miR-769-5p en biopsias pulmonares entre sujetos con y sin diagnóstico de asma. Además, se apreciaron variaciones en el contenido proteico de exosomas entre ambos fenotipos de pacientes asmáticos, así como entre los dos tipos de muestras a partir de las cuales fueron purificados. Considerando también la correlación de estos miARNs con parámetros clínicos y su participación en procesos biológicos relacionados con la patogénesis del asma, los resultados apuntaron a que la expresión de estos miARNs podría ser útil tanto para el diagnóstico del asma como para la discriminación de los distintos fenotipos de pacientes asmáticos.

Conclusión: Los perfiles de miARNs desregulados en suero se revelaron como biomarcadores prometedores, capaces de distinguir entre diferentes grupos de pacientes con asma de acuerdo con sus características clínicas observables, tales como síntomas, signos y manifestaciones de la patología.

SUMMARY

Towards precision medicine in asthma: use of circulating microRNAs (miRNAs).

Background: Asthma is a chronic respiratory disease characterised by persistent inflammation of the airways, excessive mucus production, reversible and variable airflow obstruction, non-specific airway hyperresponsiveness and structural changes resulting in the appearance of characteristic symptoms and signs, such as wheezing, shortness of breath, chest tightness and cough. Asthma is recognised as an extraordinarily complex condition involving different cells of the immune system as well as inflammatory mediators. Furthermore, it is considered a highly heterogeneous pathology due to a marked variability in clinical manifestations, the involvement of diverse and intricate underlying pathophysiological mechanisms, and a considerable variation in responses to treatment.

The heterogeneity of asthma has driven the imperative to differentiate between phenotype and endotype and to follow its progression, leading to the development of a more accurate classification of this respiratory condition. The phenotypic and endotypic diversity of asthma positions it as a suitable candidate and, in turn, poses a challenge in the field of personalised precision medicine (PPM). In this context, biomarkers represent a clinical tool of great relevance in the diagnosis, prognosis, and treatment of asthma. Currently, biomarkers in the field of asthma medicine continue to be the subject of research as, unfortunately, those that are available at the moment are not sufficiently precise, which motivates the continuous search for more specific biomarkers. MiRNAs have emerged as a promising option in multiple conditions, including asthma. This is because, in addition to being found freely circulating or associated with proteins or other components, they are transported protected within exosomes, and their expression is altered in pathological states, suggesting that they may be unique biomarkers. MiRNAs are small, single-stranded non-coding (nc) ribonucleic acid (RNA) molecules of approximately 21-25 nucleotides in length. They have the ability to bind to complementary messenger RNA (mRNA), inhibiting translation to protein, being key elements in post-transcriptional regulation.

Objectives: The main objective of this Doctoral Thesis was to identify profiles of circulating miRNAs in asthmatic subjects, grouped according to different clinical characteristics. The usefulness of these serum miRNAs as potential asthma biomarkers was investigated, helping to characterise the distinct asthma phenotypes and endotypes. We also sought to find a profile of miRNAs linked to asthma in lung tissue, which is the affected tissue in asthma, providing a comprehensive perspective that could lead to a complete understanding of the molecular changes in asthma. We also examined the protein content of exosomes present in serum and sputum supernatant from individuals with asthma classified on the basis of the presence or absence of peripheral blood eosinophilia, which could provide valuable information for understanding the disease at the molecular level, identifying biomarkers and improving diagnostic and treatment strategies.

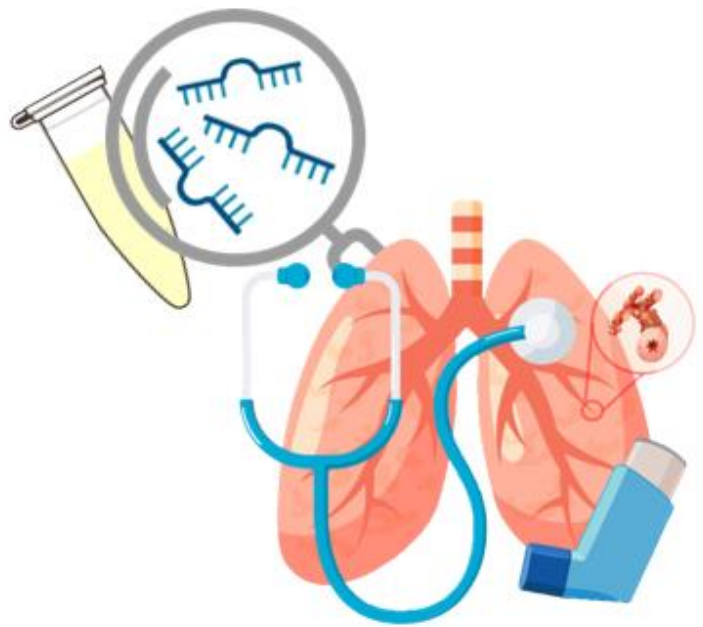
Materials and methods: To fulfil the established objectives, a serum miRNAs sequencing (miRNAs-seq) study was performed to detect miRNAs showing differences in expression between asthmatic subjects exhibiting different clinical particularities, as well as in lung tissue between individuals with and without a diagnosis of asthma. These miRNAs were then validated by reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and statistical analysis was used to assess their viability as

Summary

biomarkers and tools in defining asthma phenotypes and endotypes. In addition, the correlation between miRNAs and asthma clinical variables was determined. In silico analyses were performed with the DIANA-miRPath v3.0 bioinformatics tool to identify signalling and metabolic pathways regulated by altered miRNAs, with the aim of discovering potential target genes. Additionally, a predefined profile of serum miRNAs in small airway epithelial cells (SAEC) and bronchial smooth muscle cells (BSMC) was investigated to observe possible modifications in their expression after treatment with the glucocorticoid (GC) dexamethasone. Finally, the protein composition of exosomes purified from serum and sputum supernatant was characterised.

Results: This study has shown the existence of two specific profiles of circulating miRNAs in serum from asthma patients. One profile, which includes the miRNAs hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, showed significant differences in its expression between eosinophilic and non-eosinophilic asthma patients, as well as between these groups when considering obesity as a comorbidity (obesity-associated and non-obesity-associated asthma). The other profile, comprising the miRNAs hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 and hsa-miR-769-5p, exhibited significant differences in its expression between oral corticosteroids (OCS)-treated and non-OCS-treated severe asthma patients. However, these 5 miRNAs did not undergo significant changes in their expression in structural lung cells in response to dexamethasone. Moreover, of the 7 serum miRNAs, significant differences were seen in the expression of hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p and hsa-miR-769-5p in lung biopsies between subjects with and without a diagnosis of asthma. Furthermore, variations in the protein content of exosomes were observed between both phenotypes of asthma patients, as well as among the two types of samples from which they were purified. Considering also the correlation of these miRNAs with clinical parameters and their involvement in biological processes related to the pathogenesis of asthma, the results suggest that the expression of these miRNAs could be useful both for the diagnosis of asthma and for the discrimination of the distinct phenotypes of asthmatic patients.

Conclusion: Deregulated serum miRNAs profiles were shown to be promising biomarkers, capable of distinguishing between different groups of asthma patients according to their observable clinical characteristics, such as symptoms, signs, and manifestations of the pathology.



Abreviaturas

1. ABREVIATURAS

ABPA	Aspergilosis broncopulmonar alérgica.
ACT	Test de control del asma; del inglés, <i>Asthma Control Test</i> .
ADN/ DNA	Ácido desoxirribonucleico/ en inglés, <i>Desoxirribonucleic Acid</i> .
ADNc	ADN complementario o copia.
AE	Asma eosinofílica.
AGO/ AGOX	Argonauta/ Argonauta X (número[s]).
AIC	Criterio de información de Akaike (o índice de Akaike); del inglés, <i>Akaike's Information Criterion</i> .
AINE(s)	Antiinflamatorio(s) no esteroideo(s).
ANE	Asma no eosinofílica.
ANOVA	Análisis de la varianza; del inglés, <i>Analysis Of Variance</i> .
AO	Asma ocupacional.
APC(s)	Célula(s) presentadora(s) de antígenos; del inglés, <i>Antigen-Presenting Cell(s)</i> .
ARN(s)/ RNA(s)	Ácido ribonucleico(s)/ en inglés, <i>Ribonucleic Acid(s)</i> .
ARNm	ARN mensajero.
ARNasa	Nucleasa de ARN.
ARNnc	ARN no codificante.
ARNsn	ARN nuclear pequeño (sn; del inglés, <i>small nuclear</i>).
ARNpol(s)	ARN polimerasa(s).
ASMC	Células musculares lisas de las vías respiratorias; del inglés, <i>Airway Smooth Muscle Cells</i> .
AUC	Área bajo la curva; del inglés, <i>Area Under Curve</i> .
BAL	Lavado broncoalveolar; del inglés, <i>Bronchoalveolar Lavage</i> .
BCA	Ácido bicinconínico; del inglés, <i>Bicinchoninic Acid</i> .
BCHE	Butirilcolinesterasa (también llamada colinesterasa); del inglés, <i>Butyrylcholinesterase</i> .
BCR	Receptor de célula(s) B; del inglés, <i>B-Cell(s) Receptor</i> .
BSMC	Células musculares lisas bronquiales; del inglés, <i>Bronchial Smooth Muscle Cells</i> .
CCLX(s)	Ligando(s) X (número[s]) de quimiocinas de motivo C-C; del inglés, <i>C-C motif chemokine Ligand(s) X (number[s])</i> .
CCND1	Ciclina D1; del inglés, <i>Cyclin D1</i> .
CD(s)/ CDX(s)	Cúmulo(s) de diferenciación; del inglés, <i>Cluster(s) of Differentiation/ Cúmulo(s) de diferenciación X (número[s])</i> ; del inglés, <i>Cluster(s) of Differentiation X (number[s])</i> .
CDK6	Cinasa 6 dependiente de ciclina; del inglés, <i>Cyclin-Dependent Kinase 6</i> .
CEN(s)	Control(es) endógeno(s).
CEX	Control(es) exógeno(s).
CH(s)	Control(es) de hemólisis.
CI	Intervalo de confianza; del inglés, <i>Confidence Interval</i> .
CIBERES	Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias.
CLC	Cristal de Charcot-Leyden; del inglés, <i>Charcot-Leyden Cristal</i> .

Abreviaturas

cm	Centímetro(s).
Col.	Color.
COLXAX(s)	Cadena α X (número[s]) del(de los) colágeno(s) tipo X (número[s] romano[s]); del inglés, <i>Collagen(s) type X (Roman number[s]) α X (number[s]) chain</i> .
COX	Ciclooxigenasa.
Ct	Ciclo umbral; del inglés, <i>Cycle threshold</i> .
CXCL10	Ligando 10 de quimiocina de motivo C-X-C; del inglés, <i>C-X-C motif chemokine Ligand 10</i> .
DC(s)	Célula(s) dendrítica(s); del inglés, <i>Dendritic Cell(s)</i> .
DE	Desviación estándar.
DGCR8	Región crítica del síndrome de DiGeorge 8; del inglés, <i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i> .
E	Especificidad.
EBC	Condensado de aliento exhalado; del inglés, <i>Exhaled Condensate Breath</i> .
ECP	Proteína catiónica de eosinófilos; del inglés, <i>Eosinophil Cationic Protein</i> .
EDN o RNASE2	Neurotoxina derivada de eosinófilos; del inglés, <i>Eosinophil-Derived Neurotoxin</i> . Ribonucleasa 2; del inglés, <i>Ribonuclease 2</i> .
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético; del inglés, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> .
ELISA(s)	Ensayo(s) por inmunoabsorción ligado a enzimas; del inglés, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(s)</i> .
EPO o EPX	Peroxidasa de eosinófilos; del inglés, <i>Eosinophil Peroxidase</i> .
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
EREA	Enfermedad respiratoria exacerbada por ácido acetilsalicílico y antiinflamatorios no esteroideos.
ERK1/2	Cinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares; del inglés, <i>Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2</i> .
Exp-5	Exportina-5.
FasL	Ligando Fas; del inglés, <i>Fas Ligand</i> .
FC	Factor(es) de cambio; en inglés, <i>Fold Change(s)</i> .
FDR	Tasa de falsos descubrimientos; del inglés, <i>False Discoveries Rate</i> .
FeNO	Fracción de óxido nítrico exhalado; del inglés, <i>Fractional Exhaled Nitric Oxide</i> .
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; del inglés, <i>Forced Expiratory Volume in the first second</i> .
FLG	Filagrina; del inglés, <i>Filaggrin</i> .
FOXO3	<i>Forkhead Box O3</i> ; del inglés, <i>Forkhead Box O3</i> .
FVC	Capacidad vital forzada; del inglés, <i>Forced Vital Capacity</i> .
g	Fuerza g.
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; del inglés, <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i> .
GC(s)	Glucocorticoide(s); en inglés, <i>Glucocorticoid(s)</i> .
GCI(s)	Glucocorticoide(s) inhalado(s).
GCO(s)/ OGCs u OCS	Glucocorticoide(s) oral(es)/ en inglés, <i>Oral Glucocorticoid(s)</i> u <i>Oral Corticosteroid(s)</i> .
GCS	Glucocorticoide(s) sistémico(s).

GDP	Guanosín o guanosina difosfato (guanosina-5'[extremo 5']-difosfato); del inglés, <i>Guanosine Diphosphate</i> .
GEMA	Guía Española para el Manejo del Asma.
GH	Hormona del crecimiento; del inglés, <i>Growth Hormone</i> .
GHRH	Hormona liberadora de hormona del crecimiento; del inglés, <i>Growth Hormone-Releasing Hormone</i> .-
GINA	Iniciativa global para el asma; del inglés, <i>Global Initiative for Asthma</i> .
GO	Ontología de genes; del inglés, <i>Gene Ontology</i> .
GTP	Guanosín o guanosina trifosfato (guanosina-5'[extremo 5']-trifosfato); del inglés, <i>Guanosine Triphosphate</i> .
h	Hora(s).
HL	Hosmer-Lemeshow.
HLA-E	Antígeno de histocompatibilidad de clase I, cadena α E; del inglés, <i>Histocompatibility Antigen class I, α chain-E</i> .
HRB	Hiperrespuesta o hiperreactividad bronquial.
HRP	Peroxidasa de rábano; del inglés, <i>Horseradish Peroxidase</i> .
HSP(s)	Proteína(s) de choque térmico; del inglés, <i>Heat Shock Protein(s)</i> .
HUFJD	Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.
IFN- γ	Interferón- γ .
Ig(s)	Inmunoglobulina(s).
IGF(s)/ IGF-1	Factor(es) de crecimiento similar(es) a la insulina; del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor(s)</i> / Factor 1 de crecimiento similar a la insulina; del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor-1</i> .
IGFBP(s)/ IGFBP-3	Proteína(s) de unión al(a los) factor(es) de crecimiento similar(es) a la insulina; del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein(s)</i> / Proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3</i> .
IGF-1R	Receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina; del inglés, <i>Insulin-like Growth Factor-1 Receptor</i> .
IIS-FJD	Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz.
IL-X(s)	Interleucina(s)-X (número[s]).
ILCX(s)	Célula(s) linfoide(s) innata(s) de tipo X (número[s]); del inglés, <i>type X (number[s]) Innate Lymphoid Cell(s)</i> .
ILV(s)	Vesícula(s) intraluminal(es); del inglés, <i>Intraluminal Vesicle(s)</i> .
IL-XR(s)/ IL-XR α (s)	Receptor(es) de interleucina(s) X (número[s]); del inglés, <i>Interleukin-X (number[s]) Receptor(s)</i> / Subunidad α del(de los) receptor(es) de interleucina(s) X (número[s]); del inglés, <i>Interleukin-X (number[s]) Receptor(s) α subunit</i> .
IMC	Índice de masa corporal.
IQR	Rango intercuartílico o intercuartil; del inglés, <i>Interquartile Range</i> .
kDa	KiloDalton(s).
KEGG	Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas; del inglés, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> .
Kg	Kilogramo(s).

Abreviaturas

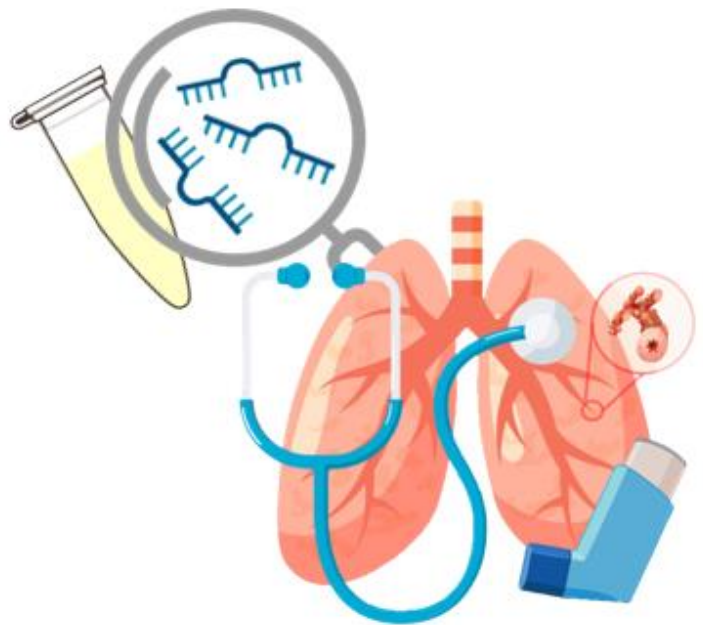
KU	Kilo unidad(es).
L	Litro(s).
LABA(s)	Agonista(s) β_2 adrenérgico(s) de acción prolongada; del inglés, <i>Long-Acting β_2 (adrenergic [adrenergic receptor, adrenoreceptor u adrenoceptor]) Agonist(s)</i> .
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función de linfocitos; del inglés, <i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i> .
Log ₂	Logaritmo en base 2.
m	Metro(s).
M	Molar.
mAb(s)	Anticuerpo(s) monoclonal(es); del inglés, <i>monoclonal Antibodie(s)</i> .
MAPK(s)/ MAPK3	Poteína(s) cinasa(s) activada(s) por mitógenos; del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase(s)</i> / Poteína cinasa 3 activada por mitógenos; del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 3</i> .
MBP o PRG2	Proteína básica mayor (o principal); del inglés, <i>Major Basic Protein</i> . Proteoglicano 2 (también llamada proteoglicano de la médula ósea); del inglés, <i>Proteoglycan 2</i> .
MEC	Matriz extracelular.
MEGA	Mecanismo(s) implicado(s) en la génesis y evolución del asma; del inglés, <i>Mechanisms involved in the Genesis and Evolution of Asthma</i> .
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad; del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i> .
miARN(s)/ miRNA(s)	MicroARNs(s)/ en inglés, <i>MicroRNA(s)</i> .
miRISC	Complejo de silenciamiento inducido por miARN; del inglés, <i>miARN-Induced Silencing Complex</i> .
min	Minuto(s).
mg	Miligramo(s).
mL	Mililitro(s).
mm	Milímetro(s).
mM	Milimolar (milimol/es).
MPP/ PPM	Medicina personalizada de precisión/ en inglés, <i>Personalised Precision Medicine</i> .
mTOR	Objetivo (diana) de la rapamicina en mamíferos; del inglés, <i>mammalian Target Of the Rapamycin</i> .
MV(s)	Microvesícula(s).
MVB(s)	Cuerpo(s) multivesicular(es); del inglés, <i>Multivesicular Bodie(s)</i> .
NF- κ B	Factor nuclear-kappa B; del inglés, <i>Nuclear Factor-Kappa B</i> .
ng	Nanogramo(s).
NGS	Secuenciación de nueva generación; del inglés, <i>Next Generation Sequencing</i> .
NK(s)	Asesina(s) natural(es) (célula[s]); del inglés, <i>Natural Killer (cell[s])</i> .
NL	Lavado nasal; del inglés, <i>Nasal Lavage</i> .
nm	Nanómetro(s).
NO	Óxido nítrico; del inglés, <i>Nitric Oxide</i> .
NS	No significativa(s)/o(s).
nt	Nucleótido(s).

n ^o X	Concentración de una solución. Ejemplos: 1X, concentración original o estándar y 2X, concentración duplicada en comparación con la original o estándar.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
p (p-valor)	Valor(es) de p; en inglés, <i>p-value(s)</i> .
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida; del inglés, <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> .
PBS	Solución salina tamponada con fosfato; del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> .
PC(s)/ PCA(s)	Componente(s) principal(es); del inglés, <i>Principal Component(s)</i> / Análisis de componentes principales; del inglés, <i>Principal Component Analysis(Analyses)</i> .
PEF	Pico (máximo) del flujo espiratorio; del inglés, <i>Peak Expiratory Flow</i> .
pg	Picogramo(s).
pH	Potencial de hidrógeno.
PI3K(s)	Fosfatidilinositol 3-cinasa(s); del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase(s)</i> .
POC	Punto de atención; del inglés, <i>Point Of Care</i> .
POSTN	Periostina.
ppb	Partes por billón.
pre	Precursor.
pri	Primario.
PSMBX(s)	Subunidad β tipo(s) X (número[s]) del proteasoma; del inglés, <i>Proteasome subunit β type(s) X (number[s])</i> .
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina (gen o proteína); del inglés, <i>Phosphatase and Tensin homolog</i> .
PVDF	Polifluoruro de vinilideno; del inglés, <i>Polyvinylidene Fluoride</i> .
q (q-valor)	Valor(es) de q; en inglés, <i>q-value(s)</i> .
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; del inglés, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> .
RA	Rinitis alérgica.
Rab(s)	Relacionada(s) con Ras en el cerebro; del inglés, <i>Ras-related in brain</i> .
Ran(s)	Proteína(s) nuclear(es) relacionada(s) con Ras; del inglés, <i>Ras-related nuclear protein(s)</i> .
RE	Retículo endoplásmico.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN; del inglés, <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> .
ROC	Característica operativa del receptor; del inglés, <i>Receiver Operating Characteristic</i> .
ROS	Especie(s) reactiva(s) del oxígeno; del inglés, <i>Reactive Oxygen Specie(s)</i> .
RPMI-1640	Instituto conmemorativo Roswell Park-1640 (medio); del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute-1640 (medium)</i> .
RP-LC-MS/MS	Cromatografía líquida de fase reversa acoplada a la espectrometría de masas en tándem; del inglés, <i>Reverse Phase-Liquid Chromatography-coupled with tandem Mass Spectrometry</i> .
RSC	Rinosinusitis crónica.
RSCcPN	RSC con pólipos nasales.

Abreviaturas

RT	Transcripción reversa o inversa; del inglés, <i>Reverse Transcription</i> .
S	Sensibilidad.
SABA(s)	Agonista(s) β_2 adrenérgico(s) de acción corta; del inglés, <i>Short-Acting β_2 (adrenergic [adrenergic receptor, adrenoreceptor u adrenoceptor]) Agonist(s)</i> .
SAEC	Células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas; del inglés, <i>Small Airway Epithelial Cells</i> .
SDS	Dodecilsulfato sódico; del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> .
s	Segundo(s).
seq	Secuenciación; del inglés, <i>sequencing</i> .
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales; del inglés, <i>Sex Hormone Binding Globulin</i> .
SIGLEC-X(s)	Lectina(s) X (número[s] o letra[s]) similar(es) a la inmunoglobulina de unión a ácido siálico; del inglés, <i>Sialic acid-binding Immunoglobulin-like Lectin(s)-X (number[s] or letter[s])</i> .
SLPI	Inhibidor de proteasa leucocitaria secretora (también llamada antileucoproteínasa); del inglés, <i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitor</i> .
T2	Tipo 2.
TA	Temperatura ambiente.
TCR	Receptor de célula(s) T; del inglés, <i>T-Cell(s) Receptor</i> .
TfR	Receptor de transferrina; del inglés, <i>Transferrin Receptor</i> .
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β ; del inglés, <i>Transforming Growth Factor-β</i> .
TGFBR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante- β ; del inglés, <i>Transforming Growth Factor-β Receptor 1</i> .
Th	T cooperador(es/as) (célula[s] o linfocito[s] T); del inglés, <i>T helper</i> .
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α ; del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> .
TNFR(s)	Receptor(es) del(de los) factor(es) de necrosis tumoral; del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor Receptor(s)</i> .
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> .
TRBP	Proteína de unión al ARN TAR; del inglés, <i>TAR RNA-Binding Protein</i> .
Tris-HCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano; del inglés, <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Hydrochloride</i> .
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica; del inglés, <i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i> .
U/ UI	Unidad(es)/ Unidad(es) internacional(es).
UCM	Universidad Complutense de Madrid.
UTR 3'	Región no traducida 3'; del inglés, <i>Untranslated Region 3'</i> .
v	Versión.
VB	Visita basal (visita inicial o primera visita).
VE(s)	Vesícula(s) extracelular(es).
VN	Verdadero(s) negativo(s).
VO	Vía oral.
VP	Verdadero(s) positivo(s).
vs.	<i>Versus</i> .

Å	Ángstrom(s).
µg	Microgramo(s).
µL	Microlitro(s).
µm	Micrómetro(s).
\bar{X}	Media(s) (media aritmética) (símbolo).
\wedge	$\bar{X} (\pm DE)$ (símbolo).
†	Mediana (IQR) (símbolo).
*	$p \leq 0,05$ (símbolo).
**	$p \leq 0,01$ (símbolo).
***	$p \leq 0,001$ (símbolo).
****	$p \leq 0,0001$ (símbolo).
↓	Menor abundancia (símbolo).
↑	Mayor abundancia (símbolo).



Introducción

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El asma: enfermedad respiratoria crónica

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define que las enfermedades crónicas son patologías que no se transmiten de persona a persona, de larga duración y, generalmente, de progresión lenta¹. Se distinguen, en función de la localización afectada, cuatro tipos principales de enfermedades crónicas: las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes².

Las enfermedades respiratorias crónicas afectan a las vías respiratorias y otras estructuras del pulmón, y se encuentran entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo^{3,4}. Se clasifican en restrictivas y obstructivas en base al patrón de deterioro fisiológico, medido con pruebas de función pulmonar⁵. Entre las enfermedades respiratorias crónicas de tipo restrictivo pueden encontrarse las enfermedades pulmonares intersticiales (como, por ejemplo, la fibrosis pulmonar idiopática), mientras que, en las de tipo obstructivo, los ejemplos más comunes, y más prevalentes, son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma^{6,7}. De entre las enfermedades respiratorias crónicas, y en concreto de entre las de tipo obstructivo, esta Tesis versará acerca de la patología asmática y su estudio.

2.1.1. Historia y epidemiología del asma

En cuanto a su origen, fue Hipócrates (460-370 a. C.) quien menciona por primera vez el asma como término médico. No obstante, en los *Tratados hipocráticos (Corpus Hippocraticum)*, una colección de unos 50 escritos médicos atribuidos clásicamente a Hipócrates, es difícil determinar si el término asma era usado para referirse a una entidad clínica independiente o meramente a un síntoma⁸. Ya en el siglo XII, Rabí Moshé ben Maimón (1135-1204), más conocido como Maimónides, escribió el *Libro del asma*, la primera monografía en la historia de la medicina sobre dicha afección, por encargo de un noble que padecía esta enfermedad pero, no fue hasta el siglo XX, cuando se produjo un gran impulso en el estudio y conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos, la clínica, el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad. Durante ese período se estableció la primera definición estandarizada del asma, la cual se atribuye fundamentalmente a los dos Simposios celebrados por la Fundación CIBA en 1959 y 1971⁹⁻¹¹. Desde entonces, la definición del asma ha sido sometida a numerosas variaciones. Aunque es una enfermedad común en niños y adultos, fácilmente reconocible por sus síntomas, su definición es ciertamente compleja y, en la actualidad, aún se desconocen muchos aspectos de su etiología y evolución.

Epidemiológicamente, se estima que alrededor de 300 millones de personas en todo el mundo sufren asma, y se calcula que esta cifra de afectados se verá incrementada en 100 millones para el año 2025¹². El asma es una de las principales enfermedades crónicas “no transmisibles” más comunes y se ha demostrado que tiene un impacto sustancial en la calidad de vida de las personas¹³. Existe una amplia variación geográfica en la prevalencia de esta patología, siendo más alta en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, en estos últimos, donde los medicamentos básicos no están disponibles y los pacientes tienen mayor dificultad para acceder a la atención médica, es probable que la prevalencia del asma esté infravalorada¹⁴. Además, la incidencia y prevalencia del asma son mayores en niños que en adultos¹⁵. No solo su elevada tasa en la población constituye un problema de salud pública mundial, sino que además es una de las enfermedades que causa mayor morbilidad, así

Introducción

como una mortalidad en torno a 0,2 muertes por cada 100.000 habitantes^{16,17}. Asimismo, es importante mencionar que, pese a que el asma grave afecta únicamente al 5-10% de la población asmática (representando esta el 5-10%, igualmente, de la población global), se asocia con mayor sintomatología, riesgo de exacerbación (agudización, ataque o crisis), morbilidad, mortalidad, gasto en salud y menor calidad de vida que el asma no grave¹⁸.

Por tanto, a causa de su elevado impacto clínico y social, y al alto coste sanitario que conlleva, el asma constituye un problema no resuelto de enorme interés sociosanitario y económico¹⁹.

2.1.2. Características clínicas y sintomatología del asma

Tanto la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) como la iniciativa global para el asma (GINA; del inglés, *Global Initiative for Asthma*) son guías de referencia para el abordaje del asma. Ambas guías han propuesto una definición consensuada del asma, considerando sus características clínicas, fisiológicas y patológicas, que la distinguen de otras condiciones respiratorias. En las dos guías, el asma se considera una enfermedad compleja, donde participan distintas células y mediadores de la inflamación, y heterogénea, que incluye diversos fenotipos clínicos que comparten manifestaciones clínicas similares, caracterizada normalmente por la inflamación crónica de las vías respiratorias, la hipersecreción de moco, la hiperrespuesta o hiperreactividad bronquial (HRB) y la obstrucción reversible, parcial o total, del flujo aéreo. Además, en ambas guías se incluyen los síntomas y signos (sibilancias, dificultad para respirar o disnea, opresión torácica y tos) que definen la patología, de predominio nocturno o de madrugada, variables en tiempo e intensidad, inespecíficos y recurrentes^{20,21}. En la figura 1 se observan las diferencias entre la vía respiratoria de un individuo sano (sin alteraciones) y la de un sujeto con asma (con alteraciones características del asma).

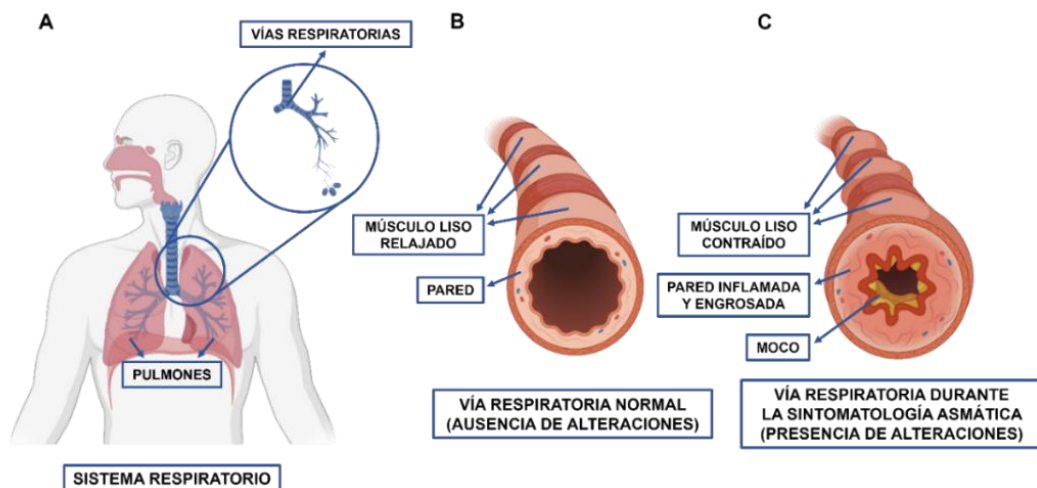


Figura 1. Alteraciones fisiológicas características del asma. A. Representación de la estructura general del sistema respiratorio. B. Vía respiratoria (bronquio) de un individuo sano (sin alteraciones). C. Vía respiratoria (bronquio) de un sujeto con asma (con alteraciones características del asma: hipertrofia del músculo liso bronquial, edema de la pared de la vía respiratoria [pared inflamada y engrosada], engrosamiento de la mucosa de la vía respiratoria, hipersecreción de moco y remodelado de la pared bronquial con el consiguiente estrechamiento del lumen). Figura creada con BioRender (BioRender.com).

2.1.3. Factores de riesgo y factores desencadenantes para el desarrollo del asma

En el desarrollo del asma es importante tener en cuenta la discriminación entre los factores de riesgo y los factores desencadenantes de los síntomas o de agudizaciones de la enfermedad²². Los factores de riesgo de la patología asmática son aquellos que se asocian a la aparición del asma, mientras que los factores desencadenantes de los síntomas o de agudizaciones de la enfermedad asmática son aquellos que, tras la exposición, desatan los síntomas o el agravamiento del asma^{23,24}.

Los factores de riesgo del asma o con mayor grado de asociación con la enfermedad asmática más estudiados, expuestos en la tabla 1, se clasifican dentro de los siguientes tipos: factores ambientales, factores del huésped, factores perinatales y fármacos²⁰.

Tabla 1. Factores de riesgo del asma o con mayor grado de asociación con la enfermedad asmática.

FACTORES DE RIESGO DEL ASMA	
Factores ambientales	Aeroalérgenos, alérgenos laborales, contaminación ambiental, infecciones respiratorias y tabaco
Factores del huésped	Atopia, hiperrespuesta bronquial, menarquia temprana, obesidad y rinitis
Factores perinatales	Cesárea, consumo de tabaco durante la gestación, dieta de la madre, dieta del lactante, edad de la madre, función pulmonar del neonato, ictericia neonatal, lactancia, preeclampsia y prematuridad
Fármacos	Antiácidos, antibióticos, paracetamol y Terapia Hormonal Sustitutiva (THS)

Los factores ambientales (alérgenos, contaminación del aire, infecciones respiratorias, tabaquismo) pueden influir drásticamente en el fenotipo de las enfermedades alérgicas, incluido el asma, y estos factores ambientales interactúan con factores del huésped, factores intrínsecos al individuo (principalmente genéticos), para promover el desarrollo y la progresión de las enfermedades alérgicas²⁵.

En relación con los factores del huésped, la atopia es una predisposición genética para producir inmunoglobulina (Ig) E y, por consiguiente, desarrollar una respuesta mediada por IgE en la patología asmática. Se considera el principal factor de riesgo para la aparición del asma alérgica o atópica, que es la forma más común del asma, afectando al 70-90% de los niños y al 50% de los adultos²⁶. Además, la HRB, un rasgo clínico característico de la enfermedad asmática, es un factor de riesgo para una disminución de la función pulmonar y el desarrollo del asma²⁷. Por otro lado, estudios epidemiológicos respaldan que las mujeres con menarquia temprana (≤ 11 años) y obesidad son más propensas a desarrollar asma y de mayor gravedad²⁸. Finalmente, la presencia de rinitis alérgica (RA), que afecta al 10-30% de la población general y comparte características fisiopatológicas comunes con la patología asmática, es un factor de riesgo identificado para el inicio del asma en adultos^{29,30}.

Puesto que el asma es la enfermedad crónica más frecuente en los niños y la prevalencia del asma infantil ha aumentado en los últimos años, la atención se ha centrado en los periodos prenatal y perinatal con la finalidad de reconocer factores de riesgo, los cuales podrían ayudar a predecir la aparición del asma^{31,32}. En referencia al tipo de parto, se ha demostrado una mayor probabilidad de padecer asma en los niños nacidos por cesárea que en los niños nacidos por vía vaginal³³. El tabaquismo materno durante el embarazo puede afectar a la función pulmonar posnatal del niño y, en consecuencia, esto puede conducir a un mayor riesgo de la patología asmática³⁴. Además, la nutrición materna durante la gestación puede

Introducción

influir en el riesgo de asma y otras enfermedades alérgicas en la descendencia, así como la alimentación infantil también se asocia con el desarrollo del asma, siendo la lactancia materna directa más protectora en comparación con la alimentación con la leche materna indirecta y la leche de fórmula^{35,36}. Igualmente, la edad de la madre en el momento del parto se ha relacionado con la presencia, en la niñez, de asma y alergia, pero el papel de este factor es susceptible de duda³⁷. Para concluir con los factores perinatales, se ha observado que la hiperbilirrubinemia neonatal, la preeclampsia y la prematuridad están vinculadas con un mayor riesgo de asma infantil³⁸⁻⁴⁰.

Por último, el consumo de ciertos medicamentos puede contribuir al riesgo de asma y alergia. El uso prenatal, durante el embarazo, de fármacos supresores de ácido puede aumentar el riesgo de la patología asmática en la descendencia⁴¹. También, la utilización de terapia antibiótica en los primeros años de vida se asocia con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad asmática⁴². Asimismo, estudios epidemiológicos apoyan que el consumo de paracetamol, tanto en el embarazo como en la infancia, aumentan el riesgo de asma durante la niñez posterior⁴³.

Por otra parte, es importante tener en cuenta los factores desencadenantes de los síntomas o de agudizaciones de la patología asmática, que se muestran en la tabla 2, porque pueden provocar situaciones graves y, por lo tanto, deben evitarse²⁰.

Tabla 2. Factores desencadenantes de los síntomas o de agudizaciones de la patología asmática.

FACTORES DESENCADENANTES DE LOS SÍNTOMAS O DE AGUDIZACIONES DEL ASMA	
Factores ambientales	Atmosféricos, domésticos, hongos y virus
Factores sistémicos	Fármacos, alimentos y otros
Factores laborales	Sustancias de peso molecular bajo: fármacos, anhídridos, disocianatos, maderas, metales y otros
	Sustancias de peso molecular alto: sustancias de origen vegetal, polvo y harinas, alimentos, enzimas vegetales, gomas vegetales, hongos y esporas, y enzimas animales

La exposición a factores ambientales de tipo atmosférico como la polución o contaminación del aire, sustancias nocivas, y pólenes, entre otros, pueden inducir síntomas del asma o exacerbaciones de la enfermedad, lo cual puede requerir atención médica e incluso hospitalización, en agudizaciones de la patología asmática^{44,45}. También, entre los factores ambientales de origen doméstico, los alérgenos, especialmente los que se encuentran en los excrementos de los ácaros del polvo, que comúnmente viven en el polvo del hogar, son aeroalérgenos que, por inhalación, desencadenan, como resultado, reacción alérgica, síntomas o exacerbaciones del asma (asma alérgica)⁴⁶. Además, dentro de este grupo de factores, varios microorganismos, como hongos y virus, se han relacionado con síntomas y agudizaciones de la enfermedad asmática^{47,48}. Los rinovirus son los patógenos más comunes de las exacerbaciones agudas del asma, en los niños en edad escolar, causadas por virus⁴⁹.

Del mismo modo, factores sistémicos como fármacos, alimentos u otros (por ejemplo, veneno de himenópteros) pueden causar síntomas y crisis del asma⁵⁰⁻⁵³.

En último lugar, se contemplan los factores laborales, donde el “asma relacionada con el trabajo” comprende tanto el asma ocupacional (AO) como el asma exacerbada por el trabajo (asma preexistente

agravada por el trabajo), siendo la exposición a agentes en el lugar de trabajo la causa en ambos casos⁵⁴. Se estima que, aproximadamente, el 15% de los casos de asma de inicio en la edad adulta son debidos a causas y condiciones atribuibles al entorno laboral⁵⁵. Los agentes causales pueden ser proteínas (o alérgenos) de bajo peso molecular (< 1 kiloDalton [kDa]) o de alto peso molecular (> 10 kDa). Los agentes de alto peso molecular causan sensibilización a través de un mecanismo mediado por IgE, mientras que, para los agentes de bajo peso molecular, los mecanismos inmunológicos exactos que conducen a la sensibilización de las vías respiratorias aún no se han caracterizado por completo⁵⁶. Se ha visto que en el AO ocasionado por agentes de bajo peso molecular puede haber mayor riesgo de exacerbación que en el AO debido a agentes de alto peso molecular⁵⁷.

No obstante, la exposición temprana a factores ambientales de riesgo asociados al asma podría tener efectos beneficiosos en la salud, comportándose como factores “protectores” que previenen el desarrollo posterior de la patología asmática y otras enfermedades alérgicas⁵⁸.

2.1.4. Fisiopatología del asma: elevada complejidad

Pese a la gran diversidad en el espectro de la sintomatología clínica del asma, la presencia de inflamación, que afecta a la vía respiratoria y está presente incluso cuando los síntomas son episódicos, es una característica patológica común⁵⁹. Sin embargo, la relación entre la intensidad de la inflamación y la gravedad del asma sigue sin haberse establecido sólidamente⁶⁰.

El fundamento de la inflamación crónica de las vías respiratorias en el asma, sobre la que surgen los síntomas, es la respuesta inmunitaria o inmune. Esta respuesta, que conlleva el desarrollo y la progresión hacia la cronicidad de la inflamación en el asma, resulta del papel crucial del epitelio de las vías respiratorias en la respuesta inmunitaria local, así como de las funciones inmunes innatas y adaptativas, que dependen de interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales^{61,62}.

El infiltrado inflamatorio del asma, tradicionalmente vinculado con un predominio de eosinófilos, puede estar constituido además por células dendríticas (DCs; del inglés, *Dendritic Cells*), linfocitos o células T (T cooperadoras, Th [del inglés, *T helper*]; Th1, Th2, y Th17, que se diferencian de las células T CD4⁺ [cúmulo de diferenciación, CD; del inglés, *Cluster of Differentiation*]), linfocitos o células B, basófilos, mastocitos, macrófagos y neutrófilos. Estas células liberan mediadores y otras moléculas que colaboran en el mantenimiento de la inflamación, la cual se vuelve crónica, y contribuye en conjunto al origen de los síntomas de la enfermedad⁶³.

A pesar de que las respuestas inmunitarias de Tipo 2 (T2) permiten la defensa del huésped frente a infecciones causadas por parásitos extracelulares, como los helmintos, su activación anómala y crónica tiene como resultado enfermedades inflamatorias de tipo alérgico como el asma, entre otras⁶⁴.

La respuesta inmunitaria T2 (Th2-alta, T2-alta o, sencillamente, T2; figura 2) se desencadena en el asma alérgica o atópica, caracterizada por un infiltrado eosinofílico, la activación de mastocitos y la producción de IgE⁶⁵. No obstante, en el asma no alérgica o no atópica, puede ocurrir una respuesta T2 con un infiltrado rico en eosinófilos, o una respuesta inmunitaria no T2 (Th2-baja, T2-baja o, simplemente, no T2), que se identifica por un infiltrado neutrofílico, o eosinofílico y neutrofílico⁶⁶.

Introducción

En la respuesta T2 alérgica (figura 2), las DCs inmaduras migran desde la médula ósea hacia las vías respiratorias, guiadas por moléculas quimioatrayentes como los ligandos 2 y 20 de quimiocinas de motivo C-C (CCL2 y CCL20; del inglés, *C-C motif chemokine Ligands 2 and 20*), liberadas por el epitelio respiratorio activado⁶⁷. Estas células capturan y procesan los antígenos (alérgenos), madurando y adquiriendo la capacidad de células presentadoras de antígenos (APCs; del inglés, *Antigen-Presenting Cells*)⁶⁸. Además, las células del epitelio de las vías respiratorias producen y secretan citocinas como interleucina (IL)-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP; del inglés, *Thymic Stromal Lymphopoietin*), conocidas como alarminas, en respuesta a desencadenantes ambientales como alérgenos, bacterias, virus, contaminantes (por ejemplo, el humo de tabaco) o superantígenos, lo que promueve la inflamación Th2 al modular la función de APCs en las DCs⁶⁹.

Las DCs presentan los alérgenos procesados al receptor de células T (TCR; del inglés, *T-Cells Receptor*) vírgenes, en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; del inglés, *Major Histocompatibility Complex*) de clase II⁶⁸. La activación de células T requiere, adicionalmente, la interacción entre las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (o B7-1 y B7-2, respectivamente) en las DCs y su receptor CD28 en las células T, resultando en células T CD4⁺ activadas⁷⁰. Las DCs activadas, por tanto, se movilizan a los ganglios linfáticos donde activan a células T, actuando como nexo entre la inmunidad innata y adaptativa⁷¹. Este proceso involucra al receptor 7 de quimiocinas de motivo C-C (CCR7; del inglés, *C-C motif chemokine Receptor 7*), expresado en las DCs, y a sus ligandos 19 y 21 de quimiocinas de motivo C-C (CCL19 y CCL21; del inglés, *C-C motif chemokine Ligands 19 and 21*), secretados principalmente en regiones paracorticales ricas en células T de los nódulos linfáticos⁷².

Tras su activación, las células T CD4⁺ se diferencian en células Th2 en presencia de IL-4, lo que conlleva la activación de la señalización dependiente del transductor de la señal y activador de la transcripción 6 (STAT6; del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) y esto, a su vez, la expresión de GATA3, ambos factores de transcripción⁷³. Las células Th2 activadas producen y liberan citocinas proinflamatorias T2 como IL-4, IL-5 e IL-13, responsables de iniciar y preservar la respuesta T2⁷⁴. Análogamente, las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2s; del inglés, *type 2 Innate Lymphoid Cells*) también secretan estas citocinas en respuesta a las alarminas producidas y liberadas por el epitelio respiratorio⁷⁵. Las ILC2s se activan rápidamente durante la fase temprana de la respuesta T2, cooperando con las células Th2 en esta respuesta inmunitaria^{76,77}. El descubrimiento de las ILC2s cuestionó la visión tradicional de que solo la respuesta inmunitaria adaptativa impulsa la respuesta T2, incorporando a las ILC2s como nuevas protagonistas en ella y el asma alérgica⁷⁵.

La IL-4, derivada de basófilos, eosinófilos, mastocitos, células asesinas naturales (NKs; del inglés, *Natural Killers*) o células Th2, está implicada en la polarización de células T CD4⁺ a células Th2 y, junto con la IL-13, promueve la producción de anticuerpos IgE en las células B^{78,79}. En una segunda exposición después de la sensibilización a un antígeno, los anticuerpos IgE unidos a su receptor de alta afinidad FcεRI (épsilon, ε) en basófilos y mastocitos provocan su activación, desencadenando la degranulación y liberación de mediadores que inducen broncoconstricción, inflamación y remodelación de las vías respiratorias⁸⁰. La IL-5 es vital para la maduración, proliferación, activación, supervivencia y reclutamiento de eosinófilos en las vías respiratorias⁸¹. Las eotaxinas (eotaxinas 1-3 o ligandos 11, 24 y 26 de quimiocinas de motivo C-C [CCL11, CCL24 y CCL26; del inglés, *C-C motif chemokine Ligands 11, 24 and 26*]), producidas y liberadas por las células del epitelio respiratorio, actúan como quimioatrayentes de

eosinófilos. Estos migran desde el endotelio vascular hacia las vías respiratorias, mediado por integrinas como integrina $\alpha 4 \beta 1$ (alfa, α ; beta, β) o antígeno 4 muy tardío (VLA-4; del inglés, *Very Late Antigen-4*) en los eosinófilos y la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1; del inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) en el endotelio vascular^{82,83}. En las vías respiratorias, los eosinófilos activados se degranulan, liberando una variedad de mediadores, que incluyen proteínas básicas o catiónicas como la proteína básica mayor (MBP; del inglés, *Major Basic Protein*), la proteína catiónica de eosinófilos (ECP; del inglés, *Eosinophil Cationic Protein*) y la peroxidasa de eosinófilos (EPO; del inglés, *Eosinophil Peroxidase*), junto con moléculas tóxicas como el óxido nítrico (NO; del inglés, *Nitric Oxide*) y las especies reactivas del oxígeno (ROS; del inglés, *Reactive Oxygen Species*), además de diversas citocinas y quimiocinas. Estos mediadores causan daño en las vías respiratorias y contribuyen a la inflamación y remodelación de las mismas⁸⁴. Finalmente, las citocinas T2 están implicadas en la hipersecreción de moco, la fibrosis subepitelial y la hiperreactividad del músculo liso⁷⁷.

Resta mencionar que la respuesta T2 se beneficia de la regulación a la baja de moléculas inmunosupresoras sobre las respuestas mediadas por células Th2, como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β ; del inglés, *Transforming Growth Factor- β*), secretadas por las células T reguladoras (T regs)⁸⁵.

En el asma no alérgica (figura 2), puede producirse una respuesta T2 con infiltrado rico en eosinófilos, o una respuesta no T2 que implica otros mecanismos inmunológicos y se caracteriza por un infiltrado neutrofílico (asma neutrofílica) o por un infiltrado eosinofílico y neutrofílico (asma paucigranulocítica). El fenotipo paucigranulocítico se distingue del fenotipo mixto, los dos con infiltrado eosinofílico y neutrofílico, por la proporción de estos tipos celulares. Se observa un porcentaje inferior de ambos tipos celulares en el fenotipo paucigranulocítico, en comparación con los valores establecidos para estos tipos celulares en los fenotipos eosinofílico y neutrofílico, y un porcentaje superior en el fenotipo mixto⁸⁶.

En el asma, además de las células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas (SAEC; del inglés, *Small Airway Epithelial Cells*), otras células estructurales como las células musculares lisas bronquiales (BSMC; del inglés, *Bronchial Smooth Muscle Cells*), células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos también secretan mediadores inflamatorios que favorecen el mantenimiento de la inflamación⁸⁷. Por ejemplo, tanto las SAEC como las BSMC producen y liberan periostina (POSTN), que actúa en la reparación del epitelio dañado, pero, si el proceso de reparación epitelial es aberrante, impulsa la producción de matriz extracelular (MEC) y la fibrosis subepitelial⁸⁸.

En resumen, la respuesta inmunitaria en el asma conlleva la inflamación crónica de las vías respiratorias, sobre la que surgen los síntomas, y cambios estructurales característicos englobados en lo que se conoce como remodelado de las vías aéreas, que incluye: engrosamiento de la capa reticular de la membrana basal, fibrosis subepitelial, hipertrofia e hiperplasia de la musculatura lisa bronquial, proliferación y dilatación de los vasos, hiperplasia de las glándulas mucosas e hipersecreción de moco, y que se asocia a una progresiva pérdida de la función pulmonar⁸⁹. También, la contracción de la musculatura lisa bronquial y la HRB son características de la fisiopatología del asma⁹⁰.

Introducción

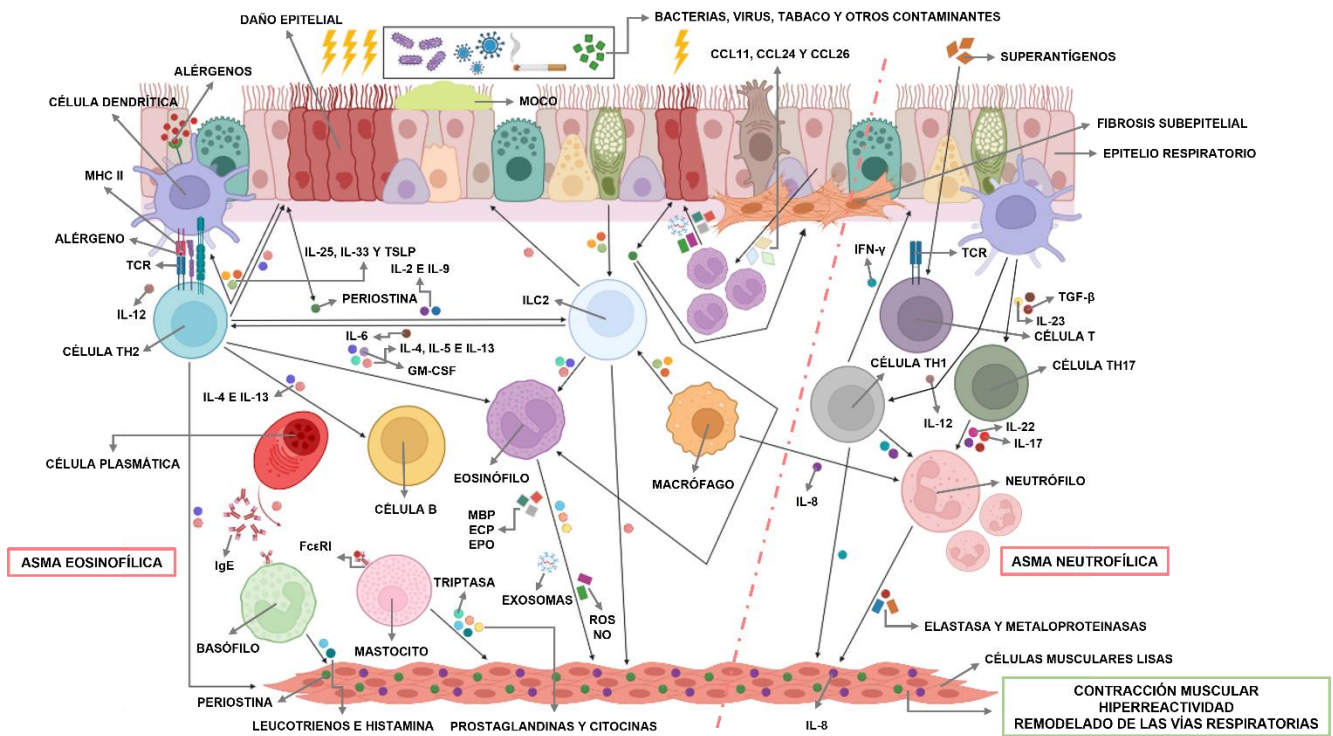


Figura 2. Fisiopatología del asma. Representación de los componentes de la inmunidad innata y adaptativa en el asma, así como las consecuencias en las vías respiratorias de la respuesta inmunitaria en esta patología. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

2.1.5. Fenotipos y endotipos: heterogeneidad del asma

La heterogeneidad propia del asma hace que la enfermedad asmática se considere un síndrome integrado por un conjunto de fenotipos clínicos que comparten manifestaciones clínicas similares, pero de etiologías y con pronósticos diferentes⁹¹. Dado que, los signos y síntomas clínicos que describen la patología asmática no son específicos del asma, pues se ponen de manifiesto en otras enfermedades respiratorias, y, además, difieren inclusive en cuanto a su presentación en individuos asmáticos, es precisa la deducción y vinculación entre ellos, teniendo en consideración su naturaleza, inicio, desencadenantes y respuesta terapéutica al tratamiento⁹². De modo que, clasificar en subgrupos fundamentados en distintos fenotipos, definidos por las características observables (clínicas, fisiológicas, morfológicas, bioquímicas y respuesta al tratamiento) sin relación directa con el proceso fisiopatológico implicado (pero incluyendo la fisiología, los desencadenantes y los parámetros inflamatorios), tiene como propósito identificar a los sujetos asmáticos candidatos a recibir tratamientos dirigidos y eficaces⁹¹.

Actualmente, desde el punto de vista clínico, el asma se caracteriza por una amplia variedad de fenotipos diferentes. La primera clasificación del asma distinguía, atendiendo a su origen, a si el asma se desencadenaba o no por alérgenos, entre los fenotipos de asma alérgica y asma no alérgica, siendo el asma alérgica, en la actualidad, el fenotipo del asma más común. Como se citó previamente, la respuesta T2 (en la que intervienen células Th2) se activa en el asma alérgica. Sin embargo, en el asma no alérgica también puede desencadenarse una respuesta T2 con infiltrado rico en eosinófilos, siendo células protagonistas en ambos fenotipos^{65,66,93,94}

Ahora bien, desde esta primera categorización, se han propuesto diversos fenotipos del asma en base a diferentes características como la edad de inicio o aparición, el desencadenante, la clínica, el patrón inflamatorio y el fenotipo molecular. Según la edad de inicio o aparición del asma se puede diferenciar entre asma de inicio temprano (asma infantil) y asma de inicio tardío (asma en adultos). El asma de inicio temprano (< 12 años) se asocia, por lo común, con la alergia mientras que el asma de inicio tardío se inicia o aparece, como su nombre indica, en la edad adulta, es más frecuente en mujeres y, a diferencia del asma de inicio temprano o de la niñez, muchas veces cursa sin alergia^{95,96}. En función del desencadenante, se han propuesto los siguientes fenotipos: asma inducida por alérgenos ambientales (asma alérgica) u ocupacionales (AO), por ejercicio, por la menstruación, por tabaquismo u otros irritantes y por aspirina^{97,98}.

Conforme a variables clínicas como gravedad, exacerbaciones, tratamiento, limitación del flujo aéreo y comorbilidades (por ejemplo, obesidad), se han designado otros fenotipos: asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada y asma persistente grave, asma con exacerbaciones graves, asma refractaria al tratamiento (individuos con asma dependiente de glucocorticoides [GCs; también llamados corticosteroides o corticoides]), asma con limitación fija al flujo aéreo (a causa de la remodelación bronquial) y asma en sujetos obesos (síntomas graves)⁹⁷. De acuerdo con la celularidad del foco inflamatorio (patrón inflamatorio), en cuya determinación es esencial la citología de esputo, sangre y características clínicas, se consideran los siguientes fenotipos: asma eosinofílica (a menudo, alérgica y con buena respuesta a glucocorticoides inhalados [GCIs]), asma neutrofílica (normalmente, en individuos con patología grave, con exacerbaciones y con peor respuesta a GCIs), asma mixta granulocítica (eosinofílica y neutrofílica) y asma paucigranulocítica (porcentaje de eosinófilos y neutrófilos inferior a los valores estipulados a tomar en consideración para estos tipos celulares en los fenotipos eosinofílico y neutrofílico)⁹⁹. Finalmente, mediante el estudio de marcadores moleculares específicos, la enfermedad asmática puede dividirse en los fenotipos (y también endotipos) asma T2 (o Th2-alto o T2-alto) y asma no T2 (o Th2-bajo o T2-bajo)¹⁰⁰.

Hoy día, por tanto, se acepta que los fenotipos del asma se agrupan en tres grandes grupos (no excluyentes entre sí): fisiológicos (edad de inicio o aparición y clínica), relacionados con desencadenantes, e inflamatorios (patrón inflamatorio y marcadores moleculares). Se admite que puede haber solapamiento entre las distintas categorías, y un sujeto asmático puede pasar de un fenotipo a otro¹⁰¹. En la tabla 3 se muestran los fenotipos del asma contemplados hasta el momento.

Pese a que los fenotipos del asma son realmente útiles, no están por necesidad vinculados directamente con el proceso fisiopatológico involucrado y, por consiguiente, se propusieron los endotipos del asma, definidos como “subtipos o entidades de una condición o enfermedad determinados funcional y fisiopatológicamente por un mismo mecanismo molecular”, fundamentándose en que múltiples mecanismos fisiopatológicos pueden ser causa de un mismo fenotipo, posibilitando así la subtipificación de los fenotipos basándose en el proceso fisiopatológico subyacente¹⁰². Fundamentalmente, desde que se introdujo el término endotipo hasta la fecha, se conocen sobre todo dos endotipos del asma, asma T2 y asma no T2, pero existen endotipos, formulados a partir de fenotipos descritos anteriormente, como: asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), asma hipereosinofílica de inicio tardío y enfermedad respiratoria exacerbada por ácido acetilsalicílico y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Introducción

(EREA)^{91,103}. En la tabla 4 se muestran los últimos cuatro endotipos del asma mencionados y una breve descripción de estos.

Tabla 3. Fenotipos del asma.

FENOTIPOS DEL ASMA		
CLASIFICACIÓN (SEGÚN)	FENOTIPOS	
Origen (desencadenamiento o no por alérgenos)	Asma alérgica (extrínseca)	
	Asma no alérgica (intrínseca)	
Edad de inicio o fisiología	Asma de inicio precoz (< 12 años; suele ser alérgica)	
	Asma de inicio tardío (se inicia en la edad adulta; sobre todo en mujeres y suele cursar sin alergia)	
Desencadenante	Asma alérgica (inducida por alérgenos ambientales u ocupacionales)	
	Asma inducida por ejercicio	
	Asma inducida por menstruación	
	Asma inducida por tabaquismo u otros irritantes	
Clínica o fisiología	Asma inducida por aspirina	
	Asma según la gravedad	Asma intermitente
		Asma persistente leve
		Asma persistente moderada
		Asma persistente grave
	Asma con exacerbaciones graves	
	Asma refractaria al tratamiento (sobre todo en pacientes sin alergia y asma dependiente de GCs)	
	Asma con limitación fija al flujo aéreo (por remodelación bronquial; por síndrome de solapamiento asma y EPOC)	
Asma y obesidad (con síntomas graves)		
Patrón inflamatorio (celularidad del foco inflamatorio)	Asma eosinofílica (suele ser alérgica y tener buena respuesta a GCIs, en general)	
	Asma neutrofílica (suele darse en pacientes con enfermedad y exacerbaciones graves, con peor respuesta a GCIs)	
	Asma mixta granulocítica (eosinofílica y neutrofílica)	
	Asma paucigranulocítica	
Marcadores moleculares (fenotipo molecular)	Asma T2 (o Th2-alto o T2-alto)	
	Asma no T2 (o Th2-bajo o T2-bajo)	

Tabla 4. Endotipos del asma.

ENDOTIPOS DEL ASMA
Asma alérgica (generalmente, inicio en la infancia y asociada a manifestaciones atópicas; eosinofilia bronquial y proceso fisiopatológico subyacente T2)
ABPA (asma mixta granulocítica, IgG e IgE específicas para <i>Aspergillus</i> y episodios de broncoespasmo, entre otros)
Asma hipereosinofílica de inicio tardío (hipereosinofilia; posibles agudizaciones graves, que pueden ser prevenidas por el empleo de glucocorticoides sistémicos [GCS], pero no de GCIs)
EREA (asma inducida por ácido acetilsalicílico y AINEs o intolerancia a ácido acetilsalicílico y AINEs)

Por último, debido a la heterogeneidad y complejidad del asma, cabe aludir a la puesta en práctica de la medicina personalizada de precisión (MPP) con el fin de optimizar la elección del tratamiento específico y adecuado dependiendo del fenotipo y endotipo de los pacientes asmáticos¹⁰⁴. Por otra parte, para la

caracterización de los fenotipos y endotipos del asma propuestos, es clave el estudio de biomarcadores (y sus dianas) moleculares específicos, campo que, por el momento, se encuentra en desarrollo y aplicación para las terapias biológicas¹⁰⁵.

2.1.5.1. Asma grave: asma eosinofílica y asma dependiente de GCs (glucocorticoides orales [GCOs; en inglés, *Oral Glucocorticoids* u *Oral Corticosteroids* (OGCs u OCS)])

La gravedad del asma es una propiedad inherente de la enfermedad, que evidencia la intensidad de las anomalías fisiopatológicas que originan síntomas, e implica tanto la intensidad del proceso, como la respuesta al tratamiento¹⁰⁶. La evaluación de la gravedad se lleva a cabo, habitualmente, con efecto retroactivo al control y tratamiento del asma (es decir, cuando el asma está controlada y el tratamiento ha sido pautado), y se clasifica en base a las necesidades de tratamiento de mantenimiento requeridas para alcanzar el control de los síntomas y las exacerbaciones¹⁰⁷. Por regla general, el asma se ha clasificado en función de la gravedad, conforme con las directrices estipuladas por la guía GEMA, distinguiéndose, según parámetros clínicos y funcionales, cuatro categorías: asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderada y asma persistente grave²⁰. La siguiente tabla (tabla 5) muestra los escalones de gravedad del asma en adultos propuestos por la guía GEMA.

Tabla 5. Gravedad del asma en adultos.

	INTERMITENTE	PERSISTENTE LEVE	PERSISTENTE MODERADA	PERSISTENTE GRAVE
Síntomas diurnos	No (2 veces o menos a la semana)	Más de 2 veces a la semana	Síntomas a diario	Síntomas continuos (varias veces al día)
Medicación de alivio (SABA)	No (2 veces o menos a la semana)	Más de 2 veces a la semana, pero no a diario	A diario	Varias veces al día
Síntomas nocturnos	No más de 2 veces al mes	Más de 2 veces al mes	Más de 1 vez a la semana	Frecuentes
Limitación de la actividad	Ninguna	Algo	Bastante	Mucha
Función pulmonar (FEV ₁ o PEF; % teórico)	> 80%	> 80%	> 60% a < 80%	≤ 60%

*SABA, agonista β_2 adrenérgico de acción corta (del inglés, *Short-Acting β_2 adrenergic [adrenergic receptor] Agonist*); FEV₁, volumen espiratorio forzado en el primer segundo (del inglés, *Forced Expiratory Volume in the first second*); PEF, pico (máximo) del flujo espiratorio (del inglés, *Peak Expiratory Flow*).

El asma grave constituye un síndrome heterogéneo con múltiples variantes clínicas¹⁰⁸. El asma eosinofílica representa aproximadamente el 84% del asma grave y se caracteriza por la presencia de eosinófilos en esputo, en biopsias bronquiales y en sangre, aún con un tratamiento con dosis altas de GCs¹⁰⁹. Los eosinófilos, una de las principales células inflamatorias implicadas en la patogenia del asma, se convirtieron en el sello distintivo del asma eosinofílica, que involucra, principalmente, células Th2, pero también las ILC2s¹¹⁰.

Los eosinófilos (figura 3) son un tipo de glóbulos blancos o leucocitos polimorfonucleares, de núcleo bilobulado, y aproximadamente 10-20 micrómetros (μm) de diámetro, que proceden de progenitores pluripotentes de la médula ósea y se caracterizan por poseer numerosos gránulos secretores, intracelulares, contenidos en el citoplasma, con un metabolismo muy activo, que almacenan la mayoría

Introducción

de las proteínas granulares catiónicas y una variedad de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento¹¹¹. El recuento de eosinófilos en esputo y en sangre es esencial para el fenotipado de pacientes con asma eosinofílica. Además, otros biomarcadores, definidos como características específicas que se miden y evalúan objetivamente, como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica, han demostrado ser valiosos para la tipificación del asma eosinofílica, en particular aquellos relacionados con la inflamación T2, como la fracción de óxido nítrico exhalado (FeNO; del inglés, *Fractional Exhaled Nitric Oxide*) y los niveles de IgE en suero^{112,113}. Son indicativos del asma eosinofílica recuentos de eosinófilos en esputo > 3%, en sangre periférica > 300 × 10⁶/L, o < 150 × 10⁶/L durante el tratamiento con GCOs (GCS administrados por vía oral [VO]), FeNO > 50 partes por billón (ppb), o pérdida del control del asma después de una reducción de ≤ 25% en la dosis regular de GCs (GCIs o GCOs)^{20,84}. Por otro lado, una elevada producción y liberación de IL-5, principal regulador de la biología del eosinófilo, podría ser indicativa de inflamación eosinofílica, contribuyendo, por lo tanto, a la identificación del asma eosinofílica¹¹⁰. En cuanto a las características clínicas, este fenotipo del asma puede cursar con rinosinusitis crónica (RSC) con pólipos nasales (PN) (RSCcPN) y estar asociado tanto con sensibilidad a la aspirina (desarrollo de la EREA) como con insensibilidad a GCs (dependencia de GCs)^{114–116}.

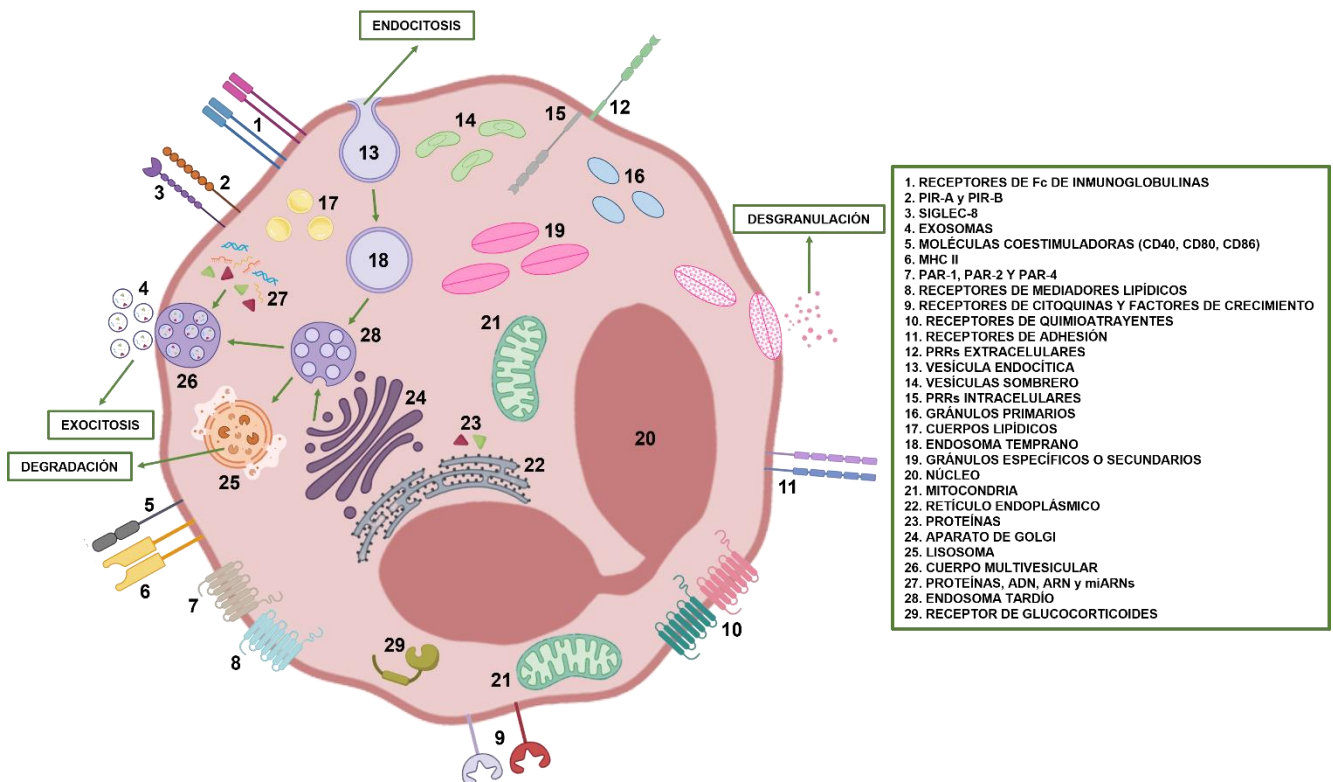


Figura 3. Estructura y composición de un eosinófilo de sangre periférica. *PIR (receptor emparejado similar a inmunoglobulina; del inglés, *Paired Immunoglobulin-like Receptor*); SIGLEC-8 (lectina 8 similar a inmunoglobulina de unión a ácido siálico; del inglés, *Sialic acid-binding Immunoglobulin-like Lectin-8*); PAR (receptor activado por proteasa; del inglés, *Protease-Activated Receptor*); ácido desoxirribonucleico (ADN); ácido ribonucleico (ARN); microARNs (miARNs). Figura creada con BioRender (BioRender.com).

El asma grave, definida como aquella que requiere tratamiento con GCIs en dosis altas más un segundo control (por lo general, agonistas β_2 adrenérgicos de acción prolongada [LABAs; del inglés, *Long-Acting β_2 adrenergic (adrenergic receptor) Agonists*]) o GCOs, afecta aproximadamente al 5-10% de la población

asmática y se asocia con un aumento de la mortalidad y la morbilidad, disminución de la calidad de vida y mayores gastos en salud^{18,117}.

2.1.6. Comorbilidades del asma

El término “comorbilidades” hace referencia a enfermedades que se desarrollan de manera simultánea, aunque se utiliza mayormente para señalar dos patologías que repercuten mutuamente¹¹⁸. Con frecuencia, el asma se acompaña de diversas comorbilidades que influyen en su gravedad¹¹⁹. Cada comorbilidad adicional se asocia a una disminución clínicamente significativa de la calidad de vida¹²⁰. Sin embargo, distinguir una comorbilidad de una enfermedad coexistente puede resultar difícil. La principal diferencia entre ambas es que las comorbilidades contribuyen a la fisiopatología del asma y provocan sus exacerbaciones, mientras que las enfermedades coexistentes no lo hacen. En cualquier caso, tanto comorbilidades como enfermedades coexistentes deben identificarse y tratarse de forma adecuada¹¹⁹.

Las comorbilidades son más frecuentes en pacientes con asma grave que en aquellos con patología leve a moderada o en la población general, y pueden ser de dos tipos, pulmonares o extrapulmonares^{118,121,122}. La prevalencia de comorbilidades en pacientes asmáticos varía según diferentes estudios, pero es superior principalmente en mujeres asmáticas de edad avanzada, antiguos fumadores (exfumadores) y pacientes con asma dependientes de GCs¹²³. Las comorbilidades pulmonares, o del tracto respiratorio, afectan concretamente a los tractos respiratorios superior y medio/inferior. Entre las comorbilidades del tracto respiratorio superior asociadas al asma, se encuentran: la apnea obstructiva del sueño, la RSC, la poliposis nasal, la RA y la disfunción de las cuerdas vocales u obstrucción laríngea inducible¹²¹. La respiración disfuncional, la EPOC y las bronquiectasias son comorbilidades que afectan expresamente al tracto respiratorio medio/inferior¹¹⁸. Por su parte, entre las comorbilidades extrapulmonares más comunes del asma son: la enfermedad por reflujo gastroesofágico, la enfermedad cardiovascular, la obesidad, la diabetes mellitus, la ansiedad y la depresión¹²⁴. Considerando que los resultados de esta Tesis Doctoral revelaron una posible asociación con la obesidad, el siguiente apartado se centrará en el desarrollo de esta comorbilidad.

2.1.6.1. Obesidad

La preobesidad (o el sobrepeso) y la obesidad son un auténtico problema de salud pública, responsables de un mayor riesgo de varias enfermedades cardiovasculares, metabólicas/endocrinas y respiratorias/pulmonares, entre otras¹²⁵. En las últimas décadas, la prevalencia de la obesidad ha crecido en todo el mundo¹²⁶. La obesidad es un factor de riesgo tanto para la incidencia como para la prevalencia del asma, y su impacto es mayor en mujeres adultas, siendo el número de mujeres con asma más elevado en comparación con el de hombres, en adultos^{127,128}. Numerosas investigaciones han señalado la coexistencia de la obesidad y el asma, lo que apunta a una vinculación entre ellos, pero, sin embargo, la vía de causalidad aún debe dilucidarse^{129,130}. El nexo entre la obesidad y el asma deriva de una interacción compleja de factores genéticos, de estilo de vida y ambientales¹³¹.

La obesidad es una comorbilidad importante del asma, especialmente del asma grave, ligada a una mayor gravedad, un peor control (incrementa la dificultad para controlar el asma), un aumento del riesgo de exacerbaciones y una reducción de la calidad de vida¹³². Alrededor del 60% de los adultos con asma

Introducción

grave son obesos^{129,133}. Los individuos con asma y obesidad pueden dividirse fundamentalmente en dos grupos: aquellos con asma de inicio temprano complicada por obesidad, y aquellos con asma de aparición tardía como consecuencia de la obesidad¹³⁴. Además, en el asma obesa puede encontrarse tanto una respuesta T2 como no T2¹³⁵.

Con frecuencia, los pacientes con asma obesos muestran una asociación con un fenotipo no eosinofílico, caracterizado por un asma de inicio tardío en mujeres de mediana edad y cierta resistencia a los tratamientos actuales, incluidos los GCs, lo que limita las opciones terapéuticas y dificulta el control del asma. La obesidad tiende a relacionarse con una inflamación sistémica de bajo grado, caracterizada por la activación de macrófagos y de células T CD8⁺ (células T citotóxicas), así como por un aumento de los niveles de marcadores inflamatorios, como el receptor 4 tipo Toll (TLR4; del inglés, *Toll-Like Receptor 4*), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α ; del inglés, *Tumor Necrosis Factor- α*), el Interferón- γ (IFN- γ ; gamma, γ), la IL-1 β , la IL-6, la IL-17, la leptina y la resistina^{135,136}.

La obesidad ocasiona modificaciones notables en la fisiología pulmonar normal. El exceso de acumulación de grasa en el mediastino y la cavidad abdominal resulta en la compresión pulmonar y la consiguiente reducción del volumen pulmonar¹³⁷. La tracción radial del parénquima pulmonar en torno a las vías respiratorias se reduce con volúmenes pulmonares insuficientes, lo que propicia el colapso de las vías aéreas¹²⁹. Además, el asma en personas con obesidad se asocia con un aumento de la HRB¹³⁸.

Finalmente, dado que la obesidad forma parte del síndrome metabólico, se cree que existe una relación entre el síndrome metabólico y el asma, es decir, que el síndrome metabólico puede contribuir a la patogenia del asma^{139,140}. La IL-6 sérica, un marcador del síndrome metabólico, aumenta en pacientes con mal control del asma¹⁴¹. Asimismo, los marcadores inflamatorios sistémicos son más altos en la obesidad, y las adipocinas, producidas por las células adiposas, ejercen un papel en la fisiopatología del asma asociada a la obesidad¹³⁴. Los macrófagos M1 y M2 pueden coexistir en diversos órganos y poseer diferente repercusión sobre el asma y la obesidad. Por tanto, es factible que la inflamación mediada por macrófagos M1 en el tejido adiposo de los sujetos con obesidad agrave la inflamación asmática pulmonar mediada por macrófagos M2¹⁴².

2.1.6.1.1. Eje hormona del crecimiento (GH; del inglés, *Growth Hormone*)-factor de crecimiento similar a la insulina (IGF; del inglés, *Insulin-like Growth Factor*): obesidad y asma

El eje GH-IGF (figura 4) es esencial para el crecimiento y desarrollo, con funciones anabólicas y metabólicas importantes¹⁴³. La hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH; del inglés, *Growth Hormone-Releasing Hormone*), producida en el hipotálamo y liberada al sistema porta hipofisario, estimula la síntesis y secreción de la GH por las células somatotropas de la adenohipófisis (hipófisis anterior)¹⁴⁴. La GH promueve la generación de factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1; del inglés, *Insulin-like Growth Factor-1*) en varios tejidos, aunque la mayoría del IGF-1 circulante se origina en el hígado por los hepatocitos¹⁴⁵. Además de su papel en el crecimiento, tanto la GH como el IGF-1 regulan el metabolismo de las grasas, las proteínas y la glucosa¹⁴⁶.

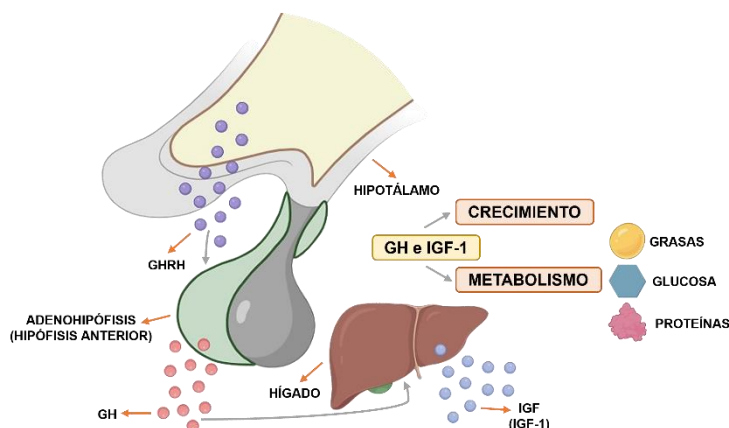


Figura 4. Eje GH-IGF. La GHRH hipotalámica induce la síntesis y liberación de GH por las células somatotropas de la adenohipófisis. La GH estimula la producción de IGF (IGF-1), principalmente en el hígado. Ambas hormonas desempeñan un papel esencial no solo en el crecimiento, sino también en la regulación del metabolismo de grasas, proteínas y glucosa. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

IGF-1 es un péptido monocatenario de 70 aminoácidos que, por su similitud estructural con la insulina, es capaz de unirse al receptor de insulina (IR; del inglés, *Insulin Receptor*), pero con menor afinidad que hacia el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R; del inglés, *Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*). IGF-1R es un receptor heterotetrámero, constituido por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por enlaces disulfuro. Tras la unión de IGF-1 a las subunidades α extracelulares de IGF-1R, los dominios quinasa intracelulares de las subunidades beta transmembrana se activan, lo que lleva a la autofosforilación de residuos de tirosina específicos y la posterior activación de vías de señalización, la vía de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K; del inglés, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*)/la proteína cinasa B (PKB; del inglés, *Protein Kinase B*) o AKT/objetivo (diana) de la rapamicina en mamíferos (mTOR; del inglés, *mammalian Target Of the Rapamycin*), que controla el metabolismo y la transcripción para promover el crecimiento o la supervivencia celular, y la vía de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK; del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*)/quinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2; del inglés, *Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2*), que arbitra las señales mitogénicas, de diferenciación y migratorias^{147,148}.

La biodisponibilidad de IGF-1 está regularizada por las proteínas de unión a los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFBPs; del inglés, *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*), que se unen a IGF-1 circulante y facilitan su transporte y prolongan su vida media¹⁴³. De las seis IGFBPs que se conocen, la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3; del inglés, *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3*) es la más abundante en suero y con mayor afinidad por IGF-1, siendo la IGFBP más común¹⁴⁹. El IGF-1 unido a las IGFBPs (IGFBP-3) no está activo. La liberación de IGF-1, ya sea a través del equilibrio químico o de la proteólisis mediada por proteasas de su unión a las IGFBPs (IGFBP-3), posibilita su unión a IGF-1R en la superficie celular, desencadenando así una cascada de señalización dentro de la célula¹⁵⁰. En la figura 5 se muestran el receptor IGF-1R inactivado y el receptor IGF-1R activado tras el acoplamiento de su ligando, el IGF-1.

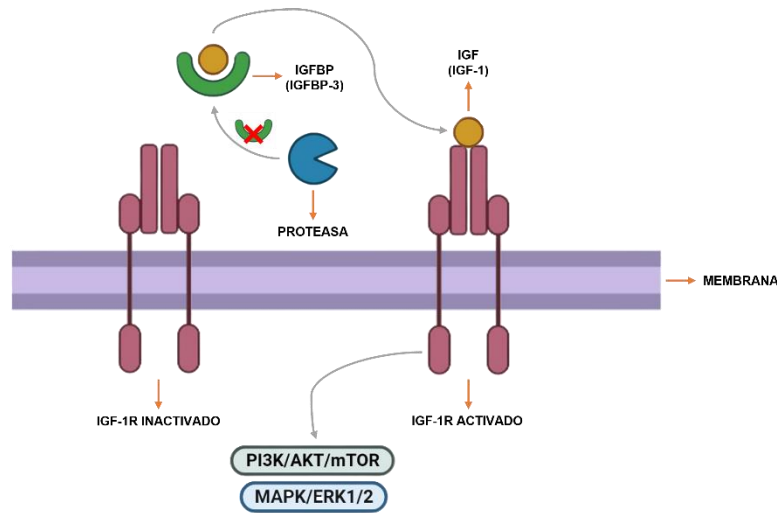


Figura 5. Receptor IGF-1R inactivado (a la izquierda) y activado (a la derecha). Tras la proteólisis de IGFBPs (IGFBP-3) por proteasas, el IGF-1 libre se une a su receptor, IGF-1R, en la superficie celular, lo que provoca la activación de las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y MAPK/ERK1/2. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

El eje GH-IGF desempeña un papel crucial en los procesos fisiológicos como el metabolismo, y las alteraciones en este sistema pueden estar implicadas en una variedad de condiciones patológicas, incluyendo la obesidad¹⁵¹. La obesidad se caracteriza por una secreción disminuida de GH, mientras que los valores de IGF-1 son controvertidos. Se ha descrito que los niveles circulantes de IGF-1 son normales, reducidos o, incluso, elevados en individuos obesos¹⁵². Esto insinúa que, pese al descenso en la liberación de GH en la obesidad, no hay asociación con la producción de IGF-1¹⁴⁶.

Cabe destacar la aportación de la vía de señalización de IGF-1 en enfermedades pulmonares inflamatorias, como el asma¹⁵³. Se ha reconocido a IGF-1 como una de las moléculas clave en la patogénesis del asma ya que ejerce funciones relevantes, contribuyendo sobre todo en la inflamación de las vías aéreas, en la HRB, en la fibrosis subepitelial y en la hiperplasia de las células musculares lisas de las vías respiratorias¹⁵⁴. Se han identificado niveles de expresión de IGF-1 significativamente superiores en biopsias endobronquiales de sujetos con asma, que se restablecen, en parte, con los GCs¹⁵⁵. La deficiencia de IGF-1R mitiga la respuesta inflamatoria¹⁵⁶. De modo que, los GCs, que son base del tratamiento del asma, parecen impedir la señalización de IGF-1/IGF-1R¹⁵⁷.

Se ha señalado que IGFBP-3 asume un rol vital en la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias, tanto de manera dependiente como independiente de IGF-1. IGFBP-3 aminora la inflamación y la HRB mediante la activación de caspasas (activación secuencial de caspasa-8 y caspasas efectoras-3,6 y 7), tras la interacción con su receptor, el receptor de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3R; del inglés, *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Receptor*), y la inhibición del factor nuclear-kappa (κ) B (NF- κ B; del inglés, *Nuclear Factor-Kappa B*)¹⁵⁴. Además, debido a su alta afinidad de unión con IGF-1 en comparación con IGF-1R, IGFBP-3 puede capturar a IGF-1, restringiendo su disponibilidad para la señalización de IGF-1/IGF-1R. Esto sugiere que IGFBP-3 podría funcionar como un reservorio de IGF-1, liberándolo gradualmente para su unión a IGF-1R, lo que podría regular a la baja la actividad de IGF-1R^{158,159}. Por lo tanto, la vía de señalización de IGF-1 podría ser trascendente en el tratamiento del asma y los desequilibrios en estos componentes los posicionan como posibles biomarcadores de la enfermedad¹⁵³.

2.1.7. Tratamiento del asma

Hasta ahora, no existe cura absoluta para el asma, posiblemente a causa de su enorme complejidad y heterogeneidad¹¹⁸. No obstante, actualmente hay tratamientos disponibles con el objetivo de, según la guía GEMA, “lograr y mantener el control de la enfermedad lo antes posible, prevenir las exacerbaciones y la obstrucción crónica al flujo aéreo, y reducir la mortalidad”²⁰. Estos medicamentos se clasifican en tratamientos de control o mantenimiento y de alivio o “rescate” (a demanda) de acuerdo a su régimen de dosificación¹²⁰. Para alcanzar y preservar el control del asma se establecen seis escalones terapéuticos (tabla 6) dependiendo de la respuesta y evolución del paciente²⁰.

Desde la década de 1950, cuando se utilizó por primera vez la cortisona en aerosol para el tratamiento del asma bronquial, los GCs constituyen la base de la terapia, siendo habitualmente administrados junto con LABAs o agonistas β_2 adrenérgicos de acción corta (SABAs; del inglés, *Short-Acting β_2 adrenergic [adrenergic receptor] Agonists*)^{121,122}. Según la guía GEMA, el uso de GCs está indicado en forma inhalada en cinco de los seis escalones terapéuticos, y como opción alternativa, por vía sistémica (VS) o VO, en el último escalón²⁰. Estos reducen la inflamación de las vías respiratorias y se consideran los agentes antiinflamatorios más efectivos para tratar la enfermedad pulmonar inflamatoria, mientras que los agonistas β_2 adrenérgicos actúan como broncodilatadores, a través de los receptores adrenérgicos β_2 de las células del músculo liso de las vías respiratorias, relajando la musculatura lisa^{123,124}.

El uso de GCs alivia los síntomas del asma, recupera la función pulmonar y disminuye las exacerbaciones¹⁶⁰. Aunque los GCIs son los más eficaces y comúnmente utilizados en el tratamiento del asma, la respuesta varía considerablemente entre individuos^{123,161}. Los GCOs se reservan para casos de asma grave no controlada con otras alternativas terapéuticas o, como terapia a corto plazo, para las exacerbaciones graves que no responden al tratamiento habitual¹⁶². Sin embargo, se recomienda, según la guía GEMA, restringir su uso en las crisis moderadas o graves sin mejoría con broncodilatadores, sobre todo en niños²⁰. La falta de adherencia al tratamiento y la presencia de exacerbaciones graves son indicadores clave del asma parcialmente controlada o no controlada¹⁶³. Estas exacerbaciones graves se identifican por la necesidad de usar GCOs o dosis aumentadas de tratamiento de mantenimiento, así como por requerir visitas a urgencias u hospitalización, incluso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)¹⁶⁴. Los GCOs pueden provocar más efectos adversos que los GCIs, por lo que se indican cuando los beneficios superan los riesgos para el paciente¹⁶⁵.

Es importante destacar las terapias biológicas, anticuerpos monoclonales (mAbs; del inglés, *monoclonal Antibodies*; omalizumab, mepolizumab, reslizumab, benralizumab, dupilumab y tezepelumab) que actúan sobre moléculas específicas de la respuesta inmunitaria. Estas, recientemente introducidas en la práctica clínica y que continúan en desarrollo, se aplican en pacientes con asma grave no controlada cuando las opciones terapéuticas convencionales no son efectivas. Su administración debe ser personalizada, de modo que cada sujeto reciba el tratamiento específico (anti-IgE, anti-IL-5, anti-receptores de IL-4 e IL-5 [IL-4R e IL-5R; del inglés, *Interleukin-4 and 5 Receptors*], anti-TSLP) que restablezca los mecanismos afectados en su fisiopatología particular. De ahí que, la investigación actual también se centra en la búsqueda de biomarcadores que permitan predecir la respuesta a las terapias biológicas disponibles^{166,167}.

Tabla 6. Tratamiento del asma (escalones terapéuticos) en adultos.

		ESCALONES TERAPÉUTICOS					
		BAJAR ←					→ SUBIR*
		Escalón 1	Escalón 2	Escalón 3	Escalón 4	Escalón 5	Escalón 6
TRATAMIENTO DE MANTENIMIENTO	De elección	-	GCI a dosis bajas	GCI a dosis bajas + LABA	GCI a dosis medias + LABA	GCI a dosis altas + LABA	Tratamiento del escalón anterior + biológico según fenotipos: omalizumab, mepolizumab, reslizumab, benralizumab, dupilumab
	Otras opciones	-	ARLT	GCI a dosis medias	GCI a dosis medias + ARLT GCI a dosis medias + LABA + LAMA**	Si mal control, añadir uno o más: - LAMA** - ARLT y/o - Teofilina y/o - Azitromicina	Si fracaso opciones previas: Termoplastia endobronquial Si persiste mal control, considerar: - Glucocorticoide VO - Triamcinolona IM
	A demanda	SABA o GCI + formoterol o GCI + salbutamol	SABA o GCI + formoterol o GCI + salbutamol (sin tratamiento de mantenimiento)	SABA o GCI + formoterol	SABA o GCI + formoterol	SABA o GCI + formoterol	SABA o GCI + formoterol

Educación, control ambiental, tratamiento de la rinitis y otras comorbilidades						
Considerar inmunoterapia con alérgenos						

*Tras confirmar la correcta terapéutica y empleo de inhalador/es. **tiotropio o glicopirronio.

2.2. Los exosomas y los microARNs (miARNs): implicación en la fisiopatología del asma y potencial como biomarcadores de la patología asmática

Las células se enfrentan a diversas condiciones adversas, como el estrés oxidativo, la alta temperatura y agentes químicos, que pueden causar daño y, eventualmente, muerte celular¹⁶⁸. La exposición de las células a estímulos externos requiere que comuniquen su estado a células en diferentes ubicaciones. Esta comunicación intercelular es esencial para coordinar las funciones celulares, especialmente en los organismos multicelulares, asegurando su desarrollo, adaptación ambiental y mantenimiento de la homeostasis^{169,170}. Una gran diversidad de factores solubles y material genético, liberados por las células estructurales e inmuno-inflamatorias de las vías respiratorias, están implicados en la comunicación célula-célula^{169,171}. Los exosomas y los miARNs son potenciales transmisores de información entre las células, generando un mecanismo de comunicación y regulación intercelular eficiente^{172,173}. Estos elementos están involucrados en el proceso fisiopatológico del asma y podrían servir como biomarcadores de la enfermedad¹⁷⁴.

2.2.1. Los exosomas: biogénesis, estructura y función

Las vesículas extracelulares (VEs) son estructuras esféricas secretadas por la mayoría de los tipos celulares al medio extracelular, con variaciones en tamaño, carga, composición de la membrana, biogénesis y función biológica. Estas VEs juegan un papel importante en la comunicación celular y en la liberación de moléculas solubles al exterior celular, así como en el contacto directo entre células¹⁷⁵. Se clasifican en tres subgrupos según su tamaño, biogénesis y liberación¹⁷⁶:

- Exosomas. Son las VEs más pequeñas (40-120 nanómetros [nm] de diámetro). Derivan de la vía endocítica, donde los materiales celulares o extracelulares se internalizan en vesículas denominadas endosomas. Tras su maduración, los endosomas se fusionan con los lisosomas para la degradación de su carga o con la membrana plasmática celular, liberando las vesículas intraluminales (ILVs; del inglés, *Intraluminal Vesicles*) como exosomas al espacio extracelular.

- Microvesículas (MVs; conocidas como ectosomas, micropartículas o partículas de desprendimiento). Son las VEs de tamaño mediano (100-1.000 nm de diámetro). Se forman por la gemación externa de la membrana plasmática celular, seguido de la fisión y liberación al medio extracelular.
- Cuerpos apoptóticos. Son las VEs más grandes (500-4.000 nm de diámetro). Originadas durante la muerte celular programada; una célula que sufre apoptosis destruye su contenido celular, el cual se engloba en vesículas adheridas a la membrana plasmática celular (cuerpos apoptóticos).

Los exosomas son pequeñas VEs (nanovesículas) que contienen proteínas, lípidos, ácidos nucleicos como fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm) y miARNs, y otros metabolitos¹⁷⁰. Se secretan al exterior celular y ejercen una función sustancial en la comunicación entre células. Una vez liberados, pueden ser captados por las células próximas o en localizaciones lejanas al lugar de secreción, alcanzadas viajando a través del torrente sanguíneo, ocasionando cambios en la célula receptora derivados de la liberación de su contenido¹⁷⁷.

Se ha vuelto crucial comprender los mecanismos mediante los cuales los exosomas modulan la homeostasis celular y tisular, así como en el sistema inmune, especialmente en enfermedades inflamatorias como el asma. Se ha demostrado que los exosomas tienen un impacto en el microambiente inflamatorio, resaltando su relevancia en este campo^{178,179}.

2.2.1.1. Biogénesis: origen de los exosomas

El sistema endosomal-lisosomal es un conjunto de compartimentos membranosos intracelulares dinámicos que participan en el transporte, clasificación y degradación de proteínas transmembrana, receptores, ligandos de receptores y proteínas solubles extracelulares internalizadas. Este sistema comprende endosomas tempranos, endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares (MVBs; del inglés, *Multivesicular Bodies*) y lisosomas¹⁸⁰.

El proceso de formación de los exosomas comienza con la endocitosis de la membrana plasmática celular en forma de omega (Ω), dando origen a los endosomas tempranos¹⁷⁷. Estos maduran en endosomas tardíos, donde la gemación interna de la membrana de los endosomas tempranos genera ILVs, que contienen componentes del citosol (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y son ricas en ácido lisobisfosfatídico (LBPA; del inglés, *Lysobisphosphatidic Acid*)^{175,180,181}. Los endosomas tardíos se desarrollan y se convierten en MVBs, llamados así por sus características morfológicas¹⁷⁷. Finalmente, los MVBs se transportan hasta la membrana plasmática, a través del citoesqueleto y la red de microtúbulos, y se fusionan con ella, liberando las ILVs al espacio extracelular como exosomas. No obstante, algunos MVBs pueden fusionarse con los lisosomas, que contienen hidrolasas ácidas, para la degradación de su contenido^{177,182}. En la figura 6 se ilustra el proceso de biogénesis de los exosomas.

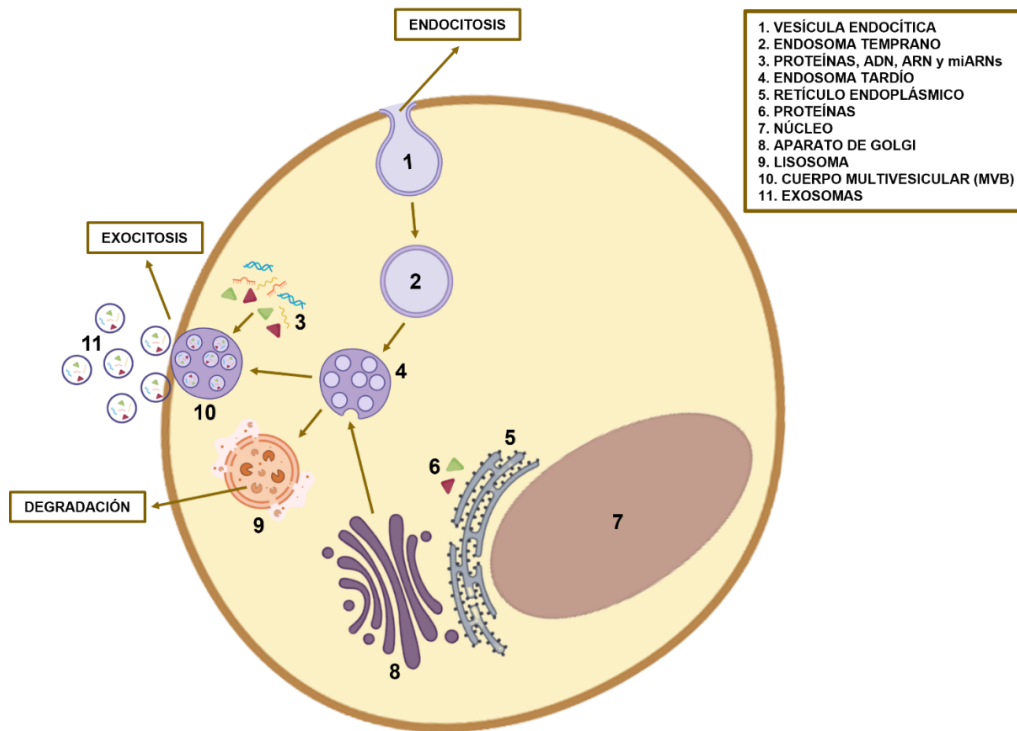


Figura 6. Proceso de biogénesis de los exosomas. La endocitosis de la membrana plasmática da lugar al endosoma temprano, el cual madura y se convierte en el endosoma tardío. La gemación de la membrana del endosoma temprano hacia el interior origina las ILVs. Los endosomas tardíos son posteriormente denominados MVBs debido a sus características morfológicas. Los MVBs pueden fusionarse con los lisosomas como con la membrana plasmática celular, liberando así las ILVs como exosomas al medio extracelular. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

2.2.1.2. Morfología y composición molecular de los exosomas

Los exosomas están compuestos, generalmente, por una membrana de bicapa lipídica y contienen proteínas, lípidos, ácidos nucleicos como fragmentos de ADN, ARN (ARNm, miARNs y ARN no codificante [ARNnc]), y otros metabolitos¹⁸³. La membrana de bicapa lipídica (fosfolipídica) refleja la composición de la membrana plasmática de la célula de origen, con altos niveles de colesterol, esfingomielina y ceramida, incluyendo dominios de membrana designados como balsas lipídicas (en inglés, *lipid rafts*)¹⁸⁴. El lumen incorpora principalmente proteínas citosólicas derivadas de la célula de procedencia¹⁸⁵. La morfología y la composición molecular de los exosomas se presentan en la figura 7.

Las tetraspaninas, como CD9, CD63, CD81 y CD82, son las proteínas exosómicas de superficie más comunes. Además, otras moléculas existentes en la superficie son: MHC de clase I y II, moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, lípidos (ácido fosfatídico, colesterol, ceramidas, esfingolípidos, fosfolípidos, gangliósidos y flotilina), moléculas de adhesión (integrinas, molécula 1 de adhesión intercelular [ICAM-1; del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule-1*], antígeno 1 asociado a la función de linfocitos [LFA-1; del inglés, *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*] y P-selectina), glucoproteínas (β -galactosidasa, O-glucanos y N-glucanos), y proteínas y receptores de señalización (ligando Fas [FasL; del inglés, *Fas Ligand*], receptor del factor de necrosis tumoral [TNFR; del inglés, *Tumoral Necrosis Factor Receptor*] y receptor de transferrina [TfR; del inglés, *Transferrin Receptor*])^{172,177,186,187}.

En el interior de los exosomas se encuentran proteínas que indican su origen endosomal (sintenina, ALG-2 [ALIX; del inglés, *ALG-2-Interacting protein X*], proteína que codifica el gen 101 de susceptibilidad tumoral [TSG101; del inglés, *Tumor Susceptibility Gene 101*]), junto con proteínas de choque térmico (HSPs; del inglés, *Heat Shock Proteins*), proteínas del citoesqueleto (actina, cofilina, miosina y tubulina), proteínas implicadas en el transporte y fusión de membranas (anexinas, dinamina, flotilina, GTPasas [guanosín o guanosina trifosfato/guanosina-5'(extremo 5')-trifosfato, GTP; del inglés, *Guanosine Triphosphate* (por ejemplo, relacionado con Ras en el cerebro [Rab; del inglés, *Ras-related in brain*] GTPasas]) y syntaxina), proteínas asociadas a los lisosomas (LAMPs; del inglés, *Lysosomal-Associated Membrane Proteins* [proteína 1 de membrana asociada a los lisosomas, LAMP-1; del inglés, *Lysosomal-Associated Membrane Protein-1*]), factores de crecimiento y citocinas (TGF- β , TNF- α y ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral [TRAIL; del inglés, *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*]), enzimas del metabolismo (ATPasas [adenosín o adenosina trifosfato, ATP; del inglés, *Adenosine Triphosphate*], enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa [GAPDH; del inglés, *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*] y piruvato quinasa) y ácidos nucleicos (fragmentos de ADN, ARNm, miARNs, ARNnc)^{172,175,177,188-190}.

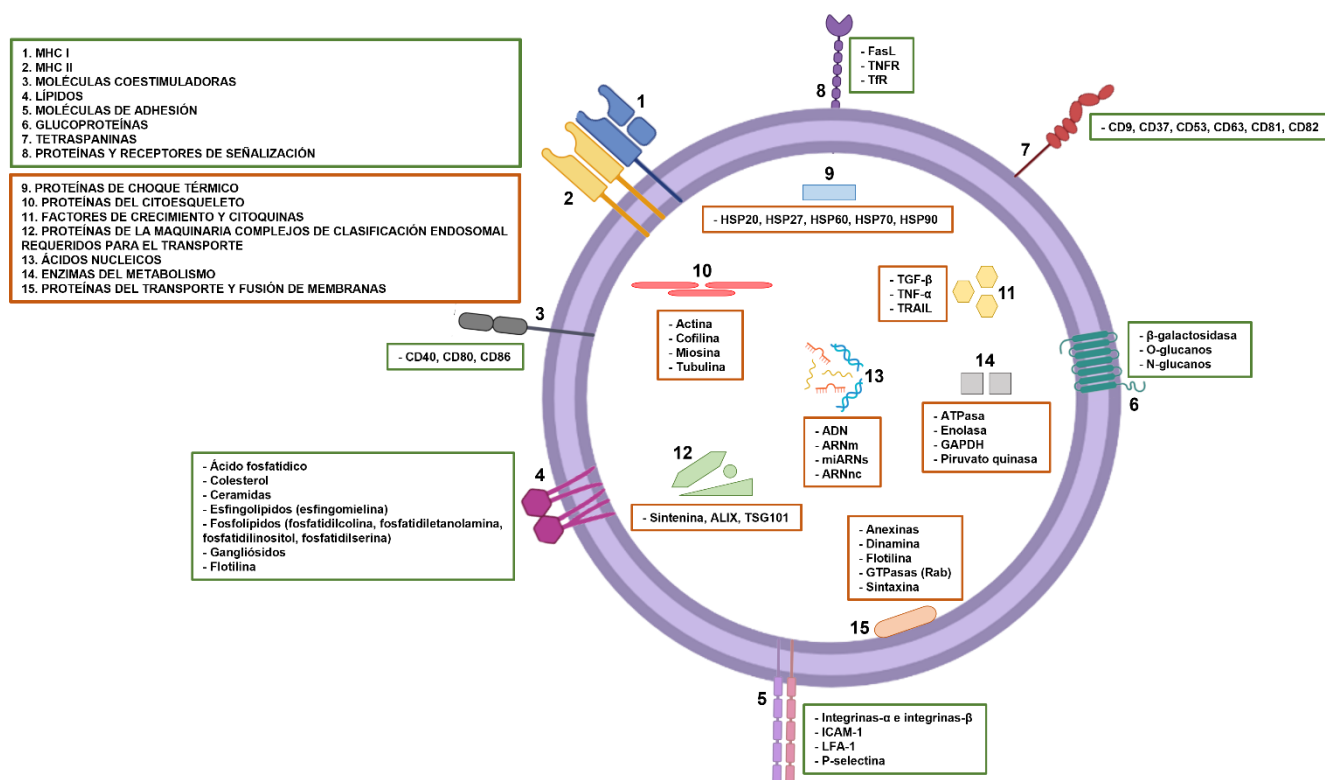


Figura 7. Estructura morfológica y composición molecular de los exosomas. Los exosomas son pequeñas estructuras con membrana de doble capa lipídica que encierra un lumen conteniendo proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros metabolitos. En su superficie, se localizan lípidos y proteínas, que se muestran en recuadros de color verde, mientras que los componentes internos se destacan en recuadros de color naranja. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

2.2.1.3. Función de los exosomas: papel en la enfermedad asmática y uso como biomarcadores

Los exosomas desempeñan un papel esencial como mediadores en la comunicación celular, siendo determinantes en los procesos biológicos tanto en condiciones normales como patológicas¹⁹¹. En los últimos años, ha aumentado el interés en entender su función en la respuesta inflamatoria y las afecciones

Introducción

respiratorias crónicas como el asma. Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer completamente los mecanismos de actuación en estas patologías, con el fin de poder disponer de nuevos biomarcadores y desarrollar terapias eficaces basadas en exosomas¹⁹².

Los exosomas, liberados por la mayoría de las células de mamíferos, se encuentran en casi todos los biofluidos corporales, lo que facilita su transporte y aislamiento. Entre estos fluidos se incluyen el suero, el lavado broncoalveolar (BAL; del inglés, *Bronchoalveolar Lavage*), el lavado nasal (NL; del inglés, *Nasal Lavage*), el condensado de aliento exhalado (EBC; del inglés, *Exhaled Condensate Breath*), el esputo y la orina. En el asma, los exosomas son secretados al exterior celular por células fundamentales en la enfermedad como los mastocitos, los eosinófilos, las DCs, las células T y las SAEC^{172,192}.

La relevancia funcional de los exosomas radica en su papel como portadores de miARNs, los cuales regulan funciones celulares y contribuyen al desarrollo del asma debido a su expresión desregulada en los individuos asmáticos¹⁷⁴. Distintos estudios han demostrado diferencias en el contenido de miARNs en exosomas de sujetos con asma en comparación con individuos sanos, así como entre sujetos asmáticos con diferente gravedad^{172,193–196}.

Además de los miARNs, los exosomas albergan lípidos y proteínas que pueden influir en su función. Investigaciones de lipidómica en exosomas aislados de BAL han revelado diferencias en la composición de varios lípidos entre individuos con asma y sujetos control no fumadores expuestos o no al humo del tabaco, con niveles más bajos de fosfatidilglicerol, fosfato de ceramida y ceramida en individuos asmáticos, excepto de esfingomielina, que es más abundante en exosomas de sujetos con asma no fumadores expuestos al humo del tabaco. Las alteraciones en el contenido lipídico de los exosomas en individuos asmáticos pueden propiciar la inflamación crónica de las vías respiratorias, ya que algunos lípidos inducen inflamación (lípidos proinflamatorios)¹⁹⁷. Asimismo, en exosomas purificados de NL de sujetos con asma se ha observado, mediante análisis proteómico, un aumento en la expresión de mucina-7, mucina-5B y proteínas asociadas al suero (haptoglobina, hemoglobina y albúmina) en comparación con exosomas aislados de individuos sanos. Este incremento en la expresión de mucinas, proteínas asociadas al asma, puede reflejar la inflamación crónica de las vías respiratorias, mientras que la expresión elevada de proteínas asociadas al suero puede indicar daño epitelial, exudación del plasma e inflamación¹⁹⁸. De modo que, los exosomas podrían ser útiles como biomarcadores para el diagnóstico y la evaluación de la gravedad del asma¹⁷².

En referencia a los exosomas provenientes de células, los derivados de mastocitos inducen la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 por las células musculares lisas de las vías respiratorias (ASMC; del inglés, *Airway Smooth Muscle Cells*), exacerbando la inflamación y prolongando los síntomas del asma¹⁹⁹. Los exosomas secretados por eosinófilos, aumentados en sujetos con asma, modulan esta afección al estimular, de forma autocrina, la síntesis de NO y ROS, así como la adhesión, quimiotaxis y quimioquinesis celular^{200,201}. Igualmente, contribuyen al remodelado de las vías respiratorias al fomentar la proliferación de células estructurales y la apoptosis de SAEC, impidiendo su reparación, además de alterar los perfiles de expresión génica en estas últimas, con una expresión más alta de genes específicos del asma como *TNF*, *CCL26* y *POSTN*²⁰². Los exosomas procedentes de macrófagos y DCs inciden en la patogenia del asma al presentar enzimas que participan en la biosíntesis de LT, promoviendo la inflamación²⁰³. Asimismo, los exosomas liberados por las DCs estimuladas con TSLP expresan el ligando

OX40 (OX40L; del inglés, *OX40 Ligand*), que propicia la multiplicación y diferenciación de células T CD4⁺ a células Th2²⁰⁴. Los exosomas producidos y liberados por células T están asociados con la patología asmática y la inflamación pulmonar, desencadenando la degranulación de mastocitos y la liberación de citocinas²⁰⁵. Por último, los exosomas originados por SAEC al influjo de citocinas T2 como la IL-13, desatan la multiplicación y quimiotaxis de macrófagos²⁰⁶.

2.2.2. Los miARNs: biogénesis y función

En 1993, Rosalind C. Lee *et al.* establecieron que el gen linaje 4 anormal (*LIN4*; del inglés, *Lineage Abnormal 4*) no codifica proteínas, sino dos pequeños ARNs no traducidos²⁰⁷. Este descubrimiento condujo a numerosos estudios para caracterizar estos pequeños ARNs, denominados miARNs^{208,209}. La identificación de los miARNs como reguladores de la expresión génica, inicialmente en *Caenorhabditis elegans* y luego en humanos y otras especies, alteró significativamente los dogmas de tiempo remoto sobre la regulación génica²¹⁰.

Los miARNs son ARNs pequeños de aproximadamente 21-25 nucleótidos (nt), monocatenarios y no codificantes. Se han encontrado en diversos linajes celulares, tanto procariotas como eucariotas, incluyendo humanos y otros mamíferos, así como plantas, algas y hongos^{211,212}. Funcionan como reguladores génicos (figura 8) al interactuar comúnmente con la región no traducida 3' (UTR 3'; del inglés, *Untranslated Region 3'*) de ARNm diana específicos, controlando su expresión mediante degradación o represión traduccional. Como resultado, los miARNs están implicados en la regulación de la fisiología celular y una amplia variedad de procesos biológicos²¹³⁻²¹⁵.

Se han reconocido más de 2.500 miARNs maduros en el genoma humano, lo que supone una enorme variabilidad y un gran potencial en la regulación génica postranscripcional. Un miARN maduro individual, integrado en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC; del inglés, *RNA-Induced Silencing Complex*), puede no ser específico de un solo ARNm, sino que puede ser complementario de parte de una o más regiones UTR 3' de distintos ARNm. De igual manera, un determinado ARNm puede ser diana de varios miARNs, ampliando así su influencia en múltiples rutas biológicas a nivel génico²¹⁶. Además, diversos miARNs pueden controlar un mismo ARNm con acciones sinérgicas²¹⁷.

Es necesario distinguir entre dos tipos de miARNs: los intracelulares, que representan la mayor parte, y los extracelulares o circulantes, presentes en una elevada proporción y localizados en los biofluidos corporales, ya sea dentro de VEs o asociados a proteínas^{218,219}. Los miARNs intracelulares intervienen en el control de diferentes vías celulares y muestran una expresión específica de tejido y enfermedad. Han sido extensamente empleados como biomarcadores para el pronóstico y diagnóstico de patologías, lo que sugiere que la modulación de su expresión podría facilitar el manejo clínico²²⁰. Por otro lado, los miARNs extracelulares o circulantes también se han utilizado como marcadores biológicos debido a sus propiedades moleculares y su ubicuidad, lo que los hace prometedores para su aplicación clínica²²¹.

Se ha evidenciado que los pulmones tienen un perfil distintivo de miARNs, los cuales cumplen un papel crucial en diversas afecciones pulmonares, como el asma, donde existe una desregulación génica postranscripcional. Por lo tanto, los miARNs constituyen un área muy atractiva de investigación en la MPP en el asma y otras enfermedades de las vías respiratorias²²².

2.2.2.1. Biogénesis: origen de los miARNs

Los genes que codifican miARNs pueden encontrarse en diferentes regiones del genoma, incluyendo transcritos no codificantes, así como intrones o exones de transcritos codificantes de proteínas²²³. Alrededor de la mitad de los miARNs conocidos hasta la fecha son intragénicos, derivando principalmente de intrones y en menor medida de exones de genes codificadores de proteínas, mientras que los restantes son intergénicos, no vinculados a genes y regidos por sus propios promotores²¹³. La mayoría de los miARNs se originan de genes dispersos en el genoma, transcribiéndose de forma individual, aunque en ocasiones pueden estar codificados por genes cercanos agrupados y ser transcritos conjuntamente²²⁴.

La biogénesis de los miARNs (figura 8) ocurre en dos compartimentos celulares: el núcleo y el citoplasma.

1) Procesamiento nuclear:

La formación de los miARNs empieza con la transcripción del ADN que los codifican (gen o intrón codificante del miARN), fundamentalmente por la ARN polimerasa (ARN pol) II²²⁵, aunque también puede ser realizada por la ARN pol III²²⁶. El transcrito primario (pri) de (mi)ARN (pri-miARN) tiene una longitud de varias kilobases (Kb) y una estructura en forma de horquilla^{227,228}. Luego, el complejo proteico conocido como “el microprocesador”, constituido por la nucleasa de ARN (ARNasa) endoribonucleasa de tipo III Drosha, la proteína de unión a ARN de doble cadena región crítica 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8; del inglés, *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) y otras proteínas, escinden ambos extremos (5' y 3') del pri-miARN generando el precursor (pre) de (mi)ARN (pre-miARN), con aproximadamente 60 a 70 nt y una estructura en forma de horquilla^{226,229}. Este pre-miARN es transportado activamente al citoplasma a través de los poros nucleares por la proteína Exportina-5 (Exp-5), en presencia de la proteína GTPasa nuclear relacionada con Ras (RanGTP [Ran; del inglés, *Ras-related nuclear protein*]). La unión del pre-miARN a Exp-5 es dependiente de RanGTP²²⁸. El complejo Exp-5-RanGTP adopta una estructura en forma de U que encapsula el pre-miARN, con un saliente de 2 nt en el extremo 3' para su reconocimiento por Exp-5. El complejo pre-miARN/Exp-5/RanGTP migra al citoplasma, donde el pre-miARN se libera debido a la hidrólisis de RanGTP a RanGDP (guanósín o guanósina difosfato/guanósina-5'[extremo 5']-difosfato, GDP; del inglés, *Guanosine Diphosphate*)²³⁰.

2) Procesamiento citoplásmico:

El pre-miARN es procesado por la ARNasa endoribonucleasa de tipo III Dicer, que forma un complejo con la proteína de unión al ARN TAR (TRBP; del inglés, *TAR RNA-Binding Protein*), conocido como complejo Dicer/TRBP²²⁶. Dicer elimina el bucle terminal del pre-miARN, liberando un dúplex de (mi)ARN de doble cadena (miARN-miARN*), fuente de los miARN maduros y funcionales, con una longitud de alrededor de 23 a 25 pares de bases (pb)²²⁸. El dúplex de miARN consta de una cadena guía (miARN) y una cadena pasajera (miARN*)²²⁶. La dirección de la cadena de miARN determina la nomenclatura de la forma madura: la cadena 5p proviene del extremo 5' de la horquilla pre-miARN y la cadena 3p se deriva del extremo 3'. Aunque ambas cadenas pueden unirse a la proteína Argonauta (AGO), generalmente prevalece una sola cadena, que se convierte en el miARN maduro. La cadena guía (miARN maduro) se carga selectivamente en AGO, constituyendo el complejo de silenciamiento inducido por miARN (miRISC; del inglés, *miARN-Induced Silencing Complex*). La selección se basa en la estabilidad termodinámica o

la presencia de un uracilo (U) en la posición 1 del extremo 5'²¹³. La cadena pasajera es expulsada de AGO y degradada²³¹. La inclusión selectiva de la cadena guía (miARN) en la proteína AGO establece la especificidad de miRISC en función de la complementariedad de secuencia entre el miARN y la UTR 3' del ARNm diana²³⁰. El genoma humano codifica cuatro proteínas AGO (AGO1-4), pero únicamente AGO2 parece ser una endonucleasa de ARN catalíticamente activa²²⁷. Las proteínas AGO están compuestas por tres dominios: el dominio específico formado por PIWI/Argonauta/Zwille (PAZ), responsable de fijar el extremo 3' de la cadena del miARN, el dominio medio (MID; del inglés, *Middle*) y el dominio testículo hinchado inducido por elemento P en *Drosophila* (PIWI; del inglés, *P-element-Induced Wimpy testis in Drosophila*), que se encargan de unir el nt terminal del extremo 5' de la cadena del miARN²³².

Los miARNs ejercen como represores de la expresión génica a nivel postranscripcional, induciendo la degradación del ARNm o inhibiendo su traducción, lo que resulta en la subregulación o el silenciamiento de genes²³³. Una vez que el miARN se incorpora al complejo miRISC, el miRISC puede identificar al ARNm diana mediante interacciones específicas entre secuencias complementarias del miARN, en particular en las "secuencias semilla" (en inglés, *seed sequence*) del miARN, que son secuencias idénticas en las posiciones de los nt 2 a 7 (6 nt) en el extremo 5', y de la región UTR 3' del ARNm¹⁷⁴. El grado de complementariedad entre el miARN y los elementos de respuesta de miARNs (MREs; del inglés, *MiRNA Response Elements*) del ARNm diana define el mecanismo de represión activado. El acoplamiento perfecto conlleva el corte dependiente de AGO2 y degradación del ARNm diana, mientras que el emparejamiento parcial desencadena la inhibición de la traducción mediada por miRISC²¹³.

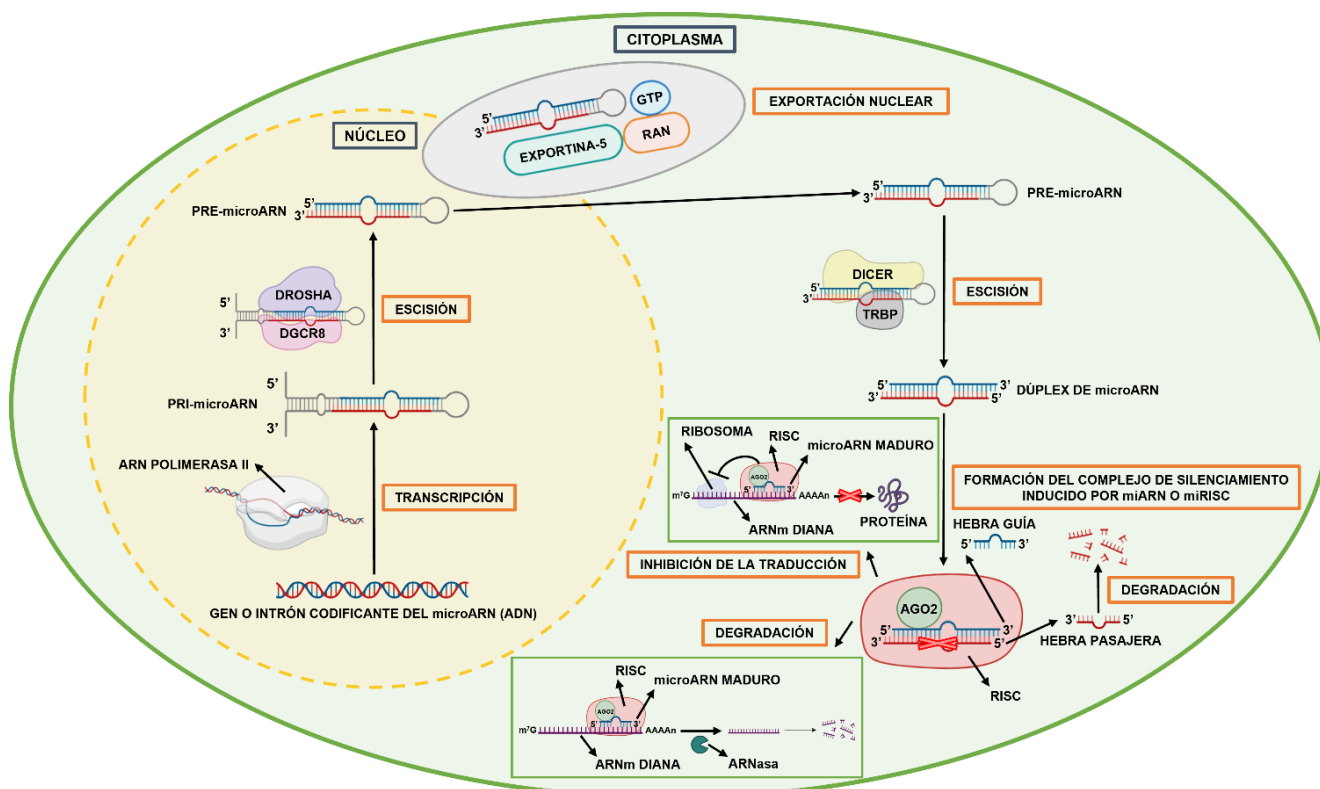


Figura 8. Biogénesis de los miARNs. La generación de los miARNs se inicia en el núcleo con la transcripción de la secuencia de ADN que los codifican por la ARN pol II, produciendo el pri-miARN. El complejo Drosha/DGCR8 corta los extremos 5' y 3' del pri-miARN, dando lugar al pre-miARN. Exp-5, junto con RanGTP, transportan el pre-miARN al citoplasma. En el citoplasma, el complejo Dicer/TRBP escinde la horquilla terminal del pre-miARN, desprendiendo el dúplex de miARN (miARN-miARN*). La cadena guía o el miARN maduro (miARN) se incorpora a la proteína AGO2, conformando

Introducción

el complejo miRISC, mientras que la cadena pasajera (miARN*) se degrada. El complejo miRISC tiene la capacidad de suprimir la expresión génica a nivel postranscripcional, inhibiendo la traducción del ARNm a proteína o degradándolo. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

Con todo, la regulación del nivel de expresión de miARNs es primordial para preservar las funciones celulares normales. Las alteraciones en sus niveles de expresión, ligada a una expresión génica anómala, puede contribuir a la patogenia de afecciones respiratorias crónicas como el asma²¹⁹.

2.2.2.2. Función de los miARNs: papel en la patología asmática y uso como biomarcadores

Los miARNs, al ser secretados por las células y encontrarse en los fluidos biológicos corporales, especialmente dentro de VEs como los exosomas o unidos a proteínas, se distribuyen ampliamente por el organismo. Regulan la expresión génica postranscripcional y la función celular de forma autocrina, paracrina o endocrina^{213,234}. No obstante, la gran mayoría de los miARNs se encuentran dentro de las células, en múltiples compartimentos subcelulares, donde intervienen en la regulación de genes del transcriptoma celular después de la transcripción^{213,218}.

En el ámbito de las enfermedades pulmonares, se ha investigado la contribución de los miARNs debido al perfil único y conservado presente en los pulmones, lo que supone una ventaja para su estudio²³⁵. Los miARNs regulan tanto las células estructurales de las vías aéreas como las células inmuno-inflamatorias implicadas en el asma²³⁶. La estimulación de estas células provoca modificaciones transitorias y estables en su perfil génico, incentivando la inflamación crónica. Por ello, las alteraciones en la expresión de los miARNs podrían influir en el inicio y en la progresión de la condición asmática, así como en su manifestación clínica²²².

En cuanto a los miARNs vinculados al asma, el miR-21 es uno de los más descritos hasta el momento por su papel en diversos eventos de la remodelación pulmonar, que incluyen la acumulación de células hiperactivas, la contracción del músculo liso, el estrés inflamatorio, el depósito de MEC y los trastornos inducidos por hipoxia. Por ejemplo, el miR-21 desregulado puede inhibir dianas como la IL-12A y muerte celular programada 4 (PCD4; del inglés, *Programmed Cell Death 4*), contribuyendo así a un desequilibrio de los balances Th1/Th2 y M1/M2 (fenotipos diferentes de macrófagos), así como al daño epitelial ocasionado por el estrés inflamatorio que, en ocasiones, conduce al remodelado pulmonar²³⁷.

Los miARNs miR-18a, miR-27a, miR-128, y miR-155, en conjunto, regulan la expresión de IL-6 e IL-8 a nivel del ARNm en células del epitelio bronquial, dos citocinas inflamatorias relevantes en el asma. La disminución simultánea de la expresión de estos miARNs en el epitelio bronquial de individuos con asma resultó en un aumento de la expresión de IL-6 e IL-8²³⁸. Asimismo, la supresión del miR-141-3p, inducida después de la estimulación alérgica en sujetos asmáticos alérgicos, en células epiteliales bronquiales tratadas con IL-13, una citocina inductora de la hiperplasia de células caliciformes y, en consecuencia, la secreción de moco, llevó a una reducción de la expresión génica en células caliciformes y en la producción de moco²³⁹.

Además de las células epiteliales, se han estudiado los mecanismos controlados por miARNs en ASMC. Los miARNs miR-146a y miR-146b regulan negativamente la expresión de los mediadores inflamatorios ciclooxigenasa (COX)-2 e IL-1 β en ASMC, sugiriendo su potencial como terapia antiinflamatoria para el

asma. El tratamiento con cytomix, una combinación de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ), indujo la expresión de miR-146a y miR-146b en ASMC de individuos asmáticos y no asmáticos, observándose una mayor expresión de miR-146a en ASMC de sujetos asmáticos²⁴⁰. Una investigación reciente revela que el miR-185-5p modula la expresión de *POSTN*, su secreción por las células estructurales de las vías respiratorias y la contracción del músculo liso, lo que puede repercutir en la fisiopatología del asma y ser una posible diana terapéutica. La expresión del miR-185-5p se correlaciona inversamente con la de *POSTN* en células de esputo de individuos asmáticos, lo que indica una relación miARN-gen diana. Por otra parte, el incremento de ciclo de división celular 42 (CDC42; del inglés, *Cell Division Cycle 42*) y miembro A de la familia de homólogos de Ras (RhoA; del inglés, *Ras homolog family member A*), proteínas procontráctiles diana del miR-185-5p en BSMC, puede explicar el aumento de la contracción en estas células por inhibición del miR-185-5p⁸⁸.

Los miARNs regulan genes diana que afectan la actividad inmunológica. Por ejemplo, miR-19 mediante la represión coordinada de varias dianas de ARNm, como el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN; del inglés, *Phosphatase and Tensin homolog*), el supresor 1 de la señalización de citocinas (SOCS1; del inglés, *Suppressor Of Cytokine Signaling 1*) y la proteína 3 inducida por TNF- α (TNFAIP3; del inglés, *TNF- α -Induced Protein 3*), promovió la polarización de células T a células Th2 y la producción de citocinas T2 en las vías respiratorias, siendo esto clave en la patogénesis del asma²⁴¹.

Dado que el fenotipo inflamatorio predominante del asma implica una inflamación eosinofílica en las vías aéreas, los miARNs son objeto de interés en la regulación de los eosinófilos. Participan en su desarrollo al influir en el crecimiento y diferenciación, destacándose el miR-223²⁴². Se ha identificado un conjunto de 14 miARNs expresados diferencialmente entre eosinófilos de individuos asmáticos y sanos, un perfil de miARNs con capacidad de discriminar entre las dos condiciones, asma y no asma. Algunos de estos miARNs, como miR-1246 y miR-1290, se descubrieron por primera vez en este estudio, mientras que otros ya se habían relacionado con el asma²⁴³. Respecto a esto último, los perfiles de expresión de miARNs varían entre sujetos asmáticos e individuos sanos. Algunos miARNs presentan mayor expresión en individuos asmáticos que en sujetos sanos, mientras que otros están regulados a la baja en individuos con asma^{244,245}.

El estudio de los miARNs está en constante crecimiento ya que se consideran marcadores no invasivos en diferentes afecciones, incluyendo cáncer, patologías cardiovasculares, trastornos del sistema nervioso y enfermedades respiratorias como el asma^{173,218}. Su función efectora en la regulación de vías de señalización celular y su impacto en la fisiopatología de numerosas afecciones, los convierte en objetivos clave de investigación. Identificar la desregulación de los miARNs en biofluidos corporales, células o tejidos específicos, como el pulmón, proporciona información adicional sobre su actividad y su utilidad como biomarcadores para el pronóstico o diagnóstico de patologías^{219,222}.

Como conclusión, explorar los distintos mecanismos que toman parte en el desarrollo del asma, así como la acción de los exosomas y los miARNs, podría brindar información valiosa para el avance de terapias y la detección de biomarcadores que mejoren el diagnóstico, pronóstico y tratamiento para el asma, una condición multifactorial y compleja^{174,246}.

2.3. Nuevas tecnologías de análisis masivo para estudiar la enfermedad asmática y uso de los miARNs circulantes para llevar a la práctica la medicina personalizada de precisión (MPP)

Dada la complejidad y heterogeneidad del asma, así como el progreso de las terapias biológicas, es fundamental mencionar los términos “medicina personalizada” y “medicina de precisión”. Estos se refieren a un enfoque más individualizado para el tratamiento, buscando seleccionar la opción terapéutica más apropiada conforme al fenotipo y endotipo del asma de cada paciente. La medicina de precisión se centra en el endotipo, definido como el “subtipo de la afección establecido, funcional y fisiopatológicamente, por el mecanismo molecular subyacente”. La medicina personalizada, en cambio, posee un significado y valor más extensos, contemplando todos los aspectos relativos al paciente^{102,104}.

La estratificación de pacientes asmáticos en fenotipos y endotipos es crucial para precisar el mecanismo patogénico implicado, facilitar el conocimiento de la respuesta al tratamiento y anticiparse a los riesgos asociados (o reducirlos)^{247,248}. La investigación y el uso de biomarcadores moleculares, como los miARNs y sus dianas, son esenciales para mejorar la clasificación del asma en sus fenotipos y endotipos y optimizar la elección terapéutica^{105,173}.

El cometido de los miARNs como reguladores en el asma, aunque estos no son nuevos en el estudio de las patologías, es un área de interés reciente²⁴⁹. Han sido ampliamente descritos como biomarcadores debido a sus propiedades bioquímicas y asociativas¹⁷³. Los miARNs cumplen con las características principales de un buen biomarcador como ser accesibles, estables y poseer alta sensibilidad (S) y especificidad (E). Esto se explica por el hecho de que^{218,221}:

- Son moléculas ubicuas.
- Se pueden identificar y medir fácilmente.
- Se pueden detectar mediante procesos mínimamente invasivos.
- Son estables, resistentes a la degradación, la temperatura y otras condiciones extremas.
- Son específicos del tipo de tejido o de célula de origen.
- Su expresión varía de forma sensible conforme avanza la enfermedad.

En resumen, los miARNs son candidatos ideales como biomarcadores para gran variedad de afecciones. Una ventaja es la posibilidad de servir como multimarcadores, permitiendo un diagnóstico preciso, pronóstico de la patología, guía del tratamiento y evaluación de la respuesta al tratamiento²⁵⁰.

Los miARNs circulantes, específicamente en la sangre, permanecen estables incluso ante la presencia de nucleasas (ribonucleasas), cambios extremos de temperatura, variaciones en el potencial de hidrógeno (pH) y ciclos de congelación y descongelación. La mayoría dependen de transportadores, como complejos de proteínas, lipoproteínas o VEs, para preservar su integridad y evitar su degradación^{221,251}. Tanto los miARNs intracelulares como los extracelulares mantienen su funcionalidad en las células receptoras, con efectos biológicos determinados por el tipo celular y el gen o los genes diana²⁵². Los miARNs procedentes de biofluidos corporales de obtención sencilla y rutinaria, como la sangre (suero y plasma), pueden ser utilizados como biomarcadores en el asma, mientras que los obtenidos de muestras no invasivas relacionadas directamente con las vías respiratorias, como el esputo, además de ser útiles como biomarcadores, ofrecen información sobre la fisiopatología de la condición a través de su expresión¹⁷³.

Por tanto, debido a sus propiedades, su capacidad de difusión por el organismo y su importancia en una amplia gama de procesos biológicos, los miARNs circulantes son biomarcadores prometedores para el

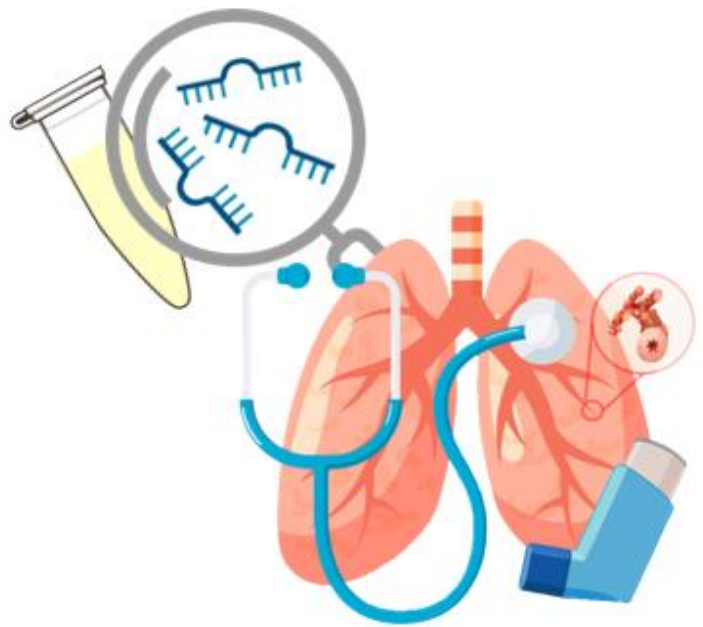
diagnóstico, pronóstico y seguimiento del tratamiento en el asma, representando un campo muy atractivo de investigación de la MPP^{235,253}.

El desarrollo tecnológico ha facilitado la detección y cuantificación de los miARNs, explorando métodos moleculares como la hibridación *Northern* (más conocida como *Northern blot*), la hibridación in situ (ISH; del inglés, *In Situ Hybridisation*), micromatriz (en inglés, *microarray*), la transcripción reversa o inversa (RT; del inglés, *Reverse Transcription*) y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR; del inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*), la PCR digital y la secuenciación de nueva generación (NGS; del inglés, *Next Generation Sequencing*) (miARNs-seq [seq; del inglés, *sequencing*]), lo que permite la generación de perfiles de miARNs (figura 9)^{218,220,250}. La NGS se está volviendo una técnica común para estudiar perfiles de expresión de miARNs²⁵⁴. Esta metodología puede analizar de manera rápida y confiable el genoma, el transcriptoma o el miARNoma completos, destacándose por su capacidad para identificar moléculas con gran S y E, convirtiéndose en la estrategia preferida para el perfilado de los ácidos nucleicos, incluidos los miARNs²⁵⁵. Se ha empleado con éxito para descubrir miARNs críticos en enfermedades como el asma, detectando incluso variantes de baja frecuencia^{243,256}. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, la RT-qPCR sigue siendo el método más usado para el análisis y cuantificación de la expresión de los miARNs, considerada la prueba estándar de oro (en inglés, *gold standard test*) para validar los resultados obtenidos por NGS²²¹.

A pesar de las limitaciones de la NGS, esta suele combinarse con la RT-qPCR y requiere un planteamiento riguroso para superarlas y aprovechar su potencial en la búsqueda de los miARNs como biomarcadores²⁵⁵.



Figura 9. Utilización de miARNs-seq para detectar y cuantificar la expresión de miARNs en suero (miARNs circulantes). Se emplea esta técnica para identificar y determinar la expresión de miARNs en muestras de suero de individuos asmáticos, agrupados en base a diferentes características clínicas, con el propósito de reconocer miARNs séricos con expresión diferencial entre dos grupos de sujetos con asma, distinguibles por un rasgo clínico específico. Estos miARNs podrían ser usados como biomarcadores para categorizar a los individuos asmáticos en subgrupos según diferentes características clínicas. Figura creada con BioRender (BioRender.com).



Hipótesis y objetivos

3. HIPÓTESIS

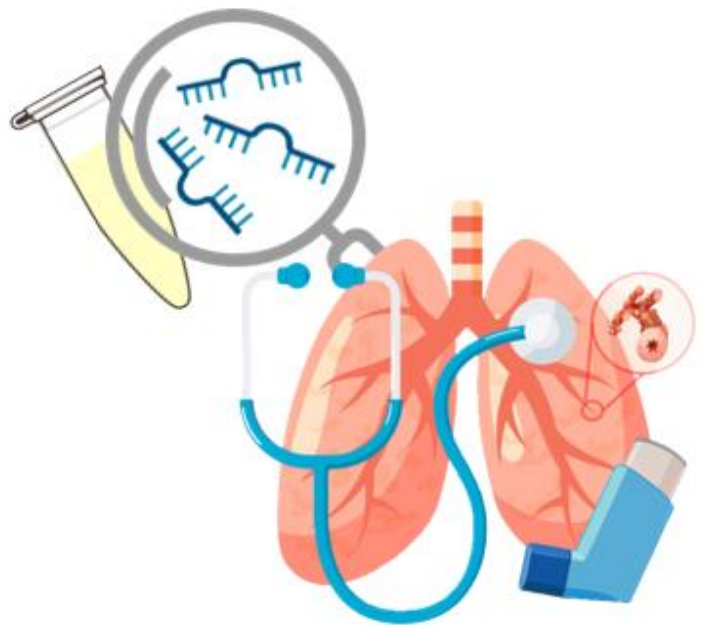
Dada la complejidad y heterogeneidad del asma, es fundamental determinar sus fenotipos y endotipos para un diagnóstico más preciso y un abordaje individualizado. En este contexto, se necesitan biomarcadores específicos, y los miARNs se presentan como candidatos prometedores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento (susceptibilidad o respuesta al tratamiento) del asma.

La hipótesis de esta Tesis Doctoral propone que los perfiles de expresión alterada de miARNs están implicados en el mantenimiento de la inflamación en el asma. De ahí que, la expresión anómala de miARNs en los distintos fenotipos y endotipos del asma podría ser utilizada como biomarcador para el diagnóstico y pronóstico, además de ayudar a detectar el riesgo individual y a conocer la respuesta terapéutica. Asimismo, el estudio mecanístico y funcional de los miARNs permitirá evaluar la viabilidad de conseguir un efecto farmacológico mediante la modulación de su actividad.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal es identificar y estudiar perfiles diferenciales de miARNs en la enfermedad asmática que proporcionen información sobre los mecanismos moleculares que contribuyen a la fisiopatología del asma. Para ello, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Buscar y validar un perfil diferencial de miARNs en suero de sujetos con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como alérgica/atópica y no alérgica/atópica, con el fin de identificar y clasificar a los individuos en estos fenotipos.
2. Investigar la relación entre los miARNs séricos diferenciales obtenidos y la expresión de genes diana en tejido pulmonar de sujetos con y sin diagnóstico de asma, así como las proteínas diana en suero de sujetos con asma, tanto eosinofílica como no eosinofílica.
3. Caracterizar el contenido proteico de los exosomas aislados de suero y de sobrenadante de esputo de individuos con asma eosinofílica y no eosinofílica, con el objetivo de reconocer la existencia de patrones diferenciales.
4. Descubrir y confirmar un perfil diferencial de miARNs en suero y en tejido pulmonar de sujetos con asma grave tratados y no tratados con GCOs, con el propósito de detectar y categorizar a los individuos en estos fenotipos. Además, investigar la relación entre los miARNs diferenciales y la expresión de genes en tejido pulmonar de sujetos con y sin diagnóstico de asma.
5. Estudiar la expresión de los miARNs derivados del objetivo previo en suero y en tejido pulmonar de individuos con y sin diagnóstico de asma para encontrar biomarcadores específicos de la enfermedad.
6. Determinar la expresión de los miARNs hallados del cuarto objetivo parcial en modelos celulares *in vitro* (SAEC y BSMC), en presencia y ausencia de tratamiento con el GC dexametasona, con la finalidad de analizar el impacto de los GCs y considerar la viabilidad de estos miARNs como posibles opciones terapéuticas alternativas.



Materiales y métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Poblaciones de estudio: selección, obtención y procesamiento de las muestras biológicas

5.1.1. Criterios para la selección de los individuos

Los sujetos con asma pertenecientes a la cohorte nacional del proyecto “mecanismos implicados en la génesis y evolución del asma” (MEGA; del inglés, *Mechanisms involved in the Genesis and Evolution of Asthma*)²⁵⁷, de los que se utilizaron muestras de suero y de sobrenadante de esputo, se reclutaron en los Servicios de Alergología y Neumología de diferentes hospitales de España: Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (HUFJD) y Hospital Universitario La Paz, en Madrid; Complejo Hospitalario de Navarra, en Pamplona (Navarra); Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, en Santiago de Compostela (La Coruña); y Hospital Clínic, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol y Hospital Universitario Vall d'Hebron, en Barcelona (Cataluña). Los individuos donantes voluntarios sanos (grupo control), de los que se emplearon muestras de suero, eran miembros del Servicio de Alergología del HUFJD y del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

Los criterios de selección para la inclusión de los individuos en el estudio fueron los siguientes:

- Individuos asmáticos:
 - Aceptación y firma del consentimiento informado para participar en el proyecto MEGA²⁵⁷.
 - Diagnóstico de asma, realizado siguiendo las pautas de la guía GEMA²⁰.
 - Edad entre 18 y 75 años.

La clasificación del asma eosinofílica (≥ 500 eosinófilos/milímetro [mm]³) y no eosinofílica (< 150 eosinófilos/mm³) se basó en el recuento de eosinófilos en sangre periférica. La categorización del asma alérgica/atópica (prueba de punción positiva o presencia IgE específica) y no alérgica/atópica (prueba de punción negativa o ausencia de IgE específica) se hizo según los resultados de la prueba de punción y la presencia o no de IgE específica para al menos un alérgeno. La determinación del asma grave tratada con GCOs (junto con GCI y LABAs) y no tratada con GCOs (pero sí con GCI y LABAs) se estableció de acuerdo con la terapia implementada o no con GCOs.

- Individuos sanos:
 - Sujetos donantes voluntarios sanos (grupo control), sin diagnóstico de asma.
 - Edad entre 18 y 75 años.
 - Sin antecedentes personales de asma y afecciones alérgicas.

Estos participantes, preferentemente no fumadores, fueron debidamente informados y dieron su consentimiento antes de formar parte del estudio.

Para identificar el fenotipo de asma alérgica/atópica, además de tener en cuenta el historial clínico y los síntomas y signos sugestivos, se efectuó una provocación con punción intraepidérmica con alérgenos para detectar posibles reacciones alérgicas inmediatas mediadas por la IgE²⁵⁸. También, se estimaron las concentraciones de IgE total y específica en suero frente a alérgenos mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida²⁵⁹. Asimismo, se realizó una provocación bronquial específica para aeroalérgenos, comunes en el asma ocupacional²⁶⁰.

Materiales y métodos

En los pacientes asmáticos tratados con GCIs, se suspendió el tratamiento al menos 2 semanas antes de la toma de las muestras. Además, ninguno de los pacientes con asma recibió GCOs, antagonistas de los receptores de los leucotrienos (ARLTs), aspirina o inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) durante al menos las 6 semanas previas a su inclusión en el estudio.

Adicionalmente, conforme a las directrices de la guía GEMA²⁰, los pacientes asmáticos del proyecto MEGA²⁵⁷ se clasificaron en distintos grados de gravedad: intermitentes, persistentes leves, persistentes moderados y persistentes graves.

Por otro lado, se usaron muestras de biopsia pulmonar (tejido pulmonar) de individuos con asma y de sujetos control (sin diagnóstico de asma). Estas muestras y los datos descriptivos sobre las características demográficas, inflamatorias y clínicas fueron proporcionados por el Consorcio Biobanco Pulmonar del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES; PT13/0010/0030), una red que incluye, actualmente, 12 hospitales españoles de tercer nivel y forma parte de la Red Nacional de Biobancos.

5.1.2. Consideraciones éticas

Todos los pacientes asmáticos del proyecto MEGA²⁵⁷ y los individuos sometidos a biopsia pulmonar fueron debidamente informados y proporcionaron su consentimiento. Se garantizó la confidencialidad de los datos de acuerdo con las leyes de protección de datos y derechos de los pacientes (Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 41/2002 de Protección de los Derechos de los Pacientes). El estudio se aprobó por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del IIS-FJD y se llevó a cabo siguiendo los principios éticos aceptados internacionalmente por las Naciones Unidas y la Comisión Europea (Declaración de Helsinki de 1964²⁶¹ y Ley 14/2007 de Investigación Biomédica). Las muestras biológicas, anonimizadas y codificadas, se procesaron conforme a los procedimientos normalizados de trabajo y obtuvieron autorización de los comités éticos y científicos locales para su uso.

5.1.3. Población de estudio

Se incluyeron un total de 188 sujetos, 149 individuos con asma y 39 sujetos sin diagnóstico de asma. Estos 188 individuos se distribuyeron de la siguiente manera:

- 152 sujetos con participación en el proyecto MEGA²⁵⁷:
 - 133 individuos con asma.
 - 19 sujetos donantes voluntarios sanos (individuos control).
- 36 sujetos sometidos a biopsia pulmonar (Consorcio Biobanco Pulmonar del CIBERES):
 - 16 individuos con asma.
 - 20 sujetos sin diagnóstico de asma (individuos control).

Los sujetos asmáticos se clasificaron en base a diversas características clínicas, lo que permitió comparar dos grupos diferenciados por una característica clínica específica. Se clasificaron en:

- Individuos con asma eosinofílica y no eosinofílica, subdivididos además en obesos y no obesos.
- Sujetos con asma alérgica/atópica y no alérgica/atópica.
- Individuos con asma grave tratados y no tratados con GCOs.

5.1.4. Clasificación de las muestras biológicas

5.1.4.1. Muestras de suero

Para cumplir con los objetivos parciales primero y cuarto, que abarcan la identificación y confirmación de perfiles de expresión diferencial de miARNs circulantes en suero, se utilizaron muestras de suero de pacientes asmáticos del proyecto MEGA²⁵⁷. Estas muestras, se obtuvieron en la visita basal (VB), la visita en la que los pacientes con asma se incorporan al proyecto. Las muestras de suero se emplearon tanto para la secuenciación de miARNs (miARNs-seq) como para la validación posterior por RT-qPCR, esta última limitada a las comparativas entre asma eosinofílica y no eosinofílica, así como entre asma grave tratada y no tratada con GCOs. En la tabla 7 se especifica el número de muestras de suero usadas en cada una de las comparaciones.

Las muestras utilizadas para analizar la expresión de dos miARNs y la concentración de dos proteínas diana de estos en suero, entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, mediante RT-qPCR y ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA; del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), respectivamente, se subdividieron en función de la presencia o no de obesidad en los pacientes, dando lugar a cuatro grupos de muestras (tabla 8). Se investigó la expresión de los miARNs y la concentración de las proteínas en relación con la inflamación por eosinofilia y obesidad como comorbilidad del asma.

Tabla 7. Comparativas definidas y cantidad de muestras de suero empleadas en cada una.

COMPARACIONES		MUESTRAS miARNs-seq	MUESTRAS RT-qPCR	MUESTRAS ELISA
1	Asma eosinofílica	4	42	42
	Asma no eosinofílica	5	39	39
2	Asma alérgica/atópica	5	-	-
	Asma no alérgica/atópica	4	-	-
3	Asma grave tratada con GCOs	6	14	-
	Asma grave no tratada con GCOs	7	19	-

Tabla 8. Grupos de pacientes y número de muestras de suero por grupo.

GRUPOS	MUESTRAS
Asma eosinofílica obesos	10
Asma eosinofílica no obesos	28
Asma no eosinofílica obesos	16
Asma no eosinofílica no obesos	23

Asimismo, se usaron muestras de suero de pacientes asmáticos graves, tratados o no tratados con GCOs, y de sujetos donantes voluntarios sanos (individuos control) para examinar la expresión de los miARNs diferenciales en suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, validada por RT-qPCR. Se utilizaron 33 muestras de suero de pacientes con asma grave y 19 de sujetos control.

Finalmente, para alcanzar el tercer objetivo parcial, que consiste en tipificar exosomas a nivel proteico, se emplearon 16 muestras de suero. De estas, 8 correspondían a pacientes con asma eosinofílica y las otras 8 a pacientes con asma no eosinofílica.

5.1.4.2. Muestras de biopsia pulmonar

Igualmente, se llevó a cabo miARNs-seq y validación por RT-qPCR en biopsias pulmonares de individuos con asma suministradas por el Consorcio Biobanco Pulmonar del CIBERES. La comparativa acordada y la cantidad de muestras usadas se detalla en la tabla 9.

Tabla 9. Comparación establecida y número de muestras de suero utilizadas.

COMPARACIÓN		MUESTRAS miARNs-seq	MUESTRAS RT-qPCR
1	Asma grave tratada con GCOs	3	9
	Asma grave no tratada con GCOs	4	7

Además, para evaluar la relación entre los miARNs diferencialmente expresados del primero y cuarto objetivos parciales y la expresión de genes diana mediante RT-qPCR, se emplearon biopsias pulmonares de 16 sujetos asmáticos y de 20 individuos sin diagnóstico de asma (sujetos control).

5.1.4.3. Muestras de sobrenadante de esputo

Para lograr el tercer objetivo parcial, se usaron 14 muestras de sobrenadante de esputo. De estas, 7 correspondían a pacientes con asma eosinofílica y las otras 7 a pacientes con asma no eosinofílica.

5.1.5. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas

5.1.5.1. Muestras de sangre periférica

5.1.5.1.1. Extracción

Se extrajo aproximadamente 10 mililitros (mL) de sangre periférica (sangre completa) de cada individuo de estudio, empleando tubos BD Vacutainer® con gel separador y con un coagulante (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos), para la obtención de suero.

5.1.5.1.2. Procesamiento

Se centrifugaron los tubos con sangre periférica en una centrífuga Allegra X-15R (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) a 2.095 fuerza centrífuga relativa (RCF; del inglés, *Relative Centrifugal Force*) o fuerza g (g) durante 10 minutos (min) a 4°C. El suero resultante se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf Safe-Lock® de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), etiquetados y almacenados a -80°C en el Biobanco del IIS-FJD hasta su uso.

5.1.5.2. Muestras de biopsia pulmonar

5.1.5.2.1. Recepción de las muestras

Las muestras de biopsia pulmonar proporcionadas por el Consorcio Biobanco Pulmonar del CIBERES, se enviaron al Departamento de Inmunología del IIS-FJD en hielo seco, contenidas en viales criogénicos

Corning™ de 1,5 mL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) con solución estabilizadora de ARN RNA^{later}™ Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) para su conservación. Se guardaron a -80°C en el Biobanco del IIS-FJD hasta su utilización.

5.1.5.2.2. Procesamiento

El día anterior a su empleo, se cortó un fragmento pequeño del tejido con un bisturí de laboratorio, dejando el resto en el vial criogénico original y conservándolo a -80°C. Este fragmento se colocó luego en un tubo Eppendorf de 1,5 mL etiquetado. A continuación, se agregaron 700 microlitros (µL) de QIAzol (Qiagen, Hilden, Alemania) para la extracción subsiguiente del ARN total. Las muestras procesadas se almacenaron a -80°C en el Biobanco del IIS-FJD hasta su uso.

5.1.5.3. Muestras de esputo

5.1.5.3.1. Inducción del esputo

La inducción del esputo se efectuó mediante la nebulización ultrasónica de suero salino hipertónico (Thermo Fisher Scientific Inc.) en concentraciones crecientes (al 3%, 4% y 5%) a intervalos de 10 min para facilitar la expectoración, con un equipo Ultrasonic Portable Nebulizer NEU 17 Atomizer (Omron, Kyoto, Japón). Tras enjuagar la boca para eliminar la saliva, los sujetos expectoraron en un contenedor estéril de 100 mL para la recogida de muestras.

5.1.5.3.2. Procesamiento

El procesamiento del esputo debe llevarse a cabo en un plazo máximo de 3 horas (h) después de su obtención para garantizar una viabilidad celular óptima²⁶²⁻²⁶⁴. Este procedimiento se realizó en una cabina de seguridad biológica de clase II MSC-Advantage™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) para asegurar la esterilidad²⁶⁵. Brevemente:

- 1) La muestra entera de esputo se depositó en un disco de Petri (Cultek S.L.U., Madrid, España). Se seleccionaron los tapones de moco con unas pinzas finas de laboratorio, evitando la contaminación salivar, y se pesaron en una balanza de precisión ME4002 Mettler Toledo™ (Thermo Fisher Scientific Inc.). Luego, se mezclaron con un volumen de ditiotreitol (DTT) al 0,1% (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, San Louis, Missouri, Estados Unidos), igual a 4 veces el peso de los tapones de esputo, en un tubo Corning™ Falcon™ de 15 mL (Thermo Fisher Scientific Inc.).
- 2) La mezcla se incubó durante 15 min a 37°C en un agitador MACSmix™ Tube Rotator (Miltenyi Biotec, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España) a una velocidad de 300 revoluciones por minuto (rpm).
- 3) Se añadió el mismo volumen de solución salina tamponada (en inglés, *buffer*) con fosfato (PBS; del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) Dulbecco 1X (libre de calcio y magnesio [Ca²⁺ y Mg²⁺]; 1X se refiere a la concentración de la solución) Gibco™ (Thermo Fisher Scientific Inc.), que de DTT al 0,1%, para detener la reacción. Seguidamente, la mezcla se incubó en las mismas condiciones previas.
- 4) La mezcla se tamizó con un filtro estéril de nailon de 40 µm Fisherbrand™ (Thermo Fisher Scientific Inc.).
- 5) El filtrado se centrifugó a 754 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Allegra X-15R.

6) El sobrenadante se repartió en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf de 1,5 mL, etiquetados y guardados a -80°C en el Biobanco del IIS-FJD hasta su utilización. El sedimento (en inglés, *pellet*) celular se resuspendió en 1 mL de PBS 1X (Thermo Fisher Scientific Inc.) estéril, seguido por el recuento de células mediante la técnica de tinción por exclusión. Se empleó la solución azul de tripano (o azul tripán) al 0,4% (Thermo Fisher Scientific Inc.) en una proporción 1:1 y una cámara de recuento BRAND™ Blaubrand™ Neubauer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Las células viables, con membrana intacta, no incorporan el colorante azul tripán; las células muertas, con membrana comprometida, se tiñen de azul al observarlas a través del microscopio óptico Labophot (Nikon, Tokyo, Japón). Se calculó la viabilidad celular (%) y la contaminación (%) usando las fórmulas:

- Viabilidad celular (%) =
$$\frac{\text{Número de células vivas (no escamosas)}}{\text{Número de células vivas (no escamosas) + número de células muertas (no escamosas)}} \times 100$$
- Contaminación (%) =
$$\frac{\text{Número de células escamosas (vivas y muertas)}}{\text{Número de células vivas (no escamosas) + número de células escamosas (vivas y muertas)}} \times 100$$

La calidad del esputo se valoró considerando la viabilidad celular (%) y la contaminación (%), siendo adecuado aquel con contaminación (células escamosas) $\leq 15\%$ y viabilidad celular $\geq 70\%$ ²⁶⁶. Para acabar, las células se centrifugaron nuevamente, resuspendidas en 700 μL de reactivo de lisis QIAzol y transferidas a tubos Eppendorf de 1,5 mL, etiquetados y almacenados a -80°C en el Biobanco del IIS-FJD para la extracción posterior del ARN total.

5.2. Análisis de la expresión de los miARNs en suero y en biopsias pulmonares

5.2.1. Extracción del ácido ribonucleico (ARN) total

5.2.1.1. Descongelación de las muestras biológicas

Las muestras biológicas, almacenadas a -80°C en el Biobanco del IIS-FJD, se descongelaron en hielo durante unos 30 min y luego se homogeneizaron por completo mediante agitación en un agitador Reax top (Heidolph, Schwabach, Alemania) antes del proceso de extracción del ARN total.

5.2.1.2. Extracción del ARN total de las muestras de suero

Se añadieron los ARNs sintéticos Uni-Sp2, Uni-Sp4 y Uni-Sp5 (RNA Spike-In Kit, Qiagen) al comienzo del proceso de extracción como controles de referencia exógenos para verificar la correcta extracción del ARN total. Para extraer el ARN total se empleó el miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen), de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. En resumen:

- 1) En un tubo Eppendorf de 2 mL (Eppendorf), se mezclaron 200 μL de suero con tampón RPL para liberar y estabilizar el ARN, efectuando la lisis de proteínas plasmáticas y vesículas extracelulares, e inactivando las ARNasas.
- 2) Se incorporó tampón RPP, se mezcló en un agitador Reax top y se centrifugó en una microcentrífuga accuSpin™ Micro 17 Fisherbrand™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) para precipitar las proteínas y otros contaminantes.
- 3) El sobrenadante se aplicó a una columna RNeasy UCP MiniElute, con la agregación de isopropanol (o 2-propanol; PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania), para la unión de las moléculas de ARN a la membrana de sílice.

- 4) Después de varios lavados para eliminar impurezas, se eluyó el ARN total purificado (>18 nt), que contiene los miARNs (≤ 200 nt), en un tubo Eppendorf de 1,5 mL con 20 μ L de agua libre de ARNasa, precalentada a 50-55°C en un agitador térmico TS-100 (Biosan, Riga Letonia). Los tubos Eppendorf de 1,5 mL etiquetados se guardaron a -80°C hasta su uso futuro o se procedió con la RT del ARN total a ADN complementario o copia (ADNc).

En la figura 10 se ilustra el procedimiento simplificado para extraer el ARN total de muestras de suero.



Figura 10. Proceso abreviado de extracción del ARN total de muestras de suero.

5.2.1.3. Extracción del ARN total de las muestras de biopsia pulmonar

Precedente a la extracción del ARN total, las muestras se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Micra D-1 Homogenizer (Micra GmbH, Heitersheim, Alemania) durante 30 segundos (s). El ARN total se extrajo siguiendo el método de Chomczynski²⁶⁷ con ligeras modificaciones:

- 1) Las muestras se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente (TA) para asegurar la disociación completa de los complejos nucleoproteicos.
- 2) Se adicionaron 140 μ L de cloroformo, se mezcló en un agitador Reax top y se dejó reposar la mezcla durante 2-3 min a TA.
- 3) Los tubos Eppendorf de 1,5 mL se centrifugaron en una centrífuga Hettich Mikro 24-48R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania) a 12.000 g durante 15 min a 4°C, resultando en tres fases diferenciadas: fase superior acuosa (ARN), interfase y fase inferior del fenol-cloroformo (ADN y proteínas).
- 4) Se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, se incorporaron 350 μ L de isopropanol, se mezcló en un agitador Reax top y se incubó la mezcla durante 2 h a -20°C para facilitar el precipitado del ARN total.
- 5) Los tubos Eppendorf de 1,5 mL se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4°C.
- 6) Se eliminó el sobrenadante y se lavó el ARN total precipitado 2 veces con etanol (PanReac AppliChem) al 80% frío, centrifugando las muestras a 7.500 g durante 5 min a 4°C.
- 7) Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el sedimento y se resuspendió en 20 μ L de agua libre de nucleasas, precalentada a 50-55°C en un agitador térmico TS-100. El sedimento contiene el ARN total purificado (>18 nt), que incluye los miARNs (≤ 200 nt).

Los tubos Eppendorf de 1,5 mL etiquetados se almacenaron a -80°C hasta su posterior empleo o se continuó con la RT del ARN total a ADNc. En la figura 11 se presenta de manera gráfica el procedimiento de extracción del ARN total usando muestras de biopsia pulmonar.

Materiales y métodos

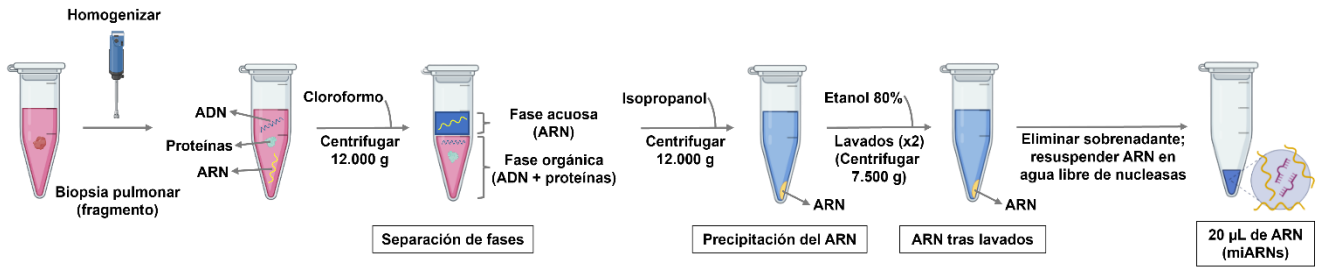


Figura 11. Proceso de extracción del ARN total de muestras de biopsia pulmonar. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

5.2.1.3.1. Determinación cuantitativa del ARN total

Se calculó la concentración (microgramos [μg]/ μL) del ARN total extraído de las muestras de biopsia pulmonar en un espectrofotómetro NanoPhotometer™ N60 (Implen GmbH, Múnich, Alemania). La pureza de las muestras se determinó mediante las relaciones de absorbancia (A) A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , con valores deseados entre 1,8 y 2. Una vez cuantificada la concentración y evaluada la pureza, se llevó a cabo la RT del ARN total a ADNc.

5.2.2. Análisis de la expresión de los miARNs en las muestras de suero y de biopsia pulmonar

Se examinó la expresión de miARNs mediante NGS, específicamente miARN-seq.

5.2.2.1. Secuenciación de nueva generación (NGS) de los miARNs (miARNs-seq [seq; del inglés, sequencing])

5.2.2.1.1. Preparación de las librerías

El ARN total, que incorpora los miARNs, se convirtió en librerías de secuenciación para NGS Illumina (San Diego, California, Estados Unidos) empleando el NEXTFLEX® Small RNA-Seq Kit versión (v)3 (Bioo Scientific Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos), cumpliendo con las pautas establecidas por el proveedor. Se usaron 10,5 μL del ARN total para las muestras de suero y 1 μg del ARN total para las muestras de biopsia pulmonar. De manera concisa, el proceso incluyó:

- 1) Ligación del adaptador adenilado en el extremo 3' (4N).
- 2) Eliminación e inactivación del exceso del adaptador (en el extremo 3').
- 3) Ligación del adaptador en el extremo 5' (4N).
- 4) RT.
- 5) Limpieza de cuentas magnéticas.
- 6) Amplificación por PCR.
- 7) Selección de tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE; del inglés, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) y purificación para las muestras de suero; y selección de tamaño sin PAGE y purificación para las muestras de biopsia pulmonar. Para la PAGE se utilizaron los geles preformados Invitrogen™ Novex™ TBE Gels, 6% (Thermo Fisher Scientific Inc.) y la cubeta de electroforesis Invitrogen™ XCell SureLock™ Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Las librerías, disueltas en 12 μ L del tampón clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl; del inglés, *Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Hydrochloride*) 10 milimolar (mM) y pH 8,5 (Sigma Aldrich), se conservaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Cada librería se identificó con un cebador codificado (en inglés, *barcoded primer*) añadido en la amplificación por PCR. Si la concentración de una librería fue inferior a 2.000 picomoles (pmol)/L, se concentraron empleando GenElute™ LPA (Sigma Aldrich), etanol al 100% frío y acetato de sodio 3 molar (M) y pH 5,2 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Para ello:

- 1) La mezcla se centrifugó en una centrífuga Hettich Mikro 24-48R a 12.000 g durante 30 min a 4°C.
- 2) Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol al 70% frío, centrifugando las muestras a 12.000 g durante 5 min a 4°C.
- 3) Se desechó el sobrenadante, se dejó secar el sedimento y se resuspendió en 12 μ L de Tris-HCl 10 mM y pH 8,5.

En última instancia, se normalizaron todas las librerías a 2 nanomoles (nM), se agruparon y luego se diluyeron y desnaturalizaron (500 μ L) en preparación para la secuenciación.

El control de calidad de las librerías se llevó a cabo en un sistema electroforético TapeStation 4200 (Agilent, Santa Clara, California, Estados Unidos), usando los reactivos High Sensitivity D1000 DNA (High Sensitivity D1000 Sample Buffer y High Sensitivity D1000 Ladder; Agilent) y el dispositivo High Sensitivity D1000 DNA ScreenTape (Agilent).

5.2.2.1.2. Secuenciación de los miARNs (miARNs-seq)

Las librerías se secuenciaron en un sistema MiniSeq 550 (Illumina), utilizando el MiniSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles; Illumina), con lectura única durante 50 ciclos.

5.2.2.1.3. Análisis bioinformático de la expresión de los miARNs

El análisis bioinformático de los datos de miARNs-seq se realizó en colaboración con la Unidad de Bioinformática del Departamento de Genética del IIS-FJD, liderada por el Dr. Pablo Mínguez. Este proceso abarcó el control de calidad, el preprocesamiento y el análisis estadístico de los resultados.

Se empleó el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para el control de calidad de las lecturas en formato FastQ, seguido de un filtrado de lecturas de baja calidad mediante el programa Fasp. El proceso de recorte de las lecturas implicó la eliminación de la secuencia adaptadora 3' TGG AATTCTCGGGTGCCAAGG y la subsiguiente reducción de cuatro bases en ambos extremos, conforme a las indicaciones de la entidad comercial. La herramienta Cutadapt descartó la secuencia del adaptador 5'- AGATCGGAAGAGCACACGTCT desde el extremo 3' y ajustó las lecturas a una longitud entre 17 y 25 nt²⁶⁸. Las secuencias resultantes se alinearon (mapearon) con el genoma humano de referencia (ensamblaje basado en la vGRCh38.p13, hg38), almacenado en la base de datos UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>, Universidad de California, Santa Cruz, California, Estados Unidos), usando el programa Bowtie2²⁶⁹. El conteo de las lecturas de miARNs conocidos se hizo con la herramienta HTSeq-count²⁷⁰, utilizando la anotación de miARNs maduros disponibles en la base de datos miRBase (miRBase v22)²⁷¹. La matriz final contó con miARNs con más de 10 lecturas en todas las muestras. Los recuentos brutos de miARNs se normalizaron mediante la función de media recortada

de valores M (TMM; del inglés, *Trimmed Mean of M-values*) del paquete NOISeq Bioconductor R²⁷², considerando la profundidad de secuenciación y la composición del ARN.

5.2.2.1.3.1. Comparación de los niveles de expresión de los miARNs normalizados

Se compararon los niveles de expresión de los miARNs normalizados entre grupos (dos grupos) empleando dos métodos de análisis de expresión diferencial, NOISeq y DESeq2^{272,273}. Se calculó el logaritmo en base 2 (\log_2) de los factores de cambio (FC; en inglés, *Fold Changes*) y los valores de p (p-valores; en inglés, *p-values*) ajustados (valores de q o q-valores; en inglés, *q-values*) por la tasa de falsos descubrimientos (FDR; del inglés, *False Discoveries Rate*) al 5% para identificar miARNs expresados diferencialmente. Se reconocieron biológicamente relevantes aquellos miARNs con expresión diferencial estadísticamente significativa ($FDR < 0,05$) y un \log_2 (FC) $\geq 1,5$ entre los grupos para muestras de suero, por medio de la aproximación con DESeq2, o con un $q \geq 0,8$ para muestras de biopsia pulmonar, siguiendo la aproximación con NOISeq.

5.2.2.1.3.2. Aplicación del análisis de componentes principales (PCA; del inglés, *Principal Component Analysis*)

Se hizo un análisis de componentes principales (PCA; del inglés, *Principal Component Analysis*) PCA usando los valores normalizados y escalados de los miARNs mediante la función `prcomp` del paquete R `stats`²⁷⁴. El PCA es una técnica que reduce la dimensionalidad de los datos al agrupar variables en componentes principales (PCs; del inglés, *Principal Components*), lo que posibilita un análisis exploratorio de los datos. Para este fin, se efectúa una transformación lineal donde las variables originales se combinan con distintos pesos para crear nuevas variables (PCs). Las PCs describen la varianza de los datos, siendo la PC1 la que más varianza explica, seguida de la PC2, y así sucesivamente. Usualmente, las PC1 y PC2 se utilizan para evaluar la separación de grupos. En el análisis de miARNs-seq, cada miARN contribuye como una dimensión, generando múltiples dimensiones al examinarse gran cantidad de miARNs. No obstante, la mayoría de los miARNs tienen expresiones similares en todas las muestras, teniendo un impacto limitado en las PCs. Estas PCs se derivan principalmente de miARNs con expresiones dispares entre las muestras, destacando aquellos que presentan diferencias entre grupos. Es probable que los miARNs que más aporten a las PCs estén diferencialmente expresados entre los grupos en comparación.

En la figura 12 se muestra un diagrama del proceso de análisis de la expresión de miARNs utilizando NGS (miARNs-seq), que comprende la preparación de librerías a partir del ARN total, el análisis de la expresión de miARNs y la implementación del PCA.

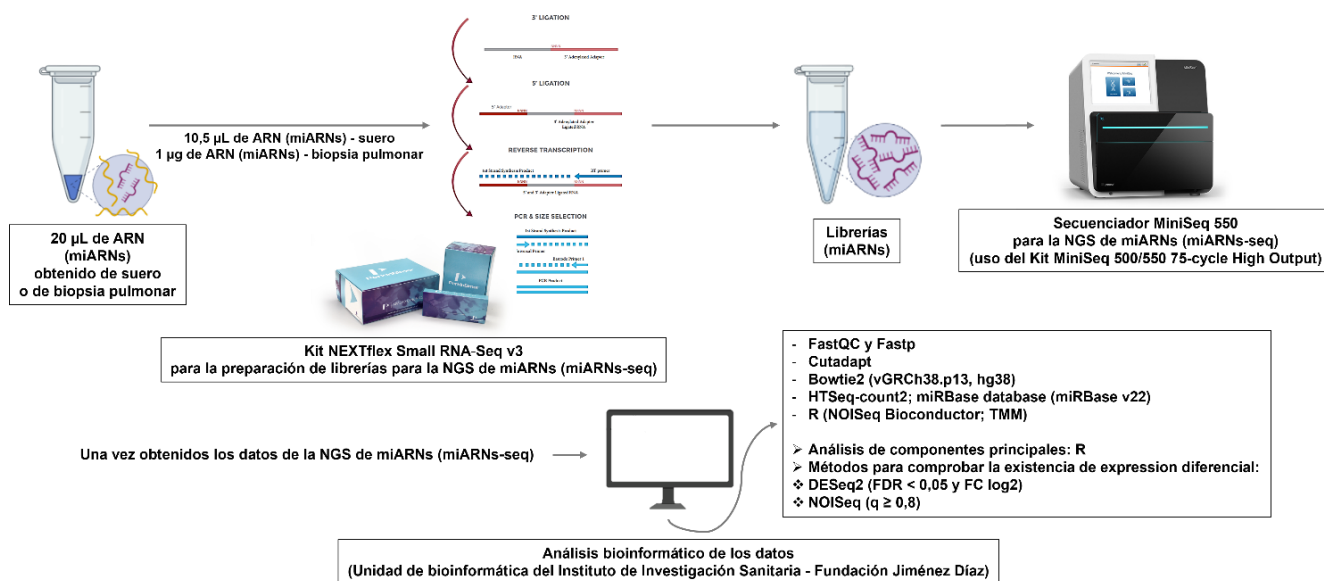


Figura 12. Esquema del análisis de la expresión de miARNs por miARNs-seq, que incluye la preparación de librerías a partir del ARN total, el análisis bioinformático de la expresión de miARNs y la aplicación del PCA.

5.2.2.2. Validación de la expresión diferencial de los miARNs en las muestras de suero y de biopsia pulmonar mediante transcripción inversa (RT; del inglés, *Reverse Transcription*) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR; del inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*)

5.2.2.2.1. RT del ARN total a ácido desoxirribonucleico complementario o copia (ADNc)

El ARN total purificado, que contiene los miARNs, se retrotranscribió (RT) a ADNc utilizando el miRCURY® LNA® RT Kit (Qiagen). En tubos Eppendorf de 0,2 mL (Eppendorf) se mezclaron:

- 2 µL de *buffer* de reacción miRCURY 5X.
- 1 µL de enzima de RT miRCURY.
- 1 µL de la combinación de RNA Spike-In Uni-Sp6 (Uni-Sp6) y cel-miR-39-3p (Qiagen).
- 2 µL de agua libre de ARNasa.
- 4 µL del ARN total extraído de muestras de suero o de biopsia pulmonar.

Se emplearon los ARNs sintéticos Uni-Sp6 y cel-miR-39-3p como controles de referencia exógenos para confirmar la adecuada ejecución de la RT. La composición de la mezcla fue la misma para el suero y las biopsias pulmonares, salvo que la concentración del ARN total de las biopsias pulmonares se ajustó a 5 nanogramos (ng)/µL para usar 20 ng (en 4 µL), mientras que en el suero no se hizo ningún ajuste. Las reacciones de RT (tabla 10) se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Fast (Thermo Fisher Scientific Inc.). Finalizada la RT, los tubos etiquetados que albergaban los 10 µL de ADNc resultantes se guardaron a -20°C para su futura utilización.

Tabla 10. Programa de tiempos y temperaturas de la RT.

TIEMPOS	TEMPERATURAS	CICLOS
60 min	42°C	1
5 min	95°C	
Infinito	4°C	

5.2.2.2.2. qPCR

Se cuantificó la expresión de los miARNs por qPCR. El ADNc de las muestras de suero se diluyó 1:30, y el de las muestras de biopsia pulmonar 1:60 en agua libre de nucleasas antes de la qPCR, para la que se empleó el miRCURY® LNA® miRNA SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). En tubos Eppendorf de 0,2 mL se dispuso una mezcla, la cual consistió en un volumen de 10 µL, compuesta por:

- 5 µL de mezcla maestra (en inglés, *master mix*) SYBR Green miRCURY.
- 1 µL de cada cebador o sonda (en inglés, *primer*) miRCURY LNA™ microRNA PCR primer set (BioNova científica, Exiqon, Qiagen) específico para cada miARN.
- 1 µL de agua libre de nucleasas.
- 3 µL del ADNc diluido.

Las secuencias de los miARNs bajo estudio, dianas de los cebadores específicos, están accesibles en la base de datos miRBase (miRBase v22)²⁷¹. La eficiencia de los cebadores fue fijada en 2 por el fabricante, y cada miARN fue evaluado por triplicado para cada muestra. Las reacciones de qPCR (tabla 11) se realizaron en microplacas de PCR de 96 pocillos (Cultek S.L.U.), selladas con MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific Inc.), en un termociclador LightCycler® 96 (Roche, Basilea, Suiza). La tabla anexa 1 exhibe los miARNs detectados con expresión diferencial en las comparaciones de dos grupos mediante miARNs-seq en suero y biopsias pulmonares, cuya expresión se investigó posteriormente para su validación por RT-qPCR, incorporando controles endógenos (CENs) y controles exógenos (CEX) para ambas muestras, así como controles de hemólisis (CHs) solamente para las muestras de suero.

Tabla 11. Etapas de la qPCR. Programa de tiempos y temperaturas.

ETAPAS	TIEMPOS	TEMPERATURAS	CICLOS
Preincubación	2 min	95°C	1
Amplificación	10 s	95°C	45
	1 min	56°C	
Fusión (en inglés, <i>melting</i>)	5 s	95°C	1
	1 min	60°C	
	1 s	95°C	
Enfriamiento	10 s	40°C	Infinito

Los resultados se expresaron en valores de ciclo umbral (Ct; del inglés, *Cycle threshold*) obtenidos al concluir la qPCR, tomados del informe emitido por el *software* LightCycler® 96 SW 1.1 (Roche). Se determinó la media aritmética (\bar{X}) de los valores de Ct, con una desviación $\leq 0,5$, para cada triplicado, miARN y muestra. Se consideraron diferentes miARNs endógenos o exógenos (tabla anexa 1) como posibles controles internos usando los programas estadísticos GraphPad Instat v3.0 y

GraphPad Prism® v6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos). La prueba estadística de igualdad de \bar{X} de Ct comprobó la idoneidad como controles internos, seleccionando aquellos cuyas \bar{X} de Ct no difirieron significativamente entre los grupos comparados. La herramienta estadística Bestkeeper también se utilizó para valorar la valía de los potenciales controles internos mediante el cálculo de la media geométrica y la formulación de un índice ponderado empleando el valor de Ct original²⁷⁵.

Los miARNs hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-451a se usaron para medir el índice de hemólisis en las muestras de suero, con la condición $Ct_{\text{hsa-miR-23a-3p}} - Ct_{\text{hsa-miR-451a}} < 7$ (en valor absoluto) para verificar la ausencia de hemólisis²⁷⁶. Además, se utilizaron los ARNs sintéticos Uni-Sp2, Uni-Sp4 y Uni-Sp5 como controles de calidad para la extracción de las muestras. Se aseguró que los valores de Ct fueran homogéneos, con variaciones no mayores a 2 o 3 ciclos, y manteniendo diferencias de 5-7 ciclos entre ellos (respecto al siguiente de menor concentración), siendo Uni-Sp2 el más expresado, Uni-Sp4 expresado de forma intermedia y Uni-Sp5 el menos expresado:

- Ct de Uni-Sp5 - Ct de Uni-Sp4 = 5-7 ciclos.
- Ct de Uni-Sp4 - Ct de Uni-Sp2 = 5-7 ciclos.

La expresión de cada miARN en cada muestra se normalizó con respecto al miARN endógeno o exógeno, o con la \bar{X} de estos (si se empleó más de uno como control interno). La expresión relativa de los miARNs se determinó mediante los métodos $2^{-\Delta Ct}$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = \bar{X}Ct_{\text{miARN}} - \bar{X}Ct_{\text{miARN/s endógeno/s o exógenos}}$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{grupo1}} - \Delta Ct_{\text{grupo2}}$; Δ , delta²⁷⁷.

En la figura 13 se presenta visualmente el proceso de análisis de la expresión de miARNs por RT y qPCR para condirmar los hallazgos significativos de expresión diferencial obtenios mediante miARNs-seq.

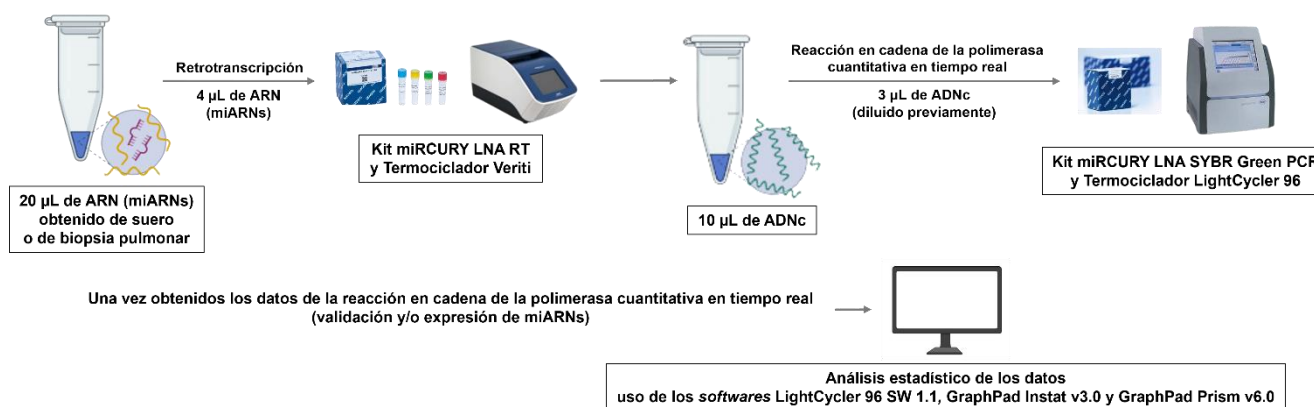


Figura 13. Diagrama del análisis de la expresión de miARNs por miARNs-seq, abarcando las metodologías moleculares RT y qPCR, utilizando ARN extraído de suero (parte superior) y de biopsia pulmonar (parte inferior).

5.2.2.3. Examen de la expresión diferencial de los miARNs, validada mediante RT-qPCR, en las muestras de suero y de biopsia pulmonar

Se investigó la expresión diferencial de los miARNs identificados por NGS (miARNs-seq) y luego confirmados mediante RT-qPCR en las comparaciones en suero entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, en sujetos

Materiales y métodos

con asma e individuos sin diagnóstico de asma (sujetos control) (tabla anexa 2). El ARN total, que incluye los miARNs, se retrotranscribió (RT) a ADNc (apartado 5.2.2.2.1), y posteriormente se procedió a la cuantificación de la expresión de los miARNs por qPCR (apartado 5.2.2.2.2). Se añadieron CENs y CEX para ambas muestras, junto con CHs exclusivamente para las muestras de suero.

5.3. Análisis de la expresión diferencial de los genes diana de los miARNs en las muestras de biopsia pulmonar mediante RT y qPCR

5.3.1. RT del ARN total a ADNc

Para la RT a ADNc del ARN total purificado, que contiene los ARNm (> 200 nt), se usó el Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). En tubos Eppendorf de 0,2 mL se mezclaron:

- 2 µL de *buffer* de RT 10X.
- 0,8 µL de mezcla de dNTPs 25X.
- 2 µL de *primers* aleatorios de RT 10X.
- 1 µL de transcriptasa inversa MultiScribe.
- El volumen correspondiente a 500 ng del ARN total ajustado con agua libre de ARNsa hasta alcanzar un volumen de 14,2 µL.

Las reacciones de RT (tabla 12) se efectuaron en un termociclador Applied Biosystems™ 2720 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Terminada la RT, los tubos etiquetados con los 20 µL de ADNc producidos se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados.

Tabla 12. Programa de tiempos y temperaturas de la RT.

TIEMPOS	TEMPERATURAS	CICLOS
10 min	25°C	1
120 min	37°C	
5 min	85°C	
Infinito	4°C	

5.3.2. qPCR

Después de obtener el ADNc, se prosiguió con la qPCR para investigar la expresión génica, usando la Applied Biosystems™ TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.). El enfoque se centró en los genes diana de los miARNs séricos, los cuales fueron identificados como diferenciales por NGS (miARNs-seq) y a continuación validados mediante RT-qPCR en las comparativas entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs.

Se emplearon sondas Applied Biosystems™ TaqMan (Thermo Fisher Scientific Inc.), caracterizadas por tener ligada carboxifluoresceína-6 (6-FAM™; del inglés, *6-carboxyfluorescein*)-unión al surco menor (MGB; del inglés, *Minor Groove Binding*) para la detección de la expresión génica, con la medición de la fluorescencia emitida. En la tabla anexa 3 se detallan los genes (humanos) evaluados y las sondas Applied

Biosystems™ Taqman específicas correspondientes. El gen humano *GAPDH* se utilizó como control interno (CEN; tabla anexa 3). La eficiencia de todas las sondas empleadas fue de 2, de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

En tubos Eppendorf de 0,2 mL se preparó una mezcla que contenía 10 µL de:

- 5 µL de *master mix* de ensayo de expresión génica Taqman 2X (Applied Biosystems™ Taqman Gene Expression Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.).
- 0,5 µL de sonda de ensayo de expresión génica TaqMan 20X de Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific Inc.).
- 3,5 µL de agua libre de nucleasas.
- 1 µL de ADNc.

Las reacciones de qPCR (tabla 13) se ejecutaron en placas Applied Biosystems™ de 96 pocillos MicroAmp™ Optical Fast (Thermo Fisher Scientific Inc.), selladas (MicroAmp™ Optical Adhesive Film), en un termociclador Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) con un sistema de registro de datos que permite su exportación como archivos de Excel® (Microsoft 365, Microsoft, Redmond, Washington, Estados Unidos).

Tabla 13. Programa de tiempos y temperaturas de la qPCR.

TIEMPOS	TEMPERATURAS	CICLOS
2 min	50°C	1
10 min	95°C	1
15 s	95°C	40
1 min	60°C	
Infinito	4°C	1

Cada gen se analizó por triplicado por muestra. Los valores de Ct de cada triplicado, gen y muestra, con una desviación $\leq 0,5$, tomados del informe generado por el sistema de datos del termociclador Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System se usaron para calcular la \bar{X} . Luego, se estandarizó la \bar{X} de los valores de Ct de cada gen con el Ct del control interno (CEN) *GAPDH* en cada muestra. Se determinó la expresión génica relativa utilizando los métodos $2^{-\Delta Ct}$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = \bar{X}Ct_{gen} - \bar{X}Ct_{GAPDH}$, y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sujetos asmáticos} - \Delta Ct_{individuos control}$ ²⁷⁷. En la figura 14 se esquematiza de forma gráfica la metodología para examinar la expresión génica mediante las técnicas moleculares RT y qPCR.

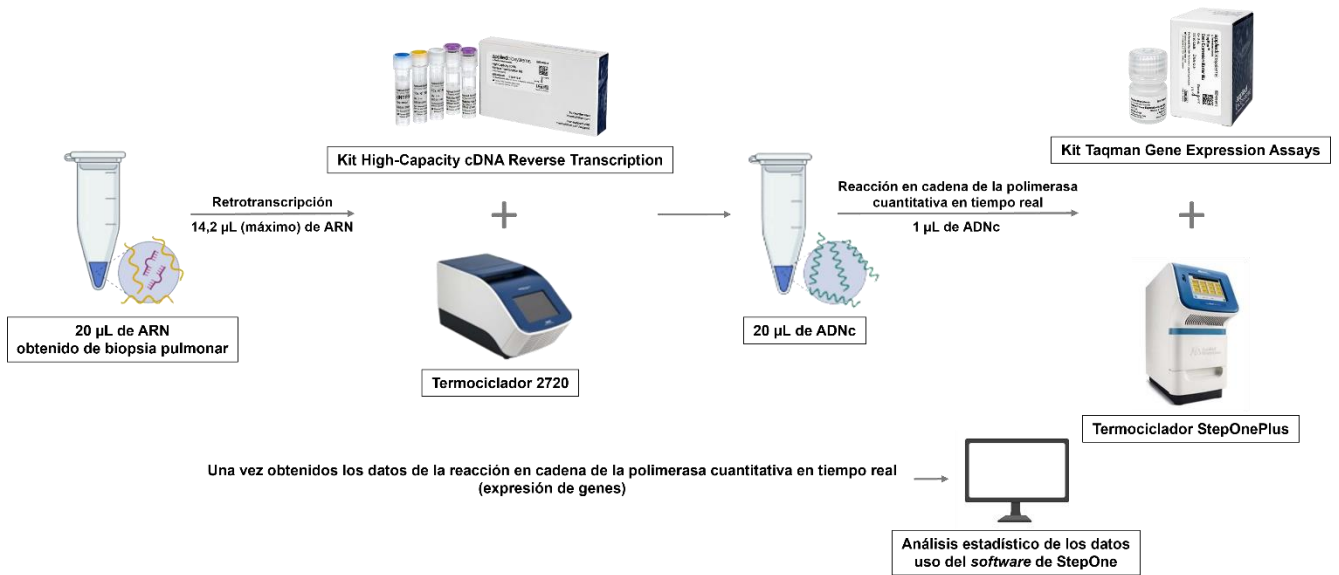


Figura 14. Representación del estudio de la expresión génica por los métodos moleculares RT y qPCR.

5.4. Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAs; del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) para medir la expresión proteica de IGFBP-3 y de IGF-1R

Las concentraciones séricas de las proteínas extracelulares solubles IGFBP-3 e IGF-1R se cuantificaron mediante ELISA. Se emplearon el Human IGFBP-3 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) y el Human IGF-I R/IGF1R DuoSet ELISA Kit (Bio-Techne), respectivamente, ambos de tipo sándwich, conforme a las instrucciones del fabricante.

Previo a llevar a cabo el ELISA de IGF-1R, la placa se incubó con el anticuerpo de captura durante toda la noche a TA, seguido de lavados, bloqueo durante 1 h a TA y nuevos lavados, quedando preparada para el experimento. Para el ELISA de IGFBP-3, la placa ya estaba tapizada con el anticuerpo de captura, evitando preparativos adicionales.

En el ELISA de IGFBP-3:

- 1) Muestras y estándares se incubaron durante 2 h a 4°C tras la adición del diluyente de ensayo. Las muestras se diluyeron 1:100.
- 2) Se lavaron los pocillos, se agregó el anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; del inglés, *Horseradish Peroxidase*) y se incubaron nuevamente (2 h a 4°C).
- 3) Después de un segundo lavado, se incorporó el sustrato (peróxido de hidrógeno [H₂O₂] y tetrametilbencidina [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina; C₁₆H₂₀N₂]) durante 30 min a TA, protegiendo la placa de la luz.
- 4) La reacción se detuvo al añadir solución de parada (ácido sulfúrico [H₃SO₄] 1 M).

En el ELISA de IGF-1R se siguió la misma metodología general, pero con variaciones: muestras y estándares se incubaron directamente, se usó un anticuerpo de detección unido a biotina y se agregó estreptavidina-HRP luego de un segundo lavado y antes de la incorporación del sustrato de la enzima (HRP), durante 20 min a TA y resguardando la placa de la luz en los dos casos.

Se construyó una curva patrón utilizando estándares de IGFBP-3 e IGF-1R recombinantes humanos, diluidos secuencialmente 1:2, cubriendo concentraciones desde 50 ng/mL hasta 0,79 ng/mL para IGFBP-3 y desde 16.000 picogramos (pg)/mL hasta 250 pg/mL para IGF-1R. La absorbancia se midió a 450 nm, con corrección a 570 nm, en un lector de placas Infinite® F200 (Tecan, Männedorf, Suiza). Las concentraciones de IGFBP-3 e IGF-1R en las muestras se calcularon extrapolando los valores a partir de ecuaciones derivadas de las curvas patrón, con ayuda de GraphPad Prism® v6.0 y Microsoft® Excel®. En la figura 15 se ilustra el proceso para evaluar las concentraciones de IGFBP-3 e IGF-1R.

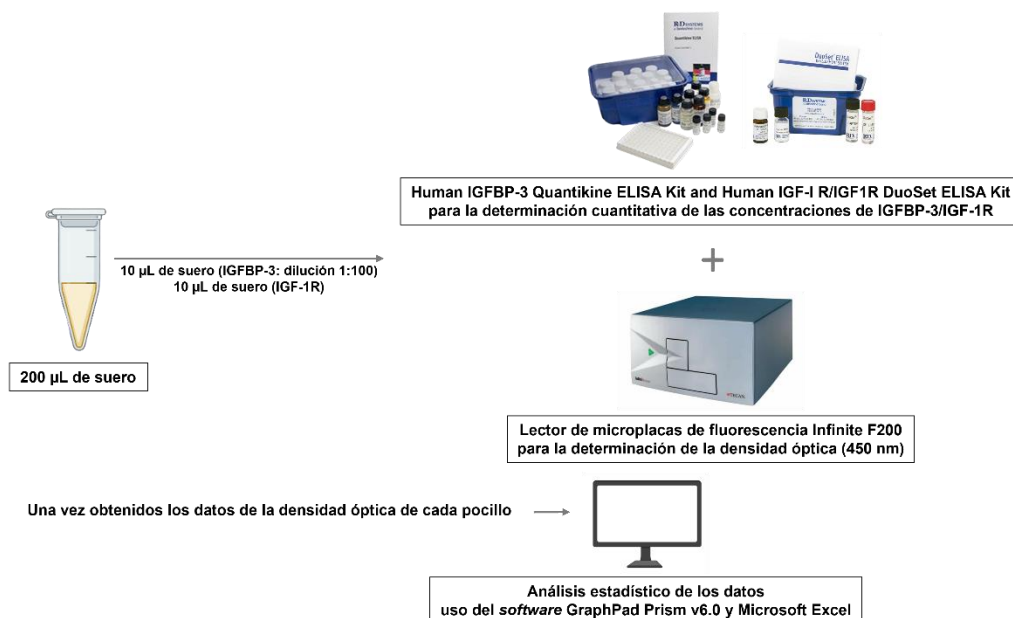


Figura 15. Procedimiento de la determinación de las concentraciones de IGFBP-3 y de IGF-1R.

5.5. Cultivos celulares de células estructurales de pulmón: células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (SAEC; del inglés, *Small Airway Epithelial Cells*) y células musculares lisas bronquiales (BSMC; del inglés, *Bronchial Smooth Muscle Cells*)

En los ensayos para evaluar el potencial impacto de la dexametasona, un GC, en la expresión de los miARNs y genes diana diferenciales en suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, se utilizaron células primarias humanas de pulmón SAEC y BSMC (Lonza Group).

5.5.1. Descongelación, siembra y mantenimiento de subcultivos de SAEC

Los viales de células, guardados en un contenedor criogénico de nitrógeno (N₂) líquido (-196°C) para su conservación, se extrajeron para su descongelación en un baño de agua con agitación Innova 3000 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, Nueva Jersey, Estados Unidos) durante 2 min a 37°C. Después, las células se sembraron de acuerdo con las directrices del proveedor, inicialmente en frascos de cultivo celular (en inglés, *flask*) de 25 centímetros (cm)² Corning® (Cultek S.L.U.). Se cultivaron a una concentración de 2.500 células/cm² con un volumen de medio de cultivo celular de 1 mL/cm². Se efectuaron cambios de medio de cultivo cada 1-2 días empleando el Small Airway Epithelial Cell Basal Medium (Promocell, Heidelberg, Alemania) con componentes adicionales añadidos conforme a las recomendaciones del fabricante (tabla anexa 4).

Materiales y métodos

Las células se incubaron para su crecimiento y proliferación en un incubador Forma™ Series II Water-Jacketed CO₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 37°C y 5% de dióxido de carbono (CO₂). Una vez alcanzaron aproximadamente el 80% de crecimiento, se procedió con un pase de cultivo. Para ello:

- 1) Se incorporaron 2,5 mL de tripsina/ácido etilendiaminetetraacético (EDTA; del inglés, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*) (0,25%) con indicador de pH rojo de fenol Gibco™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se incubaron durante 5 min a 37°C y 5% de CO₂.
- 2) Se agregaron 5 mL de una solución de neutralización de la tripsina, compuesta por:
 - Medio Gibco™ instituto conmemorativo Roswell Park-1640 (RPMI-1640; del inglés, *Roswell Park Memorial Institute-1640*) (Thermo Fisher Scientific Inc.), que también contiene el indicador de pH rojo de fenol.
 - L-glutamina (200 mM; Cultek S.L.U.).
 - Piruvato sódico (100 mM; Lonza Group, Basilea, Suiza).
 - Suero fetal bovino (FBS; del inglés, *Fetal Bovine Serum*; Sigma-Aldrich) al 10%, precalentado durante 1 h a 45°C.
 - Estreptomina-penicilina (10.000 Unidades [U]/mL; Cultek S.L.U.).
- 3) Se centrifugó el volumen total en un tubo de 15 mL en una centrífuga Allegra X-15R a 456 g durante 5 min a 22°C.
- 4) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 1 mL de medio de cultivo.
- 5) Se llevaron a cabo el conteo y la consiguiente evaluación de la viabilidad de las células en una cámara de recuento Neubauer usando la técnica de tinción por exclusión.
- 6) Las células se cultivaron de nuevo en frascos de cultivo celular de 25 cm² a una densidad de 2.500 células/cm² para mantener el crecimiento (subcultivo), o en placas de cultivo de 24 pocillos (placas de cultivo P24) Corning™ Costar™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) con una densidad de 100.000 células/pocillo para hacer experimentos al día siguiente. En ambos casos, las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta su utilización en ensayos, empleando células en cuarto pase de crecimiento y proliferación celular.

5.5.2. Descongelación, siembra y mantenimiento de subcultivos de BSMC

El procedimiento de descongelación, siembra y subcultivo se realizó siguiendo las instrucciones mencionadas previamente (apartado 5.5.1), con las variaciones que se indican a continuación:

- Las células se sembraron a una concentración de 3.500 células/cm², tanto al inicio como para los subcultivos.
- Se usó el medio de cultivo celular Smooth Muscle Cell Basal Medium 2 (Promocell), que incluye componentes suplementarios añadidos según las recomendaciones del proveedor (tabla anexa 5).
- Se utilizaron células en cuarto y quinto pase para los experimentos.

5.6. Experimentación funcional en SAEC y en BSMC

5.6.1. Estudio del impacto de la dexametasona en la expresión de los miARNs y de los genes

Se cultivaron SAEC y BSMC en placas P24 Corning™ Costar™ con una densidad de 100.000 células por pocillo en un volumen de 500 µL de medio de cultivo celular. Con un crecimiento a 37°C y 5% de CO₂, se

comenzaron los experimentos al alcanzar el 80-90% de confluencia. Cada experimento empleó dos placas P24, una por cada tiempo, 4 h y 24 h. El protocolo experimental consistió en (figura 16):

- 1) Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1X estéril para eliminar células muertas.
- 2) Se añadió dexametasona (Sigma-Aldrich) en concentraciones crecientes (10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M) en los pocillos asignados. La dexametasona se diluyó en medio de cultivo hasta completar un volumen final de 500 μ L en cada pocillo. El primer pocillo se utilizó como control, sin agregar dexametasona, solo se adicionaron 500 μ L de medio de cultivo.
- 3) Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 h y 24 h.
- 4) Posterior a los tiempos de incubación definidos, las muestras se recogieron y se guardaron a -20°C en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Esto incluyó 500 μ L del sobrenadante celular y las células (*pellet* celular) resuspendidas en 700 μ L de reactivo de lisis QIAzol para la subsiguiente extracción del ARN.

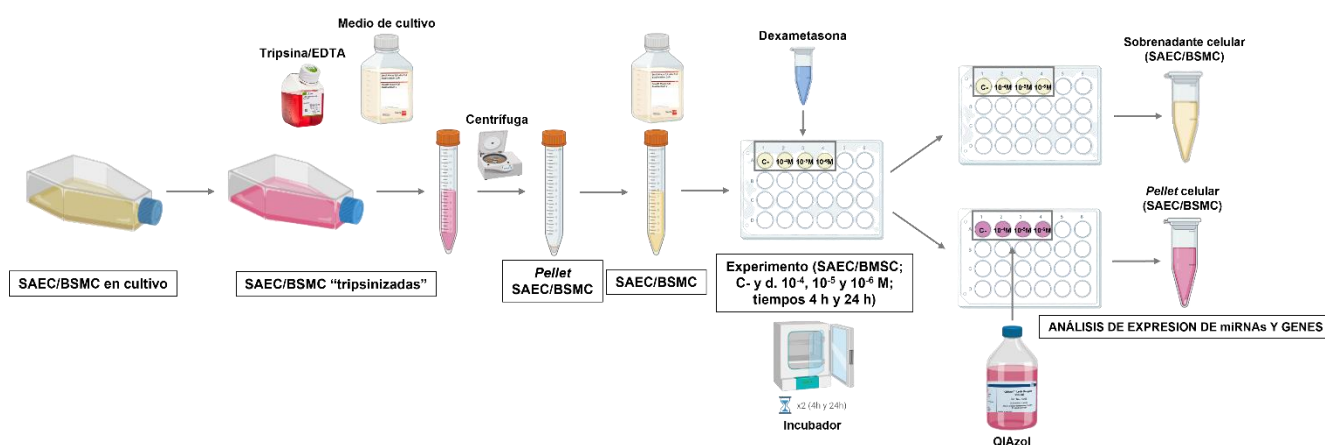


Figura 16. Diagrama de la experimentación en SAEC y en BSMC. Figura creada con BioRender (BioRender.com).

5.6.1.1. Extracción y cuantificación del ARN total, RT del ARN total a ADNc y qPCR

Se realizaron seis experimentos tanto en SAEC como en BSMC, seguidos por la extracción, la cuantificación y la RT a ADNc del ARN total (>18 nt), que contiene los miARNs (≤ 200 nt). Luego, el ADNc, ajustado a una concentración de 5 ng/ μ L para el uso de 20 ng, se utilizó en la qPCR para analizar la expresión de miARNs.

Los procesos de extracción del ARN total, determinación cuantitativa del ARN total, RT del ARN total a ADNc y qPCR se llevaron a cabo de acuerdo con lo establecido en los apartados 5.2.1.3, 5.2.1.3.1, 5.2.2.2.1 y 5.2.2.2.2. Se investigó la expresión de los miARNs diferenciales detectados mediante NGS (miARNs-seq), después confirmados por RT-qPCR, en la comparación en suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs. La tabla anexa 6 muestra los miARNs sujetos a examen mediante RT-qPCR, incorporando los CENs y CEX. Se emplearon datos de cinco experimentos para determinar su expresión. Para garantizar la efectividad del tratamiento con dexametasona, se efectuó RT-qPCR, según lo expuesto en los apartados 5.3.1 y 5.3.2, para estudiar la expresión del gen humano *GILZ*, el cual se induce en presencia de este GC. La sonda TaqMan específica para el gen *GILZ* tiene el identificador Hs00608272_m1, donde m indica que la sonda abarca una unión de exón y no detectará ADN genómico. Los resultados de expresión génica de *GILZ* se tomaron de seis experimentos en SAEC y cuatro en BSMC.

5.7. Análisis del contenido proteico de los exosomas de las muestras de suero y de sobrenadante de esputo

Se investigó la composición proteica de exosomas de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. El procedimiento comprendió la obtención de exosomas, la medición de la concentración proteica, la verificación del aislamiento de exosomas por *Western blotting* (o *Western blot* o *immunoblotting*) y la caracterización del perfil proteico. La determinación del perfil proteómico implicó la digestión de proteínas, la separación de péptidos mediante nano-cromatografía líquida de fase reversa, el análisis de péptidos por espectrometría de masas de alta resolución y la interpretación de datos para la cuantificación relativa sin marcaje de proteínas. Además, se hizo un análisis funcional de proteínas con distinta abundancia.

5.7.1. Purificación de los exosomas

Las muestras se descongelaron en hielo durante aproximadamente 30 min y luego se homogeneizaron mediante agitación en un agitador Reax top antes de proceder a la obtención de los exosomas, aplicando el método descrito a continuación:

- 1) Las muestras de suero (1 mL) se centrifugaron en una microcentrífuga Fresco™ 21 (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 12.000 g durante 20 min a 10°C.
- 2) El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga (Beckman Coulter), se suplementó con PBS 1X estéril, alcanzando un volumen de 20 mL y se ultracentrifugó en una ultracentrífuga XL-80 (Beckman Coulter) con el rotor 70Ti (Beckman Coulter) a 100.000 g durante 1 h y 10 min a 10°C.
- 3) Después de desechar el sobrenadante, el sedimento (*pellet* de exosomas) se resuspendió en 20 mL de PBS 1X estéril y se sometió a una segunda ultracentrifugación bajo las mismas condiciones.
- 4) El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 60 µL de PBS 1X/EDTA (Sigma-Aldrich) 5 mM filtrado y estéril, transfiriéndolo (60 µL) a tubos Eppendorf de 0,5 mL (Eppendorf), los cuales se almacenaron a -80°C.

Se usó el mismo procedimiento general para las muestras de sobrenadante de esputo (750 µL), con las siguientes modificaciones: inicialmente se sometieron a cinco centrifugaciones en una centrífuga Hettich Mikro 24-48R (dos a 1.020 g durante 4 min a 4°C; una a 2.850 g durante 4 min a 4°C y dos a 19.270 g durante 1 min a 4°C). Se realizó una única ultracentrifugación en tubos de micro-ultracentrífuga (Thermo Fisher Scientific Inc.), añadiendo PBS 1X estéril al sobrenadante hasta llegar a un volumen de 1,3 mL, en una micro-ultracentrífuga Sorvall™ serie MX 120 Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.) con el rotor S140-AT (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100.000 g durante 1 h y 10 min a 4°C.

Posteriormente, las muestras se utilizaron para la detección de proteínas exosomales por *Western blot* y para la caracterización del perfil proteico.

5.7.2. Determinación de la concentración proteica de los exosomas

La concentración proteica de los exosomas se midió mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA; del inglés, *Bicinchoninic Acid*), empleando el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Este método, basado en la reacción de Biuret y usando un reactivo tolerante a detergentes, como el dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*; C₁₂H₂₅NaO₄S) o el

nonilfenoxipolietoxietilanol-40 (NP-40; $C_{19}H_{32}O_3$)²⁷⁸, se cuantificó en un NanoPhotometer™ N60. Se construyó una curva patrón con diluciones seriadas 1:2 de un estándar de albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, *Bovine Serum Albumin*) en una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% con azida de sodio (NaN_3), abarcando concentraciones desde 2 miligramos (mg)/mL hasta 0,03125 mg/mL. La concentración de proteínas exosomasles se calculó por extrapolación de los valores utilizando la ecuación derivada de la curva patrón.

5.7.3. Identificación de las proteínas de los exosomas mediante *Western blot*, que involucra la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE; del inglés, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) con dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*), la transferencia y la inmunodetección

Las muestras de proteínas exosomales se prepararon en condiciones reductoras al mezclarlas con un tampón de carga en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Este tampón contenía:

- Tris-HCl 0,5 M y pH 6,8 (Sigma-Aldrich).
- Glicerol (PanReac AppliChem).
- SDS (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, Estados Unidos) al 10%.
- Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) al 0,5%.
- 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).
- Agua destilada o desionizada (DBC Distribuciones Biocientíficas S.L., Móstoles, Madrid, España).

La mezcla resultante se incubó durante 5 min a 100°C en un agitador térmico TS-100, logrando así la desnaturalización total de las proteínas.

El protocolo para la técnica de *Western blot* se implementó conforme a los pasos especificados seguidamente:

- 1) Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE; del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Las proteínas exosomales se separaron por SDS-PAGE, empleando geles de acrilamida-bis acrilamida (Bio-Rad Laboratories Inc.) al 12% con los siguientes componentes:
 - Acrilamida-bis acrilamida al 30% en una mezcla con proporción 37,5:1 (PanReac AppliChem).
 - Tris-HCl 1,5 M y pH 8,8 (Sigma-Aldrich).
 - SDS al 10%.
 - Agua destilada.
 - Se usaron dos geles idénticos, uno para las muestras de proteínas exosomales de suero y otro para las de sobrenadante de esputo.
 - La electroforesis se ejecutó a 80-120 Voltios (V) en un aparato de electroforesis PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories Inc.).
 - Además, se incluyeron 2 muestras de proteínas exosomales de eosinófilos de individuos sanos, así como 2 muestras de proteínas extraídas de células (una de SAEC y otra de BSMC) como controles. Se utilizó el marcador preteñido Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad Laboratories Inc.) para poder precisar el peso molecular de las proteínas.
- 2) Transferencia a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF; del inglés, *Polyvinylidene Fluoride*). Las proteínas exosomales, tras ser separadas, se transfirieron a una membrana de PVDF Hybond™

Materiales y métodos

P 0.45 (Amersham, GE Healthcare Technologies Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos) con el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc.).

3) Inmunodetección de las proteínas exosomales. Para ello:

- 3.1) Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la membrana con una solución compuesta de PBS 1X (Thermo Fisher Scientific Inc.)/Tween-20 (Sigma-Aldrich) al 0,2% y leche en polvo desgrasada (VWR Internacional, Radnor, Pensilvania, Estados Unidos) al 5%, durante 2 h a TA en movimiento en un balancín Bibby Stuart Platform Rocker STR6 (Akribis Scientific Limited, Knutsford, Pickmere, Reino Unido).
- 3.2) Se llevaron a cabo lavados (3-5 veces cada 5-10 min) con PBS 1X/Tween-20 al 0,2% para eliminar el exceso de leche en polvo.
- 3.3) La membrana se cortó en bandas según el tamaño de las proteínas, y cada banda se incubó con un anticuerpo primario específico (tabla anexa 7) durante toda la noche a 4°C en movimiento en un balancín Stuart See-saw Rocker SSL4 (Huberlab, Aesch, Suiza).
- 3.4) Al día siguiente, se hicieron lavados (3-5 veces cada 5-10 min) con PBS 1X/Tween-20 al 0,2% para retirar el sobrante de anticuerpo primario no unido.
- 3.5) Cada banda se incubó con un anticuerpo secundario (tabla anexa 7) durante 2 h a TA en movimiento en un balancín Bibby Stuart Platform Rocker STR6.
- 3.6) Se realizaron lavados (alrededor de 15 veces cada 5-10 min) con PBS 1X/Tween-20 al 0,2% durante 2 h a TA para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no ligado.

Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se diluyeron en PBS 1X, Tween-20 al 0,2% y leche en polvo desgrasada al 0,5%. La tabla anexa 7 proporciona información detallada sobre los anticuerpos empleados en la inmunodetección de las proteínas exosomales, incluyendo la especie, la dilución establecida y el proveedor.

Finalmente, las bandas de membrana con proteínas exosomales se incubaron con el reactivo Immobilon Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore, Merck KGaA, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos) durante 1 min y, la quimioluminiscencia generada se reveló en un equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare Technologies Inc.).

Se usaron los anticuerpos anti-CD9, anti-CD63, anti-ALIX y anti- β -actina, este último como control de carga en el *Western blot* (CEN), para verificar la correcta purificación de los exosomas. También se utilizó el anticuerpo anti-calnexina para excluir la influencia de componentes celulares. Las proteínas ALIX (95 kDa) y calnexina (90 kDa), de tamaños similares, se identificaron en una misma banda. Con este propósito, se efectuó el procedimiento de eliminación y reprobación (en inglés, *stripping and reprobing*) empleando la solución ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution (10X; Merck Millipore, Merck KGaA), para detectar calnexina luego de confirmar la existencia de ALIX. De manera que, después de la incubación con la solución de *stripping and reprobing*, se llevaron a cabo lavados (3-5 veces cada 5-10 min) con PBS 1X/Tween-20 al 0,2% y se incubó con los anticuerpos correspondientes, seguido de lavados adicionales, para visualizar la proteína calnexina.

5.7.4. Caracterización del perfil proteómico de los exosomas

El perfil proteico de los exosomas se determinó en el Servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), usando muestras de suero y de sobrenadante de esputo de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. Se realizaron dos análisis separados, posibilitando la comparación entre ambos tipos de muestras y los dos fenotipos de pacientes con asma.

5.7.4.1. Digestión de las proteínas

Las proteínas exosomales se digirieron utilizando el IST Kit (Preomics, Planegg-Martinsried, Alemania), de acuerdo con las pautas provistas por el fabricante. Brevemente:

- 1) Se concentraron 46,8 µg de las proteínas de suero y 53,5 µg de las proteínas de sobrenadante de esputo en un sistema diseñado para concentración y desecación al vacío centrífugo SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific Inc.).
- 2) Las proteínas se resuspendieron en el *buffer* LYSE y se incubaron durante 10 min a 95°C para la reducción y alquilación de estas.
- 3) Se agregó la solución DIGEST, la cual incorpora las proteasas tripsina y Lys-C, y se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación en un agitador MACSmix™ Tube Rotator.
- 4) La digestión se detuvo con el *buffer* STOP y se transfirió todo el volumen a una microcolumna.
- 5) Las proteínas se lavaron con los *buffers* WASH 1 y 2 y se eluyeron 2 veces con el *buffer* ELUTE.
- 6) Las proteínas digeridas se secaron nuevamente en el SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se reconstituyeron en 20 µL del *buffer* LOAD.

La concentración de los péptidos se midió en un fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.), y se preservaron a -20C hasta su análisis en el espectrómetro de masas.

5.7.4.2. Separación de los péptidos mediante nano-cromatografía líquida de fase reversa y análisis por espectrometría de masas de alta resolución

Los péptidos se analizaron mediante cromatografía líquida de fase reversa acoplada a la espectrometría de masas en tándem (RP-LC-MS/MS; del inglés, *Reverse Phase-Liquid Chromatography-coupled with tandem Mass Spectrometry*). Se empleó un sistema de nano-cromatografía líquida de fase reversa Vanquish™ Neo (Thermo Fisher Scientific Inc.) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive™ HF (Thermo Fisher Scientific Inc.) a través de una fuente de ionización EASY-Spray™ Nano (Thermo Fisher Scientific Inc.). Los péptidos obtenidos de la digestión de las proteínas (apartado 5.7.4.1) se cargaron en una precolumna para cromatografía líquida Acclaim™ PepMap™ 100 C18 Column (Thermo Fisher Scientific Inc.; tabla 14) con un tampón A (fase móvil con acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 0,1%) para su concentración y limpieza. Estos se separaron en una columna analítica con punta integrada EASY-Spray™ Column (Thermo Fisher Scientific Inc.; tabla 14) a un caudal de 250 nanolitros (nL)/min durante 2 h, en un gradiente del 2 al 35% de tampón B (acetonitrilo al 100% y ácido fórmico al 0,1%) en tampón A.

Tabla 14. Características de la precolumna (carga de péptidos) y columna analítica (separación de péptidos) para cromatografía líquida.

CARACTERÍSTICAS	PRECOLUMNA (CARGA)	COLUMNA ANALÍTICA (SEPARACIÓN)
Diámetro	75 µm	75 µm
Longitud	20 mm	500 mm
Resina C18	Sí	Sí
Tamaño de partícula	3 µm	2 µm
Tamaño de poro	100 Ångstroms (Å)	100 Å

5.7.4.3. Interpretación de los datos para la cuantificación relativa sin marcaje de las proteínas

Los datos se adquirieron con el programa Xcalibur v4.5 (Thermo Fisher Scientific Inc.), y la identificación de los péptidos se efectuó mediante el motor de búsqueda Mascot v2.8 (www.matrixscience.com) con el programa Proteome Discoverer v3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Proteome Discoverer v3.0 también estimó las intensidades normalizadas para la cuantificación relativa de las proteínas en las muestras de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica.

La cuantificación relativa de las proteínas se llevó a cabo comparando las intensidades de los péptidos precursores en las muestras de ambos grupos de pacientes con asma (ratios), una vez alineados los cromatogramas. Se seleccionaron solo los péptidos únicos, específicos del grupo de proteínas, presentes en al menos el 50% de las muestras de un fenotipo o condición del asma (asma eosinofílica o no eosinofílica). Para la comparación entre las muestras, se normalizó la cantidad total de proteína entre ellas usando la abundancia total de todos los péptidos identificados.

El análisis estadístico de los datos de abundancia, obtenidos de Proteome Discoverer v3.0, se realizó en RStudio v4.2.3 mediante el paquete Limma v3.56.2 (disponible en <https://bioconductor.org/packages/limma/>)²⁷⁹. Se consideraron solamente las proteínas que contaban con datos de abundancia en al menos el 50% de las muestras de al menos uno de los fenotipos o condiciones del asma. No se aplicó imputación para los valores faltantes (en inglés, *missing values*), y los valores de abundancia se normalizaron utilizando el método de la mediana. La prueba t de Student para muestras independientes se empleó para determinar la significación estadística de los cambios en la abundancia de las proteínas entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica (razón asma eosinofílica/asma no eosinofílica).

En la identificación de péptidos y proteínas, se cotejaron los resultados con la base de datos del Proteoma Humano UP000005640 (que contiene 20.376 secuencias revisadas) y con una base de datos que incluye los contaminantes más comunes y relevantes (247 secuencias). La FDR se calculó usando una base de datos reversa como señuelo, aceptándose únicamente las proteínas con un FDR inferior al 1%. Se ajustaron las puntuaciones de Mascot v2.8 por el algoritmo percolador y se aplicaron criterios de aceptación para la identificación de péptidos y proteínas, como un intervalo de confianza (CI; del inglés, *Confidence Interval*) > 95% para los péptidos y > 99% para las proteínas. Además, se establecieron p-valores < 0,02 y ≤ 0,01 para considerar estadísticamente significativos los cambios de abundancia de las proteínas exosomales de suero y de sobrenadante de esputo, en cada caso, identificadas y

cuantificadas entre los dos grupos de pacientes asmáticos. Asimismo, los PCAs se efectuaron utilizando la función `prcomp` del paquete R `stats`²⁷⁴.

5.7.4.4. Análisis funcional de las proteínas con distinta abundancia

Se llevó a cabo un análisis funcional de las proteínas humanas con diferencias significativas de abundancia entre ambos fenotipos o condiciones del asma. Se empleó el paquete `gprofiler2`²⁸⁰ en RStudio v4.2.3, con parámetros que comprendieron:

- *Homo sapiens* como organismo de referencia para la lista de identificadores proteicos.
- Un p-valor < 0,05 para definir significación estadística.
- La estimación de la FDR para la corrección de pruebas múltiples.

Para el enriquecimiento de procesos biológicos, se usaron las bases de datos:

- Ontología de genes (GO; del inglés, *Gene Ontology*)²⁸¹. Esta abarca las categorías de:
 - Componentes celulares.
 - Funciones moleculares.
 - Procesos biológicos.
- Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG; del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)²⁸²
- Reactome²⁸³.

En la figura 17 se muestra de forma visual el proceso de examen del contenido proteico de los exosomas.



Figura 17. Procedimiento para la caracterización del perfil proteómico de los exosomas.

5.8. Uso de herramientas bioinformáticas para predecir la interacción entre los miARNs y sus genes diana

Se utilizó la herramienta bioinformática en línea gratuita DIANA-miRPath v3.0 (<http://www.microrna.gr/miRPathv3>) para evaluar las funciones reguladoras de miARNs, identificar vías (en inglés, *pathways*) de señalización *in silico* y predecir interacciones con genes diana²⁸⁴. Esta

herramienta permite explorar vías biológicas que involucran miARNs y genes diana, mostrando la significación estadística (p-valores) de las asociaciones. También, ofrece la anotación funcional de miARNs mediante estadísticas estándar (distribuciones hipergeométricas), distribuciones empíricas insesgadas o metaanálisis. Integra más de 600.000 genes diana de miARNs respaldados por evidencia experimental de DIANA-TarBase v7.0²⁸⁵. Además, proporciona la opción de sustituir o combinar los genes diana de DIANA-TarBase v7.0 con aquellos previstos *in silico* de DIANA-microT-CDS o TargetScan v6.2, con interacciones de alta calidad sustentadas experimentalmente^{284,285}. Asimismo, posibilita la asociación de interacciones génicas y proteicas, físicas y funcionales, consolidando la información empírica²⁸⁴. Este recurso emplea la base de datos KEGG para describir las vías vinculadas a cada grupo de miARNs y la incorporación de secciones de la herramienta bioinformática GO ha mejorado su funcionalidad^{281,282,284}.

Inicialmente, se reconocieron y visualizaron vías de señalización KEGG estadísticamente significativas ($p < 0,05$), controladas por los miARNs diferenciales de las comparativas de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como de pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs. Se usó el módulo de búsqueda inversa de DIANA-miRPath v3.0, específicamente TarBase v7.0, para descubrir las vías biológicas en las que los miARNs participan^{284,285}. Se seleccionaron vías KEGG con significación estadística ajustada por la FDR al 5%, priorizando aquellas relacionadas con la enfermedad asmática. Posteriormente, se eligieron para su estudio los genes diana de los miARNs desregulados. Además, se generaron mapas de enriquecimiento que representan las vías y los genes afectados por los miARNs *in silico* mediante la utilización de este recurso bioinformático.

5.9. Análisis estadístico

Las características demográficas, inflamatorias, funcionales y clínicas de los sujetos se analizaron empleando la estadística descriptiva. Los datos se expresaron como la $\bar{X} \pm$ la desviación estándar (DE; conocida también como desviación típica) o la mediana y el rango intercuartílico o intercuartil (IQR; del inglés, *Interquartile Range*). Las frecuencias descriptivas se presentaron como porcentajes (%).

Se efectuaron comparaciones estadísticas entre grupos no pareados o no relacionados usando diversas pruebas según la distribución de los datos. Para grupos con datos que seguían una distribución normal o Gaussiana (datos paramétricos) y con igual DE, se utilizó el test t de Student de dos colas. En el caso de datos paramétricos con diferente DE, se empleó el test t de Student con corrección de Welch. Para grupos con datos no paramétricos, se usó el test U de Mann-Whitney. En comparaciones entre tres o más grupos (comparaciones múltiples), se aplicó el test análisis de la varianza (ANOVA; del inglés, *Analysis Of Variance*) de una vía, seguido de tests post-hoc (test posterior) como Bonferroni, Tukey o diferencia mínima significativa (LSD; del inglés, *Least Significant Difference*) de Fisher para datos paramétricos e igual DE. En el caso de datos paramétricos con distinta DE, se recurrió al test ANOVA de Brown-Forsythe y Welch. En comparaciones múltiples entre grupos con datos no paramétricos, se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Se verificó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk para grupos con tamaño muestral ≤ 50 y el test de Kolmogorov-Smirnov para grupos con tamaño > 50 .

Además, en la comparación de los niveles de expresión de los miARNs o de los genes entre grupos, se normalizaron los datos asignando un valor de 1 al grupo de control (individuos sanos, sin diagnóstico de asma) o con menor gravedad del asma (asma no eosinofílica y asma grave no tratada con GCOs) y

ajustando (el aumento o el descenso) proporcionalmente a la condición patológica (sujetos con asma) o con mayor gravedad del asma (asma eosinofílica y asma grave tratada con GCOs).

En los análisis de correlación entre los niveles de expresión de los miARNs, los genes y las proteínas, junto con los parámetros clínicos cuantitativos, se empleó el test de Pearson para grupos con datos paramétricos y el test de Spearman para grupos con datos no paramétricos. La evaluación de las diferencias estadísticas en las frecuencias de parámetros cualitativos se llevó a cabo mediante tablas de contingencia con los correspondientes test de Fisher o Chi-cuadrado. Los cálculos y gráficos se realizaron usando los programas estadísticos GraphPad InStat v3.0 y GraphPad Prism® v6.0. En todos los análisis estadísticos, se consideró significativo un p-valor < 0,05, con un máximo de probabilidad de error no superior al 5%. Todos los tests estadísticos utilizados fueron bilaterales.

La información sobre el análisis de datos de la cuantificación relativa sin marcaje de las proteínas exosomales de suero y de sobrenadante de esputo, así como el análisis funcional de las proteínas con diferente abundancia, se proporciona en los apartados 5.7.4.3 y 5.7.4.4, respectivamente.

5.9.1. Curvas ROC (características operativa del receptor, ROC; del inglés, *Receiver Operating Characteristic*) y modelos de regresión logística para examinar el potencial de los miARNs como posibles biomarcadores

La creación de curvas ROC y la construcción de modelos de regresión logística se efectuaron con la colaboración del Dr. Ignacio Mahillo, Jefe de la Unidad de Bioestadística y Epidemiología del IIS-FJD, empleando el *software* R²⁷⁴.

La curva ROC es una representación gráfica que usa el área bajo la curva (AUC; del inglés, *Area Under Curve*) para determinar la eficacia discriminativa de un parámetro o una variable de estudio entre dos condiciones, como el asma eosinofílica y no eosinofílica. La AUC, que varía de 0 (sin discriminación) a 1 (discriminación óptima), se calcula utilizando las tasas de S (%) y E (1 - E; %). El punto de corte óptimo es el valor que rinde mayor S y E, identificado por el mayor índice J de Youden o estadístico J de Youden (en inglés, *Youden's J index* o *Youden's J statistic*), una medida estadística que evalúa el rendimiento de una prueba de diagnóstico en forma dicotómica. Este refleja la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo en su grupo al comparar dos condiciones. Se calcula como:

$$J = S + E - 1 = \frac{\text{Verdaderos positivos (VP)}}{\text{Verdaderos positivos (VP)} + \text{falsos negativos (FN)}} + \frac{\text{Verdaderos negativos (VN)}}{\text{Verdaderos negativos (VN)} + \text{falsos positivos (FP)}} - 1$$

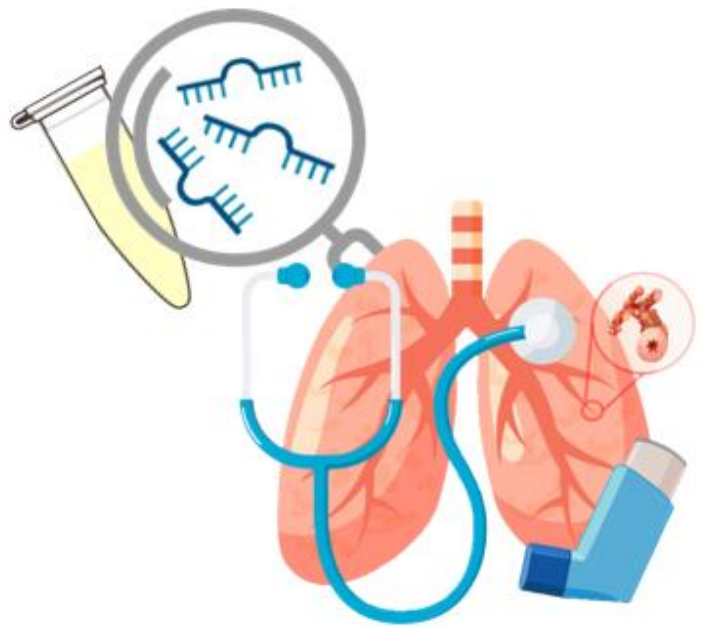
En el análisis, se emplearon los perfiles de expresión (Δ Ct) de los miARNs diferenciales para generar curvas ROC con el fin de valorar la capacidad de estos miARNs como potenciales biomarcadores del asma. La efectividad discriminativa del modelo se fundamentó en el AUC, siendo aceptable si $AUC \geq 0,7$, buena si $AUC \geq 0,8$, muy buena si $AUC \geq 0,9$ y perfecta si $AUC = 1$. El AUC se obtuvo a través de un procedimiento de validación cruzada conocido como validación cruzada de k veces (en inglés, *k-fold cross validation*).

Además, se llevaron a cabo modelos de regresión logística incorporando varios predictores representados por los perfiles de expresión (Δ Ct) de los miARNs diferenciales. El objetivo fue constatar si la combinación

Materiales y métodos

de estos perfiles permitía una mejor distinción entre diferentes condiciones patológicas que los miARNs de forma individual (predictores univariantes). Los predictores se tuvieron en cuenta tanto en su configuración original como variables cuantitativas o continuas, así como agrupados conforme a un punto de corte, es decir, como variables cualitativas o categóricas. Los puntos de corte se establecieron usando curvas ROC y el índice J de Youden, señalando la dirección de la asociación con los símbolos < o > delante de estos. Cada modelo de regresión logística se resumió mediante el criterio de información de Akaike o índice de Akaike (AIC; del inglés, *Akaike's Information Criterion*), el AUC, la S y la E, y el test de Hosmer-Lemeshow (HL).

Se optó por los modelos con un AIC más bajo, indicativo de un mejor ajuste. El AUC se acompañó de un IC al 95%. Se calcularon la S y la E para la probabilidad de pertenencia de los sujetos a grupos específicos, utilizando 0,5 como punto de corte en la estimación de la probabilidad. En este estudio, se consideraron los grupos de pacientes con asma eosinofílica y con asma grave tratada con GCOs. Si el modelo asigna al individuo una probabilidad superior al 0,5 para su inclusión en un grupo específico, como pacientes con asma eosinofílica, se clasifica en ese grupo; de lo contrario, se atribuye al otro grupo, o sea, el de pacientes con asma no eosinofílica. Se buscó que el test de HL no fuera estadísticamente significativo ($p > 0,1$), confirmando la concordancia entre las probabilidades estimadas y observadas, ratificando así la validez del modelo.



Resultados

6. RESULTADOS

Objetivo parcial 1. Buscar y validar un perfil diferencial de miARNs en suero de sujetos con asma eosinofílica y no eosinofílica, con el fin de identificar y clasificar a los individuos en estos fenotipos.

6.1. Resultados logrados en el cumplimiento del objetivo parcial 1. Publicación 1

6.1.1. Resumen del trabajo, contribución personal de la doctoranda y presentación de la publicación

Se identificaron, por miARNs-seq, 15 miARNs con expresión diferencial ($p < 0,05$) entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. De estos, 14 se sobreexpresaron y 1 se subexpresó en los pacientes con asma eosinofílica. El PCA realizado con los valores de expresión de estos miARNs permitió una clara diferenciación entre los dos grupos. Mediante RT-qPCR, se validaron 2 miARNs de los 15 miARNs analizados, hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p ($p < 0,0001$ y $p < 0,05$), observando un aumento en sus niveles en los pacientes con asma eosinofílica. Se encontró una asociación inversa entre los valores de ΔCt de hsa-miR-26a-1-3p y el recuento de eosinófilos en sangre periférica (células/mm³) ($p < 0,001$), así como entre los valores de ΔCt de hsa-miR-376a-3p y los niveles de FeNO (ppb) ($p < 0,05$) y el número de exacerbaciones ($p < 0,05$).

Los análisis de las curvas ROC y los modelos de regresión logística indicaron que hsa-miR-26a-1-3p, individualmente o en combinación con hsa-miR-376a-3p (AUC = 0,76, en los dos casos; $p < 0,05$), podría ser un predictor aceptable para distinguir entre el asma eosinofílica y no eosinofílica. Además, el análisis *in silico* sugirió la implicación de estos 2 miARNs en vías esenciales en el asma ($p < 0,05$), como la interacción MEC-receptor y la vía de señalización de p53, así como en otras enfermedades pulmonares, como el cáncer de pulmón no microcítico.

Entre pacientes con asma alérgica/atópica y no alérgica/atópica no se detectaron miARNs expresados diferencialmente.

Es importante señalar que al comparar pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, además de la diferencia en el recuento de eosinófilos en sangre periférica ($p < 0,0001$), se percibió una diferencia en los niveles de FeNO ($p < 0,0001$), siendo más elevados en los pacientes con asma eosinofílica.

Resumiendo, se demostró que 2 miARNs, hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p, se expresan diferencialmente entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, y pueden servir como biomarcadores para discriminar estos dos fenotipos del asma.

Como doctoranda y primera autora de este estudio, participé en todas las etapas de la investigación, desde el diseño experimental y la ejecución de los experimentos hasta el análisis estadístico, la curación de los datos y la interpretación de los resultados. Además, trabajé en la escritura del manuscrito original y, en colaboración con los coautores, en la revisión del primer borrador. Esta experiencia como autora principal me brindó una valiosa oportunidad para el desarrollo de habilidades esenciales en la investigación científica, participando en la concepción y la realización de los experimentos, así como en el análisis y la comprensión de los resultados.

Serum microRNAs Catalog Asthma Patients by Phenotype

Gil-Martínez M¹, Rodrigo-Muñoz JM^{1,2}, Sastre B^{1,2}, Cañas JA^{1,2}, García-Latorre R¹, Redondo N¹, de la Fuente L³, Mínguez P^{3,4}, Mahillo-Fernández I⁵, Sastre J^{2,6}, Quirce S^{2,7}, Caballero ML^{2,7}, Olaguibel JM^{2,8}, del Pozo V^{1,2,9}

¹Immunoallergy Laboratory, Immunology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain

²Center for Biomedical Network of Respiratory Diseases (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

³Genetics and Genomics Department, Bioinformatics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain

⁴Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

⁵Biostatistics and Epidemiology Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain

⁶Allergy Unit, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

⁷Department of Allergy, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

⁸Allergy Unit, Complejo Hospitalario de Navarra, Navarra, Spain

⁹Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

J Investig Allergol Clin Immunol 2022; Vol. 32(6): 471-478

doi: 10.18176/jiaci.0753

■ Abstract

Background: Asthma is a chronic inflammatory condition of the airways with a complex pathophysiology. Stratification of asthma subtypes into phenotypes and endotypes should move the field forward, making treatment more effective and personalized. Eosinophils are the key inflammatory cells involved in severe eosinophilic asthma. Given the health threat posed by eosinophilic asthma, there is a need for reliable biomarkers to identify affected patients and treat them properly with novel biologics. microRNAs (miRNAs) are a promising diagnostic tool.

Objective: The aim of this study was to identify serum miRNAs that can phenotype asthma patients.

Methods: Serum miRNAs of patients with eosinophilic asthma (N=40) and patients with noneosinophilic asthma (N=36) were evaluated using next-generation sequencing, specifically miRNAs-seq, and selected miRNAs were validated using RT-qPCR. Pathway enrichment analysis of deregulated miRNAs was performed.

Results: Next-generation sequencing revealed 15 miRNAs that were expressed differentially between eosinophilic and noneosinophilic asthma patients, although no differences were observed in the miRNome between atopic and nonatopic asthma patients. Of the 15 miRNAs expressed differentially between eosinophilic and noneosinophilic asthma patients, hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p were validated by RT-qPCR. Expression levels of these 2 miRNAs were higher in eosinophilic than in noneosinophilic asthma patients. Furthermore, expression values of hsa-miR-26a-1-3p correlated inversely with peripheral blood eosinophil count, and hsa-miR-376a-3p expression values correlated with FeNO values and the number of exacerbations. Additionally, in silico pathway enrichment analysis revealed that these 2 miRNAs regulate signaling pathways associated with the pathogenesis of asthma.

Conclusion: hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p could be used to differentiate between eosinophilic and noneosinophilic asthma.

Key words: Asthma patients. Eosinophilic asthma. microRNA-seq. Phenotypes/endotypes. Serum microRNAs.

■ Resumen

Antecedentes: El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias con una fisiopatología compleja. La estratificación de los subtipos de asma en fenotipos y en endotipos debería hacer avanzar el campo, haciendo que el tratamiento sea más eficaz y personalizado. Los eosinófilos son las células inflamatorias clave implicadas en el asma eosinofílica grave. Debido a la amenaza para la salud que representa el asma eosinofílica, existe la necesidad de biomarcadores confiables para identificar a los pacientes y tratarlos adecuadamente con nuevos biológicos. Una herramienta prometedora para el diagnóstico son los microARNs (miARNs).

Objetivo: El objetivo de este estudio fue encontrar miARNs séricos que puedan fenotipar a los pacientes asmáticos.

Métodos: Los miARNs séricos de individuos asmáticos eosinofílicos (N=40) y no eosinofílicos (N=36) fueron evaluados mediante secuenciación de próxima generación (NGS), específicamente miARN-seq, y los miARNs seleccionados fueron validados por RT-qPCR. Se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas de miARNs desregulados.

Resultados: El análisis NGS reveló 15 miARNs expresados diferencialmente entre pacientes asmáticos eosinofílicos y no eosinofílicos, mientras que no mostró diferencias en el miRNoma entre individuos asmáticos atópicos y no atópicos. De los 15 miARNs expresados diferencialmente entre asmáticos eosinofílicos y no eosinofílicos, hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p fueron validados por RT-qPCR. Los niveles de expresión de estos dos miARNs fueron más altos en los asmáticos eosinofílicos que en los no eosinofílicos. Además, los valores de expresión de hsa-miR-26a-1-3p correlacionaron inversamente con el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los valores

de expresión de hsa-miR-376a-3p con los valores de FeNO y el número de exacerbaciones. Además, el análisis de enriquecimiento de la vía *in silico* reveló que estos dos miARNs regulan vías de señalización relacionadas con la patogénesis del asma.

Conclusión: Hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p podrían usarse para distinguir pacientes asmáticos eosinofílicos y no eosinofílicos.

Palabras clave: Pacientes asmáticos. Asma eosinofílico. microARN-seq. Fenotipos/endotipos. microARNs séricos.

Introduction

Asthma is a prevalent chronic inflammatory disease of the airways with major public health consequences [1] in which the clinical and pathological characteristics are highly heterogeneous and diverse, thus complicating control. As a result, there is substantial room for improvement in the diagnostic and therapeutic tools used [2]. Asthma encompasses numerous disease variants [3], and phenotyping and endotyping of asthma can facilitate response to treatment, pinpoint the pathogenic mechanisms involved, and anticipate risks. Based on the predominant inflammatory cell, asthma phenotypes are as follows: eosinophilic, neutrophilic, mixed granulocytic, and paucigranulocytic. Taking an endotype-based approach, asthma is divided into type 2 asthma, non-type 2 asthma, and mixed complex endotypes [4]. Eosinophils emerged as the hallmark of eosinophilic asthma, which mainly involves T_H2, but also type 2 innate lymphoid cells [5].

microRNAs (miRNAs) are small, single-stranded, noncoding RNAs that are 21 to 25 nucleotides in length [6] and control gene expression by targeting specific mRNAs for degradation or translational repression. They are involved in multiple biological processes and simultaneously regulate various pathological processes [7]. Serum miRNAs are very stable and resistant to blood RNases. Some are differentially expressed in a range of diseases [8] and function as noninvasive, sensitive, and specific biomarkers [9].

The aim of this study was to determine whether miRNAs could serve as biomarkers to classify asthma patients into distinct phenotypes and endotypes using next-generation sequencing (NGS) and thus facilitate the choice of treatment.

Methods

Selection of Patients

Patients diagnosed with asthma were recruited from the allergy and pulmonology units of Fundación Jiménez Díaz Hospital (FJDH), Complejo Hospitalario de Navarra (CHN), and La Paz Hospital (LPH). Eighteen patients were selected for microRNA-sequencing (miRNA-seq) and distributed into 4 different groups: atopic asthma, nonatopic asthma, eosinophilic asthma, and noneosinophilic asthma. miRNAs were validated using semiquantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) in 67 additional patients, ie, 36 with eosinophilic asthma and 31 with noneosinophilic asthma. Descriptive data for the demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of the study participants were compiled.

All patients (N=85) took part in the MEGA project, which is based on a cohort of asthma patients of varying grades

of severity [10]. The inclusion criteria were as follows: (1) agreement to participate, with signed informed consent; (2) diagnosis of asthma following the 2019 GINA criteria [11]; (3) age between 18 and 75 years. The definitions of atopic and nonatopic disease were established based on a positive or negative prick test and/or specific IgE to at least 1 allergen. Asthma was classified as eosinophilic or noneosinophilic according to the peripheral blood eosinophil count ($\geq 500/\mu\text{L}$ and $<150/\mu\text{L}$, respectively).

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the local ethics committees.

Sample Collection

Serum was obtained by blood clotting in anticoagulant-free tubes, centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at 4°C, and stored at -80°C until use.

Isolation of miRNA

RNA (including miRNAs) was obtained from 200 μL of serum using the miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Three synthetic miRNA spike-ins (2, 4, and 5) were added to calibrate optimal RNA extraction (miRCURY LNA RNA Spike-in kit, Qiagen). The RNA enriched in miRNAs was eluted with 20 μL of RNase-free water.

miRNA-seq: Library Preparation and Sequencing

miRNA-enriched RNA isolated from the serum samples of 18 asthma patients was used for miRNA-seq.

Small RNA samples were converted to Illumina sequencing libraries using the NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit v3 (Bio Scientific Corporation), strictly adhering to the manufacturer's user guide. The size profile of the individual libraries was quantified using D1000 DNA High Sensitivity Screen Tape on a 4200 TapeStation System (both Agilent). Quantified libraries were sequenced on an Illumina MiniSeq 550 platform (Illumina) using a MiniSeq 500/550 75-cycle High Output Kit.

Bioinformatics Analysis of miRNA

Quality control, preprocessing, and statistical analysis of small RNA-seq data were carried out by the Bioinformatics Unit of IIS-Fundación Jiménez Díaz.

Adaptors were removed, and raw reads were trimmed using Cutadapt [12] by following the NEXTflex small RNA instructions. Adaptor-trimmed reads between 17 and 25 nt were retained and aligned to the reference genome (GRCh38 assembly) using Bowtie2 as an aligner [13]. Known miRNAs

were mapped with HTSeq-count2 [14] using mature miRNA annotation retrieved from the miRBase database (miRBase v22). Raw miRNA counts across samples were normalized by sequencing depth and RNA composition using the TMM function of the NOISeq Bioconductor R package [15]. Subsequent principal component analysis based on normalized and scaled values was applied using the prcomp R function from the R package [16]. Normalized expression levels across groups were compared following 2 alternative methods for testing differential expression in sequencing data: NOISeq [15] and DESeq2 [17]. Fold change and adjusted *P* values by false discovery rate were calculated and used to identify significant differentially expressed miRNAs.

miRNAs were considered biologically relevant if they were differentially expressed (adjusted *P* < .05) and presented a log2 fold change ≥ 1.5 between groups.

miRNA-seq Validation of Differentially Expressed miRNAs by RT-qPCR

For the validation of results obtained by NGS, serum miRNAs from 36 patients with eosinophilic asthma and 31 patients with noneosinophilic asthma were retrotranscribed to cDNA using the miRCURY LNA RT Kit (Qiagen), as described by the manufacturer. Briefly, 4 μ L of total RNA was mixed with reverse transcription enzyme and with the synthetic miRNAs SP6 and cel-miR-39-3p, which were used to ensure correct retrotranscription to cDNA. The final volume was 10 μ L. The reaction was performed in a Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) for 60 minutes at 42°C, then 5 minutes at 95°C, and indefinitely at 4°C; cDNA was stored at -20°C until use.

Subsequently, miRNA expression was evaluated using qPCR (miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit, Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Based on the miRNA-seq results, the probes were used were as follows: hsa-miR-206, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-6511a-3p, hsa-miR-202-5p, hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-941, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-210-3p, and hsa-miR-450a-5p (Qiagen). Additionally, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, SP6, and cel-miR-39-3p were selected as endogenous controls, and hsa-miR-23a-3p and hsa-miR-451a were used as hemolysis controls (Qiagen). All samples were run in triplicate, and reactions were generated in a Light Cycler 96 thermocycler (Roche). Cycle threshold (Ct) values were analyzed using LightCycler 96 SW 1.1 (Roche).

The values of the RT-qPCR analysis were normalized to the endogenous miRNA controls using the $2^{-\Delta Ct}$ method [18], where $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - \Delta Ct (\bar{X} Ct_{hsa-miR-103a-3p} + Ct_{hsa-miR-191-5p})$. hsa-miR-103a-3p and hsa-miR-191-5p, which are known to be stably expressed in whole serum (normal and asthmatic patients), were used as internal controls, as no significant differences in expression were observed between the 2 groups, that is, eosinophilic and noneosinophilic asthma patients. Relative quantification of differences in expression ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$; where $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{eosinophilics} - \Delta Ct_{non-eosinophilics}$) was carried out using the $\Delta\Delta Ct$ method [18].

In Silico Pathway Enrichment Analysis

Pathway enrichment analysis of dysregulated miRNAs was performed using the DIANA-miRPath v3.0 bioinformatic tool [19].

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software Inc).

Results are expressed as median and interquartile range (IQR). Normality was analyzed using the Shapiro-Wilk test. For continuous variables, parametric data were compared between nonpaired groups using an unpaired *t* test (compared groups have equal SD values) and the Welch *t* test (assumption that the population may have different SD values), and nonparametric and nonpaired groups were compared using the Mann-Whitney test.

The Spearman correlation (nonparametric data) or Pearson correlation (parametric data) was applied for comparisons between miRNA expression levels (ΔCt) and some clinical parameters (quantitative variables). The Fisher exact test was performed on a 2x2 contingency table to test the null hypothesis of independence of the 2 groups and some clinical characteristics (qualitative variables).

The expression profile (ΔCt) of each differentially expressed miRNA was used to create receiver operator characteristic (ROC) curves. Logistic regression models were developed for diagnosis.

Statistical significance was set at *P* < .05.

Results

Clinical Parameters of the Study Patients

Descriptive data for demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of 85 study patients are summarized in Supplementary Table 1S. The patients were distributed into 4 groups: 40 with eosinophilic asthma, 36 with noneosinophilic asthma, 5 with atopic asthma, and 4 with nonatopic asthma.

The groups were homogeneous in terms of demographic characteristics (ie, age, sex, body mass index [BMI], and smoking habit), with no significant differences. Women were predominant in all 4 groups (67.5%, 66.7%, 80%, and 75%, respectively). Patients from all the groups presented overweight (BMI > 25), except in the atopic group (BMI = 22.1). Smoking habit was similar across all the groups (*P* > .05). As expected, the peripheral blood count differed significantly between eosinophilic and noneosinophilic asthma patients (700 vs 100/ μ L, *P* < .0001). Regarding other inflammatory parameters, such as sputum eosinophils, atopy, and IgE levels, we did not observe significant differences, although sputum eosinophils (2.3% and 1%) and IgE levels (209 and 124 IU) were higher in eosinophilic than in noneosinophilic asthma patients, in contrast to atopic patients (60% and 77.8%), where values were slightly higher in noneosinophilic individuals.

Patients with eosinophilic asthma had significantly higher FeNO values than noneosinophilic asthma patients (50 vs 19 ppb, *P* < .0001). Moreover, higher values were recorded in patients with eosinophilic asthma for exacerbations in the previous year (22 vs 14) and severe or moderate asthma (22 vs 11 and 9 vs 5, respectively), although the difference was not statistically significant (Supplementary Table 1S). Similarly,

no significant differences were observed for the Asthma Control Test scores or other clinical traits, such as treatment with inhaled corticosteroids (ICS) and long-acting β -agonists (LABAs) (Supplementary Table 1S).

Finally, when the atopic and nonatopic asthma groups were compared, significant differences were observed only for atopy ($P < .01$).

miRNA-seq: Differential Expression of miRNAs

Analysis of data obtained by NGS (miRNA-seq) revealed 15 differentially expressed miRNAs between patients with eosinophilic asthma and patients with noneosinophilic asthma (adjusted $P < .05$). Of these 15 miRNAs, 14 were upregulated and 1 was downregulated in patients with eosinophilic asthma. Moreover, both groups were clearly differentiated when principal component analysis was performed using miRNA expression values (Supplementary Figure 1S).

In a different population selected based on atopy, the analysis of miRNA-seq data did not show differentially expressed miRNAs between atopic and nonatopic patients (data not shown).

Validation by RT-qPCR of Differentially Expressed miRNAs Identified Using miRNA-seq: Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma

After miRNA-seq, we validated miRNAs using RT-qPCR. Of the 15 miRNAs expressed differentially by miRNA-seq between eosinophilic and noneosinophilic asthma patients, 14 were checked (1 was not available). We found a significant increase in hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p expression levels in patients with eosinophilia (Figure 1A and B).

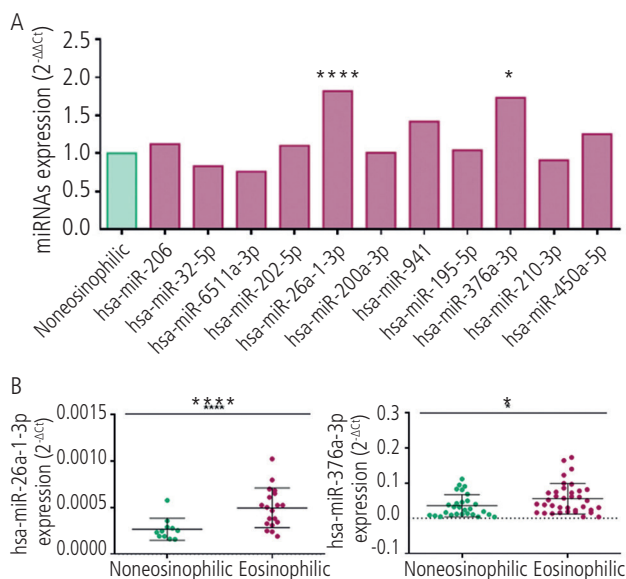


Figure 1. Serum miRNA deregulation in eosinophilic and noneosinophilic asthmatic patients A, Patients with eosinophilic asthma had higher expression levels of hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p than noneosinophilic asthma patients. B, ****, $P < .0001$; *, $P < .05$.

hsa-miR-6513, hsa-miR-1185-1, and hsa-miR-6503 were not detected, and no significant differences were observed for the remaining miRNAs evaluated (Figure 1A).

These results confirm that serum hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p are differentially expressed between eosinophilic and noneosinophilic asthma patients, suggesting that they could serve as diagnostic biomarkers.

Correlation of miRNAs With Clinical Characteristics

In order to establish an association between the expression levels of these miRNAs (ΔC_t) and clinical parameters, we performed a correlation analysis depending on whether the variables were quantitative or qualitative. The laboratory data and clinical parameters were as follows: severe asthma, peripheral blood eosinophil count, sputum eosinophil percentage, atopy, total IgE, FEV₁/FVC percentage, FeNO, exacerbations during the previous year, number of exacerbations during the previous year, ICS and LABAs, and the Asthma Control Test result.

Given that higher ΔC_t values imply lower miRNA expression levels, we emphasize that ΔC_t values of hsa-miR-26a-1-3p were inversely correlated with the peripheral blood eosinophil count (Spearman $r = -0.5736$; $P < .001$) in all patients (eosinophilic and noneosinophilic; Figure 2A), that is, the peripheral blood eosinophil count increased with the hsa-miR-26a-1-3p expression level. Furthermore, a negative correlation was observed between ΔC_t values of hsa-miR-376a-3p and FeNO levels (Spearman $r = -0.2594$; $P < .05$) in both groups together (Figure 2B) and the number of exacerbations in the previous year (Spearman $r = -0.3391$; $P < .05$) among eosinophilic asthma patients (Figure 2C) and in the total population (Spearman $r = -0.2592$; $P < .05$).

Differentially Expressed miRNAs: ROC Curves and Logistic Regression Models

ROC curves were generated and the area under the curve (AUC) was calculated. The AUC values for hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p were 0.76 and 0.68, respectively; therefore, only hsa-miR-26a-1-3p was acceptable as a univariate predictor (Figure 3).

Multivariate logistic regression models were constructed to better differentiate between eosinophilic and noneosinophilic asthma. These were based on the values in their original form (continuous predictors) and on the cut-off values of hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p expression defined by the Youden index as explanatory variables (categorical predictors) (Figure 3). Furthermore, the model combining hsa-miR-26a-3p and hsa-miR-376a-3p, which was created using the original values, yielded an AUC of 0.76, with a sensitivity of 0.79 and a specificity of 0.45 (Figure 3). The model based on categorical predictors combining both miRNAs, which was created using the cut-off values for miRNA expression, yielded an AUC of 0.79, with a sensitivity of 0.84 and a specificity of 0.91 (data not shown). However, despite the favorable AUC, sensitivity, and specificity of the latter model, it would not be acceptable owing to a value < 0.1 in the Hosmer-Lemeshow test, which was used to assess calibration of the model.

According to these results, the hsa-miR-26a-1-3p univariate predictor model seems to be the best for discriminating between eosinophilic and noneosinophilic

asthma patients, despite being similar to the multivariate regression model with hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p.

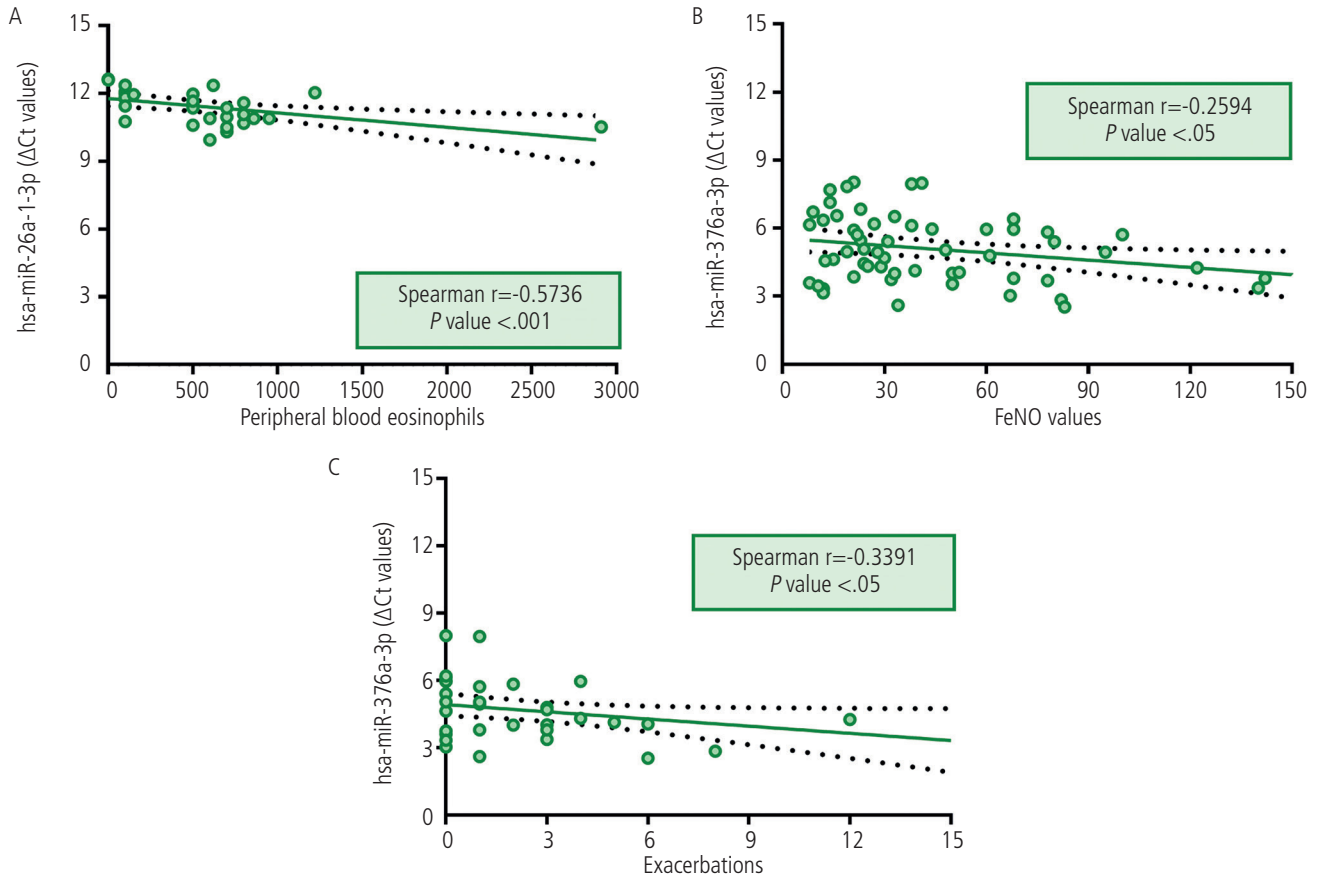


Figure 2. hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p correlate with clinical parameters. A negative correlation was observed in all patients between Δ Ct values of hsa-miR-26a-1-3p and peripheral blood eosinophil count. A, Δ Ct values of hsa-miR-376a-3p also were inversely correlated with FeNO values in both groups together (B) and the number of exacerbations in eosinophilic asthmatics (C).

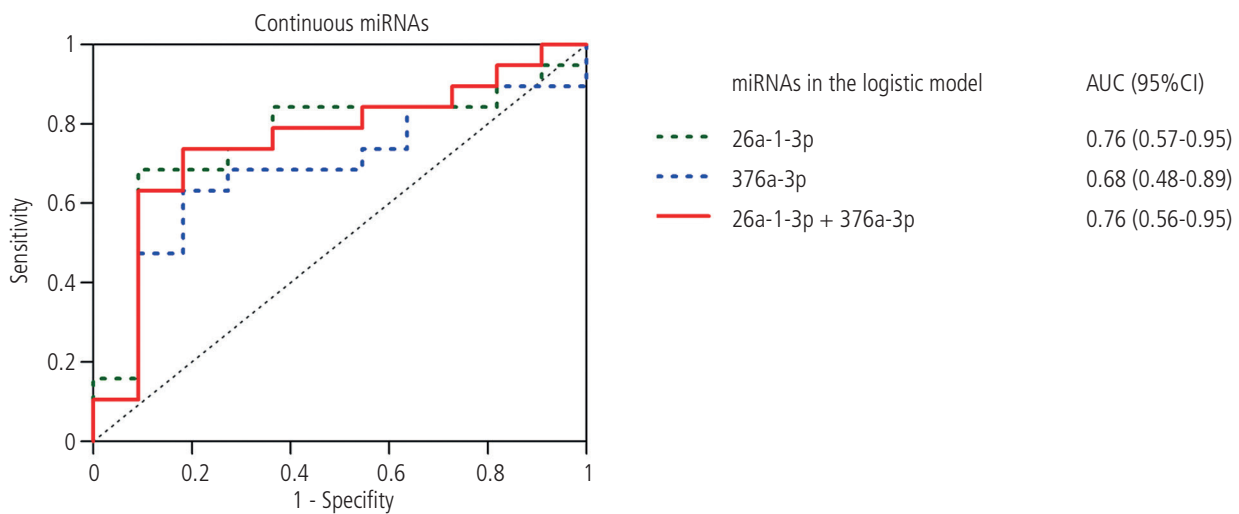


Figure 3. Receiver operator characteristic curves of differentially expressed miRNAs and multivariate logistic regression models created.

Signaling Pathways Involving Dysregulated miRNAs

An *in silico* analysis was carried out with the 2 differently expressed miRNAs to determine their involvement in biological processes.

As Supplementary Figure 2S shows, hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p are involved in the regulation of several crucial pathways: extracellular matrix (ECM)–receptor interaction, non–small cell lung cancer, and the p53 signaling pathway. hsa-miR-26a-1-3p modulates the non–small cell lung cancer and p53 signaling pathways, and hsa-miR-376a-3p modulates the ECM–receptor interaction. While the p53 and non–small cell lung cancer signaling pathways are more involved in the inflammatory response, the ECM–receptor interaction plays a major role in airway remodeling. Therefore, we can infer that the signaling pathways regulated by these miRNAs play a role in the pathogenesis of asthma.

Discussion

Ours is the first report to show altered expression of serum hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p in eosinophilic and noneosinophilic asthma patients. This profile could be used as a phenotypic biomarker to classify asthma patients into 2 groups in order to choose the appropriate treatment for each individual.

Asthma is a heterogeneous disease with varying severity [20]. Therefore, the identification of biomarkers to recognize endotypes and guide therapy has recently become a priority [21]. These biomarkers include sputum eosinophil percentage, peripheral blood eosinophil count, FeNO, and serum IgE levels [22], with eosinophil count in induced sputum proving to be the most sensitive for phenotyping patients with severe eosinophilic asthma [23]. Blood eosinophil counts are a potential surrogate biomarker of eosinophilic inflammation in asthma [24], although this relationship may differ according to the population and study. In fact, a systematic review and meta-analysis revealed that FeNO, blood eosinophils, and serum IgE have moderate diagnostic accuracy, suggesting the need for new techniques to improve this accuracy [25]. Furthermore, there is no consensus regarding eosinophil cut-off levels. The cut-off used in clinical trials to define high blood eosinophil counts ranges between 150 and 300/mL [26], and a blood eosinophil count of $0.22\text{--}0.27 \times 10^9/\text{L}$ differentiates between eosinophilic and noneosinophilic asthma with 78%–86% sensitivity [27]. In our study, the cut-off point for eosinophilia was $0.5 \times 10^9/\text{L}$ or higher.

More useful biomarkers must be found to classify asthma patients into different phenotypes and endotypes. In this sense, NGS is a powerful technique that can analyze the whole genome profile, including mRNA and small RNA expression [28]. To date, this high-throughput profiling technology has revealed critical miRNAs in diseases such as asthma and has proven feasible because it can sequence and detect low-frequency variants [29,30]. Furthermore, in this study, we obtained higher AUC values than those shown by Hastie et al [31], who found that blood eosinophils lack sufficient accuracy for predicting sputum eosinophils in asthma.

This study is the first to reveal a specific profile for 2 miRNAs that could serve to differentiate between

eosinophilic and noneosinophilic asthma. Dysregulation of hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p has previously been associated with various aspects of the pathogenesis of asthma and other respiratory diseases [32–34]. hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p could be relevant miRNAs with a phenotypic role in the identification of eosinophilic and noneosinophilic asthma patients, since they were significantly correlated with several clinical parameters. Thus, hsa-miR-26a-1-3p was associated with eosinophil counts and hsa-miR-376a-3p seems to be associated with FeNO values and the number of exacerbations in the previous year. When hsa-miR-376a-3p expression levels were high, the number of exacerbations increased in patients with eosinophilic asthma. It has been shown that blood eosinophil counts and other clinical variables can predict frequent asthma exacerbations and that an increased blood eosinophil count ($>400/\mu\text{L}$) indicates a greater likelihood of having 2 or more exacerbations per year [35].

Regarding the downstream effects, we found *in silico* that hsa-miR-26a-1-3p modulates 2 statistically significant pathways that are implicated mainly in inflammation and that hsa-miR-376a-3p significantly altered the ECM–receptor interaction signaling pathway. It is very interesting that the pathways regulated by these miRNAs play a key role in the development of airway inflammation and remodeling of asthma [36]. Asthma-associated airway inflammation is thought to be caused by eosinophilic inflammation, which is favored by airway epithelial barrier involvement and induced by the excessive release of T_H2 cytokines [37]. The deregulation of some miRNAs in noneosinophilic asthma could indicate less involvement of the pathways they regulate and more appropriate expression of the target genes, thus enabling better asthma control. However, the specific role of these miRNAs in distinguishing the phenotypes needs to be further studied.

Finally, in contrast with Bélanger et al [38], we found no differences in the expression of miRNAs between atopic and nonatopic asthma patients. This discrepancy in the results can be due to differences in patient selection: in the study by Bélanger et al, patients were selected from a family cohort and, most importantly, the miRNAs were obtained from purified eosinophils. Since no differentially expressed miRNAs were observed in atopic and nonatopic patients, we evaluated the possible statistical differences between the presence and absence of atopy in eosinophilic and noneosinophilic asthma and did not find statistically significant differences (Supplementary Table 1S). Moreover, the ΔCt values of the differentially expressed miRNAs obtained by validation did not correlate with the presence of atopic and nonatopic asthma. Therefore, in addition to the lack of miRNAs expressed differentially between atopic and nonatopic patients, the presence or absence of atopic asthma is not related to the presence or absence of eosinophilic asthma.

In summary, we describe significant differences in the expression of 2 miRNAs, hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, which could be used as biomarkers to phenotype eosinophilic and noneosinophilic asthma patients in order to facilitate the choice of treatment.

Acknowledgments

The authors recognize Oliver Shaw, English editor of IIS-FJD, for his revision and editing in English.

Funding

This study was supported by the following: Fondo de Investigación Sanitaria – FIS and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) [PI18/00044]; CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), a Carlos III Institute of Health initiative. MG-M was supported by a PFIS contract (FI19/00067) from the Fondo de Investigación Sanitaria (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain). PM has a Miguel Servet contract funded by the ISCIII (CP16/00116), LdF was supported by ISCIII contract CA18/00017.

Conflicts of Interest

JS: having served as a consultant to Thermo Fisher, MEDA, Novartis, Sanofi, Leti, Faes Farma, Mundipharma, and GSK; having been paid lecture fees by Novartis, GSK, Stallergenes, Leti, and Faes Farma; having received grant support for research from Thermo Fisher, Sanofi, and ALK.

SQ: personal fees from AstraZeneca, personal fees from Novartis, personal fees from Sanofi, personal fees from Boehringer Ingelheim, personal fees from Teva, personal fees from ALK, personal fees from Mundipharma, personal fees from GSK, personal fees from Chiesi, personal fees from Leti, outside the submitted work.

JMO: grants from Sanofi during the conduct of the study; personal fees from AstraZeneca, personal fees from Mundipharma, outside the submitted work.

VdP: honoraria (advisory board, speaker) and/or institutional grant/research support from AstraZeneca and GSK.

The remaining authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Nunes C, Pereira AM, Morais-Almeida M. Asthma costs and social impact. *Asthma Res Pract*. 2017;3:1.
- Cañas JA, Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, del Pozo V. Exosomes: a new approach to asthma pathology. *Clin Chim Acta*. 2019;495:139-47.
- Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*. 2012;67(7):835-46.
- Agache I, Akdis CA. Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J Clin Invest*. 2019;129(4):1493-503.
- Pavlidis S, Takahashi K, Ng F, Xie J, Hoda U, Sun K, et al. "T2-high" in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. *Eur Respir J*. 2019;53:1800938.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-5.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*. 2008;9(8):839-45.
- 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 U S A*. 2008;105(30):10513-8.
- Kho AT, Sharma S, Davis JS, Spina J, Howard D, McEnroy K, et al. Circulating microRNAs: association with lung function in asthma. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157998.
- Muñoz X, Álvarez-Puebla MJ, Arismendi E, Arochena L, Ausín M, 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(7):378-85.
- 2021 GINA Report. Global strategy for asthma management and prevention 2021. <https://ginasthma.org/>. Accessed May 10, 2021.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011;17(1):10.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589-95.
- Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166-9.
- Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res*. 2011;21(12):2213-23.
- 2013 R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. Accessed May 17, 2021.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W460-6.
- Carr TF, Bleeker E. Asthma heterogeneity and severity. *World Allergy Organ J*. 2016;9(1):41.
- Wan XC, Woodruff PG. Biomarkers in severe asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016;36(3):547-57.
- Lugogo NL, Akuthota P. Type 2 biomarkers in asthma: yet another reflection of heterogeneity. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(3):1276-7.
- Caballero ML, Dominguez-Ortega J, Nin-Valencia AR, Sánchez-Ocando H, Barranco P. Eosinophil count in induced sputum could be more sensitive than in peripheral blood to phenotype patients with severe eosinophilic asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021;31(4):360-1.
- Negewo NA, McDonald VM, Baines KJ, Wark PA, Simpson JL, Jones PW, et al. Peripheral blood eosinophils: a surrogate marker for airway eosinophilia in stable COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11(1):1495-504.
- Korevaar DA, Westerhof GA, Wang J, Cohen JF, Spijker R, Sterk PJ, et al. Diagnostic accuracy of minimally invasive markers for detection of airway eosinophilia in asthma: a systematic

- review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2015;3(4):290-300.
26. Bakakos A, Loukides S, Bakakos P. Severe eosinophilic asthma. *J Clin Med*. 2019;8(9):1375.
 27. Wagener AH, De Nijs SB, Lutter R, Sousa AR, Weersink EJ, Bel EH, et al. External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*. 2015;70(2):115-20.
 28. Zhao M, Liu D, Qu H. Systematic review of next-generation sequencing simulators: computational tools, features and perspectives. *Brief Funct Genomics*. 2017;16(3):121-8.
 29. Rodrigo-Muñoz JM, Cañas JA, Sastre B, Rego N, Greif G, Rial M, et al. Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy*. 2019;74(3):507-17.
 30. Cani AK, Hovelson DH, Demirci H, Johnson MW, Tomlins SA, Rao C. Next generation sequencing of vitreoretinal lymphomas from small-volume intraocular liquid biopsies: new routes to targeted therapies. *Oncotarget*. 2017;8(5):7989-98.
 31. Hastie AT, Moore WC, Li H, Rector BM, Ortega VE, Pascual RM, et al. Biomarker surrogates do not accurately predict sputum eosinophil and neutrophil percentages in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):72-80.
 32. Weidner J, Malmhäll C, Rådinger M. MicroRNAs in asthma pathogenesis - from mouse to man. *J Transl Genet Genom*. 2019;3:2.
 33. Alexandrova E, Miglino N, Hashim A, Nassa G, Stellato C, Tamm M, et al. Small RNA profiling reveals deregulated phosphatase and tensin homolog (PTEN)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in bronchial smooth muscle cells from asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):58-67.
 34. Li Y, Yin Z, Fan J, Zhang S, Yang W. The roles of exosomal miRNAs and lncRNAs in lung diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4:47.
 35. Price D, Wilson AM, Chisholm A, Rigazio A, Burden A, Thomas M, et al. Predicting frequent asthma exacerbations using blood eosinophil count and other patient data routinely available in clinical practice. *J Asthma Allergy*. 2016;9:1-12.
 36. Osei ET, Mostaço-Guidolin LB, Hsieh A, Warner SM, Al-Fouadi M, Wang M, et al. Epithelial-interleukin-1 inhibits collagen formation by airway fibroblasts: implications for asthma. *Sci Rep*. 2020;10(1):8721.
 37. Gon Y, Hashimoto S. Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. *Allergol Int*. 2018;67(1):12-7.
 38. Bélanger É, Madore AM, Boucher-Lafleur AM, Simon MM, Kwan T, Pastinen T, et al. Eosinophil microRNAs play a regulatory role in allergic diseases included in the atopic march. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):9011.

■ *Manuscript received August 19, 2021; accepted for publication September 6, 2021.*

■ **Victoria del Pozo**

Immunology Department
IIS-Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos, 2
28040 Madrid, Spain
E-mail: vpozo@fjd.es

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Demographic, inflammatory, functional and clinical characteristics eosinophilic, non-eosinophilic, atopic and non-atopic patients.

	Eosinophilic (n=40)	Non-Eosinophilic (n=36)	P-value	Atopic (n=5)	Non-atopic (n=4)	P-value
Age (years)†	44.5 (35.3-58.8)	51.5 (38.3-59.8)	N.S.	37.0 (26.5-55.0)	66.0 (58.8-71.0)	N.S.
Sex (%)						
Female	27.0 (67.5%)	24.0/35.0 (66.7%)	N.S.	4.0 (80.0%)	3.0 (75.0%)	N.S.
BMI†	25.2 (22.4-28.3)	25.8 (22.9-29.7)	N.S.	22.1 (20.5-31.9)	26.8 (23.2-31.1)	N.S.
Smoking habit (%)						
Smokers	4.0/39.0 (10.3%)	2.0/32.0 (6.3%)	N.S.	1.0 (20.0%)	0.0 (0.0%)	N.S.
Passive	4.0/39.0 (10.3%)	3.0/32.0 (9.4%)	N.S.	0.0 (0.0%)	0.0 (0.0%)	N.S.
Ex-smokers	11.0/39.0 (28.2%)	11.0/32.0 (34.4%)	N.S.	0.0 (0.0%)	2.0 (50.0%)	N.S.
Non-smokers	20.0/39.0 (51.3%)	16.0/32.0 (50.0%)	N.S.	4.0 (80.0%)	2.0 (50.0%)	N.S.
Blood eosinophils (cells/μL)†	700.0 (525.0-800.0)	100.0 (100.0-100.0)	****	300.0 (250.0-550.0)	450.0 (175.0-575.0)	N.S.
Sputum eosinophils (%)†	2.3% (0.0-20.0)	1.0% (0.0-4.0)	N.S.	7.0% (4.0-10.0)	0.5% (0.0-1.0)	N.S.
Atopy (%)	24.0 (60.0%)	28.0 (77.8%)	N.S.	5.0 (100.0%)	0.0 (0.0%)	**
IgE (IU)†	209.0 (87.4-497.0)	124.0 (62.3-391.0)	N.S.	84.1 (73.8-1175.0)	97.0 (9.7-176.8)	N.S.
FEV₁/FVC (%)†	78.3% (69.2-84.3)	78.0% (71.9-84.1)	N.S.	81.0% (76.4-97.0)	82.9% (74.9-91.3)	N.S.
FeNO (ppb)†	50.0 (31.5-78.0)	19.0 (11.3-28.1)	****	64.0 (60.0-81.0)	26.5 (13.0-30.3)	N.S.
Exacerbations (%)						
Severe	22.0/37.0 (59.5%)	14.0 (38.9%)	N.S.	3.0 (60.0%)	2.0 (50.0%)	N.S.
Moderate	9.0/37.0 (24.3%)	11.0/30.0 (36.7%)	N.S.	0.0 (0.0%)	1.0 (25.0%)	N.S.
Mild	5.0/37.0 (13.5%)	5.0/30.0 (16.7%)	*	2.0 (40.0%)	1.0 (25.0%)	N.S.
Intermittent	1.0/37.0 (2.7%)	1.0/30.0 (3.3%)	N.S.	1.0 (20.0%)	1.0 (25.0%)	N.S.
ACT†	20.0 (13.3-23.0)	20.5 (18.0-24.8)	N.S.	25.0 (18.5-25.0)	24.5 (18.0-25.0)	N.S.
		32.0 (88.9%)				
ICS and LABA (%)	33.0 (82.5%)		N.S.	3.0 (60.0%)	4.0 (100.0%)	N.S.

†Results are expressed as median (IQR); N.S., Non-significant; ****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; BMI, Body Mass Index; FEV₁, Forced Expiratory Volume measured during the first second; FVC, Forced Vital Capacity; FeNO, Fractional exhaled Nitric Oxide; Ppb, parts per billion; ICS and LABA, Inhaled Corticosteroids and Long-Acting β 2-Agonists; ACT, Asthma Control Test.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure 1S

Principal Component Analysis (PCA) of eosinophilic and non-eosinophilic asthmatic patients miRNA profiles.

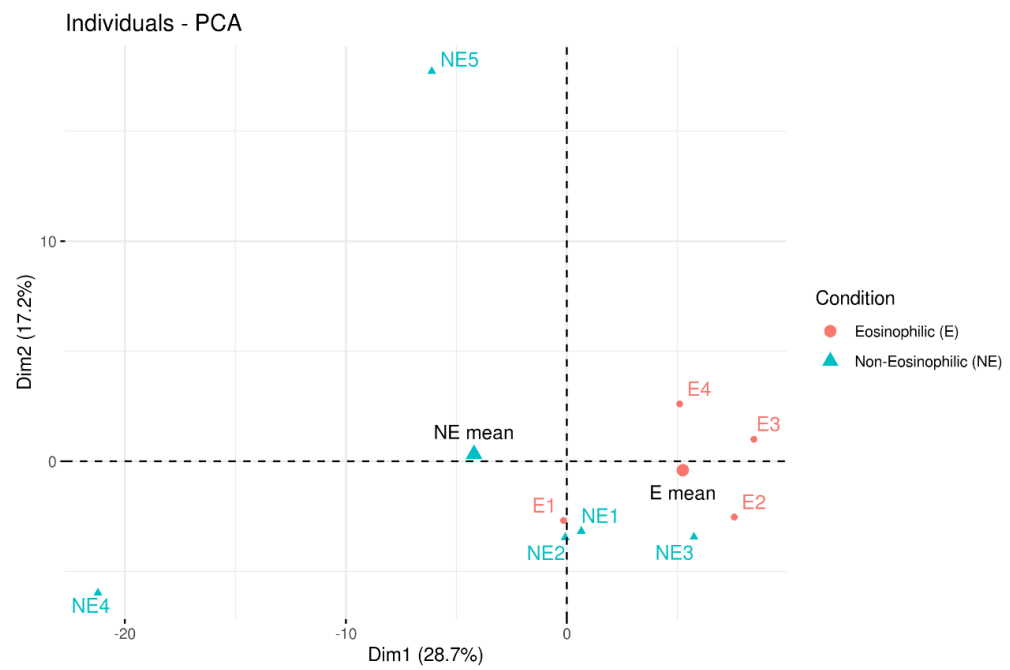
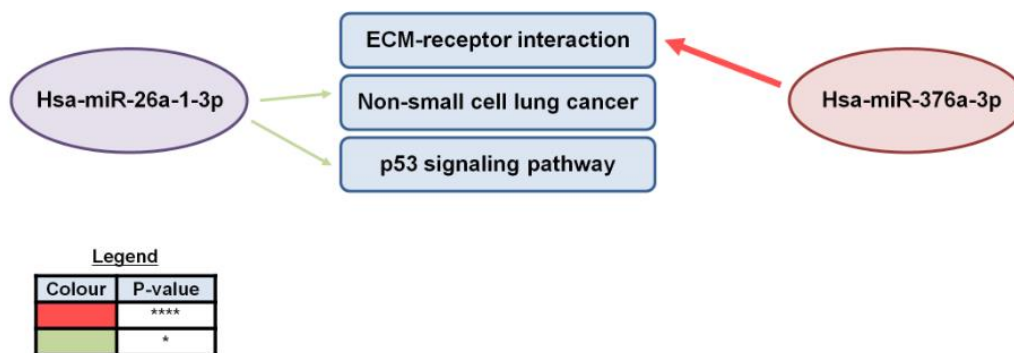


Figure 2S

Signaling pathways in which miRNAs hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p are implicated.

****, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$.



Objetivo parcial 2. Investigar la relación entre los miARNs séricos diferenciales obtenidos y la expresión de genes diana en tejido pulmonar de sujetos con y sin diagnóstico de asma, así como las proteínas diana en suero de sujetos con asma, tanto eosinofílica como no eosinofílica.

6.2. Resultados alcanzados en la consecución del objetivo parcial 2. Publicación 2

6.2.1. Resumen del trabajo, contribución personal de la doctoranda y presentación de la publicación

El análisis por RT-qPCR demostró una expresión diferencial de hsa-miR-26a-1-3p y de hsa-miR-376a-3p ($p < 0,01$ y $p < 0,001$), además de en suero, en biopsias pulmonares entre sujetos con y sin diagnóstico de asma, con sobreexpresión en los individuos con diagnóstico confirmado de asma. El análisis *in silico* indicó la participación de estos 2 miARNs en vías cruciales en la enfermedad asmática ($p < 0,05$), como la interacción MEC-receptor y la vía de señalización de p53, así como en otras patologías pulmonares, como el cáncer de pulmón no microcítico. En cuanto a la expresión génica, solo se observaron diferencias en el gen *IGFBP3* ($p < 0,01$), diana de hsa-miR-26a-1-3p, entre sujetos con asma y aquellos sin diagnóstico de asma, sobreexpresado en los individuos asmáticos. Además, se estableció una correlación directa entre los valores ΔCt de hsa-miR-26a-1-3p y de *IGFBP3* ($p < 0,05$).

Al comparar la expresión sérica de hsa-miR-26a-1-3p y de hsa-miR-376a-3p entre pacientes con asma obesos y no obesos, se vio una tendencia no significativa (NS; $p > 0,05$) al aumento de hsa-miR-26a-1-3p en los pacientes con asma obesos y una mayor expresión de hsa-miR-376a-3p en los pacientes con asma no obesos ($p = 0,07$). Asimismo, se encontraron diferencias en las concentraciones en suero de las proteínas extracelulares IGFBP-3 e IGF-1R ($p < 0,01$ y $p < 0,05$) entre pacientes asmáticos con y sin obesidad, siendo IGFBP-3 más elevada en los pacientes con asma no obesos e IGF-1R superior en los pacientes con asma obesos.

Al clasificar a los pacientes en subgrupos según la presencia o no de asma eosinofílica, y considerando también la obesidad como comorbilidad del asma, se evidenciaron diferencias en la expresión de hsa-miR-26a-1-3p y de hsa-miR-376a-3p ($p < 0,05$), así como en la concentración de las proteínas IGFBP-3 e IGF-1R ($p < 0,05$). La abundancia de IGFBP-3 fue mayor en los pacientes con asma no obesos, mientras que la de IGF-1R se incrementó en los pacientes con asma obesos, especialmente aquellos con asma eosinofílica. Además, se detectó una sobreexpresión de hsa-miR-26a-1-3p y de hsa-miR-376a-3p en los pacientes con asma eosinofílica, tanto obesos como no obesos, en comparación con los no eosinofílicos. La expresión de hsa-miR-26a-1-3p fue más elevada en los pacientes con asma obesos y, en contraste, la expresión de hsa-miR-376a-3p fue superior en los pacientes con asma no obesos.

En referencia a la correlación con las variables clínicas, se halló una asociación negativa entre los valores de concentración de IGFBP-3 y el índice de masa corporal (IMC; kilogramos [Kg]/metro [m]²) ($p < 0,01$) y, a su vez, una relación directa entre los valores de $2^{-\Delta Ct}$ de hsa-miR-26a-1-3p y el IMC ($p < 0,0001$). Igualmente, basándonos en los resultados derivados de los análisis de las curvas ROC, se demostró que hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p podrían ser predictores univariantes muy bueno y aceptable ($p < 0,05$), respectivamente, para distinguir entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, particularmente en el contexto de la comorbilidad médica de la obesidad.

Resultados

En la comparativa entre los grupos de sujetos con y sin diagnóstico de asma (muestras de biopsia pulmonar), se identificó una diferencia en la edad ($p < 0,05$), siendo más alta en individuos no diagnosticados de asma. Asimismo, se revelaron disparidades notables entre pacientes asmáticos obesos y no obesos (muestras de suero) en el porcentaje de volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁; del inglés, *Forced Expiratory Volume in the first second*)/capacidad vital forzada (FVC; del inglés, *Forced Vital Capacity*) ($p < 0,05$) y en la gravedad del asma (asma grave y moderada) ($p < 0,05$). Excepto en el porcentaje de pacientes con asma grave, los valores fueron mayores en los pacientes con asma obesos. Al separar a los pacientes asmáticos eosinofílicos y no eosinofílicos en obesos y en no obesos (muestras de suero), se vieron variaciones considerables (igual que en el IMC y en el porcentaje de sujetos obesos) ($p < 0,0001$) en los niveles de FeNO (ppb) ($p < 0,0001$) y en el porcentaje de individuos con asma grave ($p < 0,05$), con valores superiores en pacientes con asma eosinofílica no obesos.

En conclusión, hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p podrían ser utilizados como biomarcadores de la afección asmática, mostrando un potencial significativo para discriminar entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, específicamente cuando se tiene en cuenta la presencia concomitante de la obesidad como condición clínica.

Como investigadora predoctoral y autora principal de este trabajo, me involucré en todas las fases de la investigación. Esto incluyó la concepción del diseño experimental, la realización de los experimentos, el análisis estadístico, la depuración y el refinamiento de los datos, y la interpretación de los resultados. Además, me encargué de la redacción del manuscrito original y, junto a los coautores, de las modificaciones subsiguientes. La vivencia como primera autora me proporcionó una ocasión destacada para adquirir destrezas cruciales en la indagación científica, abarcando desde el diseño y la ejecución los experimentos hasta el análisis y el entendimiento de los resultados.



Article

Obese Asthma Phenotype Is Associated with hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p Modulating the IGF Axis

Marta Gil-Martínez ^{1,2}, Clara Lorente-Sorolla ¹, José M. Rodrigo-Muñoz ^{1,2}, Sara Naharro ¹, Zahara García-de Castro ¹, Joaquín Sastre ^{2,3}, Marcela Valverde-Monge ^{2,3}, Santiago Quirce ^{2,4}, María L. Caballero ^{2,4}, José M. Olaguibel ^{2,5} and Victoria del Pozo ^{1,2,6,*}

- ¹ Immunoallergy Laboratory, Immunology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid (IIS-FJD, UAM), 28040 Madrid, Spain; marta.gilm@quironosalud.es (M.G.-M.); clara.lorente@quironosalud.es (C.L.-S.); jose.rodrigom@quironosalud.es (J.M.R.-M.); sara.naharro@quironosalud.es (S.N.); zahara.garcia@quironosalud.es (Z.G.-d.C.)
 - ² CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain; jsastre@fjd.es (J.S.); marcela.valverde@quironosalud.es (M.V.-M.); squirce@gmail.com (S.Q.); mlcsoto@hotmail.com (M.L.C.); jmolaguibel@telefonica.net (J.M.O.)
 - ³ Allergy Department, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain
 - ⁴ Department of Allergy, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, 28046 Madrid, Spain
 - ⁵ Severe Asthma Unit, Department of Allergy, Hospital Universitario de Navarra, NavarraBiomed, 31008 Pamplona, Spain
 - ⁶ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28049 Madrid, Spain
- * Correspondence: vpozo@fjd.es



Citation: Gil-Martínez, M.; Lorente-Sorolla, C.; Rodrigo-Muñoz, J.M.; Naharro, S.; García-de Castro, Z.; Sastre, J.; Valverde-Monge, M.; Quirce, S.; Caballero, M.L.; Olaguibel, J.M.; et al. Obese Asthma Phenotype Is Associated with hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p Modulating the IGF Axis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11620. <https://doi.org/10.3390/ijms241411620>

Academic Editors: Kyriacos N. Felekakis and Christos Papaneophytou

Received: 20 June 2023
Revised: 7 July 2023
Accepted: 14 July 2023
Published: 18 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Clarifying inflammatory processes and categorising asthma into phenotypes and endotypes improves asthma management. Obesity worsens severe asthma and reduces quality of life, although its specific molecular impact remains unclear. We previously demonstrated that hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, biomarkers related to an inflammatory profile, discriminate eosinophilic from non-eosinophilic asthmatics. We aimed to study hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p, and their target genes in asthmatic subjects with or without obesity to find biomarkers and comprehend obese asthma mechanisms. Lung tissue samples were obtained from asthmatic patients (n = 16) and healthy subjects (n = 20). We measured miRNA expression using RT-qPCR and protein levels (IGF axis) by ELISA in confirmation samples from eosinophilic (n = 38) and non-eosinophilic (n = 39) obese (n = 26) and non-obese (n = 51) asthma patients. Asthmatic lungs showed higher hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p expression than healthy lungs. A study of seven genes regulated by these miRNAs revealed differential expression of *IGFBP3* between asthma patients and healthy individuals. In obese asthma patients, we found higher hsa-miR-26a-1-3p and IGF-1R values and lower values for hsa-miR-376a-3p and IGFBP-3. Hsa-miR-26a-1-3p and IGFBP-3 were directly and inversely correlated with body mass index, respectively. Hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p could be used as biomarkers to phenotype patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma in relation to comorbid obesity.

Keywords: asthma phenotypes/endotypes; eosinophilic asthma; obese asthma; serum microRNAs; biomarkers; IGF axis

1. Introduction

Asthma is a heterogeneous disease of the airways characterised by chronic airway inflammation leading to respiratory symptoms [1]. Asthma comprises an array of phenotypes driven by different mechanistic pathways, known as endotypes [2]. The asthma subtype most commonly associated with the T2 inflammatory profile (T2-high asthma) is severe eosinophilic asthma, in which patients experience recurrent exacerbations despite high doses of inhaled corticosteroids or even occasional oral corticosteroids [3].

Asthma is frequently accompanied by a variety of comorbidities that influence the severity of the disease. These are associated with a clinically significant reduction in quality of life (QoL) and exacerbate the rate of morbidity and the economic burden of the disease [4]. These comorbidities have been categorised based on the involvement of respiratory and/or extra-respiratory domains [5]. Obesity is a major public health concern as well as an extra-respiratory risk factor for both asthma incidence and prevalence. The relationship between obesity and asthma is the result of a complex interplay between biological, physiological, and environmental factors [6]. Nowadays, with the continuous rise in obesity, particularly among children, the obese asthma phenotype is attracting great interest [7]. Both T2 and non-T2 inflammation can be encountered in asthma patients with obesity [8]. Obese asthmatic patients are primarily associated with a non-eosinophilic phenotype and are characterised by a state of low-grade systemic inflammation marked by the activation of M1 macrophages and CD8⁺ T cells and an increase in inflammatory indicators such as Toll-like receptor 4 (TLR4), interleukin (IL)-1b, IL-6 and IL-17, interferon (IFN)- γ , tumour necrosis factor (TNF)- α , leptin, and resistin. Asthma, which is often severe in patients who are obese, may be somewhat resistant to current treatment options, including corticosteroids, thus limiting possible therapeutic approaches and complicating efforts to control the disease [8–10].

It is unclear which pathophysiological mechanisms underlie the development of obesity as a comorbidity and enhancer of asthma severity and how these mechanisms are related, and further research on the endophenotype of obese patients with severe eosinophilic asthma is needed [10]. Biomarkers are highly useful for phenotyping and endotyping asthma, as they allow for personalised therapies to be offered to patients [11]. Currently, there is increasing interest in using microRNA (miRNA) profiles as biomarkers of disease [12]. miRNAs, which are small, non-coding RNA molecules, are engaged in regulating gene expression by inhibiting protein translation [13]. Previous studies have demonstrated that miRNAs hold great potential as asthma mediators and biomarkers [14]. In previous research, we used serum samples from patients with eosinophilic ($n = 40$) and non-eosinophilic ($n = 36$) asthma to evaluate miRNA expression by next-generation sequencing (miRNA-seq), with subsequent validation by RT-qPCR. After these analyses, we demonstrated that hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p were able to discriminate between patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma [11].

The aim of this study was to analyse the expression of these miRNAs and their targets in subjects with eosinophilic vs. non-eosinophilic asthma, with or without comorbid obesity, in order to determine whether these miRNAs are associated with differential inflammatory pathways of asthma.

2. Results

2.1. Characteristics of the Study Population

Descriptive data on the demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of all individuals studied are summarised in Table S1a (population 1) and Table S1b (population 2).

Contrasting the group of asthmatic patients and control individuals based on lung biopsy samples (Table S1a), age was the only significant difference observed (52.4 vs. 63.7 years, $p < 0.05$).

As evidenced in Table S1b, with respect to functional and clinical parameters, the serum samples of obese and non-obese asthmatic patients showed significant differences in FEV1/FVC (%) (86.5 vs. 78.8, $p < 0.05$) and in severe and moderate disease severity (32% vs. 56.8%, and 44% vs. 20.5%; $p < 0.05$). The functional and clinical parameters of these patients according to the four study groups are shown in Table 1 (population 2, obese and non-obese, further subdivided into eosinophilic and non-eosinophilic), showing significant differences in FeNO levels ($p < 0.0001$) and in the rates of severe asthma ($p < 0.05$). None of the other demographic, inflammatory, functional, or clinical characteristics presented statistically significant differences (Table S1b and Table 1).

Table 1. Demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of obese and non-obese non-eosinophilic asthmatic patients, and obese and non-obese eosinophilic asthmatic patients (population 2; serum samples analysis).

	Obese Eosinophilic (n = 10)	Non-Obese Eosinophilic (n = 28)	Obese Non-Eosinophilic (n = 16)	Non-Obese Non-Eosinophilic (n = 23)	p-Value
Age (years) [^]	50.4 (±13.8)	46.4 (±15.5)	53.9 (±8.4)	47 (±15.7)	N.S.
Female (%)	6 (60%)	20 (71.4%)	13 (81.3%)	15 (65.2%)	N.S.
BMI [†]	34.5 (32.4–38.2)	23.6 (21.8–26.7)	32.2 (31–33.3)	23.8 (22.6–26)	****
Obesity (%)	10 (100%)	0 (0%)	16 (100%)	0 (0%)	****
Tobacco habit (%)					
Smokers	0 (0%)	3/27 (11.1%)	0/15 (0%)	0/20 (0%)	N.S.
Passive	0 (0%)	4/27 (14.8%)	2/15 (13.3%)	0/20 (0%)	N.S.
Ex-smokers	4 (40%)	8/27 (29.6%)	6/15 (40%)	7/20 (35%)	N.S.
Non-smokers	6 (60%)	12/27 (44.4%)	7/15 (46.7%)	13/20 (65%)	N.S.
Blood eosinophils (cells/μL) [†]	600 (500–800)	700 (600–845)	150 (100–200)	100 (100–100)	****
Sputum eosinophils (%) [†]	5% (2.5–20)	0% (0–48)	0% (0–6)	2% (0–5)	N.S.
Atopy (%)	7 (70%)	17 (60.7%)	13 (81.3%)	16 (69.6%)	N.S.
IgE (IU) [†]	131 (55.6–347)	209 (87.4–753.5)	191 (61–670)	151 (53.3–358.3)	N.S.
FEV ₁ /FVC (%) [†]	85% (74.5–104)	78.3% (68–90)	88% (72–94.3)	80.3% (71–84.5)	N.S.
FeNO (ppb) [†]	29 (21.5–41)	60 (34–82)	20.5 (11.1–30.8)	16 (12–23)	****
Exacerbations (%)	5 (50%)	17 (60.7%)	8 (50%)	9 (39.1%)	N.S.
Severity (%)					
Severe	3 (30%)	18/26 (69.2%)	5/15 (33.3%)	7/18 (38.9%)	*
Moderate	5 (50%)	5/26 (19.2%)	6/15 (40%)	4/18 (22.2%)	N.S.
Mild	2 (20%)	3/26 (11.5%)	4/15 (26.7%)	6/18 (33.3%)	N.S.
Intermittent	0 (0%)	0/26 (25%)	0/15 (0%)	1/18 (5.6%)	N.S.
ACT [†]	20.5 (15–23)	21 (14.5–23.5)	21 (17–22)	22 (18–25)	N.S.
ICS and LABA (%)	10 (100%)	25 (89.3%)	15 (93.8%)	19 (82.6%)	N.S.
Late asthma onset	8/9 (88.9%)	20/25 (80%)	9/15 (60%)	14/18 (77.8%)	N.S.

Results are expressed as [^] mean (±SD) or [†] median (IQR); N.S., Non-significant; ****, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$; BMI, body mass index; FEV₁, forced expiratory volume measured during the first second; FVC, forced vital capacity; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; Ppb, parts per billion; ICS and LABA, inhaled corticosteroids and long-acting β₂-agonists; and ACT, asthma control test.

2.2. miRNA and Gene Expression in Lung Tissue Samples

We found statistically significant differences in the expression of hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p in lung biopsies between asthmatic patients and healthy subjects ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively), with higher expressions observed in asthmatic patients (Figure 1a). This confirms that serum hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p are linked to asthma, suggesting that these miRNAs could possibly serve as biomarkers of the disease.

We subsequently conducted an in silico analysis using DIANA-miRPath v3.0 to determine the implication of these two differentially expressed miRNAs in biological processes and to identify potential target genes. We found that hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p control several signalling pathways: prion diseases ($p < 0.0001$), p53 signalling pathway and non-small cell lung cancer ($p < 0.05$), regulated by hsa-miR-

26a-1-3p, and extracellular matrix (ECM)-receptor interaction ($p < 0.0001$), influenced by hsa-miR-376a-3p. Of these, the p53 signalling pathway and extracellular matrix (ECM)-receptor interaction are critical pathways related to asthma pathogenesis. Since *CDK6*, *CCND1*, and *IGFBP3*, involved in the p53 signalling pathway, are target genes of hsa-miR-26a-1-3p, and *COL3A1*, *COL6A2*, *COL1A1*, and *COL6A3*, implicated in the extracellular matrix (ECM)-receptor interaction signalling pathway, are targeted by hsa-miR-376a-3p, RT-qPCR was performed on lung biopsy samples from asthmatic patients and healthy individuals. The results of this analysis revealed that only *IGFBP3* was significantly increased in asthmatic individuals in comparison to healthy subjects ($p < 0.01$; Figure 1b).

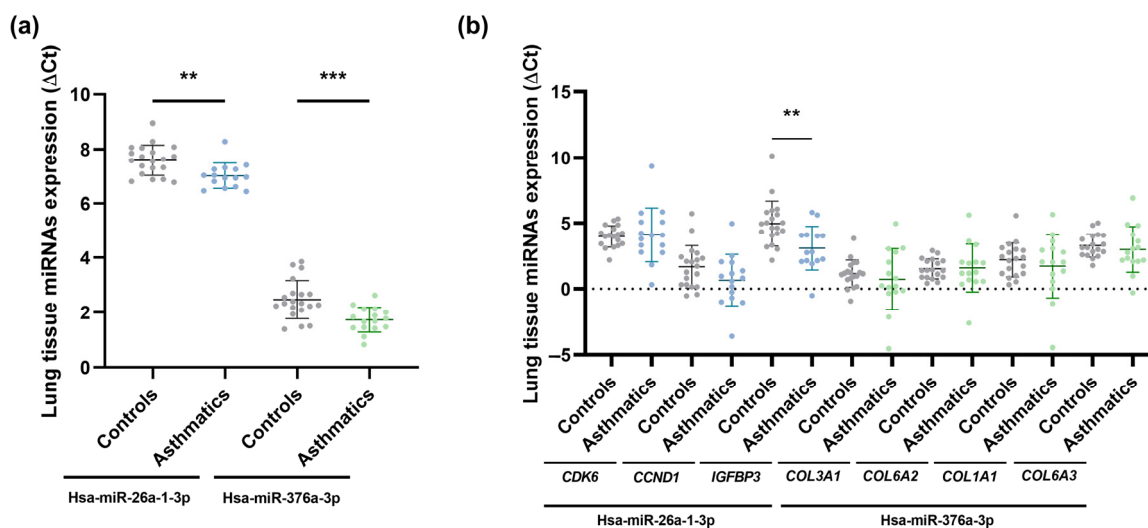


Figure 1. Lung biopsy sample miRNA expression (ΔCt) in asthmatic and non-asthmatic (controls) subjects. Hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p were differentially expressed between the two groups, showing higher expression in asthmatic individuals (a); and gene expression (ΔCt) measured in lung tissue samples from asthmatic and non-asthmatic (controls) subjects. Only *IGFBP3* exhibited differential expression between the two groups, being overexpressed in the asthma group (b). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

To establish the association between miRNA molecules and their target gene expression levels (ΔCt), a lung-tissue correlation analysis was carried out. We verified a significant, direct correlation for the total population between hsa-miR-26a-1-3p and its target gene, *IGFBP3* (Pearson $r = 0.36$, $p < 0.05$), instead of detecting, as usual, an inverse miRNA-target gene correlation. Since miRNAs generally behave as silencers of their target mRNAs, a possible explanation would be that miRNA–miRNA relationships are complex, and the lung tissue samples in which they were studied differ from each other (influence of genetic and/or environmental factors). There may be other miRNAs involved in the modulation of a particular mRNA (*IGFBP3* mRNA) and there could also be an interaction of other target genes of this miRNA (hsa-miR-26a-1-3p) that could be inhibitors of *IGFBP3*, in this case, highlighting the intricacy of post-transcriptional miRNA–mRNA regulation throughout the whole tissue.

2.3. miRNA Expression and Extracellular Protein Concentration in Serum Samples

To further investigate and confirm the relationship between these miRNAs and the *IGFBP3* gene, we analysed the serum expression of two soluble extracellular proteins, *IGFBP3* (encoded by *IGFBP3*, the target gene of hsa-miR-26a-1-3p) and *IGF1R* (encoded by *IGF1R*, targeted by hsa-miR-376a-3p), both of which are implicated, in the IGF axis, in patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma. No significant differences in target protein levels were detected between the eosinophilic and non-eosinophilic groups (data not shown), although statistically significant differences were observed in *IGFBP3* ($p < 0.01$) and *IGF1R* ($p < 0.05$) levels among obese and non-obese asthmatic patients: *IGFBP3*

showed higher levels in non-obese subjects, while IGF-1R levels were greater in obese individuals (Figure 2a,b). Regarding the levels of these proteins when subdividing patients with and without eosinophilic asthma into obese and non-obese subjects, IGFBP-3 was more concentrated in non-obese individuals than in obese subjects ($p < 0.05$) among patients with eosinophilic asthma and those with non-eosinophilic asthma (Figure 2a); on the other hand, IGF-1R was higher in obese individuals than in non-obese subjects ($p = 0.05$ and $p < 0.05$, in that order), and obese patients with eosinophilic asthma had higher amounts of IGF-1R than the rest of the groups (Figure 2b).

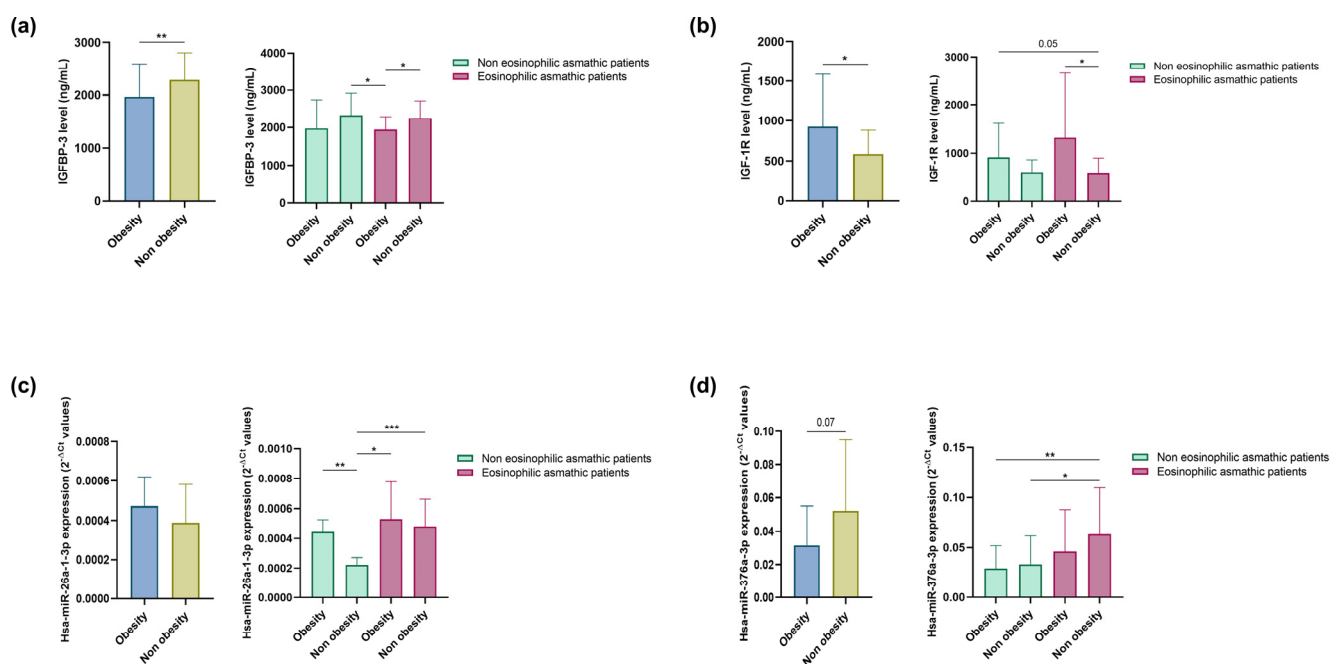


Figure 2. Serum IGFBP-3 (a); and IGF-1R (b) concentration. Serum hsa-miR-26a-1-3p (c); and hsa-miR-376a-3p (d) ($2^{-\Delta C_t}$). Differential expression of miRNAs and soluble extracellular proteins was observed between obese and non-obese eosinophilic asthma patients and obese and non-obese non-eosinophilic asthma patients. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Next, we assessed whether hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p are modulated by obesity status in asthmatic patients with and without eosinophilia. A non-significant increase in hsa-miR-26a-1-3p expression and lower expression of hsa-miR-376a-3p ($p = 0.07$) was found in this group of obese subjects (Figure 2c,d). When we subdivided patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma into obese and non-obese individuals, we observed that both miRNAs were more highly expressed in patients with eosinophilic asthma than in those with non-eosinophilic asthma ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, and $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively; Figure 2c,d). Specifically, hsa-miR-26a-1-3p exhibited higher expression in obese subjects than in non-obese individuals ($p < 0.01$) and in patients with non-eosinophilic asthma (Figure 2c), while hsa-miR-376a-3p levels were highest among non-obese eosinophilic asthmatics.

2.4. Correlation of miRNAs and Soluble Extracellular Proteins with Clinical Parameters

Because the measured soluble extracellular proteins are engaged in the IGF axis, which is metabolism-related, we analysed our data to determine if BMI correlated with serum levels of these proteins and miRNAs (Figure 3). A negative correlation was identified between IGFBP-3 and BMI in the group of patients with eosinophilic asthma (Pearson $r = -0.43$, $p < 0.01$; Figure 3a) and in the total study population (Pearson $r = -0.34$, $p < 0.01$; Figure 3c); while hsa-miR-26a-1-3p correlated directly with BMI in patients with

non-eosinophilic disease (Pearson $r = 0.86$, $p < 0.0001$; Figure 3b) and in the total population (Pearson $r = 0.38$, $p < 0.05$; Figure 3c).

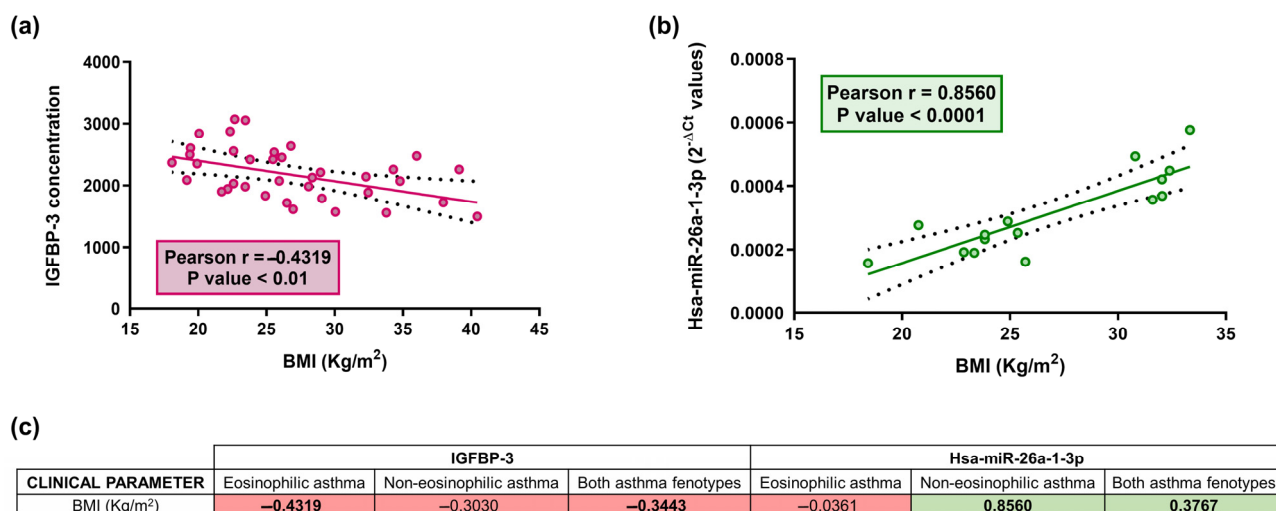


Figure 3. Relative IGFBP-3 concentration correlates inversely with BMI in serum samples ($p < 0.01$) in eosinophilic asthmatic patients (a); a direct correlation between relative hsa-miR-26a-1-3p expression ($2^{-\Delta Ct}$) and BMI was reported in serum samples ($p < 0.0001$) in non-eosinophilic asthmatic patients (b); Dots (red and green) are individual values, black dashed line indicates error bars and red/green solid line shows linear regression (a,b). Table showing the correlation coefficient (r) between BMI parameter and serum IGFBP-3 concentration and hsa-miR-26a-1-3p expression levels ($2^{-\Delta Ct}$) (c). The red color indicates negative correlations, whereas green shows positive correlations (c). Bold and underlined values are statistically significant ($p < 0.05$).

2.5. ROC Curves to Establish Potential Biomarkers of Inflammatory Endotype in Asthma

ROC curve analyses for the two miRNAs (Table 2) were performed for two-by-two group comparisons (obese and non-obese eosinophilic asthma patients, obese and non-obese non-eosinophilic asthma patients, and the entire population of obese and non-obese asthma patients), and the AUC were estimated.

Table 2. ROC curves for different comparisons between groups of asthmatic patients: obese and non-obese non-eosinophilic asthmatic patients, obese and non-obese eosinophilic asthmatic patients, and obese and non-obese in all asthmatic patients.

Comparison Groups	Hsa-miR-26a-1-3p		Hsa-miR-376a-3p	
	AUC	p -Value	AUC	p -Value
Obese non-eosinophilic vs. Non-obese non-eosinophilic	1.00	<0.01	0.50	>0.05
Obese eosinophilic vs. Non-obese eosinophilic	0.56	>0.05	0.63	>0.05
Non-obese non-eosinophilic vs. Non-obese eosinophilic	0.91	<0.001	0.71	<0.05
Obese non-eosinophilic vs. Obese eosinophilic	0.50	>0.05	0.64	>0.05
Obese non-eosinophilic vs. Non-obese eosinophilic	0.58	>0.05	0.75	<0.01
Non-obese non-eosinophilic vs. Obese eosinophilic	1.00	<0.05	0.61	>0.05
Obese vs. Non-obese	0.66	>0.05	0.60	>0.05

AUC, area under curve. Bold values are statistically significant ($p < 0.05$). Green color intensity indicates a higher positive correlation.

Hsa-miR-26a-1-3p presented an AUC value of 0.91 for the comparison between non-eosinophilic and eosinophilic asthma within the non-obese group ($p < 0.001$). An AUC of 1.00 was found for the comparisons between obese and non-obese, non-eosinophilic asthmatics ($p < 0.01$) and between the non-obese, non-eosinophilic and obese eosinophilic asthma patients ($p < 0.05$). Hsa-miR-376a-3p showed AUC values of 0.71 and 0.75, respectively, for the comparisons between non-eosinophilic and eosinophilic subjects in the

non-obese asthma group ($p < 0.05$) and between obese non-eosinophilic and non-obese eosinophilic asthmatic individuals ($p < 0.01$).

3. Discussion

The results of this study reveal that hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p are post-transcriptional modulators of the IGF axis and potential epigenetic biomarkers to differentiate asthma patients by inflammatory condition (eosinophilia and/or obesity).

Severe asthma is an inherently heterogeneous disease that encompasses several clinical phenotypes that may have several shared pathophysiological mechanisms, known as endotypes of asthma [15]. Therefore, inflammatory endotype characterisation should be a crucial component of the algorithm used to assess and manage severe disease [16]. The discovery and use of biomarkers to define phenotypes and endotypes of severe asthma and guide therapeutic strategy is increasingly necessary for clinicians, as an individual approach to disease management and personalised medicine is essential [17]. Eosinophilic phenotypes and T2-associated endotypes with eosinophilic inflammation are currently identified in clinical practice by biomarkers, including peripheral blood and sputum eosinophil count, total serum IgE levels, FeNO value, periostin, and miRNAs [18]. We observed that serum samples from both obese and non-obese patients with eosinophilic asthma showed markedly higher FeNO scores compared to non-eosinophilic asthmatic patients. As previous research has found a relationship between FeNO and the eosinophilic phenotype in asthma, FeNO, in combination with blood eosinophils, can accurately predict eosinophilic airway inflammation [19,20]. Also, as demonstrated by our results (non-obese, non-eosinophilic asthma group), elevated FeNO values and increased blood eosinophil counts are associated with increased severity of asthmatic disease, worse lung function, and an increased risk of asthma exacerbation [21].

It has been established that severe asthma is a complex clinical condition not exclusively related to airway inflammation and response to treatment [22]. Asthma is often associated with various comorbidities which can worsen asthma symptoms and affect asthma severity [23]. For patients with asthma, comorbid conditions lead to an enhanced disease burden and, consequently, a reduced QoL [24]. The involvement of other disorders is likely to lead to polypharmacy, which can negatively impact treatment adherence and asthma control [25,26]. Additionally, comorbid conditions complicate the diagnosis and management of asthmatic patients and carry a considerable economic cost [23]. Obesity is a common comorbidity in children and adults with asthma, and both obesity and asthma have risen dramatically in prevalence [27,28]. Obesity is defined as having a BMI of 30 kg/m² or greater [29]. Obese asthmatics are generally characterised by more severe asthma, are less responsive to treatment, and have poorer asthma control, according to the asthma control test (ACT) questionnaires [30], although this does not appear to be a determining factor in the risk of asthma exacerbations with regard to disease severity [31]. This absence of a link between obesity status and exacerbations appears to be in line with our results, as both obese asthmatic patient groups, compared to the two non-obese asthmatic patient groups, had similar or higher asthma severity (80% and 73.3%, respectively; 88.5% and 61.1% of patients with severe and moderate asthma), lower ACT scores (20.5 and 21, 21 and 22), and a lower, or roughly similar, presence of exacerbations (50% and 50%, 60.7% and 39.1%). As cited earlier, our findings indicate more frequent occurrences of exacerbations among obese women (19/26) and late-onset asthmatics (17/24) [12]. Also, since no significant differences are observed in relation to patient therapy, it could be considered that the changes in miRNA expression are not due to the treatment. However, it is worth mentioning that, surprisingly, in contrast to what has been described in the literature in relation to lung function, that obese asthmatic patients have worse lung function than non-obese asthmatic patients. In our population the opposite is shown, obese asthma patients show more improved lung function than non-obese asthma subjects [32], which may be due, to some extent, to the fact that there are more non-obese than obese asthmatic patients and, within the group of non-obese asthmatic patients there was a high number of patients with eosinophilic

asthma, which may cause these non-obese asthmatic patients to have lower pulmonary function since, subdividing obese and non-obese asthmatic patients into eosinophilic and non-eosinophilic categories, the eosinophilic asthmatic patient groups showed poorer lung function than the non-eosinophilic asthmatic patient groups, contributing to a decrease in the overall group's lung function. Moreover, according to the percentage of neutrophils in sputum in our study, the 27% of patients with obese asthma are individuals with a neutrophilic component. The differences in clinical and inflammatory findings between the four patient groups may be due to the combined influence of the different inflammation profiles in obese asthma [12] and the pathophysiological differences between eosinophilic and non-eosinophilic asthma [33].

Biomarkers are promising tools for categorising asthma patients into different phenotypes and endotypes, as they enable the identification of potential therapeutic targets and make it possible to deliver personalised therapy [17]; of these tools, miRNAs could be an effective biomarker [34]. In this study we found expression differences of the two miRNAs, hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, in lung tissue samples from asthmatic individuals and healthy subjects. The same difference was previously observed in serum from patients with eosinophilic asthma and others with non-eosinophilic asthma [11]. This finding supports the involvement of these miRNAs in asthma, as they were detected in target tissue, and further indicates that the two miRNAs could serve as potential biomarkers to classify patients into either group. In terms of downstream effects, *in silico* experiments revealed that hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p significantly modulate two pathways associated with asthma pathogenesis that play a key role in the development of airway inflammation and asthma remodelling [35,36]. Also, of the target genes selected for study due to their relationship with differential expression of these two miRNAs, only *IGFBP3* displayed differential expression between lung biopsy samples from asthmatic individuals and healthy subjects, with higher values found in asthmatic individuals; the expression levels of the miRNA and its target gene were correlated, emphasising the involvement of this inflammation-related gene in asthma pathology, as has been previously described [37]. Moreover, we found differences in the expression of two soluble extracellular proteins, IGFBP-3 and IGF-1R, which are encoded by target genes of these miRNAs, in the serum of subjects with eosinophilic asthma and in individuals with non-eosinophilic asthma, further separated into obese and non-obese asthmatic patients.

Growth hormone (GH), which is deficient in obese patients, stimulates the secretion of insulin-like growth factor I (IGF-1) in most tissues. Jointly, GH and IGF-1 exert strong actions on fat, protein, and glucose metabolism [38]. The actions of IGF-1 are typically mediated through interactions with its receptor (IGF-1R), resulting in the activation of intracellular signalling pathways, including MAP kinase and PI3 kinase/AKT [39]. In addition, the bioavailability, half-life, and actions of IGF-1 in circulation are regulated through its binding to one of the members of the IGF binding proteins, of which IGFBP-3 is the most abundant in plasma and the one with the highest affinity for IGF-1 [40]. Alterations in the IGF axis may be implicated in a variety of pathological conditions, including obesity [41]. Furthermore, a link between asthma and obesity has been recognised alongside other markers of the metabolic syndrome, such as insulin resistance and hypertension [42]. It has also been proposed that insulin resistance may have an effect on asthma risk [43]. Peters and co-workers observed that, among asthma patients participating in a severe asthma research programme, patients with insulin resistance had poorer asthma-control test scores and greater deterioration in lung-function test responses [44]. Finally, it is well known that both insulin and IGF-1 can mutually activate insulin and IGF-1R receptors, sharing downstream signalling pathways but with different biological effects [45].

Regarding our study on obese asthma molecular mechanisms, on the one hand, hsa-miR-26a-1-3p showed higher expression in subjects with eosinophilic asthma and in the subgroups of obese individuals, while the concentration of the soluble extracellular protein IGFBP-3, which is encoded by the target gene of this miRNA, as expected in terms of miRNA-gene interaction, was lower in the non-obese patient groups. Also, since

IGFBP-3 is a molecule that displays anti-inflammatory action [46], a greater concentration was expected in subjects with no additional inflammatory condition such as obesity. As reported in other studies [47], hsa-miR-376a-3p showed greater expression in non-obese subjects and in asthmatic patients without additional comorbid conditions, with expression increasing in eosinophilic asthmatics. As in the previous case, there is an inverse miRNA-gene relation, such that the concentration of IGF-1R, which is encoded by the target gene of hsa-miR-376a-3p, was elevated in obese individuals, and specifically in obese patients with eosinophilic asthma. This result supports previous reports indicating that the higher expression of this molecule results in more prominent inflammatory responses [48].

Since IGFBP-3 and IGF-1R are involved in the IGF axis, which is closely related to metabolism, we studied the correlation of the expression of hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, in addition to these two soluble extracellular proteins encoded by their respective target genes, and established their correlation with clinical parameters. The results suggested that these molecules could be relevant in phenotypically distinguishing patients based on the inflammatory component and thus be used in asthma diagnosis.

Lastly, based on the AUC values calculated, hsa-miR-26a-1-3p could be a highly valuable biomarker in differentiating obese from non-obese subjects among patients with non-eosinophilic asthma or in discriminating individuals with no inflammatory condition (non-obese, non-eosinophilic asthma subjects) from individuals with combined inflammatory states (obese eosinophilic asthma subjects). Hsa-miR-26a-1-3p is also effective in distinguishing non-eosinophilic from eosinophilic individuals within the group of non-obese asthma patients. Therefore, this miRNA can discern the inflammatory conditions of obesity or eosinophilia (individually) and can distinguish the presence of both inflammatory processes from cases with no inflammatory condition. Based on the AUC score found, hsa-miR-376a-3p could be an acceptable biomarker to differentiate non-eosinophilic from eosinophilic subjects within the group of non-obese asthma patients (i.e., eosinophilia in the absence of obesity) or to separate individuals with one inflammatory state (i.e., non-obese, non-eosinophilic patients) from subjects with the other (non-obese eosinophilic patients).

We wish to point out that a limitation of this study is the low number of samples from obese individuals, mainly patients with eosinophilic asthma, compared to the number of samples from non-obese subjects (patients with eosinophilic asthma and non-eosinophilic asthma). A more even sample size in the four groups could provide more consistent results. Another limitation of our study is the existence of significant differences in age between the asthmatic and control groups of subjects, whose lung tissue samples were included for analysis, as this was not evaluated as a confounding factor. However, although there were significant age differences between these two groups, in the obese and non-obese groups (with a larger number of subjects), from which serum samples were included, or in the four groups after being subdivided, no significant age differences were observed; therefore, it is possible that age does not significantly affect miRNA expression. In addition, unfortunately, as the samples were from patients belonging to biobanks, we did not have all the clinical data available.

4. Materials and Methods

4.1. Study Subjects and Sample Collection

We obtained lung biopsy samples from 16 asthmatic patients and 20 control subject donors (population 1) to examine miRNAs and gene expression. Biopsy samples were provided by the CIBERES Pulmonary Biobank Consortium (PT13/0010/0030), a network currently made up of 12 tertiary Spanish hospitals (www.ciberes.org; accessed on 5 June 2023) listed in the Acknowledgements section and integrated in the Spanish National Biobanks Network. Lung biopsies were processed in accordance with standard operating procedures, and subsequent approval was granted for processing by the local ethics and scientific committees (ref. B.0000471 Registro Nacional de Biobancos—ISCIII; CIBERES Pulmonary Biobank Consortium started its activity in 2008 and has been ISO9001:2015 (formerly ISO9001:2008) certified since 2012.).

Lung tissue samples were preserved in RNAlater stabilisation solution at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

A cohort of 77 subjects with diagnosed asthma (population 2) was selected for confirmation studies. This cohort was recruited from the allergy and pulmonology units of Fundación Jiménez Díaz Hospital in Madrid (Spain); 10 of these individuals were phenotyped as obese patients with eosinophilic asthma, 28 as non-obese patients with eosinophilic asthma, 16 as obese patients with non-eosinophilic asthma, and 23 as non-obese patients with non-eosinophilic asthma. Descriptive data representing the demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of study subjects were collected.

The following scheme (Figure S1) shows the groups of the two studies (with the exact number of patients per group) and the material (lung tissue or serum) used from each patient in each phase of the study, facilitating the understanding of the design.

Serum samples were obtained by blood clotting in plain, additive-free tubes which were subsequently centrifuged at 3000 rpm for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

The inclusion criteria were as follows: (i) acceptance to participate, providing signed informed consent; (ii) asthma diagnosis in accordance with the 2021 GINA criteria [49]; and (iii) age between 18 and 75 years. Eosinophilic asthma was determined by counts of ≥ 500 eosinophils/ mm^3 in peripheral blood, while non-eosinophilic patients had ≤ 200 eosinophils/ mm^3 . Participants were considered obese if they had a body mass index (BMI) $\geq 30\text{ kg/m}^2$, and non-obese if BMI was $< 30\text{ kg/m}^2$.

The study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the CEIm of the participating hospital ethics committees (EOH2014/48, 4 December 2014).

4.2. miRNA and mRNA Analysis by RT-qPCR

Four μL of serum miRNA samples or 30 ng of miRNA-enriched lung tissue RNA were reverse-transcribed to cDNA using the miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. Synthetic Uni-Sp6 and miRNA cel-miR-39-3p (Qiagen, Hilden, Germany) were used to verify correct reverse transcription. The cDNA obtained was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Then, miRNA expression was evaluated by qPCR using the miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen) as indicated in the instructions. For this purpose, we used 3 μL of cDNA from the serum or lung tissue miRNAs diluted in 1:30 or 1:60 in RNase-free water, respectively, according to the producer's recommendations. To ensure that differences in concentration, due to choosing the same volume in the case of serum samples, did not affect the miRNA expression measurements, the samples were normalised with endogenous control genes, which functioned as a control for the qPCR reaction. The following probes (Qiagen) were used for miRNA expression analysis in the serum and lung tissue: hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p. Additionally, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, SP6, cel-miR-39-3p, and U6 (Qiagen) were selected as housekeeping miRNAs. The program GraphPad Prism[®] v6-8.0 was used to perform a homogeneity test of Ct means of the samples from each of the comparison groups to select endogenous and/or exogenous genes as internal control of the qPCR reaction. In addition, a normalisation analysis was carried out with the use of the Bestkeeper tool. All samples were run in triplicate, and reactions were performed in a LightCycler[®] 96 thermal cycler (Roche, Basel, Switzerland). Cycle threshold (Ct) values were analysed with LightCycler[®] 96 SW 1.1 (Roche) software, and miRNA expression was calculated by normalising levels of expression to the endogenous miRNA controls. Relative quantification of differences in expression ($\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$; where $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{eosinophilic asthmatics}} - \Delta\text{Ct}_{\text{non-eosinophilic asthmatics}}$ and $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA}} - \text{Ct}_{\text{housekeeping miRNAs}}$) was carried out by means of the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method [50].

For gene expression analysis in lung tissue, 500 ng of RNA quantified by Nanodrop[®] ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), followed by qPCR analysis according to manufacturer guidelines

on a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). TaqMan™ gene expression probes were purchased for *CDK6*, *CCND1*, *IGFBP3*, *COL3A1*, *COL6A2*, *COL1A1*, *COL3A3*, and *GAPDH* using TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). Gene expression was calculated by normalising to the endogenous control gene *GAPDH* applying the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method as reported previously ($RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$; where $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{asthmatics}} - \Delta C_{t_{healthy\ subjects}}$) [50].

4.3. Pathway Enrichment Analyses

In order to identify the target genes related to asthma disease, hsa-miR-26-a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, and differentially expressed miRNAs, a pathway enrichment analysis of the dysregulated miRNAs was performed using the DIANA-miRPath v3.0 online bioinformatic resource [51]. Relevant pathways for asthma pathology were represented when a p -value < 0.05 , and the involved genes were analysed by RT-PCR, as previously mentioned.

4.4. Protein Detection by ELISA

Zehavi et al., identified the *IGF1R* gene as a target of hsa-miR-376a and hsa-miR-376c miRNAs. Since the protein encoded by the *IGF1R* gene is involved in the IGF axis, it was chosen, together with *IGFBP-3*, for ELISA evaluation [52].

For a determination of the soluble extracellular proteins *IGFBP-3* and *IGF-1R* (genes encoded which are targeted by both hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p), 10 μ L (dilution 1:100) or 100 μ L of serum samples, in that order, were used for ELISA, performed with the Human *IGFBP-3* Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and Human *IGF-1R/IGF-1R* DuoSet ELISA Kit (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), respectively, following the manufacturers' instructions.

The optical density of each well was determined using a Tecan Infinite® F200 microplate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) adjusted to 450 nm, with the wavelength correction set to 570 nm.

4.5. Statistical Analysis

Statistical analyses and graphs were created with GraphPad Prism® v6-8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

The results are shown as mean (standard deviation, SD) or median (interquartile range, IQR) values. For all statistical analyses, differences showing $p < 0.05$ were considered significant. Normality was analysed by means of the Shapiro–Wilk test. For continuous variables, comparisons of normally distributed data among non-paired groups were performed via an unpaired t test (equal to SD) and t test with Welch's correction (different SD), and non-normally distributed data and non-paired groups were compared by Mann–Whitney test.

Multiple comparisons between groups with data following a normal distribution were carried out with one-way ANOVA test (equal to SD) and Brown–Forsythe and Welch ANOVA test (different SD) without Welch's correction test or with Kruskal–Wallis test without Dunn's correction for non-normally distributed data.

Additionally, correlations among miRNA expression levels (ΔC_t), soluble extracellular protein concentration, and clinical parameters (quantitative variables) were estimated by Spearman (non-normally distributed data) or Pearson (normally distributed data) correlations; one-way ANOVA and Chi-square test (contingency table) were applied to test the null hypothesis of the independence of groups and some demographic, inflammatory, functional, and clinical (quantitative and qualitative) variables. Finally, the expression profile (ΔC_t) of each differentially expressed miRNA was used to create receiver operator characteristic (ROC) curves to evaluate miRNA performance as biomarkers; an area under the curve (AUC) of 0.7 indicated an acceptable biomarker.

5. Conclusions

In summary, this is the first study to describe differences in the expression of the previously validated serum miRNAs, hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, in lung tissue samples. Findings from this study support their potential use as biomarkers to distinguish between obese and non-obese non-eosinophilic asthma patients, and in non-obese asthma patients, and to catalogue eosinophilic and non-eosinophilic patients. Finally, the findings can be used to discriminate non-eosinophilic asthma patients without obesity and eosinophilic asthma patients with obesity.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241411620/s1>.

Author Contributions: V.d.P. conceived the manuscript and designed the study. M.G.-M., C.L.-S., J.M.R.-M. and S.N. performed experiments and data analysis. M.G.-M. drafted and revised the manuscript. Z.G.-d.C. assisted with the experiments. J.S., M.V.-M., S.Q., M.L.C. and J.M.O. recruited patients and obtained samples and clinical data. All authors contributed to the article and approved the submitted version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by ISCIII—Instituto de Salud Carlos III, FIS (Fondo de Investigación Sanitaria—Spanish Health Research Fund) grants PI21/00896 and FI19/00067; Ciber de Enfermedades Respiratorias (CIBERES); Comunidad de Madrid grant PEJ-2021-AI_BMD-22320; and FEDER funds (Fondo Europeo de Desarrollo Regional).

Institutional Review Board Statement: The study protocol was approved by the ethics committees of each hospital, and the study was conducted in accordance with the principles set forth in the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Signed informed consent was obtained from all patients. The study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the participating hospitals' ethics committees.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, V.d.P., upon reasonable request.

Acknowledgments: We want to particularly acknowledge the patients and the CIBERES Pulmonary Biobank Consortium (PT13/0010/0030), on behalf of Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital del Mar-IMIM, Hospital Universitario de Getafe, Consorcio Universitario Hospital General de Valencia, Fundación Jiménez-Díaz, Hospital Clínic de Barcelona, Hospital Universitario de Bellvitge, Hospital Universitario Joan XXIII, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Hospital Vall d'Hebron, and Hospital Universitario Son Espases, integrated in the Spanish National Biobanks Network, for their collaboration. The authors also acknowledge Oliver Shaw for editorial support.

Conflicts of Interest: J.S.: having served as a consultant to Thermo Fisher, MEDA, Novartis, Sanofi, Leti, Faes Farma, Mundipharma, and GSK; having been paid lecture fees by Novartis, GSK, Stallergenes, Leti, and Faes Farma; having received grant support for research from Thermo Fisher, Sanofi, and ALK. S.Q.: personal fees outside of the submitted manuscript received from AstraZeneca, Novartis, Sanofi, Boehringer Ingelheim, Teva, ALK, Mundipharma, GSK, Chiesi, and Leti. J.M.O.: grants from Sanofi during performance of the study; personal fees outside of the submitted work from AstraZeneca and Mundipharma. V.d.P.: honoraria (advisory board, speaker) and/or institutional grant/research support from AstraZeneca and GSK. The remaining authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Varricchi, G.; Ferri, S.; Pepys, J.; Poto, R.; Spadaro, G.; Nappi, E.; Paoletti, G.; Virchow, J.C.; Heffler, E.; Canonica, W.G. Biologics and airway remodeling in severe asthma. *Allergy* **2022**, *77*, 3538–3552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kuruvilla, M.E.; Lee, E.-H.; Lee, G.B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *56*, 219–233. [[CrossRef](#)]
3. Chung, K.F.; Dixey, P.; Abubakar-Waziri, H.; Bhavsar, P.; Patel, P.H.; Guo, S.; Ji, Y. Characteristics, phenotypes, mechanisms and management of severe asthma. *Chin. Med. J.* **2022**, *135*, 1141–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Porsbjerg, C.; Menzies-Gow, A. Co-morbidities in severe asthma: Clinical impact and management. *Respirology* **2017**, *22*, 651–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fasola, S.; Ferrante, G.; Cilluffo, G.; Malizia, V.; Alfano, P.; Montalbano, L.; Cuttitta, G.; La Grutta, S. Asthma Comorbidities: Frequency, Risk Factors, and Associated Burden in Children and Adolescents. *Children* **2022**, *9*, 1001. [[CrossRef](#)]
6. Peters, U.; Dixon, A.; Forno, E. Obesity and Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 1169–1179. [[CrossRef](#)]
7. Roshan Lal, T.; Cechinel, L.R.; Freishtat, R.; Rastogi, D. Metabolic Contributions to Pathobiology of Asthma. *Metabolites* **2023**, *13*, 212. [[CrossRef](#)]
8. Kaplan, A.G.; Kim, J.W. Asthma Exacerbations and Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists: A Review of the Current Evidence. *Pulm. Ther.* **2022**, *8*, 343–358. [[CrossRef](#)]
9. Bantulà, M.; Roca-Ferrer, J.; Arismendi, E.; Picado, C. Asthma and Obesity: Two Diseases on the Rise and Bridged by Inflammation. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 169. [[CrossRef](#)]
10. Wang, Y.; Hu, C. Leptin and Asthma: What Are the Interactive Correlations? *Biomolecules* **2022**, *12*, 1780. [[CrossRef](#)]
11. Gil-Martínez, M.; Rodrigo-Muñoz, J.M.; Sastre, B.; Cañas, J.A.; García-Latorre, R.; Redondo, N.; de la Fuente, L.; Mínguez, P.; Mahillo-Fernández, I.; Sastre, J.; et al. Serum microRNAs Catalog Asthma Patients by Phenotype. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2022**, *32*, 471–478. [[CrossRef](#)]
12. Condrat, C.E.; Thompson, D.C.; Barbu, M.G.; Bugnar, O.L.; Boboc, A.; Cretoiu, D.; Suci, N.; Cretoiu, S.M.; Voinea, S.C. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* **2020**, *9*, 276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2018**, *9*, 402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gil-Martínez, M.; Lorente-Sorolla, C.; Rodrigo-Muñoz, J.M.; Lendínez, M.Á.; Núñez-Moreno, G.; de la Fuente, L.; Mínguez, P.; Mahillo-Fernández, I.; Sastre, J.; Valverde-Monge, M.; et al. Analysis of Differentially Expressed MicroRNAs in Serum and Lung Tissues from Individuals with Severe Asthma Treated with Oral Glucocorticoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Scichilone, N.; Barnes, P.J.; Battaglia, S.; Benfante, A.; Brown, R.; Canonica, G.W.; Caramori, G.; Cazzola, M.; Centanni, S.; Cianferoni, A.; et al. The Hidden Burden of Severe Asthma: From Patient Perspective to New Opportunities for Clinicians. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Svenningsen, S.; Nair, P. Asthma Endotypes and an Overview of Targeted Therapy for Asthma. *Front. Med.* **2017**, *4*, 158. [[CrossRef](#)]
17. Carr, T.F.; Kraft, M. Use of biomarkers to identify phenotypes and endotypes of severe asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2018**, *121*, 414–420. [[CrossRef](#)]
18. Porpodis, K.; Tsiouprou, I.; Apostolopoulos, A.; Ntontsi, P.; Fouka, E.; Papakosta, D.; Vliagoftis, H.; Domvri, K. Eosinophilic Asthma, Phenotypes-Endotypes and Current Biomarkers of Choice. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 1093. [[CrossRef](#)]
19. Badar, A.; Salem, A.M.; Bamasa, A.O.; Qutub, H.O.; Gupta, R.K.; Siddiqui, I.A. Association between FeNO, Total Blood IgE, Peripheral Blood Eosinophil and Inflammatory Cytokines in Partly Controlled Asthma. *J. Asthma Allergy* **2020**, *13*, 533–543. [[CrossRef](#)]
20. Gao, J.; Wu, F. Association between fractional exhaled nitric oxide, sputum induction and peripheral blood eosinophil in uncontrolled asthma. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 21. [[CrossRef](#)]
21. Al Ghobain, M.O.; Alsubaie, A.S.; Aljumah, W.A.; Alrumayh, F.M.; Aldawsari, K.F.; Alqahtani, A.M.; Alotaibi, S.N. The Correlation between Fractional Exhaled Nitric Oxide (FeNO), Blood Eosinophil Count, Immunoglobulin E Levels, and Spirometric Values in Patients with Asthma. *Cureus* **2023**, *15*, e35289. [[CrossRef](#)]
22. McDowell, P.J.; Heaney, L.G. Different endotypes and phenotypes drive the heterogeneity in severe asthma. *Allergy* **2020**, *75*, 302–310. [[CrossRef](#)]
23. Kaplan, A.; Szeffler, S.J.; Halpin, D.M.G. Impact of comorbid conditions on asthmatic adults and children. *NPJ Prim. Care Respir. Med.* **2020**, *30*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Maule, M.; Olivieri, B.; Guarnieri, G.; De Franceschi, L.; Martinelli, N.; Vaia, R.; Argentino, G.; Vianello, A.; Senna, G.; Caminati, M. Hidden Comorbidities in Asthma: A Perspective for a Personalized Approach. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 2294. [[CrossRef](#)]
25. Yawn, B.P.; Han, M.L.K. Practical Considerations for the Diagnosis and Management of Asthma in Older Adults. *Mayo Clin. Proc.* **2017**, *92*, 1697–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ban, G.Y.; Trinh, T.H.K.; Ye, Y.M.; Park, H.S. Predictors of asthma control in elderly patients. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *16*, 237–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tashiro, H.; Shore, S.A. Obesity and severe asthma. *Allergol. Int.* **2019**, *68*, 135–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Oudjedi, A.; Said Aissa, K. Associations between obesity, asthma and physical activity in children and adolescents. *Apunts Sports Med.* **2020**, *55*, 39–48. [[CrossRef](#)]
29. Lin, X.; Li, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 706978. [[CrossRef](#)]
30. Juel, C.T.B.; Ulrik, C.S. Obesity and asthma: Impact on severity, asthma control, and response to therapy. *Respir. Care* **2013**, *58*, 867–873. [[CrossRef](#)]

31. Gonzalez-Barcala, F.-J.; Nieto-Fontarigo, J.-J.; Lourido-Cebreiro, T.; Rodríguez-García, C.; San-Jose, M.-E.; Carreira, J.-M.; Calvo-Alvarez, U.; Cruz, M.-J.; Facal, D.; Garcia-Sanz, M.-T.; et al. Obesity Does Not Increase the Risk of Asthma Readmissions. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 221. [[CrossRef](#)]
32. Bermúdez Barón, N.; Kankaanranta, H.; Hedman, L.; Andersson, M.; Stridsman, C.; Lindberg, A.; Rönmark, E.; Backman, H. Body mass index increase: A risk factor for forced expiratory volume in 1 s decline for overweight and obese adults with asthma. *ERJ Open Res.* **2022**, *8*, 00110–02022. [[CrossRef](#)]
33. Heaney, L.G.; Perez de Llano, L.; Al-Ahmad, M.; Backer, V.; Busby, J.; Canonica, G.W.; Christoff, G.C.; Cosio, B.G.; FitzGerald, J.M.; Heffler, E.; et al. Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma: An Expert Consensus Framework to Characterize Phenotypes in a Global Real-Life Severe Asthma Cohort. *Chest* **2021**, *160*, 814–830. [[CrossRef](#)]
34. Kyyaly, M.A.; Vorobeva, E.V.; Kothalawala, D.M.; Fong, W.C.G.; He, P.; Sones, C.L.; Al-Zahrani, M.; Sanchez-Elsner, T.; Arshad, S.H.; Kurukulaarachy, R.J. MicroRNAs—A Promising Tool for Asthma Diagnosis and Severity Assessment: A Systematic Review. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Taghadosi, M.; Adib, M.; Jamshidi, A.; Mahmoudi, M.; Farhadi, E. The p53 status in rheumatoid arthritis with focus on fibroblast-like synoviocytes. *Immunol. Res.* **2021**, *69*, 225–238. [[CrossRef](#)]
36. Joseph, C.; Tatler, A.L. Pathobiology of Airway Remodeling in Asthma: The Emerging Role of Integrins. *J. Asthma Allergy* **2022**, *15*, 595–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Veraldi, K.L.; Gibson, B.T.; Yasuoka, H.; Myerburg, M.M.; Kelly, E.A.; Balzar, S.; Jarjour, N.N.; Pilewski, J.M.; Wenzel, S.E.; Feghali-Bostwick, C.A. Role of insulin-like growth factor binding protein-3 in allergic airway remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2009**, *180*, 611–617. [[CrossRef](#)]
38. Asgharianjani, N.; Vafa, M. The role of IGF-1 in obesity, cardiovascular disease, and cancer. *Med. J. Islam Repub. Iran* **2019**, *33*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bach, L.A. IGF-binding proteins. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**, *61*, T11–T28. [[CrossRef](#)]
40. Zhang, W.B.; Aleksic, S.; Gao, T.; Weiss, E.F.; Demetriou, E.; Vergheze, J.; Holtzer, R.; Barzilai, N.; Milman, S. Insulin-like Growth Factor-1 and IGF Binding Proteins Predict All-Cause Mortality and Morbidity in Older Adults. *Cells* **2020**, *9*, 1368. [[CrossRef](#)]
41. Kim, H.; Fu, Y.; Hong, H.J.; Lee, S.G.; Lee, D.S.; Kim, H.M. Structural basis for assembly and disassembly of the IGF/IGFBP/ALS ternary complex. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 4434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Singh, S.; Prakash, Y.S.; Linneberg, A.; Agrawal, A. Insulin and the lung: Connecting asthma and metabolic syndrome. *J. Allergy (Cairo)* **2013**, *2013*, 627384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Carr, T.F.; Granell, R.; Stern, D.A.; Guerra, S.; Wright, A.; Halonen, M.; Henderson, J.; Martinez, F.D. High Insulin in Early Childhood Is Associated with Subsequent Asthma Risk Independent of Body Mass Index. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2022**, *10*, 785–792.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Peters, M.C.; Schiebler, M.L.; Cardet, J.C.; Johansson, M.W.; Sorkness, R.; DeBoer, M.D.; Bleecker, E.R.; Meyers, D.A.; Castro, M.; Sumino, K.; et al. The Impact of Insulin Resistance on Loss of Lung Function and Response to Treatment in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2022**, *206*, 1096–1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Nagao, H.; Cai, W.; Wewer Albrechtsen, N.J.; Steger, M.; Batista, T.M.; Pan, H.; Dreyfuss, J.M.; Mann, M.; Kahn, C.R. Distinct signaling by insulin and IGF-1 receptors and their extra- and intracellular domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2019474118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mohanraj, L.; Kim, H.S.; Li, W.; Cai, Q.; Kim, K.E.; Shin, H.-J.; Lee, Y.-J.; Lee, W.J.; Kim, J.H.; Oh, Y. IGFBP-3 inhibits cytokine-induced insulin resistance and early manifestations of atherosclerosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55084. [[CrossRef](#)]
47. Pescador, N.; Pérez-Barba, M.; Ibarra, J.M.; Corbatón, A.; Martínez-Larrad, M.T.; Serrano-Ríos, M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type two diabetes and obesity biomarkers. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77251. [[CrossRef](#)]
48. Wang, Z.; Li, W.; Guo, Q.; Wang, Y.; Ma, L.; Zhang, X. Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling in Lung Development and Inflammatory Lung Diseases. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 6057589. [[CrossRef](#)]
49. Global Initiative for Asthma—GINA. Available online: <https://ginasthma.org/> (accessed on 10 May 2023).
50. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
51. Vlachos, I.S.; Zagganas, K.; Paraskevopoulou, M.D.; Georgakilas, G.; Karagkouni, D.; Vergoulis, T.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A.G. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W460–W466. [[CrossRef](#)]
52. Zehavi, L.; Avraham, R.; Barzilai, A.; Bar-Ilan, D.; Navon, R.; Sidi, Y.; Avni, D.; Leibowitz-Amit, R. Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: Biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1a. Demographic, inflammatory, and clinical characteristics of the study subjects, asthmatic and control individuals (population 1; lung biopsy samples analysis).

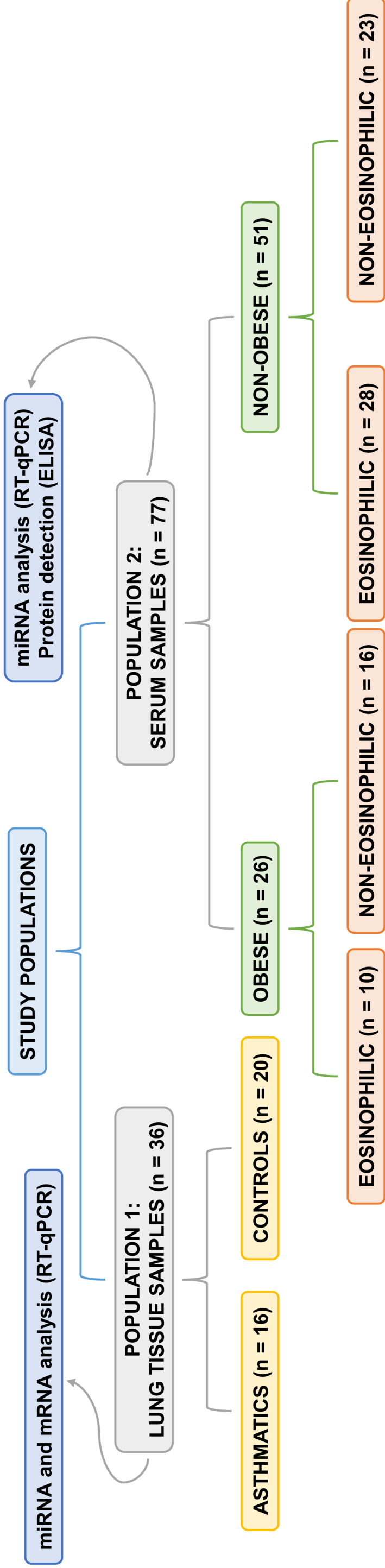
	Asthmatics (n=16)	Controls (n=20)	P-value
Age (years)[^]	52.4 (± 17.7)	63.7 (± 8.5)	*
Female (%)	6 (37.5%)	8 (40%)	N.S.
Smoking habit (%)			
Smokers	4/15 (26.7%)	4 (20%)	N.S.
Ex-smokers	7/15 (46.7%)	4 (20%)	N.S.
Non-smokers	4/15 (26.7%)	12 (40%)	N.S.
Neutrophils (%)[^]	71.4 % (± 16.2)	80.6 % (± 6.1)	N.S.
Lymphocytes (%)[^]	18.2 % (± 12.7)	10.7 % (± 3.9)	N.S.
Monocytes (%)[^]	8.4 % (± 2.9)	7.7 % (± 2.6)	N.S.
Eosinophils (%)[^]	1.6 % (± 1.9)	0.8 % (± 0.8)	N.S.
Basophils (%)[†]	0.3 % (0.1-0.5)	0.2 % (0.1-0.4)	N.S.
Atopy (%)	3 (18.8%)	0/18 (0%)	N.S.

Results are expressed as [^]Mean (± SD) or [†]median (IQR); N.S., Non-significant; *, $p < 0.05$.

Table S1b. Demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of obese and non-obese asthmatic patients (population 2; serum samples analysis).

	Obese (n=26)	Non-obese (n=51)	P-value
Age (years)[^]	52.5 (±10.7)	46.7 (±15.5)	N.S.
Female (%)	19 (73.1%)	35 (68.6%)	N.S.
BMI[†]	33 (31.6-36.4)	23.8 (22.2-26.5)	****
Obesity (%)	26 (100%)	0 (0%)	****
Tobacco habit (%)			
Smokers	0/25 (0%)	3/47 (6.4%)	N.S.
Passive	2/25 (8%)	4/47 (8.5%)	N.S.
Ex-smokers	10/25 (40%)	15/47 (31.9%)	N.S.
Non-smokers	13/25 (52%)	25/47 (53.2%)	N.S.
Blood eosinophils (cells/μL)[†]	200 (115-525)	500 (100-700)	N.S.
Sputum eosinophils (%)[†]	4% (0-12)	2% (0-11.8)	N.S.
Atopy (%)	20 (76.9%)	33 (64.7%)	N.S.
IgE (IU)[†]	180.5 (65.3-460.8)	178 (62.9-401.5)	N.S.
FEV₁/FVC (%)[^]	86.5% (±14.6)	78.8% (±13.5)	*
FeNO (ppb)[†]	24 (14.5-36.5)	33.5 (15.8-68)	N.S.
Exacerbations (%)	13 (50%)	26 (51%)	N.S.
Severity (%)			
Severe	8/25 (32%)	25/44 (56.8%)	*
Moderate	11/25 (44%)	9/44 (20.5%)	*
Mild	6/25 (24%)	9/44 (20.5%)	N.S.
Intermittent	0/25 (0%)	1/44 (2.3%)	N.S.
ACT[†]	21 (16.5-22)	21 (17-24)	N.S.
ICS and LABA (%)	25 (96.2%)	44 (86.3%)	N.S.
Late asthma onset	17/24 (70.8%)	34/43 (79.1%)	N.S.

Results are expressed as [^]mean (±SD) or [†]median (IQR); N.S., Non-significant; ****, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$; BMI, Body Mass Index; FEV₁, Forced Expiratory Volume measured during the first second; FVC, Forced Vital Capacity; FeNO, Fractional exhaled Nitric Oxide; Ppb, parts per billion; ICS and LABA, Inhaled Corticosteroids and Long-Acting β 2-Agonists; ACT, Asthma Control Test.



Objetivo parcial 3. Caracterizar el contenido proteico de los exosomas aislados de suero y de sobrenadante de esputo de individuos con asma eosinofílica y no eosinofílica, con el objetivo de reconocer la existencia de patrones diferenciales.

6.3. Resultados derivados de la realización del objetivo parcial 3

6.3.1. Características de los pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica

Se examinó el contenido proteico de los exosomas obtenidos de suero y de sobrenadante de esputo de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. Las características demográficas y clínicas de estos pacientes se presentan en las tablas 15A y 15B.

Tabla 15A. Características demográficas y clínicas de los pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, cuyas muestras de suero se utilizaron para analizar el contenido proteico de los exosomas.

CARACTERÍSTICAS		ASMA EOSINOFÍLICA (n = 8)	ASMA NO EOSINOFÍLICA (n = 8)	P-VALORES
Edad (años) [^]		49,5 (± 9,8)	49,5 (± 12,6)	NS
Sexo (%)	Hombre	4 (50%)	2 (25%)	NS
	Mujer	4 (50%)	6 (75%)	
IMC (Kg/m ²) [^]		25,9 (± 6,4)	25,9 (± 4,5)	NS
Obesidad (%)		1/7 (14,3%)	2 (25%)	NS
Hábito tabáquico (%)	Fumador activo	1 (12,5%)	0/7 (0%)	NS
	Fumador pasivo	0 (0%)	0/7 (0%)	-
	Exfumador	2 (25%)	4/7 (57,1%)	NS
	No fumador	5 (62,5%)	3/7 (42,9%)	NS
Eosinófilos en sangre periférica (células/mm³)[†]		550 (500-800)	100 (100-100)	***
Eosinófilos en esputo inducido (%) [^]		1,5% (± 3,7)	1,2% (± 1,4)	NS
Atopia (%)		4 (50%)	5 (62,5%)	NS
IgE (KU/L) [†]		328 (17,9-736)	179 (69,3-670)	NS
FEV ₁ /FVC (%) [^]		80,6% (± 16,7)	82,4% (± 10,2)	NS
FeNO (ppb) [†]		38 (30-41)	11,5 (8,8-33,5)	NS
Exacerbaciones en el año anterior (%)		5 (62,5%)	5 (62,5%)	NS
Exacerbaciones en el año anterior (número) [†]		1 (0-3,8)	2 (0-3)	NS
Gravedad (%)	Asma grave	4 (50%)	3 (37,5%)	NS
	Asma moderada	4 (50%)	2 (25%)	NS
	Asma leve	0 (0%)	2 (25%)	NS
	Asma intermitente	0 (0%)	1 (12,5%)	NS
ACT [†]		20,5 (8,8-22)	20 (14-23)	NS
Tratamiento con GCI y LABAs (%)		7 (87,5%)	7 (87,5%)	NS
Tratamiento con GCOs (%)		1 (12,5%)	1 (12,5%)	NS
Inicio del asma (%)	Temprano	0/7 (0%)	3 (37,5%)	NS
	Tardío	7/7 (100%)	5 (62,5%)	

Los resultados se muestran como: [^] \bar{X} (± DE) o [†]Mediana (IQR). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita. *, Imposible de hacer (presencia de 0); ***, p < 0,0001.

Tabla 15B. Características demográficas y clínicas de los pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, cuyas muestras de sobrenadante de esputo se utilizaron para analizar el contenido proteico de los exosomas.

CARACTERÍSTICAS		ASMA EOSINOFÍLICA (n = 7)	ASMA NO EOSINOFÍLICA (n = 7)	P-VALORES
Edad (años) [^]		46,3 (± 15,5)	34,1 (± 8,9)	NS
Sexo (%)	Hombre	4 (57,1%)	2 (28,6%)	NS
	Mujer	3 (42,9%)	5 (71,4%)	
IMC (Kg/m ²) [^]		26,9 (± 6,6)	23,8 (± 4)	NS
Obesidad (%)		1/6 (16,7%)	0 (0%)	NS
Hábito tabáquico (%)	Fumador activo	1 (14,3%)	1/6 (16,7%)	NS
	Fumador pasivo	1 (14,3%)	0/6 (0%)	NS
	Exfumador	0 (0%)	1/6 (16,7%)	NS
	No fumador	5 (71,4%)	4/6 (66,7%)	NS
Eosinófilos en sangre periférica (células/mm³)[†]		600 (500-700)	100 (100-100)	***
Eosinófilos en esputo inducido (%) [^]		5,4% (± 8,1)	1,9% (± 1,3)	NS
Atopia (%)		4 (57,1%)	6 (85,7%)	NS
IgE (KU/L) [†]		285 (171-588)	104,2 (49,2-397,8)	NS
FEV ₁ /FVC (%) [†]		81,1% (79,3-83,6)	80,3% (75,5-84,8)	NS
FeNO (ppb)[†]		50 (29-83)	8 (8-16)	*
Exacerbaciones en el año anterior (%)		5 (71,4%)	3 (42,9%)	NS
Exacerbaciones en el año anterior (número) [†]		2 (0-6)	0 (0-3)	NS
Gravedad (%)	Asma grave	4/6 (66,7%)	1/5 (20%)	NS
	Asma moderada	1/6 (16,7%)	1/5 (20%)	NS
	Asma leve	0/6 (0%)	2/5 (40%)	NS
	Asma intermitente	1/6 (16,7%)	1/5 (20%)	NS
ACT [†]		15,5 (7,8-23,3)	23 (14-24)	NS
Tratamiento con GCIs y LABAs (%)		6 (85,7%)	4 (57,1%)	NS
Tratamiento con GCOs (%)		3 (42,9%)	1 (14,3%)	NS
Inicio del asma (%)	Temprano	1/5 (20%)	1/5 (20%)	NS
	Tardío	4/5 (80%)	4/5 (80%)	

Los resultados se muestran como: \bar{X} (± DE) o †Mediana (IQR). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita. *, Imposible de hacer (presencia de 0); ***, p < 0,0001.

En cuanto a los parámetros poblacionales (tablas 15A y 15B), no se observaron diferencias estadísticamente significativas (NS; p > 0,05) en ninguna de las características demográficas entre los dos grupos de pacientes.

Con relación a los parámetros clínicos (tablas 15A y 15B), se evidenció una diferencia estadísticamente significativa (p < 0,001) entre los dos grupos de pacientes asmáticos en el número de eosinófilos/mm³ en sangre periférica, al clasificar a los pacientes en eosinofílicos (> 500 eosinófilos/mm³) y no eosinofílicos (≤ 100 eosinófilos/mm³). Además, se encontró una diferencia estadísticamente significativa (p < 0,05) en el FeNO (ppb) entre los pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, de los cuales se emplearon muestras de sobrenadante de esputo (tabla 15B).

En las demás variables clínicas, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas (NS; p > 0,05) entre los grupos de pacientes asmáticos. No obstante, es importante destacar que, en ambos

casos (tablas 15A y 15B), tres marcadores distintivos del asma eosinofílica: el número de eosinófilos/mm³ en sangre periférica, los niveles de IgE sérica (KU/L) totales y el valor de FeNO, mostraron cifras más altas en los pacientes con asma eosinofílica.

6.3.2. Determinación del perfil proteómico de los exosomas

6.3.2.1. Identificación de las proteínas características de los exosomas mediante *Western blot*

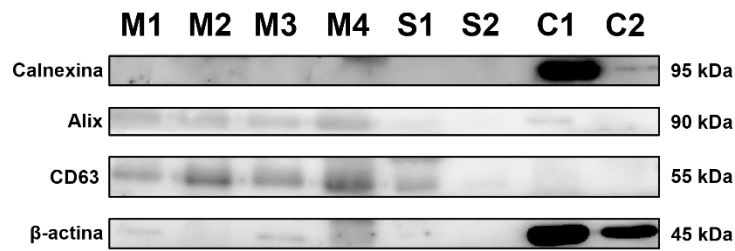
Se usaron 2 muestras de lisados de exosomas purificados de suero y de sobrenadante de esputo para cada uno de los dos fenotipos: pacientes con asma eosinofílica (M1 y M2) y no eosinofílica (M3 y M4). Además, se incluyeron 2 muestras de lisados de exosomas de eosinófilos de sujetos sanos (S1 y S2) como controles para asegurar la capacidad de detección de los exosomas, y 1 muestra de proteínas extraídas de células SAEC y BSMC (C1 y C2), respectivamente, como controles para validar la especificidad del ensayo y confirmar la pureza de las muestras de exosomas²⁰⁰⁻²⁰² (figura 18).

Para verificar el correcto aislamiento de los exosomas, se efectuó la detección de las proteínas CD63 y ALIX²⁸⁶, conocidos marcadores de exosomas (http://www.exocarta.org/exosome_markers). También se utilizó un anticuerpo frente a la proteína β -actina, empleada frecuentemente como control de carga (CEN) en *Western blot* debido a su expresión constante en células eucariotas, independientemente de los tratamientos a los que se sometan las células²⁸⁷⁻²⁹⁰. Asimismo, se utilizó un anticuerpo para reconocer la proteína calnexina en los controles C1 y C2, lo que ayudó a descartar la presencia de componentes celulares en las muestras de lisados de exosomas obtenidos de suero, de sobrenadante de esputo y de eosinófilos procedentes de individuos sanos. La calnexina es una proteína de tipo I del grupo de las chaperonas. Se trata de una proteína integral en la membrana del retículo endoplasmático (RE; ubicado en el citoplasma de células eucariotas), vinculada a la secreción celular, y cumple la función de marcador negativo (marcador de exclusión) para la identificación de exosomas²⁹¹⁻²⁹⁵.

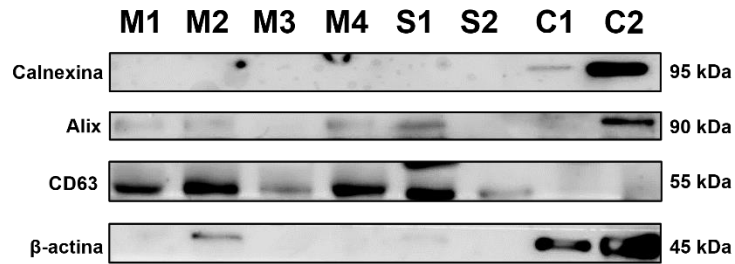
En las imágenes de *Western blot* (figura 18), que muestran los lisados de exosomas purificados de suero (figura 18A) y de sobrenadante de esputo (figura 18B) de pacientes asmáticos, tanto con asma eosinofílica como no eosinofílica (M1-M4), se observaron las bandas correspondientes a las proteínas β -actina (45 kDa), CD63 (55 kDa) y ALIX (95 kDa). Las muestras M1-M4 evidenciaron un patrón de bandas semejante al de los controles S1 y S2, lo que aseguró la presencia de exosomas. La banda perteneciente a la proteína β -actina estuvo presente en todas las muestras, pero su intensidad fue superior en los controles C1 y C2^{190,296,297}. Además, se visualizó la banda relativa a la proteína calnexina (90 kDa) en los controles C1 y C2, inexistente en las demás muestras, indicando la ausencia de constituyentes celulares y, en consecuencia, validando la pureza de los exosomas (M1-M4, S1 y S2).

En resumen, la inmunodetección por *Western blot* de las moléculas CD63 y ALIX, marcadores confiables de exosomas, respalda el exitoso aislamiento de exosomas de suero y de sobrenadante de esputo de pacientes con asma, tanto eosinofílica como no eosinofílica.

A) Exosomas obtenidos de suero y controles



B) Exosomas obtenidos de sobrenadante de esputo y controles



Legenda:

- M1 y M2: Exosomas purificados de pacientes con asma no eosinofílica.
- M3 y M4: Exosomas purificados de pacientes con asma eosinofílica.
- S1 y S2: Exosomas purificados de eosinófilos de individuos sanos (S).
- C1 y C2: Proteínas de células (C) BSMC y SAEC, respectivamente.

Figura 18. Exosomas obtenidos de suero (A) y de sobrenadante de esputo (B) de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. Inmunodetección de los marcadores específicos ALIX y CD63.

6.3.2.2. Descripción del contenido proteico de los exosomas

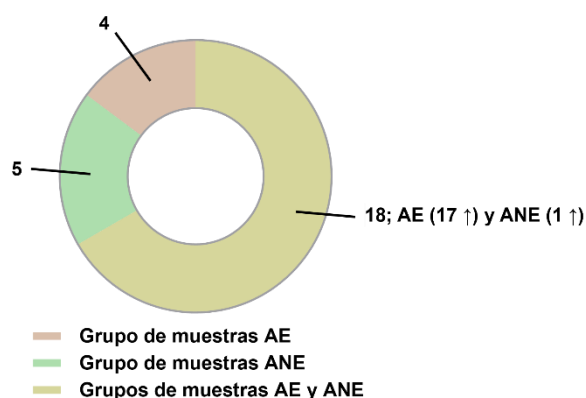
Para desentrañar la composición proteica de los exosomas purificados de suero y de sobrenadante de esputo de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, se llevó a cabo una investigación exhaustiva mediante nano-cromatografía líquida de fase reversa acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución. Este enfoque permitió la identificación y cuantificación relativa (sin marcaje) de las proteínas, arrojando luz sobre las diferencias y similitudes en el perfil proteico de los exosomas en función de la muestra y del grupo de pacientes (según el fenotipo o la condición). Esto proporciona una mejor comprensión de cómo varía el contenido proteico en distintos contextos y las posibles implicaciones biológicas y clínicas derivadas de estas diferencias.

Para la detección y determinación cuantitativa de las proteínas de los exosomas de suero y de sobrenadante de esputo, se emplearon 46,8 µg y 53,5 µg de exosomas por muestra. Se identificaron y cuantificaron un total de 403 proteínas en los exosomas de suero y de 1.934 proteínas en los exosomas de sobrenadante de esputo. Entre ellas, 27 y 316 proteínas, en cada caso, exhibieron diferencias significativas en su abundancia ($p < 0,02$ y $p \leq 0,01$) entre ambas condiciones (figura 19). El 100% de las proteínas mostró, en al menos una muestra de uno de los dos grupos comparados, como mínimo un péptido único con alta confianza (IC > 99%). Las tablas anexas 8 y 9 presentan las 27 proteínas de los exosomas de suero (tabla anexa 8) y las 316 proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo (tabla anexa 9), respectivamente.

De las 27 proteínas de los exosomas de suero, 4 eran únicas de pacientes con asma eosinofílica, 5 eran exclusivas de pacientes con asma no eosinofílica y 18 eran comunes a ambos grupos de pacientes asmáticos. De estas 18 proteínas compartidas, 17 fueron más abundantes en el grupo de pacientes con asma eosinofílica y solo 1 tuvo una abundancia inferior en este grupo (figura 19A). Entre las 27 proteínas, destacan la filagrina (FLG; del inglés, *Filaggrin*) y el CD44 por su relevancia en la inflamación de las vías respiratorias en el asma^{298,299}.

De las 316 proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo, 92 eran únicas de pacientes con asma eosinofílica, 113 eran exclusivas de pacientes con asma no eosinofílica y 111 eran comunes a los dos grupos de pacientes asmáticos. De estas 111 proteínas compartidas, 77 tuvieron una mayor abundancia en el grupo de pacientes con asma eosinofílica y 34 fueron menos abundantes en este grupo (figura 19B). Entre las 316 proteínas, resaltan el proteoglicano de médula ósea o proteoglicano 2 (PRG2; del inglés, *Proteoglycan 2*, también conocida como MBP), la peroxidasa de eosinófilos (EPX; del inglés, *Eosinophil Peroxidase*, también denominada EPO), la ribonucleasa 2 (RNASE2; del inglés, *Ribonuclease 2*, también designada como EDN [neurotoxina derivada de eosinófilos, EDN; en inglés, *Eosinophil-Derived Neurotoxin*]) y el cristal de *Charcot-Leyden* (CLC; del inglés, *Charcot-Leyden Cristal*, también conocida como glectina-10), todas con una abundancia superior en el grupo de pacientes con asma eosinofílica, desempeñando un papel crucial en las funciones de los eosinófilos³⁰⁰, sugiriendo un posible origen de estos exosomas en este tipo celular.

A) Proteínas de los exosomas aislados de suero



B) Proteínas de los exosomas aislados de sobrenadante de esputo

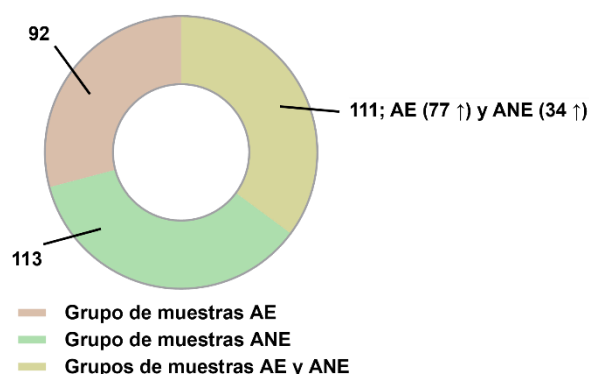


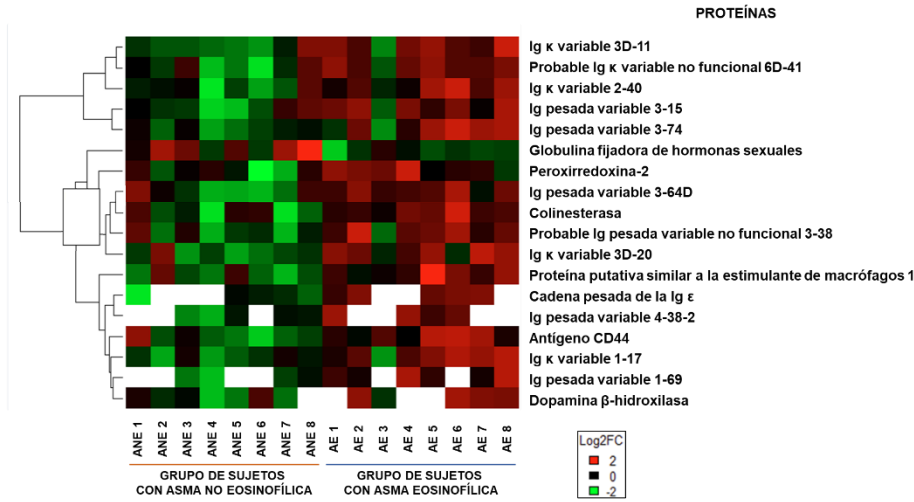
Figura 19. Proteínas con variaciones significativas en su abundancia, identificadas y cuantificadas en los exosomas aislados de suero (A; $p < 0,02$) y de sobrenadante de esputo (B; $p \leq 0,01$). *AE, asma eosinofílica (sujetos con asma eosinofílica); ANE, asma no eosinofílica (individuos con asma no eosinofílica); ↑, mayor abundancia.

En el mapa de calor (en inglés, *heatmap*) de las proteínas de los exosomas de suero (figura 20A), se contemplan los niveles de abundancia de las 18 proteínas compartidas por los dos grupos de pacientes asmáticos analizados. Estas proteínas comprenden segmentos de Ig κ variable e Ig pesada variable, la cadena pesada de la Ig ϵ , la globulina fijadora de hormonas sexuales, la peroxirredoxina-2, la colinesterasa, la proteína putativa similar a la estimulante de macrófagos 1, el antígeno CD44 y la dopamina β -hidroxilasa. Con el color verde se señala una menor abundancia y con el color rojo se denota una abundancia superior de estas proteínas. La intensidad de los colores en el mapa de calor refleja la magnitud de la abundancia de las proteínas, de modo que una intensidad más alta de los colores se atribuye a una abundancia más elevada de las proteínas. Por otra parte, en el mapa de calor de las proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo (figura 20B), se sigue un patrón idéntico, ilustrando

Resultados

solo las proteínas más representativas de las 111 proteínas coincidentes en ambos grupos de pacientes con asma. Estas proteínas incluyen, entre otras, subunidades del proteasoma, la subunidad S1 de la ATPasa protónica tipo V, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la coronina-1A y la catalasa.

A) Proteínas de los exosomas purificados de suero



B) Proteínas de los exosomas purificados de sobrenadante de esputo

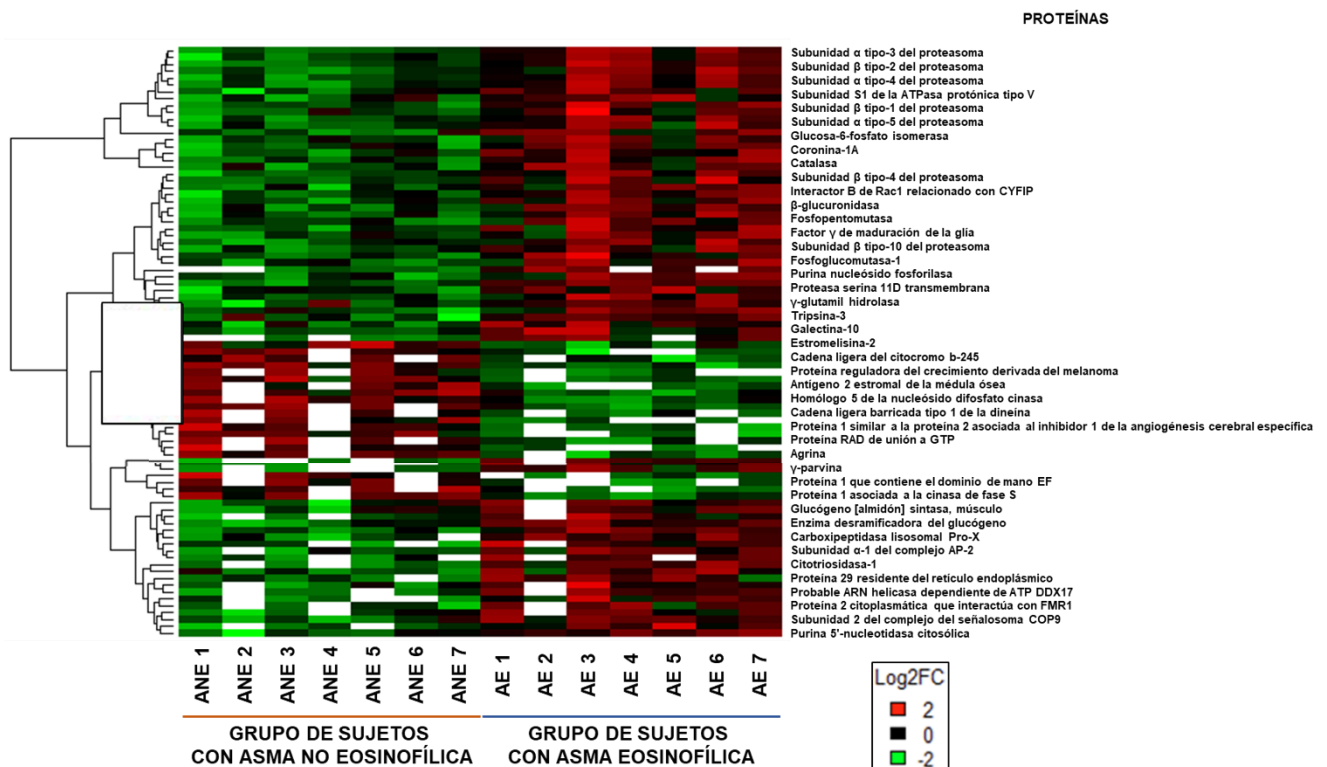


Figura 20. Proteínas de los exosomas purificados de suero (A) y de sobrenadante de esputo (B) comunes a los dos grupos de pacientes asmáticos ($p < 0,02$ y $p \leq 0,01$, en ese orden), pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. El color verde indica una abundancia inferior y el color rojo hace patente una mayor abundancia de las proteínas. La intensidad de los colores revela el nivel de la abundancia de las proteínas. Por lo tanto, una intensidad más fuerte pone de manifiesto una abundancia superior de las proteínas.

Se generó un diagrama de Venn (figura 21) para presentar gráficamente las relaciones entre las proteínas de los exosomas obtenidos de suero y de sobrenadante de esputo. En este gráfico, se pueden observar

las proteínas diferentes o únicas de cada tipo de muestra, 24 proteínas en los exosomas de suero y 313 proteínas en los exosomas de sobrenadante de esputo, y las proteínas en común a los exosomas de ambos tipos de muestras (3 proteínas), situadas en el área donde los dos círculos se superponen. Estas 3 proteínas compartidas por los exosomas de ambos tipos de muestras son: la subunidad β tipo 1 del proteasoma (PSMB1; del inglés, *Proteasome subunit β type 1*), la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG; del inglés, *Sex Hormone Binding Globulin*) y la butirilcolinesterasa, o simplemente colinesterasa (BCHE; del inglés, *Butyrylcholinesterase*).

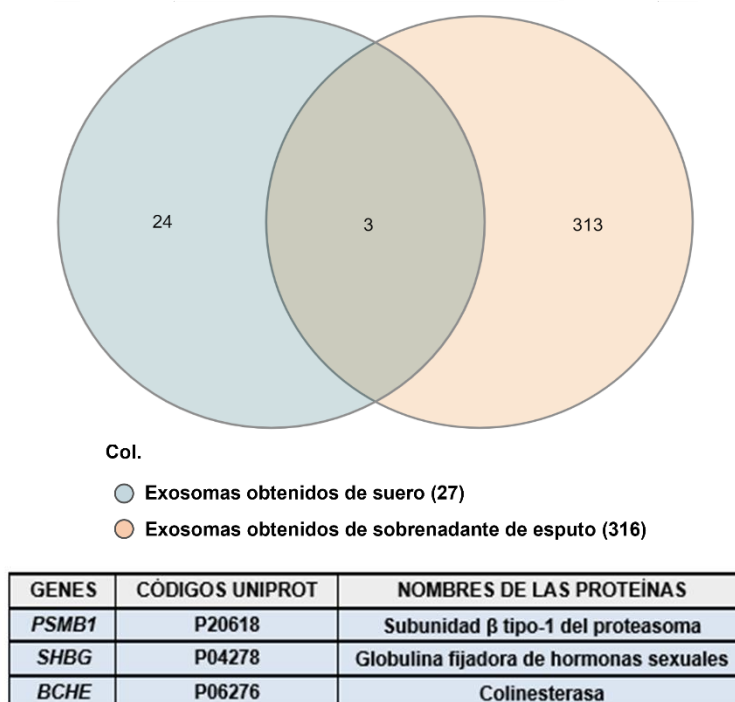


Figura 21. Diagrama de Venn que expone visualmente los vínculos entre las proteínas de los exosomas obtenidos de suero y de sobrenadante de esputo. La tabla incluye los nombres de las proteínas presentes en los exosomas de los dos tipos de muestras, los códigos de las proteínas registrados en la base de datos UniProtKB y los genes que codifican a las proteínas. *Col., color.

Con el PCA de las muestras usadas para el estudio de proteínas de los exosomas de suero, se explicó el 37,0% (dimensiones 1 y 2) de la varianza total encontrada (figura 22A), mientras que con el PCA de las muestras utilizadas para el examen de proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo, se describió el 50,9% (dimensiones 1 y 2) de la varianza total descubierta (figura 22B). En ambos casos, las divergencias conforme a la PC2, del 11,9% (figura 22A) y del 19,9% (figura 22B) en las muestras, de manera respectiva, dividieron claramente a las muestras de los dos grupos de pacientes con asma; las muestras de pacientes con asma no eosinofílica se agruparon en la parte superior y las muestras de pacientes con asma eosinofílica se situaron en la parte inferior.

Resultados

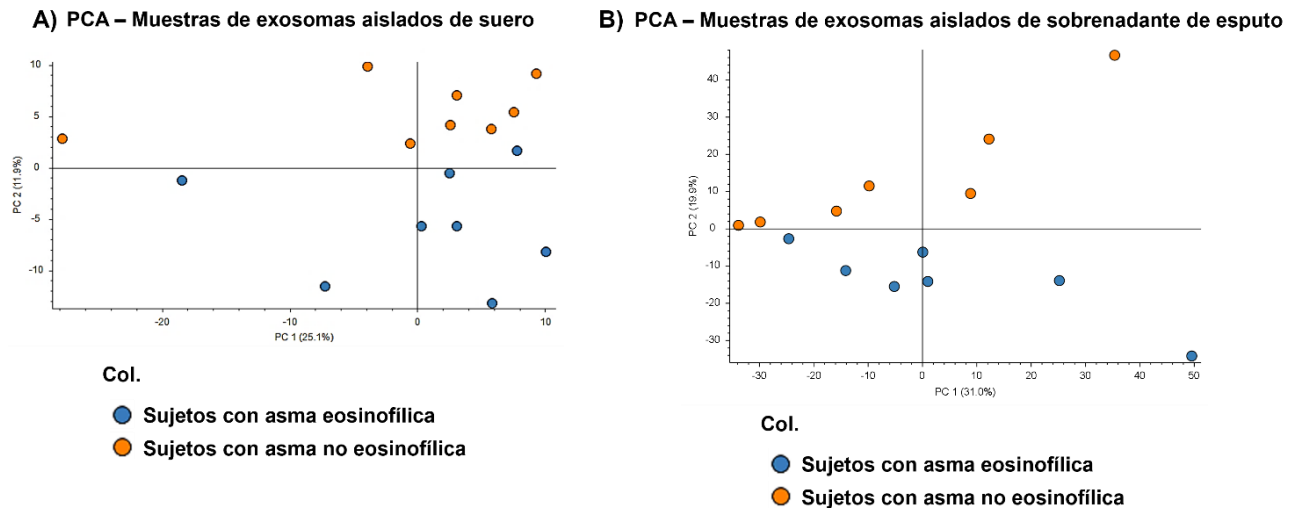
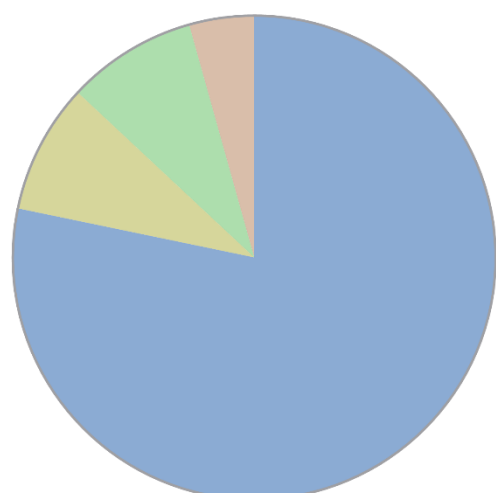


Figura 22. PCA de muestras de exosomas aislados de suero (A) y de sobrenadante de esputo (B) de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. *Col., color.

Por último, se efectuó un análisis *in silico* de los procesos biológicos en los que participan las proteínas. Para ello, se emplearon las bases de datos (consideradas asimismo herramientas bioinformáticas al proporcionar conocimiento sobre genes, proteínas y procesos biológicos) GO, KEGG y Reactome. Los diversos procesos biológicos ($p < 0,05$) en los que están involucradas las proteínas de los exosomas purificados de suero (tabla anexa 10) y de sobrenadante de esputo (tabla anexa 11) se clasificaron en diferentes categorías (figura 23). Esta categorización se fundamentó en la información de la clase para los procesos biológicos ofrecidos por la base de datos KEGG, la localización facilitada por el buscador de vías para los procesos biológicos exhibidos por la base de datos Reactome, o simplemente, en el nombre para los procesos biológicos revelados por la base de datos GO.

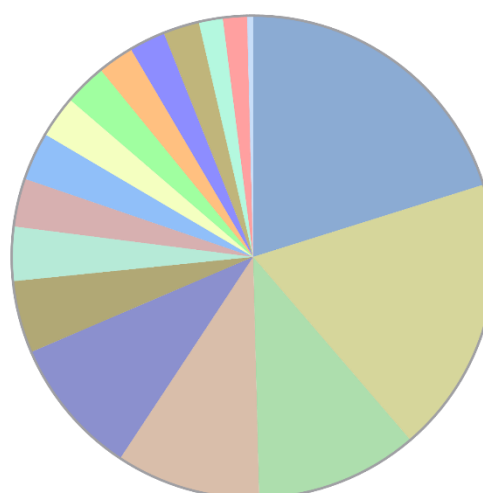
Dado su mayor número, las proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo toman parte en una cantidad superior de procesos biológicos distribuidos en una gama más amplia de categorías que las proteínas de los exosomas de suero (figura 23). Las proteínas de los exosomas de suero intervienen en 23 procesos biológicos que se reparten en 4 categorías (figura 23A), sobresaliendo especialmente la categoría sistema inmune (78,26% [o 18/23] de los procesos biológicos) y teniendo la representación más limitada la categoría hemostasia (4,35% [o 1/23] de los procesos biológicos). En cambio, las proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo participan en 248 procesos biológicos que se disponen en 17 categorías (figura 23B); en este caso, la categoría metabolismo es la más frecuente (20,16% [o 50/248] de los procesos biológicos), mientras que la categoría procesamiento de la información genética se muestra como la menos común (0,40% [o 1/248] de los procesos biológicos).

A) Proteínas de los exosomas purificados de suero



■ Sistema inmune (78,26 %)
 ■ Transporte mediado por vesículas (8,70 %)
 ■ Enfermedad (8,70 %)
 ■ Hemostasia (4,35 %)

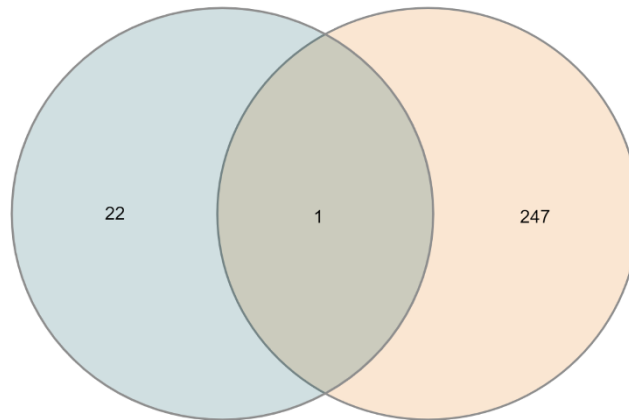
B) Proteínas de los exosomas purificados de sobrenadante de esputo



■ Metabolismo (20,16 %)
 ■ Ciclo celular (18,55 %)
 ■ Transducción de señales (10,89 %)
 ■ Sistema inmune (9,68 %)
 ■ Enfermedad (9,27 %)
 ■ Transporte (4,84 %)
 ■ Respuestas celulares a estímulos (3,63 %)
 ■ Biogénesis y mantenimiento de orgánulos (3,23 %)
 ■ Biología del desarrollo (3,23 %)
 ■ Biología celular (2,82 %)
 ■ Motilidad celular (2,82 %)
 ■ Expresión génica (Transcripción) (2,42 %)
 ■ Enzimas (2,42 %)
 ■ Localización (2,42 %)
 ■ Interacciones moleculares (1,61 %)
 ■ Muerte celular programada (1,61 %)
 ■ Procesamiento de la información genética (0,40 %)

Figura 23. Categorías en las que se organizan los procesos biológicos ($p < 0,05$ en los dos análisis) en los que operan las proteínas de los exosomas purificados de suero (A) y de sobrenadante de esputo (B) de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. Junto a cada categoría, se especifica entre paréntesis el porcentaje de los procesos biológicos que abarca la categoría.

Se elaboró un diagrama de Venn (figura 24) para demostrar de manera ilustrativa las conexiones entre los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas de los exosomas obtenidos de suero y de sobrenadante de esputo. En esta figura se aprecian los procesos biológicos distintos o exclusivos en los que participan las proteínas de los exosomas de cada tipo de muestra, 22 procesos biológicos en los que actúan las proteínas de los exosomas de suero y 247 en los que están involucradas las proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo, y los procesos biológicos comunes en los que toman parte las proteínas de los exosomas de ambos tipos de muestras (1 proceso biológico), ubicado en la región de solapamiento de los dos círculos. El proceso biológico coincidente en el que intervienen las proteínas de los exosomas de ambos tipos de muestras es la señalización del receptor FcεRI, un receptor esencial en el marco de la patología asmática, particularmente en el asma alérgica³⁰¹.



Col.

- Exosomas obtenidos de suero (23)
- Exosomas obtenidos de sobrenadante de esputo (248)

BASE DE DATOS	CATEGORÍA DEL PROCESO BIOLÓGICO	NOMBRE DEL PROCESO BIOLÓGICO
Reactome	Sistema inmune	Señalización del receptor FcεRI

Figura 24. Diagrama de Venn que pone de manifiesto de forma gráfica las relaciones entre los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas de los exosomas obtenidos de suero y de sobrenadante de esputo. La tabla incorpora el nombre del proceso biológico compartido al que contribuyen las proteínas de los exosomas de suero y de sobrenadante de esputo, el nombre de la base de datos que suministró el proceso biológico y la categoría que identifica al proceso biológico. *Col., color.

Como resumen y a la luz de estos resultados, se constatan diferencias en el contenido proteico de los exosomas aislados de muestras de suero y de sobrenadante de esputo, tanto entre los dos fenotipos de pacientes asmáticos estudiados, pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, como entre ambos tipos de muestras de las cuales se purifican estos exosomas. La variabilidad en el perfil proteico observado en las muestras de exosomas sugiere que las proteínas diferenciales existentes en estas VEs podrían jugar un papel como marcadores efectivos para discriminar entre fenotipos o condiciones médicas, como la diferenciación entre el asma eosinofílica y el asma no eosinofílica.

Objetivo parcial 4. Descubrir y confirmar un perfil diferencial de miARNs en suero y en tejido pulmonar de sujetos con asma grave tratados y no tratados con GCOs, con el propósito de detectar y categorizar a los individuos en estos fenotipos. Además, investigar la relación entre los miARNs diferenciales y la expresión de genes en tejido pulmonar de sujetos con y sin diagnóstico de asma.

6.4. Resultados obtenidos al completar el objetivo parcial 4. Publicación 3

6.4.1. Resumen del trabajo, contribución personal de la doctoranda y presentación de la publicación

El análisis mediante miARNs-seq demostró que existen 11 miARNs diferencialmente expresados ($p < 0,05$) en suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, todos sobreexpresados en los pacientes tratados con GCOs. La utilización de un PCA realizado con los valores de expresión de estos miARNs permitió una distinción clara entre los dos grupos. De los 11 miARNs, se validaron 5 (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p) por RT-qPCR ($p < 0,05$), contemplando un aumento en sus niveles de expresión en los pacientes tratados con GCOs. Se estableció una asociación directa entre los valores de ΔCt de hsa-miR-148b-3p y de hsa-miR-221-5p y el porcentaje de FEV₁/FVC ($p < 0,05$). A excepción de hsa-miR-148b-3p, los otros 4 miARNs podrían ser predictores univariantes aceptables ($p < 0,05$) según los análisis de las curvas ROC. El modelo de regresión logística multivariante óptimo para discernir entre el asma grave tratada y no tratada con GCOs incluyó hsa-miR-221-5p y hsa-miR-769-5p (AUC = 0,77; $p < 0,05$). Además, el análisis *in silico* reveló la participación de estos 5 miARNs en vías clave en el asma ($p < 0,05$) y modulan la expresión de genes como *FOXO3* y *PTEN* (dianas de hsa-miR-148b-3p) y *MAPK3* (diana de hsa-miR-221-5p), confirmados en biopsias pulmonares.

En contraste, en biopsias pulmonares, solo se identificaron 3 miARNs (hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p y hsa-miR-451a) con expresión diferencial ($p < 0,05$) entre ambos grupos, sobreexpresados en los pacientes tratados con GCOs, validada mediante RT-qPCR, aunque sin significación estadística. Es preciso destacar que, al comparar estos dos grupos de pacientes, además de la diferencia en el tratamiento con GCOs ($p < 0,0001$ en suero y $p < 0,01$ en biopsias pulmonares), se observaron disparidades en los niveles de IgE (KU/L) en suero y en el porcentaje de monocitos en biopsias pulmonares ($p < 0,05$), siendo más altos en los pacientes tratados con GCOs.

En definitiva, este trabajo evidenció diferencias en la expresión de 8 miARNs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p y hsa-miR-451a) en suero y en biopsias pulmonares, entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, sugiriendo su potencial como biomarcadores distintivos de estos fenotipos del asma.

Como estudiante de doctorado y coautora principal de este artículo original junto a Clara Lorente-Sorolla, contribuí en todas las etapas de la investigación. Participé en la planificación y la ejecución de los experimentos, en el análisis estadístico, en el tratamiento de los datos y en la interpretación de los resultados. Además, colaboré en la elaboración del borrador inicial del manuscrito original y, con los demás autores, en la corrección de este. Esta experiencia como primera autora me permitió fomentar capacidades primordiales en la investigación científica, comprendiendo desde la concepción y la realización de los experimentos hasta el análisis y la comprensión de los resultados.



Article

Analysis of Differentially Expressed MicroRNAs in Serum and Lung Tissues from Individuals with Severe Asthma Treated with Oral Glucocorticoids

Marta Gil-Martínez ^{1,2,†} , Clara Lorente-Sorolla ^{1,†}, José M. Rodrigo-Muñoz ^{1,2} , Miguel Ángel Lendínez ¹, Gonzalo Núñez-Moreno ^{3,4,5} , Lorena de la Fuente ³, Pablo Mínguez ^{3,4,5} , Ignacio Mahillo-Fernández ⁶ , Joaquín Sastre ^{2,7}, Marcela Valverde-Monge ^{2,7}, Santiago Quirce ^{2,8}, María L. Caballero ^{2,8}, Francisco J. González-Barcala ^{2,9}, Ebymar Arismendi ^{2,10} , Irina Bobolea ^{2,10}, Antonio Valero ^{2,10}, Xavier Muñoz ^{2,11}, María Jesús Cruz ^{2,11} , Carlos Martínez-Rivera ^{2,12} , Vicente Plaza ^{2,13} , José M. Olaguibel ^{2,14} and Victoria del Pozo ^{1,2,15,*}

- ¹ Immunoallergy Laboratory, Immunology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD, UAM), Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain
- ² CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain
- ³ Department of Genetics, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD, UAM), 28040 Madrid, Spain
- ⁴ Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain
- ⁵ Bioinformatics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD, UAM), 28040 Madrid, Spain
- ⁶ Biostatistics and Epidemiology Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), 28040 Madrid, Spain
- ⁷ Allergy Department, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, 28040 Madrid, Spain
- ⁸ Department of Allergy, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, 28046 Madrid, Spain
- ⁹ Pulmonology Department, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, 15706 Santiago de Compostela, Spain
- ¹⁰ Allergy Unit & Severe Asthma Unit, Pulmonology and Allergy Department, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain
- ¹¹ Pulmonology Department, Hospital Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain
- ¹² Pulmonology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain
- ¹³ Respiratory Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain
- ¹⁴ Severe Asthma Unit, Department of Allergy, Complejo Hospitalario de Navarra, 31008 Pamplona, Spain
- ¹⁵ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: vpozo@fjd.es
- † These authors have contributed equally to this work.



Citation: Gil-Martínez, M.; Lorente-Sorolla, C.; Rodrigo-Muñoz, J.M.; Lendínez, M.Á.; Núñez-Moreno, G.; de la Fuente, L.; Mínguez, P.; Mahillo-Fernández, I.; Sastre, J.; Valverde-Monge, M.; et al. Analysis of Differentially Expressed MicroRNAs in Serum and Lung Tissues from Individuals with Severe Asthma Treated with Oral Glucocorticoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1611. <https://doi.org/10.3390/ijms24021611>

Academic Editor: Anagha Malur

Received: 19 December 2022

Revised: 4 January 2023

Accepted: 11 January 2023

Published: 13 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nowadays, microRNAs (miRNAs) are increasingly used as biomarkers due to their potential contribution to the diagnosis and targeted treatment of a range of diseases. The aim of the study was to analyze the miRNA expression profiles in serum and lung tissue from patients with severe asthma treated with oral corticosteroids (OCS) and those without OCS treatment. For this purpose, serum and lung tissue miRNAs of OCS and non-OCS asthmatic individuals were evaluated by miRNAs-Seq, and subsequently miRNA validation was performed using RT-qPCR. Additionally, pathway enrichment analysis of deregulated miRNAs was conducted. We observed altered expression by the next-generation sequencing (NGS) of 11 miRNAs in serum, of which five (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, and hsa-miR-769-5p) were validated by RT-qPCR, and three miRNAs in lung tissue (hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p, and hsa-miR-451a). The best multivariate logistic regression model to differentiate individuals with severe asthma, treated and untreated with OCS, was to combine the serum miRNAs hsa-miR-221-5p and hsa-miR-769-5p. Expression of hsa-miR-148b-3p and hsa-miR-221-5p correlated with FEV₁/FVC (%) and these altered miRNAs act in key signaling pathways for asthma disease and the regulated expression of some genes (*FOXO3*, *PTEN*, and *MAPK3*) involved in these pathways. In conclusion, there are miRNA profiles differentially expressed in OCS-treated individuals with asthma and could be used as biomarkers of OCS treatment.

Keywords: biomarker; oral corticosteroids; miRNAs; individuals with severe asthma

1. Introduction

Asthma is a heterogeneous disease of the lower airways that affects approximately 300 million people worldwide [1]. Chronic airway inflammation as well as airway damage and remodeling are hallmark features of the disease and induce bronchial hyper-reactivity and variable expiratory airflow limitation [2]. Individuals with asthma exhibit a broad spectrum of disease severity. Severe asthma, defined as that which requires treatment with high-dose inhaled corticosteroids plus a second controller and/or systemic corticosteroids [3], affects about 5–10% of the asthmatic population, and is associated with increased mortality and morbidity, diminished quality of life, and greater health expenditure [4].

The pathophysiology of asthma is highly complex, comprising distinct phenotypes and endotypes [5]. In addition, a broad range of triggers including environmental risk factors, genetic polymorphisms, and epigenetic changes contribute to the onset of asthma, variations in phenotypes, and response to steroid treatment [6]. Severe asthma comprises two predominant inflammatory endotypes: Type 2 (T2)-high and T2-low disease [7]. T2-high asthma is more severe and difficult to treat, and many patients with this endotype require high-dose treatments and/or biological therapy for better control of the symptoms and exacerbations, and to avoid adverse reactions caused by the administration of oral corticosteroids (OCS) [8,9].

To help guide the selection of treatment in patients with severe asthma, currently available biomarkers such as peripheral blood and induced sputum eosinophil count, fraction of exhaled nitric oxide (FeNO) level, and immunoglobulin-E (IgE) levels have been used [10]. However, interest in using microRNA (miRNA) profiles as biomarkers for diseases is currently on the rise [11]. These small, single-stranded, non-coding RNA molecules [12] participate in the regulation of gene expression by inhibiting protein translation [13] and are useful as biomarkers as they are stable and disease-related particles [14]. Previous studies have demonstrated that miRNAs hold great potential as asthma mediators and biomarkers and can further be of use in asthma endotyping and phenotyping, thereby making it possible to offer personalized therapies for patients [15,16]. Among them, Mirra et al. recently identified a new expression profile of circulating miRNAs including a member of the miR-181 family, related to lung inflammation, which could be used as a clinical marker of bronchial asthma and response to pharmacological treatment [17].

The aim of this study was to search for a profile of differentially expressed miRNAs between individuals with severe asthma receiving OCS treatment versus those without OCS therapy using next-generation sequencing (NGS). The miRNAs found could serve as lung-tissue or systemic biomarkers of oral corticosteroid treatment and facilitate the selection of the most appropriate management approach.

2. Results

2.1. Characteristics of the Study Population

Descriptive data reflecting the demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of all individuals studied are summarized in Tables 1 and 2. The subjects were distributed into two different analyses: 20 OCS-treated versus (vs.) 26 non-OCS-treated severe asthmatics (serum samples analysis) and six OCS-treated vs. seven non-OCS-treated asthmatic subjects (lung biopsy samples analysis).

As shown in Table 1, regarding inflammatory parameters, the OCS-treated and non-OCS-treated severe asthmatics from which serum samples were used had significant differences in IgE levels (366.0 and 96.8 IU, $p < 0.05$). Additionally, as expected, we observed significant differences in treatment with systemic corticosteroids ($p < 0.0001$). Other characteristics (i.e., demographic, inflammatory, functional, clinical) did not present statistically significant differences.

Moreover, comparing the treated and non-treated with OCS groups in the analysis of lung biopsy samples (Table 2), the only significant differences were detected in the percentage of monocytes (10.0% vs. 5.9%, $p < 0.05$) and, as planned, in the oral corticosteroid treatment ($p < 0.01$).

Table 1. Demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of the study subjects (serum sample analysis).

		OCS-Treated (n = 20)	Non-OCS-Treated (n = 26)	p-Value
Age (years) †		54.5 (44.3–59.5)	53.0 (42.8–61.3)	N.S.
Sex (%)	Female	17 (85.0%)	23 (88.5%)	N.S.
BMI †		26.7 (23.1–30.4)	28.7 (24.2–33.4)	N.S.
Smoking habit (%)	Smokers	1 (5.0%)	4/25 (16.0%)	N.S.
	Passive	2 (10.0%)	2/25 (8.0%)	N.S.
	Ex-smokers	7 (35.0%)	9/25 (36.0%)	N.S.
	Non-smokers	10 (50.0%)	10/25 (40.0%)	N.S.
Blood eosinophils (cells/ μ L) †		300.0 (100.0–500.0)	300.0 (200.0–525.0)	N.S.
Sputum eosinophils (%) †		0.0% (0.0–35.0)	3.1% (2.0–22.1)	N.S.
Atopy (%)		12 (60.0%)	17 (65.4%)	N.S.
IgE (IU) †		366.0 (110.0–690.0)	96.8 (36.6–285.8)	*
FEV ₁ /FVC (%) #		67.4% (\pm 15.9)	73.3% (\pm 23.5)	N.S.
FeNO (ppb) †		23.0 (13.5–78.3)	32.0 (13.8–62.0)	N.S.
Exacerbations (%)		17 (85.0%)	16 (61.5%)	N.S.
Severity (%)	Severe	20 (100.0%)	26 (100.0%)	N.S.
	Moderate	0 (0.0%)	0 (0.0%)	N.S.
	Mild	0 (0.0%)	0 (0.0%)	N.S.
	Intermittent	0 (0.0%)	0 (0.0%)	N.S.
ACT #		16.8 (\pm 5.9)	17.2 (\pm 5.5)	N.S.
ICS and LABA (%)		20 (100.0%)	26 (100.0%)	N.S.
Systemic corticosteroid (%)		20 (100.0%)	0 (0.0%)	****

Results are expressed as # mean (\pm SD) or † median (IQR); N.S., non-significant; ****, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$; BMI, body mass index; FEV₁, forced expiratory volume measured during the first second; FVC, forced vital capacity; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; ppb, parts per billion; ACT, asthma control test; ICS and LABA, inhaled corticosteroids and long-acting β 2-agonists; OCS, oral corticosteroids.

Table 2. Demographic, inflammatory, and clinical characteristics of the study subjects (lung biopsy sample analysis).

		OCS-Treated (n = 6)	Non-OCS-Treated (n = 7)	p-Value
Age (years) †		63.0 (56.8–66.3)	34.0 (27.0–74.0)	N.S.
Sex (%)	Female	3 (50.0%)	1 (14.3%)	N.S.
Smoking habit (%)	Smokers	1 (16.7%)	1/6 (16.7%)	N.S.
	Ex-smokers	3 (50.0%)	4/6 (66.7%)	N.S.
	Non-smokers	2 (33.3%)	1/6 (16.7%)	N.S.
Neutrophils (%) †		61.9% (50.3–72.5)	83.6% (70.6–89.5)	N.S.
Lymphocytes (%) †		24.1% (16.5–35.5)	8.7% (5.9–16.5)	N.S.
Monocytes (%) †		10.0% (8.9–12.2)	5.9% (4.4–9.0)	*

Table 2. Cont.

	OCS-Treated (n = 6)	Non-OCS-Treated (n = 7)	p-Value
Eosinophils (%) [†]	2.1% (0.3–3.0)	0.5% (0.1–3.1)	N.S.
Basophils (%) [†]	0.4% (0.3–0.7)	0.2% (0.1–0.5)	N.S.
Atopy (%)	1 (16.7%)	1 (14.3%)	N.S.
OCS (%)	6 (100.0%)	0 (0.0%)	**

Results are expressed as [†] median (IQR); N.S., non-significant; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; OCS, oral corticosteroids.

2.2. MiRNA Profile in Serum Samples

Analysis of the data obtained by NGS (miRNAs-seq) showed 11 differentially expressed serum miRNAs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-548I, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-941, hsa-miR-181d-5p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-133a-3p, and hsa-miR-3614-5p) between the OCS-treated and non-OCS-treated patients with severe asthma (adjusted $p < 0.05$) (Figure 1a). All of these 11 miRNAs were overexpressed in the OCS-treated subjects.

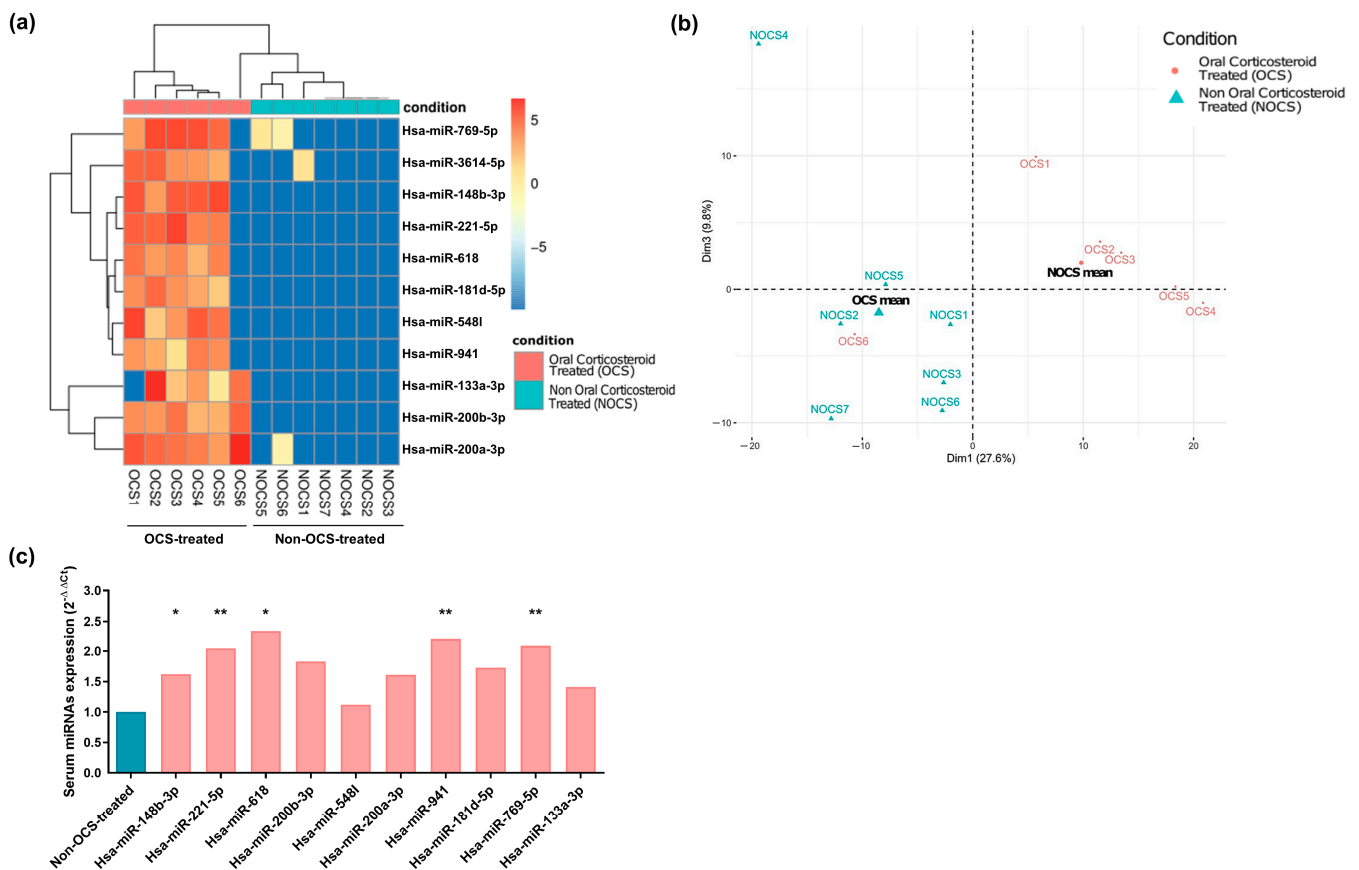


Figure 1. miRNA expression profile in the serum samples from asthmatic patients. (a) Heatmap of differentially expressed serum miRNAs between the OCS-treated and non-OCS-treated patients with severe asthma (adjusted $p < 0.05$; Log₂ fold change ≥ 1.5). (b) Principal component analysis (PCA) of severe asthmatic serum samples showing the two different treatment groups (OCS-treated vs. non-OCS-treated severe asthmatics). (c) RT-qPCR validation of the differentially expressed serum miRNAs between OCS-treated and non-OCS-treated individuals with severe asthma. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values are represented in the graph (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

When PCA was performed using the miRNA expression values, the results revealed that both groups were clearly differentiated (Figure 1b).

After the miRNAs-Seq analysis, RT-qPCR validation of miRNAs was performed in a larger cohort of serum samples. Of the 11 differentially expressed miRNAs obtained by miRNAs-Seq between the OCS-treated and non-OCS-treated individuals with severe asthma, we found significantly increased levels in five of them (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, and hsa-miR-769-5p) in the OCS-treated patients (Figure 1c). Hsa-miR-3614-5p was not detected by RT-qPCR, and the remaining miRNAs evaluated did not reach statistical significance (Figure 1c).

These results confirm that serum hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, and hsa-miR-769-5p were differentially expressed miRNAs between the OCS-treated and non-OCS-treated subjects with severe asthma, suggesting that these could serve as markers of treatment.

2.3. MiRNAs Correlation and Signaling Pathways

In order to establish some relation between the expression levels of these serum miRNAs (ΔCt) and different clinical characteristics, we performed correlation analyses. We observed a significant direct correlation between FEV_1/FVC and hsa-miR-148b-3p in the two groups (correlation coefficient (r) = 0.63 for the OCS-treated patients with severe asthma or correlation coefficient (r) = 0.59 for non-OCS-treated subjects with severe asthma) and hsa-miR-221-5p among the OCS-treated individuals with severe asthma (correlation coefficient (r) = 0.56) (Figure 2a). Since there is a correlation between FEV_1/FVC and hsa-miR-221-5p in the OCS-treated severe asthmatics, it can explain the difference in treatment between the two groups, whereas, since FEV_1/FVC correlated with hsa-miR-148b-3p in both groups, we can say that, in this case, there is no explanation for the difference in treatment, but there was a link with asthma pathology. Furthermore, despite not being a result of statistical significance, it is worth noting the opposite trend between the groups of the OCS-treated and non-OCS-treated asthmatic individuals, in the correlation of hsa-miR-148b-3p with the FeNO levels, perhaps because OCS treatment modified the FeNO/miR-148b-3p relation.

(a)

CLINICAL PARAMETERS	Hsa-miR-148b-3p		Hsa-miR-221-5p	
	OCS	Non OCS	OCS	Non OCS
Peripheral blood eosinophils (cells/mm ³)	-0.009	-0.04	-0.12	-0.44
IgE (kU/L)	-0.43	0.08	-0.36	0.14
FEV1/FVC (%)	0.63	0.59	0.56	0.23
FeNO	-0.31	0.36	-0.22	0.08
Last year exacerbations (N°)	-0.002	-0.22	-0.03	-0.30
Asthma control test (ACT)	0.01	-0.29	-0.01	-0.27

(b)

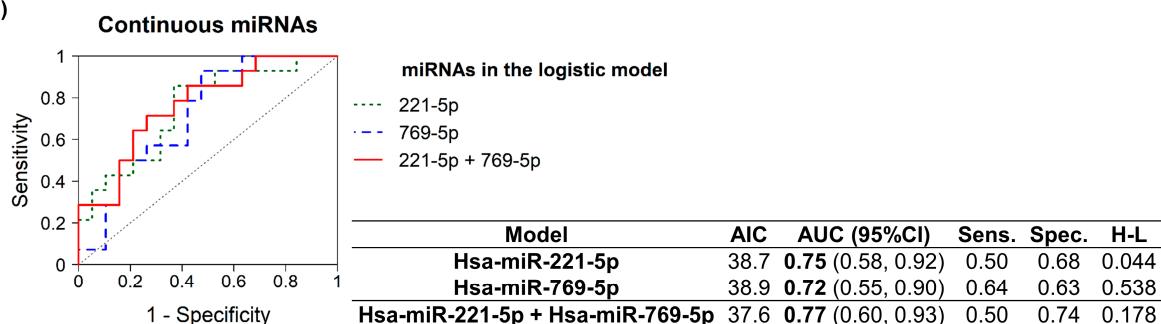


Figure 2. Correlation analyses and the ROC curves of differentially expressed serum miRNAs. (a) Table showing the correlation coefficient (r) between the distinct clinical parameters and serum miRNA expression levels. Red color intensity indicates a higher negative correlation, whereas green color intensity shows higher positive correlations. Bold and underlined values were statistically significant ($p < 0.05$). (b) ROC curves and multivariate logistic regression models (continuous predictors) of serum hsa-miR-221-5p and hsa-miR-769-5p. Bold values indicate an AUC over 0.70.

ROC curves were generated, and we calculated the areas under the curve (AUC). Multivariate logistic regression models (continuous predictors) were created for better discrimination of the OCS-treated and non-OCS-treated patients with severe asthma (Supplementary Table S1). Hsa-miR-221-5p and hsa-miR-769-5p showed AUC values of 0.75 and 0.72, respectively, indicating that both are acceptable as univariate predictors. Furthermore, when both serum miRNAs were combined, the AUC was even better (AUC = 0.77), as this was the best multivariate logistic regression model for differentiating OCS-treated and non-OCS-treated severe asthmatics (Figure 2b).

When an in silico analysis was carried out to determine their involvement in the biological processes with the differently expressed miRNAs, we determined that these miRNAs are involved in the regulation of several crucial asthma pathways, which are extracellular matrix (ECM)–receptor interaction, fatty acid biosynthesis, steroid biosynthesis, the Hippo signaling pathway, and adherens junction (Figure 3a). As *TGFRB1*, *FOXO3*, and *PTEN* are target genes of hsa-miR-148b-3p, and *MAPK3* is the objective gene of hsa-miR-221-5p, all are involved in the signaling pathways related to asthma disease. The RT-qPCR assay was conducted in lung tissue samples from asthmatic patients and healthy subjects, revealing that *FOXO3*, *PTEN*, and *MAPK3* were significantly increased in asthmatic individuals compared to the controls (Figure 3b).

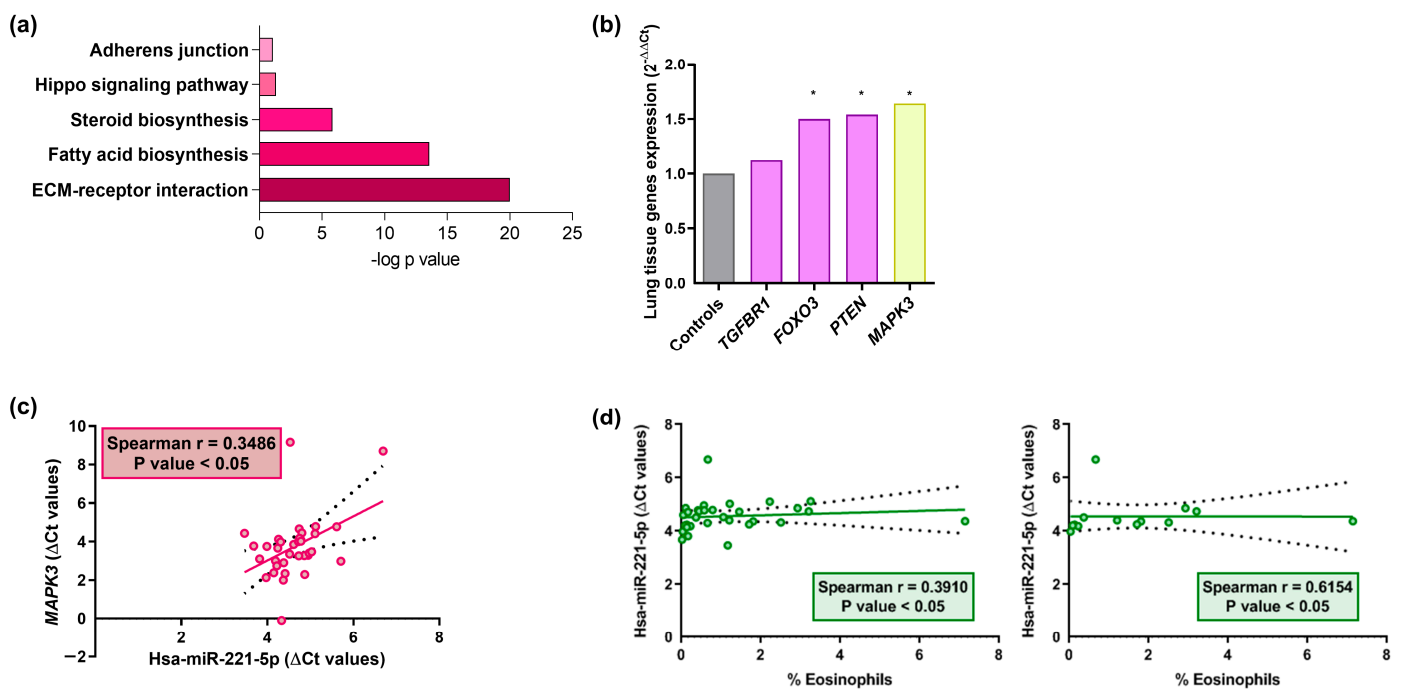


Figure 3. In silico pathway analysis, gene expression, and correlation data of serum miRNA results. (a) Graph showing enrichment (as $-\log p$ value) of the signaling pathways obtained using the DIANA-miRPath v3.0 bioinformatic tool. (b) RT-qPCR in the lung biopsies of target genes of the differentially expressed serum miRNAs (hsa-miR-148b-3p and hsa-miR-221-5p). *GAPDH* was used as a housekeeping gene (*, $p < 0.05$). (c) The relative miRNA expression of hsa-miR-221-5p (ΔCt) correlated directly with *MAPK3* in the lung tissue samples ($p < 0.05$). (d) Correlation graphs of hsa-miR-221-5p in the lung biopsy samples with blood eosinophil percentage (%) in different population groups (asthmatic individuals and total subjects) ($p < 0.05$). Dots (red and green) are individual values, black dashed line indicates error bars and red/green solid line shows linear regression.

Furthermore, to verify the association between miRNAs and the expression levels of their respective target genes (ΔCt), correlation analyses were carried out. We found a significant positive correlation for the total population between hsa-miR-221-5p and their target gene, *MAPK3* (Spearman $r = 0.35$) (Figure 3c).

Finally, we examined the relation between the miRNA expression levels and eosinophil counts. We showed a statistically significant direct correlation between hsa-miR-221-5p with the percentage of eosinophils in the different population subsets (i.e., total subjects and asthmatic individuals) (Figure 3d).

2.4. MiRNA Profile in Lung Samples

Therefore, validated serum miRNAs were analyzed in the target tissue of asthma disease. We found no statistically significant differences in the expression of these miRNAs in the lung biopsies. For this reason, we decided to conduct miRNA-Seq in these samples from asthmatic patients in order to understand the miRNA profile in lung tissue. Here, three miRNAs were differentially expressed between the OCS-treated and non-OCS-treated asthmatics ($q \geq 8$). Hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p, and hsa-miR-451a were overexpressed in the OCS-treated patients (Figure 4).

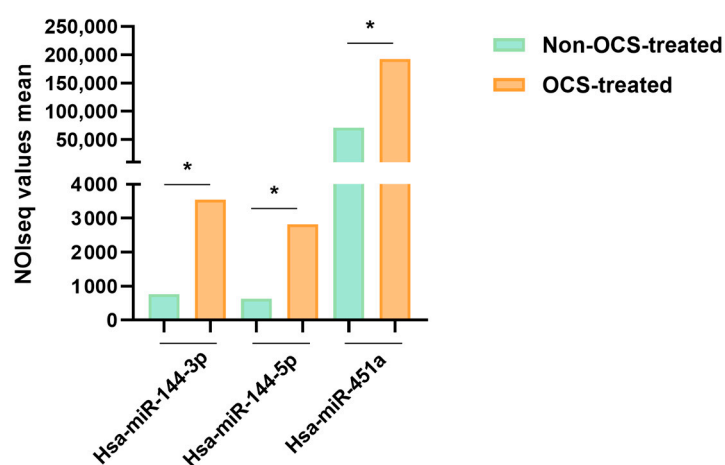


Figure 4. miRNA expression profile in the lung tissue biopsies from asthmatic individuals. Graph showing the mean NOIseq values obtained after miRNAs-Seq bioinformatic analyses (*, $q \geq 0.8$).

We then performed RT-qPCR on asthmatic lung biopsies from a larger cohort to validate the miRNAs obtained by sequencing analysis. None of the three miRNAs were validated, however, we observed a similar expression tendency in OCS-treated asthmatic patients ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ for each hsa-miR: 144-3p = 6.5, 144-5p = 5.2 and 451a = 2.0), as obtained in miRNA-Seq.

3. Discussion

This article draws on data from a comprehensive study of the miRNAs differentially expressed by NGS in the serum (of which 5 were validated: hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, and hsa-miR-769-5p) and in lung tissue (hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p and hsa-miR-451a) between the OCS-treated and non-OCS-treated patients. These miRNAs could be used as epigenetic biomarkers to distinguish individuals with severe asthma under OCS treatment, although we do not know whether this miRNAs alteration is due to treatment or a characteristic of patients that need OCS in their asthma control.

Asthma is a heterogeneous disease comprising different phenotypes and endotypes, and as a result, patient stratification by inflammatory endotype is a central component of the algorithm used to assess and manage severe disease [18,19]. Identification and application of biomarkers used to identify phenotypes and endotypes of severe asthma and guide therapeutic strategy is of increasing interest to clinicians, as individual approaches to disease management and personalized medicine are imperative [20]. The severe asthma endotype is currently defined by biomarkers of varying accuracy including blood and sputum eosinophils, periostin, FeNO, and IgE for T2 asthma [16,21,22]. As reported in the literature, we found that serum samples of OCS-treated asthmatic patients had elevated

IgE levels compared to the non-treated asthmatics [23]. Here, it is worth mentioning that the expression of biomarkers may be modified or even suppressed by pharmacological treatment (i.e., oral corticosteroids for blood eosinophils), making it advisable to examine biomarkers in combination. For example, we observed that the combination of two serum miRNAs used as biomarkers (hsa-miR-221-5p and hsa-miR-769-5p) resulted in a better AUC than when these were analyzed individually, suggesting that the profile of these two miRNAs was greater than using them separately.

Biomarkers are promising tools for the recognition and management of non-adherence to inhaled and oral corticosteroid therapy in asthma and can help to identify potential responders to therapeutic options, thus enabling their use as predictors of treatment response [24]. In recent years, miRNAs have been proposed as diagnostic and prognostic biomarkers for diseases [25]. NGS is a valuable technique in these efforts and can be employed for whole genome analysis including mRNA and small RNA expression such as miRNAs [26]. Our group previously used NGS to describe 15 miRNAs differentially expressed between eosinophilic and non-eosinophilic asthmatic patients, two of which were validated and could serve as instruments to classify patients into different phenotypes/endotypes [15]. In addition, hsa-miR-144-3p was previously described by our group to present an increase in miRNA levels in corticosteroid treated subjects by RT-qPCR [27], which validates the result obtained in miRNAs-Seq from the lung biopsy samples of asthmatics.

In this study, we found different profiles of miRNAs in the serum and lung tissue. Dysregulation of hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p, and hsa-miR-451a has been previously associated with different aspects of asthma pathogenesis and/or other respiratory diseases [28–32]. Nevertheless, these profiles have never been described as indicators of treatment. These miRNAs could be relevant molecules with implications for the phenotypic distinction of patients based on whether they are treated or untreated and may be indicated for use in asthma pathogenesis, since they were significantly correlated with clinical parameters. Interestingly, we found different miRNA profiles in asthmatics regarding the sample origin, which underscore the roles of these molecules as epigenetic regulators, as found in previous studies of miRNA tissue specificity [33].

Furthermore, we observed an enrichment in the ECM–receptor interaction pathway, which is widely associated with asthma due to the central role it plays in the development of airway inflammation and remodeling associated with asthma [2]. Moreover, miRNAs have been shown to affect the expression of multiple genes directly or indirectly, and for this purpose, we studied target genes related to differential miRNA expression. Here, *FOXO3*, *PTEN*, and *MAPK3* exhibited increased expression in asthmatic samples, which correlated with the miRNA expression studied, which emphasizes the implication of these inflammatory genes in the disease, as previously described by others [34–36]. In addition, in this study, we observed a positive correlation between hsa-miR-221-5p and *MAPK3*, its target gene, instead of detecting, as usual, an inverse miRNA–target gene correlation. Given that miRNAs generally behave as silencers of their target mRNAs, a possible explanation would be that miRNA–mRNA relationships are complex, and the lung tissue samples in which they have been studied differ from each other (influence of genetic and/or environmental factors), while there may be other miRNAs involved in the modulation of a particular mRNA (*MAPK3* mRNA), and there could also be interaction of other target genes of this miRNA (hsa-miR-221-5p) that could be inhibitors of *MAPK3*, in this case, remarking the intricacy of miRNA–mRNA post-transcriptional regulation in whole tissue.

One of the main limitations of this study is the lack of the same-subject pre-treatment samples, which made it impossible to determine whether the difference in the miRNA profiles between the groups of patients treated with OCS therapy was a consequence of the treatment (reflects treatment response) or if, in contrast, the existence of differentially expressed miRNAs between the groups was a baseline characteristic of the disease and

selected the treatment. Another limitation is the low number of lung biopsy samples available from asthmatic patients and, in fact, some of these samples were derived from individuals with other severe lung pathology, which could probably explain the reason why no significant differences were observed. Due to the limited number of analyzed lung biopsy samples available from the asthmatic patients, it is a preliminary level study in this case. Finally, it would be very interesting to evaluate the levels of protein expression by ELISA of the genes regulated by two of the altered miRNAs (hsa-miR-148b-3p and hsa-miR-221-5p) in this study.

4. Materials and Methods

4.1. Study Subjects and Sample Collection

Serum samples were obtained from 46 subjects with a severe asthma diagnosis who were recruited from allergy and pulmonology units of a series of hospitals in Spain; from these, we selected samples from 20 patients undergoing treatment with OCS and 26 not receiving OCS. MiRNA-sequencing (miRNA-Seq) was performed on serum samples from six of the OCS-treated and seven non-OCS-treated patients, respectively. Of the remaining 33 samples, 14 of those obtained from OCS-treated and 19 from non-OCS-treated subjects were included for miRNA validation by means of quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Descriptive data representing the demographic, inflammatory, functional, and clinical characteristics of the study subjects were collected.

All patients were participants in the MEGA project, which studies a cohort of asthmatic individuals with varying grades of severity [37]. The inclusion criteria were as follows: (i) acceptance to participate by providing signed informed consent; (ii) asthma diagnosis following the 2021 GINA criteria [38]; and (iii) age between 18 and 75 years. The definition of OCS-treated and non-OCS-treated severe asthmatic was established based on their treatment.

The study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the participating hospital ethics committees.

In addition, we analyzed the lung biopsy samples and relevant descriptive data corresponding to 13 asthmatic patient donors; these were also subdivided depending on whether the individuals were treated with OCS (OCS-treated) or not (non-OCS-treated). Furthermore, we had 20 lung biopsy samples from the control subjects, required for the gene expression analysis in lung tissue. Lung biopsy samples from these asthmatic patients and control individuals were provided by the CIBERES Pulmonary Biobank Consortium (PT13/0010/0030), a network currently formed by 12 tertiary Spanish hospitals (www.ciberes.org, accessed on 10 January 2023) detailed in the Acknowledgements section, and integrated in the Spanish National Biobanks Network. Lung biopsies were processed in accordance with the standard operating procedures, and subsequent approval was granted for processing by the local ethics and scientific committees.

Serum samples were obtained by blood clotting in anticoagulant-free tubes and subsequent centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 4 °C and stored at −80 °C until use. Lung tissue samples were preserved in the RNAlater stabilization solution at −80 °C until use.

4.2. Library Preparation, MiRNAs-Seq, Bioinformatic Analysis

Serum RNA (including miRNAs) was extracted from 200 µL of serum using the miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Hilden, Germany), as indicated by the manufacturer. Lung tissue RNA was purified using the QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany), followed by the application of the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method [39]. In all cases, the RNA enriched in miRNAs was eluted by adding 20 µL of RNase-free water.

Then, small RNA (miRNA-enriched RNA) was converted to Illumina sequencing libraries using the NEXTFLEX® Small RNA-Seq Kit v3 (Bioo Scientific Corporation, Austin, TX, USA), strictly according to the manufacturer's instructions. The size profile of the individual libraries was quantified using High Sensitivity D1000 Screentape on a 4200 TapeSta-

tion System (both Agilent, Santa Clara, CA, USA). Quantified libraries were sequenced on an Illumina MiniSeq 550 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) using a MiniSeq 500/550 75-Cycle High Output Kit.

Bioinformatic analyses including quality control, pre-processing, and statistical analysis of small RNA-Seq data were carried out by the Bioinformatics Unit of IIS-Fundación Jiménez Díaz. Adaptor removal and trimming of raw reads were performed using Cutadapt [40] by following the instructions for the NEXTflex small RNA-Seq Kit. Adaptor-trimmed reads between 17 and 25 nt were retained and aligned to the reference genome (GRCh38 assembly) using Bowtie2 [41]. Mapping of reads to known miRNAs was performed with HTSeq-count2 [42] using mature miRNA annotation retrieved from the miRBase database (miRBase v22). Raw miRNA counts across samples were normalized by sequencing depth and RNA composition using the trimmed mean of M-values (TMM) function from the NOISeq Bioconductor R package [43]. Subsequent principal component analysis (PCA) on normalized and scaled values was applied using the prcomp function from the R stats package [44]. Comparison of the normalized expression levels across groups was performed following two alternative methods for testing differential expression in the sequencing data: NOISeq [43] and DESeq2 [45]. Fold-change and *p*-values adjusted by false discovery rate (FDR) were calculated and used to identify significant differentially expressed miRNAs. MiRNAs were considered biologically relevant if they were differentially expressed (adjusted *p* < 0.05) and presented a Log2 fold change ≥ 1.5 between two groups, or if *q* ≥ 0.8 in the case of NOISeq.

4.3. RT-qPCR and Pathway Enrichment Analyses

For validation of the miRNA-Seq results or the expression analysis of the validated miRNAs, 4 μ L of serum miRNA samples or 30 ng of lung tissue miRNA-enriched RNA were reverse transcribed to cDNA using the miRCURY LNA RT Kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. The synthetic miRNAs SP6 and cel-miR-39-3p were used to control for correct reverse transcription. The cDNA obtained was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Then, miRNA expression was evaluated by qPCR using the miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen), as indicated in the instructions. For this purpose, we used 3 μ L of cDNA from the serum or lung tissue miRNAs diluted 1:60 or 1:30, respectively, in RNase-free water. Based on the results of the miRNA-Seq, the probes (Qiagen) used for the validation analysis of miRNAs in the serum and lung tissue were the following: hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-548I, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-941, hsa-miR-181d-5p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-144-3p, and hsa-miR-144-5p. Additionally, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, SP6, cel-miR-39-3p, and U6 (Qiagen) were selected as housekeeping miRNAs. All samples were run in triplicate, and reactions were performed in a Light Cycler[®] 96 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland). Cycle threshold (Ct) values were analyzed with LightCycler[®] 96 SW 1.1 (Roche) software and miRNA expression was calculated by normalizing to the endogenous miRNA controls by applying the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method [46], where $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA}} - \text{Ct}_{\text{housekeeping miRNAs}}$. The relative quantification of differences in expression ($\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$; where $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{OCS-treated}} - \Delta\text{Ct}_{\text{non-OCS-treated}}$) was carried out by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method [46].

For gene expression analysis in lung tissue, 500 ng of RNA quantified by a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), followed by qPCR according to the manufacturer's guidelines on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). TaqMan[™] gene expression probes were purchased for *TGFBR1*, *FOXO3*, *PTEN*, *MAPK3*, and *GAPDH* using TaqMan[™] Gene Expression MasterMix (Applied Biosystems). Gene expression was calculated by normalizing to the endogenous gene *GAPDH* control by applying the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method as previously reported ($\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$; where $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{asthmatics}} - \Delta\text{Ct}_{\text{healthy subjects}}$) [46].

In order to identify target genes linked to asthmatic pathology of hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, and hsa-miR-769-5p, differentially expressed

miRNAs in the serum between the OCS-treated and non-OCS-treated patients with severe asthma, pathway enrichment analysis of dysregulated miRNAs was performed using the DIANA-miRPath v3.0 bioinformatic online resource [47]. Relevant pathways for asthma disease were represented when a p -value < 0.05 , and the related genes were analyzed by RT-PCR, as previously mentioned.

4.4. Statistical Analysis

Statistical analyses and graphs were created with GraphPad Prism[®] v6-8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and R software[®] v4.1.0 [44] (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results are shown as the mean (standard deviation, SD) or median (interquartile range, IQR) values. For all statistical analyses, differences showing $p < 0.05$ were considered significant. Normality was analyzed by means of the Shapiro–Wilk test. For continuous variables, comparisons of normally distributed data between non-paired groups were performed via an unpaired t test (equal SD) and t test with Welch’s correction (different SD), and non-normally distributed data and non-paired groups were compared by the Mann–Whitney test.

Additionally, correlations between the miRNA expression levels (Δ Ct) and some clinical parameters (quantitative variables) were estimated by Spearman (non-normally distributed data) or Pearson (normally distributed data) correlation; the Fisher exact test was applied to a 2×2 contingency table to test the null hypothesis of the independence of groups and some clinical characteristics (qualitative variables). Finally, the expression profile (Δ Ct) of each differentially expressed miRNA was used to create receiver operator characteristic (ROC) curves, and logistic regression models were developed to evaluate the performance of miRNA as biomarkers; an area under the curve (AUC) of 0.7 indicated an acceptable biomarker.

5. Conclusions

In summary, we describe the significant differences in the expression of eight miRNAs, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p, and hsa-miR-451a (the first five in serum and the last three in lung tissue). These miRNAs could be used as biomarkers of oral corticosteroid treatment, allowing for the differentiation of patients treated with OCS from the patients not treated with OCS.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24021611/s1>.

Author Contributions: V.d.P. conceived the manuscript and designed the study. M.G.-M., C.L.-S., J.M.R.-M. and M.Á.L. performed the experiments and data analysis. M.G.-M. and C.L.-S. edited and wrote the manuscript. G.N.-M., L.d.l.F., P.M. and I.M.-F. performed the bioinformatics and statistical data analysis. J.S., M.V.-M., S.Q., M.L.C., F.J.G.-B., E.A., I.B., A.V., X.M., M.J.C., C.M.-R., V.P. and J.M.O. recruited the patients and obtained the samples and clinical data. All authors contributed to the article and approved the submitted version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by ISCIII—Instituto de Salud Carlos III, FIS (Fondo de Investigación Sanitaria—Spanish Health Research Fund) grants PI18/00167, PI21/00896, and FI19/00067; Ciber de Enfermedades Respiratorias (CIBERES); RTC-2017-6501-1 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades), a Carlos III Institute of Health Initiative; and FEDER funds (Fondo Europeo de Desarrollo Regional).

Institutional Review Board Statement: The study protocol was approved by the Ethics Committee of each different hospital, and the study was conducted in accordance with the principles set forth in the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Signed informed consent was obtained from all patients. The study was conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the participating hospital ethics committees.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, V.d.P., upon reasonable request.

Acknowledgments: We wish to particularly acknowledge the patients and the CIBERES Pulmonary Biobank Consortium (PT13/0010/0030) on behalf of Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital del Mar-IMIM, Hospital Universitario de Getafe, Consorcio Universitario Hospital General de Valencia, Fundación Jiménez-Díaz, Hospital Clínic de Barcelona, Hospital Universitario de Bellvitge, Hospital Universitario Joan XXIII, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Hospital Vall d'Hebron, and Hospital Universitario Son Espases, integrated in the Spanish National Biobanks Network, for their collaboration. The authors also acknowledge Oliver Shaw for the editorial support.

Conflicts of Interest: Authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflict of interest.

References

1. James, S.L.; Abate, D.; Abate, K.H.; Abay, S.M.; Abbafati, C.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1789–1858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hough, K.P.; Curtiss, M.L.; Blain, T.J.; Liu, R.M.; Trevor, J.; Deshane, J.S.; Thannickal, V.J. Airway Remodeling in Asthma. *Front. Med.* **2020**, *7*, 191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chung, K.F.; Wenzel, S.E.; Brozek, J.L.; Bush, A.; Castro, M.; Sterk, P.J.; Adcock, I.M.; Bateman, E.D.; Bel, E.H.; Bleecker, E.R.; et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma task force report ERS/ATS guidelines on severe asthma Executive Summary. *Eur. Respir. J.* **2014**, *43*, 343–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Côté, A.; Godbout, K.; Boulet, L.-P. The management of severe asthma in 2020. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *179*, 114112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Agache, I.; Akdis, C.A. Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 1493–1503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sheikhpour, M.; Maleki, M.; Ebrahimi Vargoorani, M.; Amiri, V. A review of epigenetic changes in asthma: Methylation and acetylation. *Clin. Epigenet.* **2021**, *13*, 65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kuruvilla, M.E.; Lee, F.E.H.; Lee, G.B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *56*, 219–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Busse, W.W. Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. *Allergol. Int.* **2019**, *68*, 158–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Suehs, C.M.; Menzies-Gow, A.; Price, D.; Bleecker, E.R.; Canonica, G.W.; Gurnell, M.; Bourdin, A. Expert consensus on the tapering of oral corticosteroids for the treatment of asthma: A delphi study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2021**, *203*, 871–881. [[CrossRef](#)]
10. Li, H.; Zhang, Q.; Wang, J.; Gao, S.; Li, C.; Wang, J.; Zhang, S.; Lin, J. Variability of Type 2 inflammatory markers guiding biologic therapy of severe asthma: A 5-year retrospective study from a single tertiary hospital. *World Allergy Organ. J.* **2021**, *14*, 100547. [[CrossRef](#)]
11. Weidner, J.; Bartel, S.; Kılıç, A.; Zissler, U.M.; Renz, H.; Schwarze, J.; Schmidt-Weber, C.B.; Maes, T.; Rebane, A.; Krauss-Etschmann, S.; et al. Spotlight on microRNAs in allergy and asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *76*, 1661–1678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ying, S.Y.; Chang, D.C.; Lin, S.L. The MicroRNA (miRNA): Overview of the RNA Genes that Modulate Gene Function. *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38*, 257–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dexheimer, P.J.; Cochella, L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mori, M.A.; Ludwig, R.G.; Garcia-Martin, R.; Brandão, B.B.; Kahn, C.R. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 656–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gil-Martínez, M.; Rodrigo-Muñoz, J.; Sastre, B.; Cañas, J.; García-Latorre, R.; Redondo, N.; de la Fuente, L.; Mínguez, P.; Mahillo-Fernández, I.; Sastre, J.; et al. Serum microRNAs catalog asthmatic patients by phenotype. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2021**, *32*, 471–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Popović-Grle, S.; Štajduhar, A.; Lampalo, M.; Rnjak, D. Biomarkers in Different Asthma Phenotypes. *Genes* **2021**, *12*, 801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Mirra, D.; Cione, E.; Spaziano, G.; Esposito, R.; Sorgenti, M.; Granato, E.; Cerqua, I.; Muraca, L.; Iovino, P.; Gallelli, L.; et al. Circulating MicroRNAs Expression Profile in Lung Inflammation: A Preliminary Study. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5446. [[CrossRef](#)]

18. Carr, T.F.; Bleecker, E. Asthma heterogeneity and severity. *World Allergy Organ. J.* **2016**, *9*, 41. [CrossRef]
19. Licari, A.; Castagnoli, R.; Brambilla, I.; Marseglia, A.; Tosca, M.A.; Marseglia, G.L.; Ciprandi, G. Asthma endotyping and biomarkers in childhood asthma. *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* **2018**, *31*, 44–55. [CrossRef]
20. Xtara, X.; Carr, F.; Xmd, X.; Kraft, X. Use of biomarkers to identify phenotypes and endotypes of severe asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2018**, *121*, 414–420. [CrossRef]
21. Tiotiu, A. Biomarkers in asthma: State of the art. *Asthma Res. Pract.* **2018**, *4*, 10. [CrossRef] [PubMed]
22. Canonica, G.W.; Blasi, F.; Crimi, N.; Paggiaro, P.; Papi, A.; Fanelli, F.; Stassaldi, A.; Furneri, G. Defining type 2 asthma and patients eligible for dupilumab in Italy: A biomarker-based analysis. *Clin. Mol. Allergy* **2021**, *19*, 5. [CrossRef] [PubMed]
23. Zieg, G.; Lack, G.; Harbeck, R.J.; Gelfand, E.W.; Leung, D.Y. In vivo effects of glucocorticoids on IgE production. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1994**, *94*, 222–230. [CrossRef] [PubMed]
24. FitzGerald, J.M.; Lemiere, C.; Lougheed, M.D.; Ducharme, F.M.; Dell, S.D.; Ramsey, C.; Yang, M.C.L.; Côté, A.; Watson, W.; Olivenstein, R.; et al. Recognition and management of severe asthma: A Canadian Thoracic Society position statement. *Can. J. Respir. Crit. Care Sleep Med.* **2017**, *1*, 199–221. [CrossRef]
25. Wu, Y.; Li, Q.; Zhang, R.; Dai, X.; Chen, W.; Xing, D. Circulating microRNAs: Biomarkers of disease. *Clin. Chim. Acta* **2021**, *516*, 46–54. [CrossRef]
26. Potla, P.; Ali, S.A.; Kapoor, M. A bioinformatics approach to microRNA-sequencing analysis. *Osteoarthr. Cartil. Open* **2021**, *3*, 100131. [CrossRef]
27. Rodrigo-Muñoz, J.M.; Gil-Martínez, M.; Lorente-Sorolla, C.; García-Latorre, R.; Valverde-Monge, M.; Quirce, S.; Sastre, J.; del Pozo, V. miR-144-3p Is a Biomarker Related to Severe Corticosteroid-Dependent Asthma. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 858722. [CrossRef]
28. Ong, J.; Faiz, A.; Timens, W.; van den Berge, M.; Terpstra, M.M.; Kok, K.; van den Berg, A.; Kluiver, J.; Brandsma, C.A. Marked TGF- β -regulated miRNA expression changes in both COPD and control lung fibroblasts. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18214. [CrossRef]
29. Guan, Y.; Ma, Y.; Tang, Y.; Liu, X.; Zhao, Y.; An, L. MiRNA-221-5p suppressed the Th17/Treg ratio in asthma via ROR γ t/Foxp3 by targeting SOCS1. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2021**, *17*, 123. [CrossRef]
30. Li, C.; Hu, X.; Li, L.; Li, J. hui Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *J. Clin. Lab. Anal.* **2020**, *34*, e23590. [CrossRef] [PubMed]
31. Liu, P.F.; Yan, P.; Zhao, D.H.; Shi, W.F.; Meng, S.; Liu, Y.; Liu, B.; Li, G.F.; Xie, L.X. The effect of environmental factors on the differential expression of miRNAs in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A pilot clinical study. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2018**, *13*, 741–751. [CrossRef] [PubMed]
32. Rodrigo-Muñoz, J.M.; Cañas, J.A.; Sastre, B.; Rego, N.; Greif, G.; Rial, M.; Mínguez, P.; Mahillo-Fernández, I.; Fernández-Nieto, M.; Mora, I.; et al. Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *74*, 507–517. [CrossRef] [PubMed]
33. Jovičić, A.; Roshan, R.; Moiso, N.; Pradervand, S.; Moser, R.; Pillai, B.; Luthi-Carter, R. Comprehensive Expression Analyses of Neural Cell-Type-Specific miRNAs Identify New Determinants of the Specification and Maintenance of Neuronal Phenotypes. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 5127–5137. [CrossRef] [PubMed]
34. Imraish, A.; Abu-Thiab, T.; Zihlif, M. IL-13 and FOXO3 genes polymorphisms regulate IgE levels in asthmatic patients. *Biomed. Rep.* **2021**, *14*, 55. [CrossRef] [PubMed]
35. Wen, X.; Yan, J.; Han, X.R.; Zheng, G.H.; Tang, R.; Liu, L.F.; Wu, D.M.; Lu, J.; Zheng, Y.L. PTEN gene silencing contributes to airway remodeling and induces airway smooth muscle cell proliferation in mice with allergic asthma. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 202–211. [CrossRef]
36. Alam, R.; Gorska, M.M. MAPK Signaling and ERK1/2 bistability in Asthma. *Clin. Exp. Allergy* **2011**, *41*, 149–159. [CrossRef]
37. Muñoz, X.; Álvarez-Puebla, M.J.; Arismendi, E.; Arochena, L.; del Pilar Ausín, M.; Barranco, P.; Bobolea, I.; Cañas, J.A.; Cardaba, B.; Crespo, A.; et al. Estudio de los mecanismos implicados en la génesis y evolución del asma (proyecto MEGA): Creación y seguimiento a largo plazo de una cohorte de pacientes asmáticos. *Arch. Bronconeumol.* **2018**, *54*, 378–385. [CrossRef]
38. Global Initiative for Asthma-Global Initiative for Asthma-GINA. Available online: <https://ginasthma.org/> (accessed on 10 May 2021).
39. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159. [CrossRef]
40. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* **2011**, *17*, 10–12. [CrossRef]
41. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [CrossRef]
42. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 166–169. [CrossRef] [PubMed]
43. Tarazona, S.; García-Alcalde, F.; Dopazo, J.; Ferrer, A.; Conesa, A. Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Res.* **2011**, *21*, 2213–2223. [CrossRef] [PubMed]
44. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2013; Available online: <http://www.R-project.org/> (accessed on 10 January 2023).
45. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [CrossRef]

46. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Vlachos, I.S.; Zagganas, K.; Paraskevopoulou, M.D.; Georgakilas, G.; Karagkouni, D.; Vergoulis, T.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A.G. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W460–W466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. ROC curves (continuous predictors) of OCS-treated and non-OCS-treated asthmatic patients.

Predictors number	Model	AIC	AUC (95%CI)	Sens.	Spec.	H-L
1	Hsa-miR-148b-3p	4.3	0.62 (0.42, 0.82)	0.36	0.63	0.957
	Hsa-miR-221-5p	8.7	0.75 (0.58, 0.92)	0.50	0.68	0.044
	Hsa-miR-618	1.9	0.72 (0.53, 0.91)	0.36	0.74	0.503
	Hsa-miR-941	0.9	0.71 (0.53, 0.89)	0.29	0.63	0.770
2	Hsa-miR-769-5p	8.9	0.72 (0.55, 0.90)	0.64	0.63	0.538
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p	0.6	0.72 (0.54, 0.90)	0.57	0.68	0.680
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-618	3.4	0.64 (0.44, 0.84)	0.36	0.74	0.669
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-941	2.2	0.68 (0.50, 0.87)	0.29	0.68	0.095
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-769-5p	0.7	0.70 (0.52, 0.88)	0.57	0.63	0.863
	Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618	9.9	0.72 (0.54, 0.90)	0.50	0.74	0.297
	Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-941	7.8	0.76 (0.59, 0.93)	0.43	0.63	0.935
	Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-769-5p	7.6	0.77 (0.60, 0.93)	0.50	0.74	0.178
	Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941	1.9	0.68 (0.50, 0.87)	0.29	0.74	0.273
	Hsa-miR-618 + Hsa-miR-769-5p	0.5	0.70 (0.52, 0.89)	0.64	0.74	0.526
3	Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	0.2	0.70 (0.52, 0.88)	0.43	0.74	0.840
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618	1.5	0.68 (0.49, 0.87)	0.57	0.68	0.703
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-941	8.8	0.73 (0.55, 0.91)	0.57	0.74	0.244
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-769-5p	8.5	0.74 (0.57, 0.92)	0.64	0.79	0.564
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941	3.7	0.63 (0.43, 0.82)	0.29	0.68	0.470
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-769-5p	2.4	0.67 (0.48, 0.86)	0.64	0.68	0.751
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	2.1	0.67 (0.48, 0.85)	0.36	0.74	0.810
	Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941	9.8	0.71 (0.53, 0.89)	0.29	0.68	0.936
	Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-769-5p	9.6	0.72 (0.54, 0.90)	0.50	0.68	0.171
	Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	9.2	0.75 (0.58, 0.92)	0.50	0.68	0.058
	Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	2.1	0.68 (0.49, 0.86)	0.43	0.74	0.552
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941	0.8	0.67 (0.47, 0.86)	0.43	0.63	0.254
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-769-5p	0.5	0.70 (0.51, 0.88)	0.64	0.79	0.562
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	9.8	0.73 (0.55, 0.90)	0.57	0.74	0.433
Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	4.1	0.61 (0.42, 0.81)	0.36	0.74	0.771	
5	Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	1.1	0.70 (0.52, 0.88)	0.36	0.68	0.948
	Hsa-miR-148b-3p + Hsa-miR-221-5p + Hsa-miR-618 + Hsa-miR-941 + Hsa-miR-769-5p	1.8	0.68 (0.49, 0.87)	0.50	0.68	0.444

AIC: Akaike's Information Criterion; AUC: Area Under the Curve; IC: Confidence Interval; Sens.: Sensitivity; Spec.: Specificity; H-L: Hosmer-Lemeshow. Shadow, bold and underlined text correspond to the hsa-miRs included in the best multivariate logistic regression model.

Objetivo parcial 5. Estudiar la expresión de los miARNs derivados del objetivo previo en suero y en tejido pulmonar de individuos con y sin diagnóstico de asma para encontrar biomarcadores específicos de la enfermedad.

6.5. Resultados logrados del desarrollo del objetivo parcial 5

6.5.1. Examen de la expresión de los miARNs en suero y en tejido pulmonar

Se evaluó la expresión de los 5 miARNs con expresión diferencial ($p < 0,05$) en suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, previamente validados. Esto se llevó a cabo por RT-qPCR en suero de pacientes asmáticos, pacientes con asma grave tratados o no tratados con GCOs, y de individuos donantes voluntarios sanos (grupo control). También se analizó la expresión de estos miARNs en biopsias pulmonares de sujetos asmáticos y de individuos control (sin diagnóstico de asma).

6.5.1.1. Características de los sujetos asmáticos y de los individuos sin asma incluidos en el análisis de la expresión de los miARNs en suero

Las características demográficas y clínicas de los sujetos se detallan en la tabla 16.

Tabla 16. Características demográficas y clínicas de los pacientes con asma grave, tanto tratados como no tratados con GCOs, y de los individuos donantes voluntarios sanos (grupo control).

CARACTERÍSTICAS		ASMÁTICOS (n = 33)	CONTROLES (n = 19)	P-VALORES
Edad (años) [†]		52 (43,5-58)	27 (25,8-29,5)	****
Sexo (%)	Hombre	6 (18,2%)	9 (47,4%)	NS
	Mujer	27 (81,8%)	10 (52,6%)	
IMC (Kg/m ²) [^]		28,9 (± 6,7)	23,6 (± 1,3)	***
Obesidad (%)		14 (42,4%)	0/9 (0%)	*
Hábito tabáquico (%)	Fumador activo	5 (15,2%)	1/18 (5,6%)	NS
	Fumador pasivo	3 (9,1%)	0/18 (0%)	NS
	Exfumador	12 (36,4%)	1/18 (5,6%)	*
	No fumador	13 (39,4%)	16/18 (88,9%)	***
Eosinófilos en sangre periférica (células/mm ³) [†]		300 (195-500)	300 (100-500)	NS
Eosinófilos en esputo inducido (%) [†]		3,4% (2-40)	0% (0-0)	-
Atopia (%)		19 (57,6%)	3/15 (20%)	*
IgE (KU/L) [†]		200 (63,1-606,5)	10 (9,6-140)	NS
FEV ₁ /FVC (%) [^]		69,9% (± 23)	81,6% (± 2,5)	*
FeNO (ppb) [†]		26 (12-58,8)	12 (6,7-15,5)	NS
Exacerbaciones en el año anterior (%)		24 (72,7%)	0/5 (0%)	**
Exacerbaciones en el año anterior (número) [†]		2 (0-3)	0 (0-0)	-
Tratamiento con GCI y LABAs (%)		33 (100%)	0/7 (0%)	****
Tratamiento con GCOs (%)		14 (42,4%)	0/7 (0%)	NS

Los resultados se muestran como: \bar{X} (± DE) o [†]Mediana (IQR). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita. *, Imposible de hacer (presencia de 0); ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Con relación a los parámetros poblacionales (tabla 16), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en todas las características demográficas (edad, IMC, obesidad [%] y

Resultados

hábito tabáquico [%]), a excepción del sexo. La mediana de edad (años) en los sujetos asmáticos es aproximadamente el doble que la de los individuos control ($p < 0,0001$). Además, el IMC (Kg/m^2) es más alto en el grupo de sujetos con asma ($p < 0,001$), con casi la mitad de los individuos en este grupo clasificados como obesos, a diferencia del grupo de sujetos control en el que no hay ningún individuo con obesidad ($p < 0,05$). Respecto al hábito de fumar, aunque la mayoría de los sujetos en ambos grupos no son fumadores (ni activos ni pasivos), el grupo de individuos asmáticos muestra un mayor porcentaje de exfumadores ($p < 0,05$) y un porcentaje inferior de no fumadores ($p < 0,001$).

En cuanto a los parámetros clínicos (tabla 16), pese a que el número de eosinófilos/ mm^3 en sangre periférica es similar en los dos grupos (NS; $p > 0,05$), se evidenciaron diferencias en las demás características clínicas. El grupo de individuos con asma presenta un porcentaje más bajo de FEV_1/FVC ($< 70\%$) ($p < 0,05$), denotando un deterioro en la función pulmonar. Además, exhibe un porcentaje de más del doble de sujetos atópicos ($p < 0,05$), un porcentaje elevado de individuos con exacerbaciones en el año anterior ($p < 0,01$), y todos los sujetos están bajo tratamiento con GCIs y LABAs ($p < 0,0001$), a diferencia del grupo de individuos control. Asimismo, el grupo de sujetos asmáticos registra un porcentaje de eosinófilos en esputo inducido superior al 3%, propio del asma grave, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (NS; $p > 0,05$). Los niveles de IgE sérica (KU/L) y el valor de FeNO (ppb) son considerablemente más altos en el grupo de individuos con asma en comparación con el grupo de sujetos control (NS; $p > 0,05$).

6.5.1.2. Características de los individuos con asma y de los sujetos no asmáticos incluidos en el análisis de la expresión de los miARNs en tejido pulmonar

Las características demográficas y clínicas de los individuos se especifican en la tabla 17.

Tabla 17. Características demográficas y clínicas de los sujetos asmáticos y de los individuos control (sin diagnóstico de asma).

CARACTERÍSTICAS		ASMÁTICOS (n = 16)	CONTROLES (n = 20)	P-VALORES
Edad (años) [^]		52,4 (± 17,6)	63,7 (± 8,5)	*
Sexo (%)	Hombre	10 (62,5%)	12 (60%)	NS
	Mujer	6 (37,5%)	8 (40%)	
Hábito tabáquico (%)	Fumador	4/15 (26,7%)	4 (20%)	NS
	Exfumador	7/15 (46,7%)	4 (20%)	NS
	No fumador	4/15 (26,7%)	12 (60%)	NS
Neutrófilos (%) [^]		71,4% (± 16,2)	80,6% (± 6,1)	NS
Linfocitos (%) [^]		18,2% (± 12,7)	10,7% (± 3,9)	NS
Monocitos (%) [^]		8,4% (± 2,9)	7,7% (± 2,6)	NS
Eosinófilos (%) [^]		1,6% (± 1,9)	0,8% (± 0,8)	NS
Basófilos (%) [†]		0,3% (0,1-0,5)	0,2% (0,1-0,4)	NS
Atopia (%)		3 (18,8%)	0/18 (0%)	NS
Bronquiectasias (%)		2 (12,5%)	ND	NS
Bronquitis crónica (%)		2 (12,5%)	ND	NS
Enfermedad inmunológica (%)		3 (18,8%)	0 (0%)	NS

Los resultados se muestran como: \bar{X} (± DE) o [†]Mediana (IQR). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita. *ND, No Disponible; *, $p < 0,05$.

De todos los parámetros, tanto poblacionales como clínicos (tabla 17), solo se vieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la variable de edad entre ambos grupos; los sujetos con asma tienen una edad (años) promedio menor que los individuos control.

Respecto a las características clínicas (NS; $p > 0,05$), los porcentajes de los diversos tipos de células sanguíneas (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), con excepción de los neutrófilos, son más elevados en el grupo de sujetos asmáticos. Además, hay un aumento en el porcentaje de individuos atópicos en este grupo (sujetos con asma). Asimismo, resulta relevante señalar la presencia de comorbilidades, como bronquiectasias, bronquitis crónica y enfermedad inmunológica, en algunos de los individuos asmáticos.

6.5.1.3. Estudio de la expresión de los miARNs en suero

Para determinar el índice de hemólisis se empleó la fórmula $Ct_{\text{hsa-miR-23a-3p}} - Ct_{\text{hsa-miR-451a}} < 7$ (en valor absoluto). La verificación de esta expresión en todas las muestras de suero confirmó la ausencia de hemólisis y la inexistencia de miARNs de eritrocitos²⁷⁶. De los 3 miARNs (hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p y cel-miR-39-3p) valorados como posibles controles internos en la qPCR, se seleccionó hsa-miR-103a-3p como CEN para normalizar la expresión de cada miARN debido a su expresión más estable, respaldada por la prueba estadística de igualdad de \square de Ct. Las \square de Ct de hsa-miR-103a-3p no diferían significativamente entre los dos grupos de la comparación (\square de Ct \pm DE] en muestras de sujetos con asma = $23,58 \pm 1,67$; en muestras de individuos control = $23,94 \pm 1,15$). Aunque hsa-miR-191-5p y la relación (la \square) entre hsa-miR-103a-3p y hsa-miR-191-5p cumplían la hipótesis nula del contraste de homogeneidad de \square de Ct, no se usaron como CENs debido a su menor estabilidad comparado con hsa-miR-103a-3p.

De los 5 miARNs analizados por RT-qPCR, se encontró el miARN hsa-miR-148b-3p con expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) en suero (figura 25A), siendo mayor en los sujetos asmáticos ($0,30 \pm 0,23$ unidades arbitrarias) que en los individuos control ($0,15 \pm 0,05$ unidades arbitrarias) (figura 25B). La expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) del resto de los miARNs analizados sugiere una tendencia al aumento de hsa-miR-221-5p en los sujetos asmáticos, mientras que las variaciones en la expresión relativa de los demás miARNs no fueron prácticamente apreciables (figura 25A).

Resultados

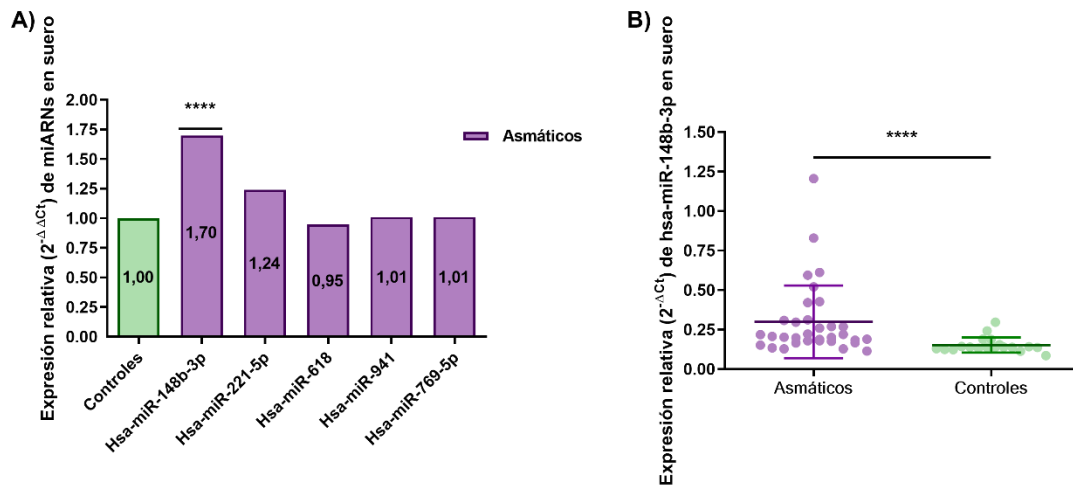
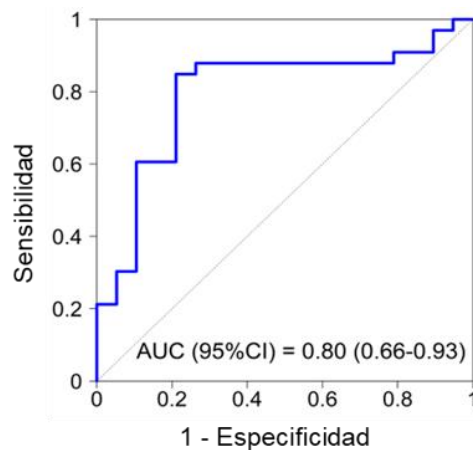


Figura 25. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los 5 miARNs examinados en suero entre sujetos asmáticos (asma grave tratados o no tratados con GCOs) e individuos control (A); expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) estadísticamente significativa de hsa-miR-148b-3p en suero entre individuos con asma e individuos sanos (grupo control) (B). Se muestra el p-valor: ****, $p < 0,0001$.

6.5.1.3.1. Evaluación de hsa-miR-148b-3p como posible biomarcador del asma

La mera existencia de expresión diferencial entre las dos condiciones (asmáticos y sanos) para hsa-miR-148b-3p en suero no es suficiente para definirlo como biomarcador si $AUC \geq 0,70$, por lo que se generó la curva ROC y se calculó el AUC. El AUC para hsa-miR-148b-3p fue de 0,80 (figura 26). Este modelo univariante, utilizando exclusivamente el miARN hsa-miR-148b-3p como predictor en su forma original como variable continua (variable cuantitativa), demostró una capacidad de discriminación buena ($AUC \geq 0,80$) con valores altos de S (0,88) y E (0,79).



Modelo	Tipo de predictor	AIC	AUC (95%CI)	S	E	HL
Hsa-miR-148b-3p	Continuo	54,1	0,80 (0,66-0,93)	0,88	0,79	0,164

Figura 26. Curva ROC de hsa-miR-148b-3p sérico, considerándolo como predictor univariante continuo. Se detallan el AIC, el AUC con el CI al 95%, la S, la E y el resultado del test de HL.

Por consiguiente, hsa-miR-148b-3p podría considerarse un biomarcador específico del asma con valor diagnóstico.

6.5.1.3.1.1. Correlación de la expresión de hsa-miR-148b-3p (Δ Ct) con las variables clínicas

En la búsqueda de biomarcadores, es habitual intentar identificar un vínculo entre la expresión relativa de los miARNs y las características clínicas que facilitan la determinación del diagnóstico. Se realizaron análisis de correlación entre los valores de la expresión relativa (Δ Ct) de hsa-miR-148b-3p y de diversos parámetros clínicos. Se valoraron variables clínicas como el número de eosinófilos en sangre periférica (células/mm³), el porcentaje de eosinófilos en esputo inducido, la IgE sérica total (kU/L), el porcentaje de FEV₁/FVC, el FeNO (ppb), el ACT y el número de exacerbaciones en el año anterior. En la interpretación de los resultados de correlación, es esencial tener en cuenta que a medida que se incrementa el valor de Δ Ct del miARN hsa-miR-148b-3p, su nivel de expresión se reduce.

El test de Spearman reveló una correlación positiva con significación estadística entre los valores de la expresión relativa (Δ Ct) en suero de hsa-miR-148b-3p y los del porcentaje de FEV₁/FVC en el grupo de sujetos asmáticos (r de Spearman = 0,38, $p < 0,05$; figura 27). Este hallazgo indica que a niveles más bajos de expresión de hsa-miR-148b-3p, se observan valores más elevados del porcentaje de FEV₁/FVC en el grupo de individuos con asma, es decir, mejor función pulmonar cuanto menor es la expresión de hsa-miR-148b-3p. Estos resultados apoyan los obtenidos en la RT-qPCR, que muestran una sobreexpresión de hsa-miR-148b-3p en suero en el grupo de sujetos asmáticos en relación con el grupo de individuos sanos (grupo control). No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con las demás características clínicas analizadas en el grupo de sujetos con asma.

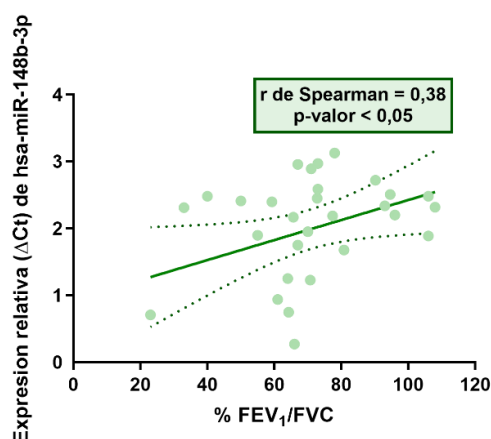


Figura 27. Correlación directa y estadísticamente significativa entre los valores de la expresión relativa (Δ Ct) de hsa-miR-148b-3p en suero y los valores del porcentaje de FEV₁/FVC en el grupo de individuos asmáticos. Se presentan el valor de la r de Spearman y el p -valor.

6.5.1.4. Estudio de la expresión de los miARNs en tejido pulmonar

De los 4 ARNs (hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, cel-miR-39-3p y U6 [RNU6] ARNs) considerados como posibles controles internos para la qPCR, se eligió emplearlos de manera conjunta (la \bar{X} de los 4 ARNs; cel-miR-39-3p como CEX y los otros 3 como CENS) para normalizar la expresión de cada miARN. La decisión se basó en los resultados de la prueba estadística de igualdad de \bar{X} . Las \bar{X} de Ct de los ARNs no diferían de forma estadísticamente significativa entre ambos grupos de la comparación (\bar{X} de Ct [\pm DE] de los ARNs hsa-miR-103a-3p + hsa-miR-191-5p + cel-miR-39-3p + U6 [RNU6] ARNs) en

Resultados

muestras de sujetos con asma = $25,58 \pm 0,86$; en muestras de individuos control = $25,70 \pm 0,55$). Colectivamente, estos ARNs mostraron una expresión más consistente.

De los 5 miARNs evaluados mediante RT-qPCR, se observó una expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de hsa-miR-769-5p en biopsias pulmonares (figura 28A), con un aumento en los sujetos asmáticos ($0,07 \pm 0,02$ unidades arbitrarias) en comparación con los sujetos control ($0,06 \pm 0,03$ unidades arbitrarias) (figura 28B). La expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) del resto de los miARNs entre los dos grupos refleja una inclinación al alza de hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p y hsa-miR-618, así como una tendencia descendente de hsa-miR-941 en individuos con asma (figura 28A).

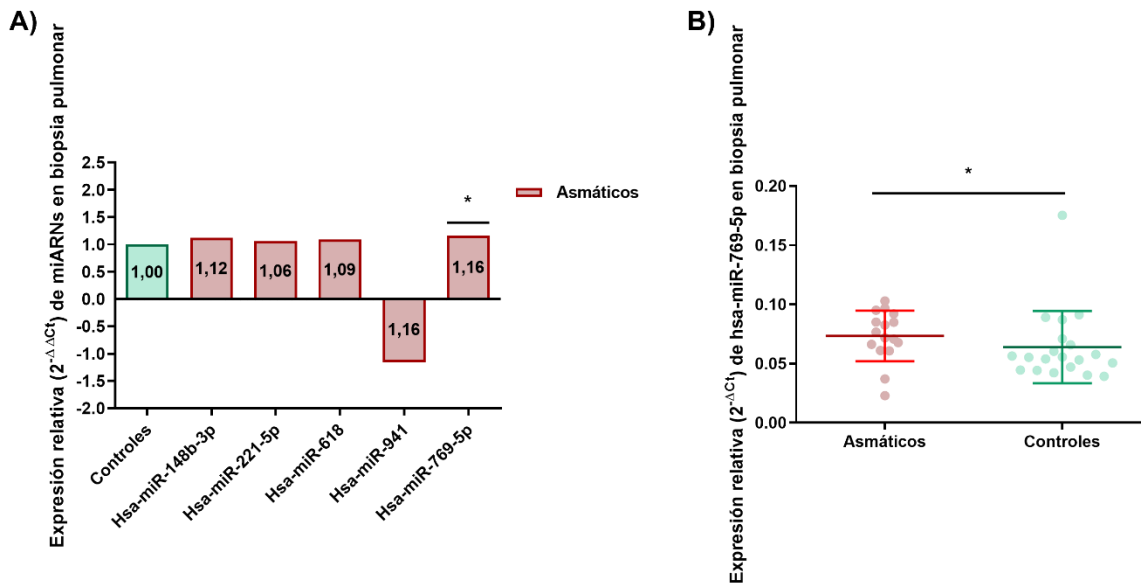


Figura 28. Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los 5 miARNs examinados en biopsias pulmonares entre sujetos con asma e individuos control (sin diagnóstico de asma) (A); expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) estadísticamente significativa de hsa-miR-769-5p en biopsias pulmonares entre sujetos asmáticos e individuos control (B). Se muestra el p-valor: *, $p < 0,05$.

En resumen, se identificó un ligero incremento, aunque estadísticamente significativo, en la expresión ($2^{-\Delta Ct}$) de hsa-miR-769-5p en los sujetos asmáticos en comparación con los individuos control (no diagnosticados de asma) en tejido pulmonar. Esto sugiere su potencial uso como biomarcador específico de la patología asmática.

6.5.1.4.1. Investigación del potencial de hsa-miR-769-5p como biomarcador

Se efectuó un análisis de la curva ROC para determinar si la expresión relativa (ΔCt) de hsa-miR-769-5p en biopsias pulmonares podría diferenciar entre sujetos con asma e individuos control (sin diagnóstico de asma), valorando su utilidad como biomarcador (si $AUC \geq 0,70$). El modelo de hsa-miR-769-5p como predictor univariante en su forma original como variable continua (variable cuantitativa), exhibió un AUC de 0,62. Sin embargo, al considerar un punto de corte (4,05) y utilizarlo como variable categórica (variable cualitativa), el AUC fue de 0,70 (figura 29). Por lo tanto, la capacidad de discriminación del modelo no fue aceptable cuando se trató el miARN hsa-miR-769-5p como variable continua ($AUC < 0,70$), pero resultó aceptable cuando fue tratada como variable categórica ($AUC \geq 0,70$), con un valor de S reducido (0,31) y

de E muy bueno (0,95). Por lo que, hsa-miR-769-5p podría ser reconocido como un biomarcador específico del asma cuando se emplea como variable categórica.

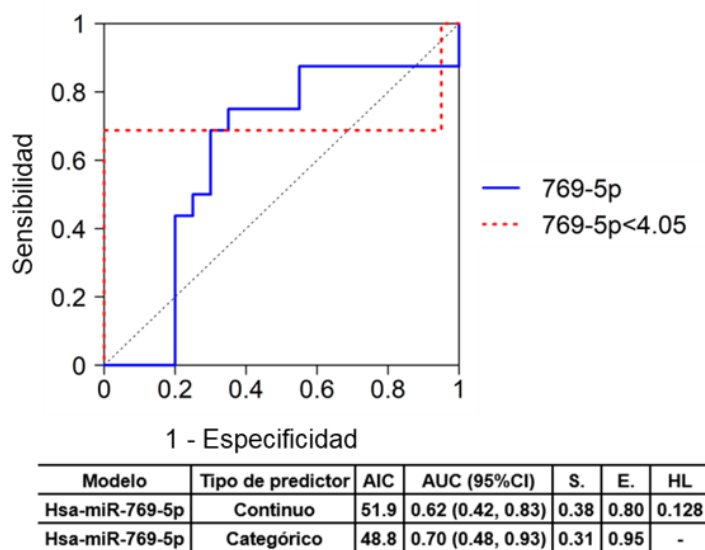


Figura 29. Curva ROC de hsa-miR-769-5p en biopsias pulmonares, evaluado como predictor univariante continuo (variable cuantitativa) y categórico (variable cualitativa). Se especifican el AIC, el AUC con el CI al 95%, la S, la E y el resultado del test de HL.

6.5.1.4.1.1. Correlación de la expresión de hsa-miR-769-5p (Δ Ct) con los parámetros clínicos

Se exploró la relación entre los valores de la expresión relativa (Δ Ct) de hsa-miR-769-5p y de diversas variables clínicas solamente en el grupo de sujetos asmáticos, ya que no se disponía de datos clínicos del grupo de individuos control (no diagnosticados de asma). Se llevaron a cabo correlaciones entre los valores de la expresión relativa (Δ Ct) de hsa-miR-769-5p y de características clínicas, tales como el porcentaje de distintos tipos de células sanguíneas (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), así como el porcentaje de FEV₁/FVC.

No se hallaron correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el grupo de sujetos con asma entre los valores de la expresión relativa (Δ Ct) de hsa-miR-769-5p en biopsias pulmonares y los parámetros clínicos mencionados.

Luego, a pesar de que hsa-miR-769-5p podría considerarse como un biomarcador específico para la enfermedad asmática, la falta de correlación entre los valores de su expresión relativa (Δ Ct) en tejido pulmonar y de las variables clínicas en el grupo de individuos asmáticos sugiere que no está vinculado con la sintomatología del asma ni ejerce influencia en su fisiopatología.

Objetivo parcial 6. Determinar la expresión de los miARNs hallados del cuarto objetivo parcial en modelos celulares *in vitro* (SAEC y BSMC), en presencia y ausencia de tratamiento con el GC dexametasona, con la finalidad de analizar el impacto de los GCs y considerar la viabilidad de estos miARNs como posibles opciones terapéuticas alternativas.

6.6. Resultados alcanzados de la ejecución del objetivo parcial 6

6.6.1. Estudio de la expresión de los miARNs en SAEC y BSMC

Se analizó por RT-qPCR la expresión de los 5 miARNs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, utilizando modelos celulares *in vitro* (SAEC y BSMC), tanto en presencia como en ausencia de tratamiento con dexametasona, para evaluar el efecto de este GC en su expresión. Además, se investigó la expresión del gen *GILZ*, inducible por GCs, en ambos tipos celulares también mediante RT-qPCR para verificar la eficacia del tratamiento con dexametasona y autenticar los resultados experimentales.

De los 5 miARNs examinados por RT-qPCR, aunque se mostró una expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$), estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de hsa-miR-941 entre células sin tratar con dexametasona (C-; $0,0033 \pm 0,0016$ unidades arbitrarias) y células tratadas con dexametasona a la concentración de 10^{-5} M ($0,0015 \pm 0,0003$ unidades arbitrarias) durante 4 h (figura 30A), no se evidenciaron modificaciones destacadas en su expresión entre células no tratadas y tratadas con este GC en sus distintas concentraciones y a los diferentes tiempos (figuras 30A y 30B). En SAEC, no se detectó el miARN hsa-miR-618 (figura 30).

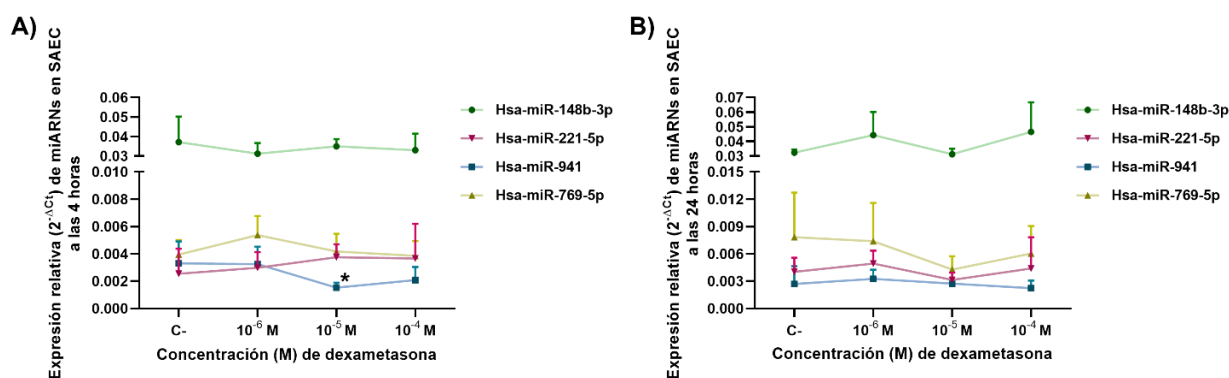


Figura 30. Expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) de hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p en SAEC incubadas en ausencia y en presencia de dexametasona a las concentraciones de 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M, a las 4 h (A) y a las 24 h (B) tras el tratamiento. Se indica el p-valor: *, $p < 0,05$.

Las BSMC (figura 31) presentaron expresión de los 5 miARNs, con una expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de hsa-miR-148b-3p y hsa-miR-221-5p entre células sin tratar con dexametasona (C-; $0,0161 \pm 0,0073$ unidades arbitrarias y $0,0040 \pm 0,0016$ unidades arbitrarias, respectivamente) y células tratadas con dexametasona a la concentración de 10^{-5} M ($0,0060 \pm 0,0022$ y $0,0012 \pm 0,0006$ unidades arbitrarias, de manera correspondiente) a las 24 h después de la aplicación del tratamiento (figura 31B).

Resultados

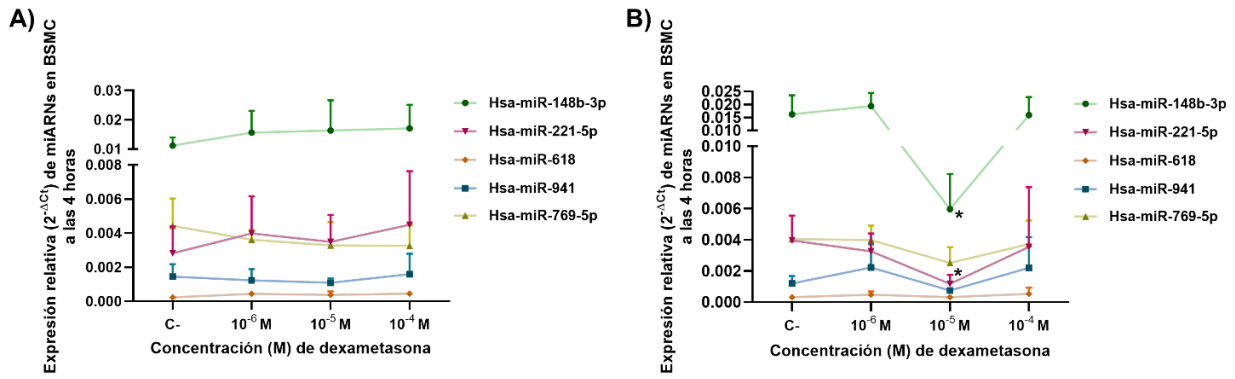


Figura 31. Expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) de hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p en BSMC incubadas en ausencia y en presencia de dexametasona a las concentraciones de 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M, a las 4 h (A) y a las 24 h (B) tras el tratamiento. Se presenta el p-valor: *, $p < 0,05$.

Se observó una expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) estadísticamente significativa ($p < 0,01$ o $p < 0,05$) del gen *GILZ* en SAEC (figura 32) y en BSMC (figura 33). Esta diferencia se encontró entre células sin tratamiento con dexametasona y en aquellas tratadas con dexametasona a las distintas concentraciones (10^{-6} M, 10^{-5} M o 10^{-4} M), a las 4 h (BSMC) y a las 24 h (SAEC y BSMC) después del tratamiento con este GC (figuras 32 y 33). En respuesta a la dexametasona en todas sus concentraciones, la expresión de *GILZ* en ambos tipos celulares fue superior tanto a las 4 h como a las 24 h, en comparación con las células no tratadas con dexametasona.

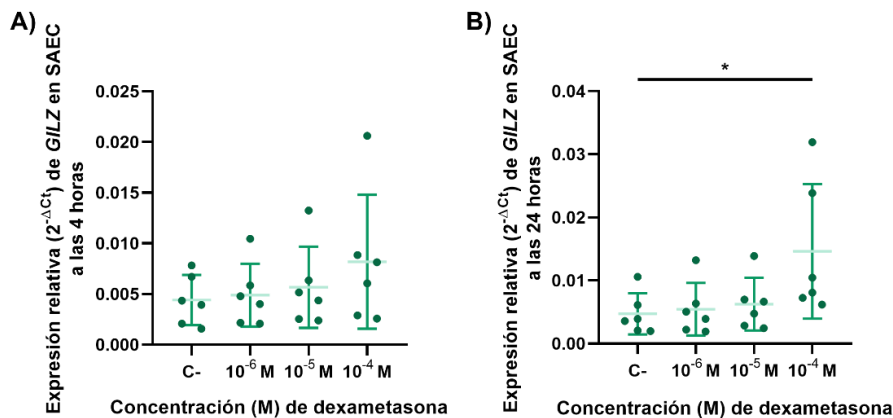


Figura 32. Expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) de *GILZ* en SAEC incubadas en ausencia y en presencia de dexametasona a las concentraciones de 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M, a las 4 h (A) y a las 24 h (B) tras el tratamiento. Se muestra el p-valor: *, $p < 0,05$.

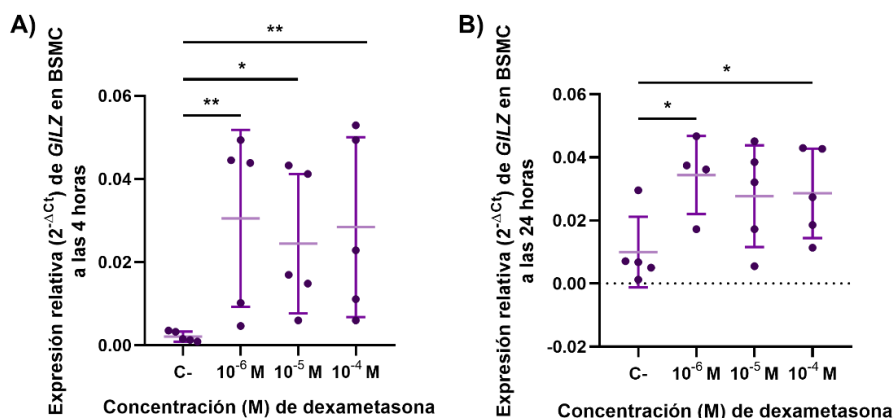
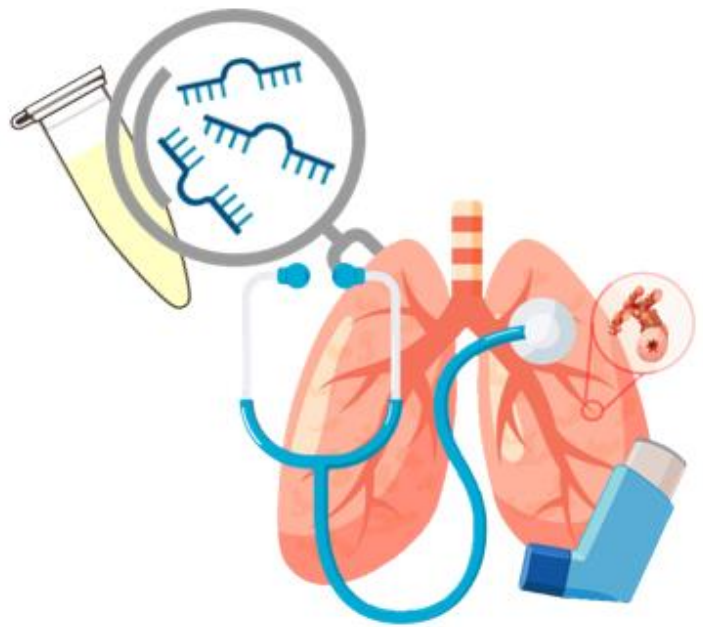


Figura 33. Expresión diferencial ($2^{-\Delta Ct}$) de *GILZ* en BSMC incubadas en ausencia y en presencia de dexametasona a las concentraciones de 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M, a las 4 h (A) y a las 24 h (B) tras el tratamiento. Se especifican los p-valores: **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Según los resultados de la experimentación *in vitro*, la falta de variaciones notables en la expresión de los miARNs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p) en respuesta a la dexametasona sugiere que las diferencias en su expresión en suero entre pacientes con asma grave, tratados y no tratados con GCOs, estarían más asociadas a la gravedad inherente del asma u otros factores, en lugar de al tratamiento con GCs (GCOs), que se administra en función de la gravedad de los pacientes. Además, la expresión diferencial del gen *GILZ* en células tratadas con dexametasona respaldó la efectividad del tratamiento con este GC y la validez de los hallazgos experimentales.



Discusión

7. DISCUSIÓN

7.1. Desentrañando la complejidad del asma: en dirección a una medicina personalizada con el uso de los miARNs como biomarcadores

A pesar de los avances en el conocimiento y tratamiento del asma, persisten numerosos aspectos desconocidos sobre los mecanismos subyacentes y la evolución de la enfermedad en situaciones individuales³⁰²⁻³⁰⁵.

El asma, una patología respiratoria crónica compleja y multifactorial, es un problema de salud prevalente en los países desarrollados^{306,307}. El aumento en su incidencia destaca la necesidad de abordar esta condición de manera efectiva y holística³⁰⁴. La variabilidad inherente del asma, con una patogénesis complicada, dificulta tanto la clasificación como el diagnóstico³⁰⁸⁻³¹⁰. La interacción de múltiples células y moléculas efectoras contribuye a una amplia heterogeneidad en los mecanismos fisiopatológicos (endotipos), síntomas y manifestaciones (fenotipos), así como en la base genética y las respuestas al tratamiento^{91,311-313}.

Frente a la complejidad y diversidad de la afección, la aplicación de la MPP se presenta como una opción factible y eficaz³¹⁴. La MPP, al considerar las características únicas de cada paciente, emerge como una estrategia promisoriosa para manejar las particularidades de cada paciente con asma, proporcionando tratamientos individualizados y optimizados para mejorar significativamente el bienestar de aquellos que padecen esta enfermedad respiratoria³¹⁵.

Para hacer frente, clínicamente hablando, a la heterogeneidad del asma, la propuesta más consensuada es categorizarla en fenotipos y endotipos³¹⁶. La clasificación en fenotipos, basada en características clínicas y observables, ofrece un enfoque simple e imparcial para seleccionar el tratamiento adecuado para cada paciente³¹⁷.

El asma eosinofílica y el asma grave tratada con GCOs son subgrupos del asma grave relacionados con la respuesta T2 (T2-alta)^{162,318}. El asma grave se caracteriza por síntomas persistentes y una respuesta deficiente a los tratamientos convencionales, a menudo requiriendo terapias más intensivas^{319,320}. El asma eosinofílica se distingue por la presencia de eosinófilos en las vías respiratorias y en la sangre periférica, lo que contribuye a la inflamación de las vías aéreas y posiblemente vinculada con episodios recurrentes de exacerbación³²¹. Por otro lado, el asma grave tratada con GCOs se refiere a pacientes que necesitan dosis significativas de GCs para controlar sus síntomas³²². Identificar y comprender las diversas manifestaciones del asma es crucial para desarrollar enfoques terapéuticos más personalizados y eficaces, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes y reducir la carga en su día a día asociada a esta compleja patología respiratoria³²³.

En casos como el asma grave, se ha reconocido que un mismo fenotipo puede involucrar diferentes mecanismos fisiopatológicos, lo que implica que un tratamiento específico puede no ser eficaz para todos los pacientes con el mismo fenotipo³²⁴. Para lidiar con esto, se recomendó la designación de endotipos, que se centran en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes³⁰⁸. La catalogación más detallada del asma en fenotipos y endotipos ha demostrado ser útil para detectar subgrupos con características

Discusión

fisiopatológicas específicas, permitiendo una selección más precisa de tratamientos³²⁵. Esta aproximación hacia los fenotipos y endotipos se alinea con la MPP, donde se busca adaptar los tratamientos a las características individuales de cada paciente^{326,327}.

En la actualidad, la asignación de los endotipos y fenotipos del asma se ve dificultada por la falta de biomarcadores específicos en la práctica clínica, lo que hace imperativo investigar y descubrir nuevos marcadores para categorizar a los pacientes^{316,328}. En este contexto, el estudio de los miARNs como biomarcadores para el asma surge como una respuesta a la necesidad de descubrir indicadores clínicos alternativos a los tradicionalmente utilizados¹⁷³.

Los miARNs se perfilan como biomarcadores prometedores debido a su estabilidad en biofluidos, la posibilidad de medirlos de forma no invasiva y su vinculación con estados patológicos del organismo³²⁹. Su utilidad como biomarcadores en otras enfermedades, como el cáncer, ha sido previamente confirmada²²⁰. Por lo tanto, explorar la capacidad de los miARNs como biomarcadores del asma podría brindar nuevas perspectivas para su clasificación y empleo en el ámbito clínico, incorporándolos en la práctica médica¹⁷³.

En la investigación de biomarcadores, una táctica común es usar distintos tejidos o tipos celulares para identificar miARNs, facilitando la búsqueda de biomarcadores innovadores²²⁰. No obstante, la opción más conveniente es analizar miARNs extraídos de fluidos biológicos de fácil obtención, como sangre, suero, plasma, esputo inducido, BAL, NL, EBC u orina³³⁰⁻³³³.

El procedimiento utilizado para la exploración de biomarcadores, como los miARNs, es un factor crítico²¹⁸. La secuenciación o NGS de miARNs (miARNs-seq) se ha establecido como una buena técnica. Esta avanzada metodología posibilita reconocer y cuantificar los miARNs en muestras biológicas con una alta precisión y sensibilidad³³⁴. La secuenciación de miARNs proporciona una visión minuciosa de los perfiles de expresión de miARNs en diversas condiciones fisiopatológicas, contribuyendo de manera relevante a la comprensión de su papel en varias patologías y procesos biológicos^{335,336}. Su creciente integración en la investigación biomédica es cada vez mayor, respaldada por su eficacia y exactitud, lo que la convierte en una técnica valiosa para el estudio de miARNs³³⁷.

En esta Tesis Doctoral, se empleó miARNs-seq para analizar principalmente miARNs circulantes en suero y en tejido pulmonar (biopsias pulmonares) de individuos asmáticos agrupados según diferentes características clínicas. Los miARNs resultantes fueron validados por RT-qPCR en cohortes más extensas de muestras. La finalidad era determinar perfiles de miARNs a nivel sistémico y en el tejido específico comprometido por el asma, con el potencial uso como biomarcadores para catalogar la afección asmática en función de sus distintos fenotipos. La ampliación del conjunto de miARNs como posibles biomarcadores del asma podría permitir una categorización más precisa de la enfermedad. Además de entender cómo estos miARNs inciden en los mecanismos de la fisiopatología del asma, este enfoque perfeccionará la implementación de la MPP.

7.2. Perspectivas actuales en la inflamación T2 en el asma para la MPP: incorporación de los miARNs en la investigación de los fenotipos

En el marco de las enfermedades pulmonares, el asma grave se destaca como una condición compleja que conlleva importantes retos en su manejo y tratamiento³³⁸. El asma grave afecta a aproximadamente el 5-10% de la población asmática y representa más del 50% de los costes sanitarios relacionados con el asma, siendo una carga sustancial tanto en términos de salud como socioeconómicos^{339,340}. Pese a recibir dosis más altas de GCI, que son la terapia farmacológica principal, los pacientes con asma grave no logran un control total. Estos pacientes requieren dosis diarias elevadas de GCIs y un segundo agente controlador o GCOs para mantener el control, o incluso no consiguen controlarlo a pesar de este tratamiento intensivo^{21,341}.

Las personas con asma grave experimentan más síntomas y exacerbaciones recurrentes, lo cual es un rasgo distintivo de este tipo de asma³⁴². Estas exacerbaciones pueden ser graves, llegando incluso a requerir hospitalización o resultar mortales^{340,341}. Además, los pacientes con asma grave experimentan una pérdida gradual de la función pulmonar y una disminución en la calidad de vida³⁴³. El asma también se asocia a menudo con diversas comorbilidades, que son más prevalentes en el asma grave en comparación con el asma leve o moderada^{119,344}. Estas condiciones médicas concurrentes pueden exacerbar los síntomas y agravar el asma, incrementando así la carga de enfermedad asociada a esta afección y disminuyendo el bienestar^{16,345}. Asimismo, la coexistencia del asma con otros trastornos adicionales puede llevar al uso de varios medicamentos, lo que incide de manera adversa en la adherencia a la terapia y el control del asma¹⁶. La obesidad, reconocida por empeorar numerosos desordenes respiratorios e impactar en la dinámica pulmonar, el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria, es una comorbilidad frecuente en el asma. Esta vinculación no solo influye en el inicio o el desarrollo de la enfermedad, sino que también acentúa su gravedad y contribuye al control deficiente y al compromiso de la calidad de vida^{346,347}.

Con respecto al asma grave, es fundamental identificar y examinar fenotipos específicos para personalizar las estrategias terapéuticas y mejorar los resultados clínicos. La presente Tesis Doctoral se enfoca en analizar la expresión de miARNs en diferentes fenotipos ligados al asma grave, con la finalidad de contribuir a un abordaje más preciso y efectivo de esta patología pulmonar.

El fenotipo más común y mejor comprendido en el asma T2 es el asma eosinofílica, que se manifiesta en más del 50% de los pacientes con diagnóstico de asma grave³⁴⁸. A diferencia del asma alérgica, de aparición temprana y caracterizada por una inflamación T2 (T2-alta) desencadenada por alérgenos, confirmada mediante pruebas cutáneas positivas a determinados alérgenos y/o aumento de los niveles de IgE específica en suero, incremento de eosinófilos en esputo y en sangre periférica, y valores altos de FeNO, el asma eosinofílica parece ser más predominante en aquellos que desarrollan el asma en la edad adulta que en aquellos que lo hacen durante la infancia. Además, el asma eosinofílica de inicio tardío suele no ser alérgica³⁴⁹. Aunque el asma en adultos tiende a afectar más a mujeres en general, el asma eosinofílica se reparte de manera más equitativa entre ambos géneros^{15,116}.

El diagnóstico del asma eosinofílica se basa en la detección de eosinofilia en esputo o sangre periférica, dado que este fenotipo se define por un recuento elevado de eosinófilos en el esputo inducido y en sangre

Discusión

periférica, así como por la infiltración eosinofílica de las vías respiratorias. Asimismo, los pacientes con asma eosinofílica suelen exhibir niveles aumentados de FeNO (≥ 50 ppb en adultos y > 35 ppb en niños), concentraciones normales o altas de IgE total sérica (≥ 200 kU/L) y valores elevados de POSTN en suero³⁵⁰⁻³⁵². Con relación a la IgE, aunque los pacientes con asma eosinofílica no estén sensibilizados a los alérgenos inhalados comunes, es habitual encontrar en muchos de ellos aumentos en los niveles de IgE séricos totales, que podrían estar asociados a antígenos no convencionales imperceptibles, como los superantígenos¹¹⁶.

La existencia de conteos altos de eosinófilos se vincula con un control insuficiente del asma, mayor propensión a las exacerbaciones y un pronóstico desfavorable^{351,353}. Además, los pacientes con asma eosinofílica normalmente sufren una forma más grave de la condición, marcada por una limitación persistente del flujo de aire y una reducción de la función pulmonar¹¹⁶. Igualmente, muchos de ellos también padecen afecciones concomitantes del tracto respiratorio superior, como la RSCcPN³⁵³.

Por otro lado, es importante enfatizar que en ocasiones, pese al tratamiento con GCI en dosis elevadas y LABAs, no se logra un control adecuado del asma. En estas situaciones, se hace necesario incorporar GCOs como parte de la terapia, aunque incluso esta medida podría no ser suficiente para alcanzar un manejo apropiado del asma^{349,351}. En comparación con aquellos que presentan asma de gravedad leve a moderada, los sujetos con asma grave requieren dosis más altas de GCI como componente de su tratamiento de control. Además, debido a las exacerbaciones agudas, también recurren al uso más regular de GCOs de corta duración. Sin embargo, una pequeña proporción de pacientes con asma grave desarrolla dependencia de GCOs, necesitando una terapia diaria con estos para controlar los síntomas. Este grupo no mantiene los síntomas bajo control inclusive con un tratamiento inhalatorio adecuado o precisa cursos repetidos de GCOs para tratar exacerbaciones persistentes a pesar de la terapia intensiva^{162,354}.

La definición de pacientes con asma dependientes de GCOs, es decir, aquellos individuos que requieren utilizarlos a diario, no es del todo clara, ya que abarca tanto a los que experimentan una escasa mejoría con este tratamiento como a los que responden de forma variable³⁵⁵. Varios mecanismos moleculares contribuyen a la resistencia de las células a los efectos antiinflamatorios de los GCs en el asma grave, y estos mecanismos difieren entre los pacientes. La resistencia a los GCs puede ser el resultado de defectos en diferentes niveles de la señalización de los GCs, como la disminución de la expresión del receptor de GCs, la reducción de la unión de los GCs a su receptor, la alteración de la translocación nuclear o la actividad alterada de los cofactores³⁵⁶.

Aunque los sujetos con asma dependiente de GCOs son una minoría en la población asmática en su conjunto, generan costes considerables en el ámbito de la atención médica. El empleo prolongado de GCOs en estos individuos conlleva a un marcado incremento en la morbilidad, los ingresos hospitalarios, la mortalidad y el riesgo potencial de efectos adversos³⁵⁷. Desde una perspectiva clínica, es crucial tener en cuenta que el uso de GCOs puede afectar a la correcta identificación de biomarcadores validados, como el recuento de eosinófilos en sangre periférica y el valor de FeNO³⁵⁸.

La obesidad se ha relacionado con la inflamación en las vías aéreas, habitualmente considerada como un rasgo del asma de aparición tardía no eosinofílica. Aunque el fenotipo principal de asma asociado a la

obesidad se distingue por una inflamación no T2, inicio en la adultez, gravedad pronunciada y complejidad en el manejo, ocasionalmente se observa inflamación eosinofílica. Diversas investigaciones han señalado niveles aumentados de IL-5 en las vías respiratorias y la presencia de eosinófilos en pacientes con obesidad, sugiriendo una posible conexión tanto con el asma eosinofílica como con el asma neutrofílica^{349,359}. El perfil predominante en el fenotipo de asma relacionado con la obesidad de inicio tardío corresponde a mujeres de mediana edad, no alérgicas y con síntomas agudos a pesar de una función pulmonar moderadamente preservada⁹¹. Este fenotipo del asma resulta ser difícil de tratar, con un control ineficaz y consecuencias negativas en términos de morbilidad y mortalidad. Se ha evidenciado una asociación entre la obesidad y exacerbaciones frecuentes, las cuales podrían ser influenciadas por una mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias virales y bacterianas, así como a un incremento en la utilización de GCOs. Además de una gestión insatisfactoria del asma, los pacientes obesos experimentan una gravedad significativamente más elevada, teniendo en cuenta la demanda de ventilación mecánica y de un período de hospitalización más duradero en comparación con los pacientes no obesos^{129,360}.

Curiosamente, la obesidad predispone a las células T CD4⁺ hacia la diferenciación Th1, y se han visto respuestas inmunes innatas adicionales que involucran vías Th17 e ILCs, siendo las células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3s; del inglés, *type 3 Innate Lymphoid Cells*) las que expresan las citocinas IL-17 e IL-22, vinculadas al asma relacionada con la obesidad. Otra citocina relevante es la IL-6, que provoca inflamación sistémica en pacientes obesos con asma grave⁹¹. Además, las rutas de señalización asociadas con el interferón también están presentes en individuos con asma y obesidad, activadas por distintos factores inductores de interferón, como la hormona leptina³⁶¹. Desde la perspectiva patogénica, los adipocitos secretan una amplia gama de sustancias, incluyendo moléculas que modulan el sistema inmunológico, fomentando una respuesta T2, la degranulación de mastocitos y el proceso de remodelación de las vías aéreas. La adiponectina, originada en los adipocitos, se destaca como un elemento fundamental en pacientes con obesidad y asma debido a sus múltiples funciones biológicas. La sobreexpresión de adiponectina contrarresta la acción de la IL-13, una citocina inflamatoria producida en gran cantidad por las ILC2s^{91,362,363}.

Por otra parte, en el contexto de la afección asmática, la obesidad parece influir en la expresión de los biomarcadores de la inflamación T2; ciertamente, se ha constatado que el aumento del IMC guarda relación con un descenso en los niveles de FeNO, sin importar la dosis de GCs empleada³⁶⁴. Es reseñable que la obesidad puede tener una repercusión desfavorable en los resultados clínicos de los medicamentos biológicos, ya que el peso corporal se considera una variable significativa desde el punto de vista médico que podría alterar la manera en que estos tratamientos son procesados en el cuerpo. De modo que, el manejo de los pacientes con asma grave y obesidad debe incorporar una estrategia dietética para reducir el peso corporal, incluyendo un abordaje preciso para combatir la obesidad como la cirugía bariátrica, con el fin de mitigar el impacto de la obesidad en la eficacia del tratamiento^{346,365}.

Por último, es esencial señalar que, con la introducción de fármacos biológicos, novedosos tratamientos específicos dirigidos a componentes de la respuesta inflamatoria, se ha tornado imprescindible categorizar a los pacientes según sus características clínicas (fenotipo) y los mecanismos patobiológicos (endotipo) con el propósito de personalizar las terapias. Esta aproximación busca adaptar los tratamientos de forma

Discusión

concreta a las particularidades de cada paciente, en especial en casos de asma grave, dentro del marco de la MPP³⁴⁹.

El enfoque terapéutico del asma basado en endotipos se encamina hacia las vías moleculares implicadas en la respuesta inflamatoria T2³⁶⁶. Para pacientes con inflamación T2, sobre todo aquellos con asma eosinofílica o asma grave sin control apropiado con dosis elevadas de GCI, junto con un segundo agente controlador como un LABA, o que requieren GCOs para manejar su enfermedad, es crucial entender las vías moleculares que subyacen en la producción de IL-5 y la eosinofilia. Este conocimiento es determinante para seleccionar el tratamiento biológico más efectivo y adecuado para cada paciente, especialmente para aquellos con niveles altos de eosinófilos^{21,116,349,367}.

En la actualidad, hay seis agentes biológicos (mAbs) aprobados que se dirigen a moléculas clave vinculadas con la inflamación T2: omalizumab, que se une selectivamente a la IgE circulante; mepolizumab y reslizumab, que tienen como diana la IL-5; benralizumab, frente a la subunidad α del receptor de IL-5 (IL-5R α ; del inglés, *IL-5 receptor α -subunit*); dupilumab, cuya diana es la subunidad α del receptor de IL-4 (IL-4R α ; del inglés, *IL-4 receptor α -subunit*) y, por lo tanto, afecta las vías de IL-4 e IL-13; y tezepelumab, frente a la alarmina TSLP. Omalizumab es la elección primordial para pacientes con asma grave alérgica no eosinofílica, mientras que para aquellos con asma grave eosinofílica no alérgica, sería lógico añadir un agente biológico anti-IL-5 o anti-IL-5R a la terapia estándar. El tratamiento anti-IL-4R α está indicado para el asma T2 grave con elevada eosinofilia o para pacientes que requieren dosis altas sostenidas de GCOs. Hasta ahora, no se ha demostrado la eficiencia de ninguna intervención fundamentada en el endotipo para el asma no T2, pero se están explorando vías moleculares con la expectativa de ofrecer una estrategia particular para este perfil fisiopatológico³⁶⁶.

Los avances recientes en la MPP para el asma se enfocan en el fenotipado y endotipado, con el desarrollo y la aplicación de biomarcadores confiables³⁶⁸. Estos indicadores brindan conocimiento vital acerca de la actividad de la patología asmática, la respuesta terapéutica y la predicción de los resultados clínicos¹¹³. Además, juegan un papel crucial al contribuir a una mejor clasificación de los fenotipos y endotipos, proporcionando información sobre los mecanismos inmunopatológicos y la gravedad de la condición. También ayudan a definir los criterios de elegibilidad para pacientes con más posibilidades de beneficiarse de las nuevas terapias biológicas para el asma grave, ofreciendo indicios acerca del potencial rendimiento de estos tratamientos específicos³⁵¹.

Los marcadores biológicos del asma, de mayor relevancia en la medicina actual, están estrechamente asociados con el asma con respuesta inflamatoria T2. Entre estos biomarcadores se encuentran la presencia de eosinófilos en esputo (porcentaje) y en sangre periférica (células/ μ L), el nivel total de IgE (kU/L) en suero, la medición del valor de FeNO (ppb), la cuantificación (unidades de concentración) de POSTN sérica, el análisis (unidades de concentración) de una variedad de citocinas y la evaluación (unidades internacionales/min o unidades/min [UI/min o U/min]) de la enzima Dipeptidil Peptidasa-4 (DPP-4). Aunque se espera una concordancia en el incremento de los datos numéricos de estos indicadores médicos, podrían experimentar aumentos de manera independiente debido a la influencia particular de diferentes vías mecanicistas. Asimismo, los marcadores podrían verse modificados por variables como la terapia y mostrar resultados más destacados cuando se utilizan teniendo en cuenta

ciertos aspectos clínicos. Por estas razones, la determinación de varios biomarcadores en combinación puede ser más apropiada que el empleo de uno solo^{91,366,369}.

El indicador por excelencia del asma T2 es el elevado conteo de eosinófilos en el esputo, reflejo de una inflamación intensa de las vías respiratorias. Aunque es sensible y específico, el procedimiento de inducción de esputo, mínimamente invasivo y tedioso, puede no ser la opción preferida en las pruebas de rutina^{91,102}. Por otro lado, el recuento de eosinófilos en la sangre periférica, un marcador usado ampliamente debido a la facilidad de obtención de la muestra y a la estandarización o automatización del conteo celular, se emplea con frecuencia como alternativa a la eosinofilia en las vías aéreas, aunque carece de especificidad al encontrarse en otros desordenes médicos como las infecciones parasitarias. A pesar de ser un biomarcador preciso para prever la eosinofilia en el esputo, existe la posibilidad de una considerable diferencia entre los niveles de eosinófilos en la sangre y las vías respiratorias. En otras palabras, los recuentos de eosinófilos en la sangre periférica (células/ μ L) no siempre correlacionan con los conteos en el esputo^{102,367}. Se establece que los pacientes con asma eosinofílica presentan eosinofilia aumentada en la sangre periférica junto con otros indicadores clínicos como la expresión elevada de citocinas T2 (IL-4, IL-5 e IL-13)^{351,352}. Estas citocinas son el referente principal para confirmar el asma caracterizada con respuesta inflamatoria T2³⁷⁰. Respecto al asma grave, la eosinofilia en el esputo y en la sangre periférica se vincula con un deficiente control del asma, conduciendo a exacerbaciones frecuentes, hospitalizaciones y deterioro progresivo de la función pulmonar³⁵¹.

La producción de FeNO, un marcador biológico indirecto de la inflamación T2 en las vías aéreas, está impulsada por las vías de IL-4 e IL-13, las cuales estimulan la actividad de la NO sintasa. La inflamación eosinofílica se vuelve altamente probable cuando los niveles de FeNO superan los 50 ppb en adultos y los 35 ppb en niños³⁷⁰. La combinación de FeNO y los recuentos de eosinófilos en el esputo y en la sangre periférica ofrece un enfoque recomendable para el diagnóstico del asma eosinofílica³⁵¹.

En cuanto a los biomarcadores disponibles en la actualidad para pacientes con asma no T2, cuya respuesta a GCs es restringida y para los que aún no existen tratamientos biológicos dirigidos, son prácticamente nulos³⁷¹. Únicamente se encuentran los neutrófilos en el esputo y algunas citocinas. Al igual que en el asma T2, la citología del esputo resulta fundamental para distinguir entre pacientes con asma neutrofílica, caracterizada por un predominio de neutrófilos, o paucigranulocítica, con ausencia o baja presencia de eosinófilos y neutrófilos, fenotipos que se definen por una respuesta inflamatoria no T2. Se considera asma neutrofílica cuando el recuento de neutrófilos en el esputo es \geq 40-60% y paucigranulocítica cuando los niveles de neutrófilos y eosinófilos en el esputo son normales. Además, citocinas como IL-17 o IL-22, que fomentan la inflamación neutrofílica, podrían medirse y emplearse como indicadores de este endotipo del asma^{91,370}.

7.3. Del laboratorio a la práctica médica: los miARNs como biomarcadores para el fenotipado del asma y su potencial en los tratamientos personalizados

A pesar de los extensos esfuerzos científicos para comprender las vías inmunológicas subyacentes a los fenotipos clínicos del asma grave y de detectar marcadores distintivos que describan los endotipos o anticipen la respuesta farmacológica, persiste una insatisfacción global³⁴⁹. Además, ante el creciente interés en los miARNs, moléculas con propiedades biológicas y químicas que los hacen adecuados

Discusión

biomarcadores para enfermedades¹⁷³, nos centramos en la búsqueda de perfiles de miARNs, tratando de descubrir indicadores biológicos del asma para la estratificación de los pacientes y la selección óptima de la terapia.

En este estudio se encontraron dos perfiles de miARNs en suero. Uno está conformado por 2 miARNs (hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p), asociados al fenotipo de asma eosinofílica y a la obesidad como comorbilidad del asma, y el otro está compuesto por 5 miARNs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p), relacionados con el fenotipo de asma grave tratada con GCOs. Estos miARNs podrían servir como potenciales marcadores médicos del asma y facilitar la catalogación de sujetos según sus distintos fenotipos. Todos ellos han sido previamente vinculados con la afección asmática u otras patologías pulmonares^{332,372-376}.

Entre estos miARNs, hsa-miR-26a-1-3p, tanto como predictor univariante (AUC = 0,76) como en combinación con hsa-miR-376a-3p (AUC = 0,76), sobresalen como indicadores eficaces para el fenotipo de asma eosinofílica, superando a otros marcadores como el porcentaje de eosinófilos en sangre periférica (AUC = 0,69), el FeNO (ppb; AUC = 0,68) y la IgE total sérica (kU/L; AUC = 0,62)³⁷⁷. Para predecir la respuesta a GCIs (a diferencia de nuestra aproximación con GCOs), los valores de AUC para el porcentaje de eosinófilos en esputo (AUC = 0,61), el conteo de eosinófilos en sangre periférica (células/ μ L; AUC = 0,64) y los niveles de FeNO (AUC = 0,62), fueron inferiores en comparación con los valores de AUC individuales de hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p (AUC > 0,70) del perfil de miARNs asociado al asma tratada con GCOs. La combinación de hsa-miR-221-5p y hsa-miR-769-5p mostró un rendimiento aún mejor (AUC = 0,77)³⁷⁸. Además, la ceramida C18:0 (ng/mL) tuvo un AUC menor (AUC = 0,72) que hsa-miR-26a-1-3p (AUC = 1,00) para discriminar entre pacientes con asma obesos y no obesos³⁷⁹. Estos datos subrayan la utilidad de los miARNs como biomarcadores del asma, especialmente cuando se combinan mediante modelos de regresión logística, perfilándose como herramientas prometedoras para la categorización fenotípica de pacientes asmáticos.

Huo *et al.* analizaron la expresión de hsa-miR-181b-5p en el asma, detectando una reducción, correlacionada inversamente con parámetros clínicos vinculados con la inflamación eosinofílica en las vías aéreas y los genes *CLCA1*, *POSTN* y *SERPINB2* inducidos por IL-13. Esto sugirió una relación entre hsa-miR-181b-5p epitelial (epitelio de las vías respiratorias) y el asma T2. Además, se vio un patrón análogo en su expresión a nivel plasmático, con un incremento tras la administración de GCIs, indicando su posible uso como biomarcador no invasivo para valorar la eosinofilia de las vías aéreas en individuos con asma. En células BEAS-2B se evidenció que hsa-miR-181b-5p regula la expresión génica de *SPP1*, una diana de este miARN, suprimiendo la regulación positiva de *SPP1* y de citocinas proinflamatorias IL-1 β y CCL11, tanto a nivel génico como proteico, motivada por IL-13. Asimismo, el tratamiento con dexametasona restauró la expresión de hsa-miR-181b-5p. En resumen, la sobreexpresión de hsa-miR-181b-5p podría ser una herramienta terapéutica en el asma³⁸⁰.

Xu *et al.* descubrieron la importancia de miR-223 en el control de la inflamación en el asma neutrofílica inducida por ovoalbúmina (OVA) en ratones. La deficiencia en miR-223 exacerbó la inflamación pulmonar, con un incremento de células inflamatorias y exceso de producción de moco, junto con mayor resistencia en las vías respiratorias y una disminución en la distensibilidad pulmonar. Se observaron elevados niveles

de citocinas inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-22, IL-23 e IL-1 β) en el BAL. Se confirmó la asociación entre miR-223 y el inflammasoma NLRP3, una diana directa del miR-223. Se identificó un aumento en la actividad de NLRP3, junto con incrementos en los niveles de caspasa-1, IL-1 β e IL-18 a nivel ARNm y proteína, advirtiendo que miR-223 regula selectivamente el inflammasoma NLRP3. El bloqueo del inflammasoma NLRP3 o de la IL-1 β , y la administración intranasal de un mimético del miR-223, revirtieron la inflamación exacerbada y atenuaron los eventos referidos en ratones deficientes de miR-223. Estos resultados resaltan la relevancia de miR-223 y del circuito regulador miR-223-NLRP3/IL-1 β en el control de la inflamación de las vías aéreas en el asma neutrofílica, planteando que la regulación positiva de miR-223 podría ser una propuesta esperanzadora en el tratamiento de esta enfermedad al impedir la activación de la vía de señalización NLRP3/IL-1 β , la cual está implicada en la patogénesis del asma³⁸¹.

Los miARNs han adquirido un protagonismo singular por su precisión y sensibilidad en reflejar cambios en la expresión de genes asociados con patologías como el asma³⁸². Los miARNs séricos hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p, vinculados al fenotipo de asma eosinofílica, juegan un rol crucial en la inflamación y remodelación de las vías respiratorias al influir en las vías de señalización de p53 y la interacción MEC-receptor³⁸³. Asimismo, el perfil de los miARNs séricos hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p, asociados al fenotipo de asma grave tratada con GCOs, muestra un aumento en la regulación de las vías de interacción MEC-receptor y de biosíntesis de ácidos grasos.

Un dato relevante es que la capacidad diagnóstica de los miARNs no se limita a su validación mediante RT-qPCR en el laboratorio, sino que también pueden ser identificados por dispositivos punto de atención (POC; del inglés, *Point Of Care*), que son portátiles y permiten la detección inmediata en pacientes sin requerir de pruebas de laboratorio. Estos aparatos utilizan numerosos métodos, como la amplificación isotérmica, el flujo lateral, la reacción con oligonucleótidos, y aquellos fundamentados en nanopelotas, electroquímica o dispositivos microfluídicos³⁸⁴. Por tanto, los miARNs obtenidos del estudio en suero podrían ser altamente provechosos al ser evaluados con dispositivos POC, lo que facilitaría un diagnóstico rápido y certero del asma, así como la clasificación en los distintos fenotipos.

Dado que los miARNs circulan contenidos en los exosomas o asociados con proteínas en el torrente sanguíneo³⁸⁵, se propuso examinar el contenido proteico de los exosomas entre diferentes subgrupos de pacientes con asma (apartados 7.4 y 7.4.1). Esto, que alude a la necesidad de las tecnologías ómicas (en este caso, la proteómica), permitió hallar patrones proteicos específicos ligados al asma y sus fenotipos, con preponderancia de algunas de las proteínas³⁸⁶, otorgando una comprensión más profunda sobre los mecanismos inherentes y potenciales puntos de intervención terapéutica.

7.3.1. Perfiles diferenciales de miARNs en suero y en biopsias pulmonares: los miARNs como biomarcadores específicos del asma para un fenotipado preciso. Objetivos 1, 2 y 4-6

El trabajo que fundamenta esta Tesis Doctoral se centró en estudiar perfiles diferenciales de miARNs en muestras de suero y biopsia pulmonar de individuos asmáticos, clasificados según diversas características clínicas para discriminar entre fenotipos del asma. Se empleó miARNs-seq para conseguir una evaluación exhaustiva de la expresión de miARNs en estas muestras, y la fiabilidad de los perfiles de miARNs identificados se garantizó mediante la posterior validación por RT-qPCR.

Discusión

La elección de usar muestras de suero y biopsia pulmonar se justifica por la necesidad de obtener información tanto a nivel sistémico como local, específicamente en el tejido pulmonar, la región principal afectada por el asma^{335,336,387–390}. Esto se basa en el reflejo sistémico y específico, la complejidad del asma, la distinción de fenotipos y endotipos, la identificación de biomarcadores potenciales y la revelación de estrategias terapéuticas^{91,113,391–393}. Las muestras de suero posibilitan analizar miARNs circulantes, evidenciando cambios sistémicos en respuesta al asma, mientras que las biopsias pulmonares brindan conocimiento directo sobre las modificaciones en el tejido pulmonar^{385,394–396}.

La combinación de estas muestras proporciona una comprensión más profunda de los perfiles de miARNs, lo que arroja luz sobre las interacciones entre sistemas biológicos y la respuesta asmática²³⁶. Esto facilita encontrar miARNs específicos (tanto de patología como de tejido) que permiten diferenciar entre grupos de sujetos con asma, fenotipando así la enfermedad debido a su variabilidad clínica y biológica. Estos miARNs pueden servir como biomarcadores relacionados con la presencia y gravedad del asma, resultando útiles para diagnóstico, pronóstico y seguimiento^{173,397}. Además, este enfoque favorece el descubrimiento de miARNs desregulados, lo que orienta hacia opciones de tratamiento dirigidas para manejar la condición asmática inherente³⁹³.

En el suero, los miARNs pueden hallarse encapsulados en exosomas, los cuales tienen un papel clave en la comunicación intercelular, o en forma libre, asociados con proteínas y otras estructuras para protegerlos contra la degradación³⁸⁵. Los exosomas, producidos y liberados por células importantes en el asma como los eosinófilos, pueden tener un impacto autocrino al influir en las funciones de las células que los secretaron, así como exocrino al afectar a las células estructurales del pulmón como las células epiteliales y musculares bronquiales^{175,398,399}. Estos mecanismos pueden incentivar la fisiopatología asmática, es decir los procesos biológicos subyacentes que contribuyen a los síntomas y características del asma^{175,247}. Por otra parte, la purificación de miARNs del tejido pulmonar es esencial para la investigación del asma, ya que es el foco de la afección, pero la extracción de miARNs del suero es valiosa debido a su accesibilidad y facilidad de manejo en comparación con las muestras directas de tejidos pulmonares u otras muestras biológicas^{400,401}. Esto permite analizar la expresión de miARNs y representa fielmente el contenido celular de diversas células implicadas en la patología asmática, ya que el torrente sanguíneo es el destino final del contenido intracelular de estas células^{331,402}. En consecuencia, el suero proporciona un entorno propicio para el examen de miARNs, lo que simplifica el análisis de estos componentes en el estudio de los complejos procesos patológicos del asma⁴⁰³.

Basándonos en los resultados, se identificaron tres perfiles diferenciales de miARNs:

1) En muestras de suero:

- Asma eosinofílica y no eosinofílica:
 - Los resultados de miARNs-seq revelaron 15 miARNs con expresión diferencial, de los cuales 14 estaban sobreexpresados y 1 estaba subexpresado en los pacientes con asma eosinofílica.
 - La validación mediante RT-qPCR confirmó los miARNs hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p (perfil 1), con un aumento en su expresión en los pacientes con asma eosinofílica.
- Asma alérgica/atópica y no alérgica/atópica:
 - No se observaron diferencias significativas en la expresión de miARNs por miARNs seq.

- Asma grave tratada y no tratada con GCOs:
 - Los resultados de miARNs-seq revelaron 11 miARNs expresados diferencialmente entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, todos sobreexpresados en los pacientes con asma grave tratados con GCOs.
 - La validación mediante RT-qPCR confirmó los miARNs hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p (perfil 2), con un aumento en su expresión en los pacientes con asma grave tratados con GCOs.
- 2) En muestras de biopsia pulmonar:
- Asma grave tratada y no tratada con GCOs:
 - Los resultados de miARNs-seq revelaron 3 miARNs (hsa-miR-144-3p, hsa-miR-144-5p y hsa-miR-451a) con expresión diferencial (perfil 3) entre individuos con asma grave tratados y no tratados con GCOs, todos sobreexpresados en los sujetos con asma grave tratados con GCOs.
 - No se confirmaron diferencias significativas en la expresión de los miARNs por RT-qPCR. No obstante, se observó una tendencia al aumento en su expresión en los individuos con asma grave tratados con GCOs, coincidiendo con los resultados obtenidos mediante miARNs-seq.

La falta de diferencias en la expresión de miARNs (miARNs-seq) al comparar entre pacientes con asma alérgica/atópica y no alérgica/atópica podría atribuirse a varias razones. Estas incluyen la complejidad de la patología, el tamaño limitado de la muestra (ausencia de poder estadístico), la invariabilidad en el nivel de expresión de miARNs entre los grupos comparados, la heterogeneidad intragrupal, las limitaciones en la sensibilidad y precisión del método de detección, las complejas interacciones en las redes regulatorias en las que participan los miARNs, lo que puede dificultar el reconocimiento de patrones lineales o correlaciones directas con las características clínicas consideradas, y la variabilidad temporal, donde las fluctuaciones en la expresión de miARNs podrían ser transitorias y no reflejarse en el momento de la toma de muestras. Todos estos factores podrían ser determinantes en la falta de identificación de diferencias en la expresión de miARNs entre estos grupos^{404–412}.

El hallazgo de menor cantidad de miARNs diferencialmente expresados en cohortes más grandes, en las validaciones (RT-qPCR) para las comparaciones de asma eosinofílica y no eosinofílica, así como asma grave tratada y no tratada con GCO en suero y en biopsias pulmonares, podría explicarse por diversos factores. En muestras de mayor tamaño, las diferencias podrían ser más sutiles, complicando alcanzar la significación estadística, especialmente si el efecto es pequeño^{413,414}. Las correcciones estadísticas múltiples podrían reducir la significación estadística de las diferencias contempladas⁴¹⁵. En cohortes más amplias, el ruido biológico y técnico podría jugar un papel más destacado, entorpeciendo la identificación de señales reales⁴¹⁶. La heterogeneidad dentro de grupos más grandes podría introducir variabilidad adicional. Igualmente, pese a la eficacia de la técnica de PCR, su utilidad puede limitarse en cohortes numerosas, donde la expresión de miARNs puede ser más estable y los cambios menos notorios, especialmente con diferencias modestas^{417–420}.

Los miARNs del perfil 1 sobresalen como posibles marcadores diagnósticos para distinguir entre los fenotipos de asma eosinofílica y no eosinofílica, mientras que los de los perfiles 2 y 3 podrían ser indicadores diagnósticos para discernir entre los fenotipos de asma grave tratada y no tratada con GCOs. Estos hallazgos sugieren el potencial de estos miARNs como biomarcadores del asma, demostrando su eficacia en la caracterización de fenotipos en pacientes con esta condición.

Discusión

Se examinaron mediante RT-qPCR los 5 miARNs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p) con expresión diferencial en suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, en suero de sujetos con asma grave (tanto tratados como no tratados con GCOs) y de individuos donantes voluntarios sanos (grupo control). Se evidenció la expresión diferencial en hsa-miR-148b-3p, con una sobreexpresión en los sujetos con asma. Además, se evaluó por RT-qPCR la expresión de estos 5 miARNs, junto con los 2 miARNs (hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p) diferencialmente expresados en suero entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, en biopsias pulmonares de individuos diagnosticados con asma y de sujetos sin diagnóstico de esta afección. Se constató la expresión diferencial de hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p y hsa-miR-769-5p, con una sobreexpresión de estos en los individuos diagnosticados con asma.

En resumen, estos resultados indican que hsa-miR-148b-3p en suero, y hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p y hsa-miR-769-5p en tejido pulmonar (biopsias pulmonares), podrían servir como biomarcadores para el asma, exhibiendo una efectividad prometedora en la discriminación de sujetos afectados por esta enfermedad y aquellos que no lo están.

7.3.1.1. Explorando las interacciones miARNs-gen(es) en biopsias pulmonares: implicación de los miARNs y sus genes diana en vías de señalización u otros procesos en el asma

Después de analizar la expresión de los miARNs en biopsias pulmonares de individuos con y sin diagnóstico de asma, se estudió la expresión de genes diana mediante RT-qPCR. Se exploró la asociación entre los miARNs desregulados y genes seleccionados involucrados en vías de señalización u otros procesos moduladas por estos miARNs empleando la herramienta bioinformática DIANA-miRPath v3.0²⁸⁴. De los genes diana que fueron objeto de evaluación, como cinasa 6 dependiente de ciclina (*CDK6*; del inglés, *Cyclin-Dependent Kinase 6*), ciclina D1 (*CCND1*; *Cyclin D1*) e *IGFBP3* para hsa-miR-26a-1-3p; cadena α 1 del colágeno tipo III (*COL3A1*; del inglés, *Collagen type III α 1 chain*), cadena α 2 del colágeno tipo VI (*COL6A2*; del inglés, *Collagen type VI α 2 chain*), cadena α 1 del colágeno tipo I (*COL1A1*; del inglés, *Collagen type I α 1 chain*) y cadena α 3 del colágeno tipo VI (*COL6A3*; del inglés, *Collagen type VI α 3 chain*) para hsa-miR-376a-3p; receptor 1 del TGF- β (*TGFBR1*; del inglés, *TGF- β receptor 1*), caja de horquilla O3 (*FOXO3*; del inglés, *Forkhead Box O3*) y *PTEN* para hsa-miR-148b-3p; y proteína cinasa 3 activada por mitógenos (*MAPK3*; del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase 3*) para hsa-miR-221-5p, solo se vieron diferencias en la expresión de *IGFBP3*, *FOXO3*, *PTEN* y *MAPK3* entre sujetos con y sin diagnóstico de asma. La expresión de estos cuatro genes fue superior en los individuos con diagnosticados con asma.

En particular, *IGFBP3* y *PTEN* participan en la vía de señalización de la proteína p53, mientras que *FOXO3*, junto con *PTEN*, intervienen en la vía de señalización de FoxO. Por otro lado, *MAPK3* toma parte en las vías de regulación del citoesqueleto de actina y de las uniones adherentes. Dado que los miARNs desregulados (hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-148b-3p y hsa-miR-221-5p) contribuyen al control de diversas vías fundamentales del asma, se enfatiza la importancia de sus genes diana inflamatorios (*IGFBP3*, *FOXO3*, *PTEN* y *MAPK3*) en la patología asmática, respaldando investigaciones previas⁴²¹⁻⁴²⁴.

Además, se observó una correlación directa entre hsa-miR-26a-1-3p e *IGFBP3*, así como entre hsa-miR-221-5p y *MAPK3* en la población total, tanto en los sujetos con diagnóstico de asma como en aquellos sin este diagnóstico. Generalmente se espera una relación inversa entre los miARNs y sus genes diana, donde un aumento en la expresión de un miARN conlleva una disminución en la expresión del gen diana, y viceversa⁴²⁵. Esto se debe a que cuando un miARN se une a un ARNm, puede inhibir su traducción en proteína o inducir su degradación, reduciendo así la cantidad de proteína producida a partir de ese gen²¹³. En cambio, en estos casos se contempló una dinámica opuesta. La explicación podría residir en la intrincación de las interrelaciones miARN-ARNm⁴²⁶.

Las variaciones en las biopsias pulmonares analizadas pueden ser resultado de factores genéticos y ambientales^{427,428}. Además, es plausible la intervención de otros miARNs en la modulación de ARNm específicos, como *IGFBP-3* o *MAPK3*, creando una red de regulación más compleja. También, hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-221-5p podrían estar conectados con otros de sus genes diana, lo que podría llevar al control inverso de *IGFBP3* o *MAPK3* de manera indirecta, promoviendo ciclos de retroalimentación positiva mediados por estos miARNs⁴²⁹. Estos argumentos resaltan la complejidad de la modulación postranscripcional miARN-ARNm en el tejido examinado.

7.3.1.2. Interrelación entre los miARNs, sus genes diana y las proteínas del eje IGF: efectos fenotípicos de los miARNs en la influencia de la obesidad como condición comórbida del asma

Para profundizar en el vínculo entre los miARNs y sus genes diana, se evaluó la expresión sérica de las proteínas extracelulares solubles *IGFBP-3* e *IGF-1R* en pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como en pacientes con asma obesos y no obesos. Estas proteínas, que participan en el eje IGF, son codificadas por los genes *IGFBP3* e *IGF1R*, siendo dianas de los miARNs hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p, respectivamente^{143,430-433}. Aunque no hubo diferencias en los niveles de *IGFBP-3* e *IGF-1R* entre los grupos de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, se encontraron diferencias en sus concentraciones entre pacientes con asma obesos y no obesos. Los niveles séricos de *IGFBP-3* fueron más elevados en los pacientes con asma no obesos y, por el contrario, la concentración sérica de *IGF-1R* resultó inferior en este mismo grupo. Al clasificar a los pacientes asmáticos en cuatro grupos según la presencia de eosinofilia en sangre periférica y obesidad (asma eosinofílica obesa, asma eosinofílica no obesa, asma no eosinofílica obesa y asma no eosinofílica no obesa), se registraron niveles séricos de *IGFBP-3* más altos en los pacientes con asma no obesos en comparación con los obesos, tanto en aquellos con asma eosinofílica como no eosinofílica. Además, se detectaron mayores niveles séricos de *IGF-1R* en los pacientes con asma obesos en comparación con los no obesos, especialmente notables en los pacientes con asma eosinofílica obesa.

En síntesis, tanto los datos anteriores como los últimos hallazgos apuntan a que las proteínas *IGFBP-3* e *IGF-1R* están asociadas con el asma y podrían desempeñar un papel activo, particularmente en el marco de la obesidad como comorbilidad⁴³⁴⁻⁴³⁷. Esto se manifiesta en las diferencias en sus niveles entre pacientes con asma obesos y no obesos, así como en la condición de presencia o ausencia de eosinofilia en sangre periférica, subrayando la influencia significativa de la obesidad en esta relación.

Tras inspeccionar la expresión de los miARNs hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p en suero de pacientes con asma, ya sean obesos o no, se apreció una tendencia al incremento de la expresión sérica

de hsa-miR-26a-1-3p en los pacientes con asma obesos, mientras que la expresión de hsa-miR-376a-3p fue más baja en este grupo en comparación con los pacientes con asma no obesos. Al categorizar a los pacientes asmáticos en función de la eosinofilia en sangre periférica y el IMC, se percibió una expresión más pronunciada de ambos miARNs séricos en los pacientes con asma eosinofílica, tanto en individuos obesos como no obesos. Se evidenció una expresión superior de hsa-miR-26a-1-3p en los pacientes con asma obesos en comparación con los no obesos, sobre todo en aquellos sin eosinofilia. Sin embargo, la expresión de hsa-miR-376a-3p fue más alta en los pacientes con asma no obesos en comparación con los obesos, principalmente en aquellos sin eosinofilia.

En definitiva, la nueva información acentúa la conexión entre los miARNs séricos hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p (miARNs circulantes) y la condición asmática^{219,332,372}, indicando su potencial como biomarcadores del asma y su capacidad para identificar y describir fenotipos de esta afección. Estos resultados incluyen los fenotipos de asma eosinofílica y no eosinofílica, así como su vinculación con la obesidad como comorbilidad.

7.3.1.3. Correlación entre la expresión de los miARNs y las proteínas con los parámetros clínicos: vínculos de los miARNs con el asma, sus comorbilidades y las posibles implicaciones en su fisiopatología

La correlación entre la expresión de los miARNs y los parámetros clínicos respalda su utilidad como biomarcadores del asma y su contribución a la diferenciación de fenotipos^{388,438}. Se observó una asociación negativa entre los valores de ΔCt de hsa-miR-26a-1-3p y los recuentos de eosinófilos en sangre periférica en el conjunto total de sujetos, abarcando tanto a los pacientes con asma eosinofílica como aquellos con asma no eosinofílica. Recordar que un valor ΔCt más elevado denota una menor expresión del miARN. En este caso, la expresión de hsa-miR-26a-1-3p aumentó a medida que se incrementó el conteo de eosinófilos en sangre periférica. Por otra parte, los valores de ΔCt de hsa-miR-376a-3p se correlacionaron inversamente con los niveles de FeNO en la población completa (pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica), así como con el número de exacerbaciones del asma en el año anterior en el grupo de pacientes con asma eosinofílica y en toda la población. En consecuencia, la expresión de hsa-miR-376a-3p se acrecentó en concordancia con las mediciones de FeNO y la cantidad de episodios de agravamiento del asma en el año previo.

Se estableció una correlación positiva entre las puntuaciones de ΔCt de hsa-miR-148b-3p y el porcentaje de FEV₁/FVC en los individuos con asma, tanto en comparación con los sujetos control en suero como al comparar los grupos de pacientes con asma grave tratados o no tratados con GCOs en suero. De forma similar, se halló una asociación directa entre las cifras de ΔCt de hsa-miR-221-5p y el porcentaje de FEV₁/FVC, pero únicamente en el grupo de pacientes con asma grave tratados con GCOs (comparativa entre pacientes con asma grave tratados o no tratados con GCOs en suero).

La expresión de hsa-miR-148b-3p y hsa-miR-221-5p disminuyó a medida que aumentó el FEV₁/FVC. Asimismo, se identificó una relación negativa entre los valores de ΔCt de hsa-miR-26a-1-3p y las mediciones del IMC en el grupo de pacientes con asma no eosinofílica y en la población total (pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica). También, se detectó una asociación inversa entre los niveles de concentración de IGFBP-3 y las evaluaciones del IMC en el grupo de pacientes con asma eosinofílica y

en la totalidad de la población, señalando que la expresión de hsa-miR-26a-1-3p se elevó proporcionalmente al IMC, mientras que los niveles de IGFBP-3 mermaron con el aumento del IMC.

La correlación entre los niveles de expresión de los miARNs y las variables clínicas sugiere que estos miARNs no solo son útiles como biomarcadores del asma, sino que también podrían tener funciones en su fisiopatología al estar ligados con los aspectos clínicos.

7.3.1.4. Interpretación de las respuestas de los miARNs: importancia de los modelos celulares para entender las respuestas terapéuticas en el asma

Es crucial destacar la relevancia de los modelos biológicos *in vitro* en la investigación científica⁴³⁹. Nuestra indagación de los perfiles diferenciales de miARNs se benefició de SAEC y BSMC, representativas de las células estructurales del pulmón¹⁷⁵. Las células epiteliales y musculares bronquiales de las vías respiratorias tienen un papel crítico en el asma, ya sea eosinofílica o neutrofílica. Esta función se manifiesta a través de fenómenos como el descamado epitelial, la fibrosis subepitelial, el incremento de la masa muscular y la polarización hacia un comportamiento contráctil, todos ellos vinculados al proceso de remodelado de las vías respiratorias⁴⁴⁰. Los modelos celulares *in vitro* permiten estudiar fenómenos biológicos, contemplando mecanismos moleculares, de manera controlada, precisa y simplificada, reduciendo la complejidad de los sistemas vivos y acortando los periodos de estudio^{439,441-445}. En nuestro caso, utilizar SAEC y BSMC nos permitió enfocarnos en el efecto de la dexametasona, un GC, en la expresión de los 5 miARNs diferenciales confirmados entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs en suero. No obstante, al no encontrar alteraciones significativas en la expresión de los miARNs después de la exposición a la dexametasona a corto (4 h) o largo (24 h) plazo en los dos tipos celulares mediante RT-qPCR, estas diferencias en su expresión no están relacionadas con el tratamiento con GCs en sí mismo, sino que podrían estar asociadas a la gravedad del asma u otros factores en los pacientes que requieren tratamiento con GCOs. Por consiguiente, estos modelos celulares nos proporcionaron una comprensión más detallada en el ámbito terapéutico al examinar la expresión de los miARNs.

En conclusión, este enfoque minucioso, que aborda distintos escenarios como el suero y el tejido pulmonar, ha proporcionado una comprensión más completa de los perfiles de miARNs tanto circulantes como locales en el asma. Los avances logrados con este trabajo en la identificación de biomarcadores específicos para el asma plantean la perspectiva de una clasificación más precisa de los pacientes y el desarrollo de tratamientos personalizados empleando estas herramientas, los miARNs.

7.4. Los exosomas y su composición proteica en el fenotipado del asma. Objetivo 3

Los exosomas derivados de eosinófilos y de otras células del sistema inmune con capacidad para secretar exosomas, como células dendríticas, células B, células T, macrófagos y mastocitos, tienen una funcionalidad importante en el asma debido a la presencia, entre otros componentes, de proteínas esenciales implicadas en el desarrollo y la progresión esta enfermedad^{175,446}.

El uso de técnicas ómicas (genómica, metabolómica, proteómica, transcriptómica, etc.) desempeña un papel fundamental en la investigación a gran escala para la búsqueda de posibles biomarcadores moleculares de patologías⁴⁴⁷. Las VEs ejercen una función destacada en la patogénesis de múltiples

Discusión

afecciones y su composición biomolecular refleja el estado fisiológico y patológico de las células precursoras. Con el avance de las tecnologías ómicas, se han intensificado los estudios acerca de las proteínas contenidas en las VEs a través de técnicas proteómicas, con la intención de descubrir indicadores moleculares efectivos que posibilitan el diagnóstico precoz en una variedad de tipos de cáncer^{448–450}.

Para abordar el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral, que consistió en caracterizar el contenido proteico de los exosomas purificados de suero y de sobrenadante de esputo de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, se verificó la existencia de exosomas aislados en las dos muestras biológicas. La confirmación se basó en la detección de CD63 y ALIX, moléculas clave que describen a los exosomas y que comúnmente se usan como marcadores proteicos de estas VEs²⁹⁴. Estas proteínas fueron seleccionadas debido a su relevancia en la biogénesis de los MVBs y los exosomas⁴⁵¹. Además, se aseguró la ausencia de calnexina, una proteína negativa para los exosomas, evitando influencias de proteínas residuales de las células de origen⁴⁵². La presencia de CD63 y ALIX, junto con la carencia de calnexina, se corroboró mediante ensayos de reconocimiento de proteínas por *Western blot*.

Después de comprobar la existencia de los exosomas, se determinó su perfil proteico mediante nano-cromatografía líquida de fase reversa acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución. Se identificó y cuantificó la abundancia de un número superior de proteínas en los exosomas purificados de sobrenadante de esputo (1.934 proteínas) en comparación con los exosomas aislados de suero (403 proteínas). Esta disparidad podría atribuirse a factores como la diferencia en la concentración de los exosomas (el suero, al ser una muestra más diluida en contraste con el esputo, podría albergar menos exosomas), el origen y contenido de estos, los métodos de purificación (que podrían influir en la cuantía y composición de los exosomas obtenidos) y las limitaciones técnicas en el análisis de proteínas (que, sumado a la sensibilidad de los equipos utilizados, podría afectar a la cantidad de proteínas).

Se detectaron perfiles distintivos de exosomas en suero y en sobrenadante de esputo de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica. Con relación a las proteínas que mostraron diferencias significativas en su abundancia entre los grupos de pacientes asmáticos, pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, se hallaron 18 de 27 proteínas de los exosomas de suero ($p < 0,02$) y 111 de 316 proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo ($p \leq 0,01$) en ambos grupos de pacientes con asma. Las proteínas restantes fueron únicas de uno de los dos grupos de pacientes asmáticos.

La nano-cromatografía líquida de fase reversa acoplada espectrometría de masas no identificó los marcadores de exosomas establecidos por *Western blot* (CD63 y ALIX). Esto podría deberse a que la espectrometría de masas, al detectar péptidos específicos entre una gran diversidad, podría ser potencialmente menos sensible que el *Western blot*, lo que podría llevar a que algunos péptidos pasen desapercibidos durante la identificación. A diferencia del *Western blot*, que busca y amplifica señales de moléculas específicas, la espectrometría de masas permitió la descripción de otros marcadores de exosomas, como tetraspanina-9 (TSPAN9; del inglés, *Tetraspanin-9*) y RAP2B en los exosomas de suero, como también algunas HSPs y RABs en los exosomas de sobrenadante de esputo.

Entre las proteínas identificadas, 9 de 27 proteínas de los exosomas de suero y 209 de 316 proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo habían sido previamente encontradas en el proteoma completo de los eosinófilos⁴⁵³, lo que apunta hacia un origen eosinofílico de los exosomas.

En cuanto a las proteínas de los exosomas de suero, se resaltan especialmente dos proteínas: FLG, exclusiva en los pacientes con asma no eosinofílica, y CD44, más abundante en los pacientes con asma eosinofílica. Estas proteínas están relacionadas con la inflamación de las vías aéreas en el asma. En el contexto de las citocinas T2 en el asma, Gao *et al.* observaron que la deficiencia de FLG en las células epiteliales respiratorias puede incrementar la permeabilidad epitelial y la expresión de IL-33/TSLP, retroalimentando positivamente la respuesta inflamatoria T2²⁹⁸. Katoh subrayó la importancia de CD44 en la acumulación de células Th2 específicas de alérgenos en las vías aéreas en modelos de ratón de asma aguda desencadenada por alérgenos²⁹⁹. Sano *et al.* vieron que CD44 se expresa constitutivamente en eosinófilos en estado de reposo (inactivos) y que su expresión se eleva tras la activación de estos mediada por citocinas⁴⁵⁴.

Por otro lado, en los exosomas de sobrenadante de esputo, sobresalen tres proteínas básicas o catiónicas primordiales de los eosinófilos, que presentaron una mayor abundancia en pacientes con asma eosinofílica. Estas proteínas, PRG2 o MBP, EPX o EPO y RNASE2 o EDN, se localizan en los gránulos secundarios o específicos de los eosinófilos⁴⁵⁵. Además, se destaca CLC o galectina-10, también con una abundancia más alta en pacientes con asma eosinofílica, típica de los gránulos primarios o azurófilos de los eosinófilos. Estas proteínas de los eosinófilos son conocidas por su papel esencial en el asma^{111,456}.

La diferencia en la presencia de estas proteínas en los exosomas de sobrenadante de esputo en comparación con los exosomas de suero donde no fueron detectadas, podría ser consecuencia de varias razones. Esto incluye la constitución de proteínas de los exosomas (liberados por diferentes tipos de células y en distintos microambientes biológicos), la composición celular de las muestras biológicas de las que provienen estos (los exosomas de sobrenadante de esputo reflejan la respuesta inmunitaria local y pueden ser ricos en proteínas vinculadas con la inflamación, sobre todo al ser secretados por células inflamatorias como los eosinófilos), la variabilidad en el origen (pueden proceder de variedad de células, y la contribución relativa de los diferentes tipos celulares a la población de exosomas puede ser variable entre suero y sobrenadante de esputo), los métodos de aislamiento y las restricciones técnicas en el análisis de proteínas.

Además de las proteínas del sobrenadante de esputo ya mencionadas, otras son relevantes por su asociación con los eosinófilos y su función en el asma. Entre estas figuran CD101, antileucoproteína o inhibidor de proteasa leucocitaria secretora (SLPI; del inglés, *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*), receptor 1 de C5a (C5AR1; del inglés, *C5a Receptor 1*), ligando 10 de quimiocina de motivo C-X-C (CXCL10; del inglés, *C-X-C motif chemokine Ligand 10*), y antígeno de histocompatibilidad de clase I, cadena α E (HLA-E; del inglés, *Histocompatibility Antigen class I, α chain-E*).

Van Hulst *et al.* indicaron que los subconjuntos de eosinófilos regulatorios e inflamatorios se distinguen por la expresión de los marcadores lectina F similar a inmunoglobulina de unión a ácido siálico (SIGLEC-F; del inglés, *Sialic acid-binding Immunoglobulin-like Lectin-F*) y CD101. Al contrario de los eosinófilos regulatorios, los eosinófilos inflamatorios se caracterizan por tener una elevada expresión de

Discusión

SIGLEC-F y ser CD101⁺³²¹. Osiecka *et al.* reportaron que los eosinófilos humanos son una de las principales fuentes de SLPI, almacenándose en el núcleo cristalino de sus gránulos⁴⁵⁷. Raundhal *et al.* informaron que la expresión de SLPI se regula negativamente en situaciones de afección grave, como el asma grave, tanto en humanos como en modelos animales de ratón, lo que podría explicar la disminución de la función pulmonar en el asma grave, ya que el SLPI es un inhibidor de la HRB⁴⁵⁸.

Wiese *et al.* registraron una expresión incrementada de C5aR1 en eosinófilos inflamatorios en comparación con los eosinófilos residentes. En modelos de ratón de asma alérgica carentes de *C5ar1*, notaron una disminución en el tráfico de eosinófilos inflamatorios y una menor producción de IL-5 (una citocina fundamental en la activación y supervivencia de los eosinófilos) por ILC2s⁴⁵⁹. Nakagome y Nagata, afirmaron que CXCL10 activa los eosinófilos *in vitro* y está regulada al alza en el asma inducida por virus⁴⁶⁰. Finalmente, Baines *et al.* revelaron una posible correlación entre el grado de obstrucción de las vías respiratorias en el asma y algunos genes, incluido *HLA-E*⁴⁶¹.

En el diagrama de Venn se puso de manifiesto que solo 3 proteínas, PSMB1, SHBG y BCHE, eran compartidas por los exosomas de suero (27 proteínas) y de sobrenadante de esputo (316 proteínas). La abundancia de SHBG era más baja en los exosomas de suero en los pacientes con asma eosinofílica en comparación con aquellos con asma no eosinofílica, y era única de los exosomas de sobrenadante de esputo en pacientes con asma eosinofílica. Por otra parte, la abundancia de las otras dos proteínas fue superior, con PSMB1 en los exosomas de sobrenadante de esputo y BCHE en los exosomas de suero, o eran exclusivas, con PSMB1 en los exosomas de suero y BCHE en los exosomas de sobrenadante de esputo, en los pacientes con asma eosinofílica.

De estas 3 proteínas, solamente PSMB1 ha sido reconocida en el proteoma completo de los eosinófilos⁴⁵³ y podría estar involucrada en la patogénesis del asma. Liu *et al.* señalaron que la subunidad β tipo 3 del proteasoma (PSMB3; del inglés, *Proteasome subunit β type 3*) podría interferir desfavorablemente en el mecanismo de protección de los GCs en la desensibilización de los receptores adrenérgicos β_2 , dianas de agonistas como el salbutamol para aliviar los síntomas de pacientes asmáticos. Nuestros resultados, con PSMB1 única en los exosomas de suero, y PSMB1 y PSMB3 más abundantes en los exosomas de sobrenadante de esputo en los pacientes con asma eosinofílica, concuerdan con los hallazgos de Liu *et al.* y sugieren un posible efecto perjudicial en la eficacia protectora de los GCs en la desensibilización de los receptores adrenérgicos β_2 en estos pacientes, quienes experimentan un fenotipo del asma más grave y suelen recibir tratamiento con GCs⁴⁶².

Respecto a SHBG, Arathimos *et al.* proporcionaron indicios de que un aumento en sus niveles circulantes se vincula con una reducción en el riesgo de desarrollar asma, particularmente en mujeres⁴⁶³. En nuestro estudio, encontramos una menor existencia de SHBG en los exosomas de suero en los pacientes con asma eosinofílica en comparación con aquellos con asma no eosinofílica. Dado que el asma eosinofílica tiende a ser más grave que el asma no eosinofílica, se podría argumentar que el nivel de expresión de SHBG guarda una correlación inversa con la gravedad. Por otro lado, Ben Anes *et al.* comunicaron una mayor actividad de BCHE en pacientes con EPOC y una asociación positiva entre la actividad de BCHE y el daño oxidativo⁴⁶⁴. De manera similar, en nuestro estudio, observamos una abundancia más alta de BCHE en los exosomas de suero, así como su exclusividad en los exosomas de sobrenadante de esputo en los pacientes con asma eosinofílica. Este hallazgo podría interpretarse como una respuesta

compensatoria a una inflamación más intensa y al estrés oxidativo, con la consiguiente acumulación de oxidantes y radicales libres.

7.4.1. Proteínas exosomales en el centro del escenario: papel en los procesos biológicos asociados al asma

Las proteínas de los exosomas de suero están mayoritariamente ligadas a procesos biológicos relacionados con el sistema inmune, representando el 78,26% del total. El sistema inmune está estrechamente vinculado a la condición asmática debido a su implicación en la respuesta inflamatoria crónica de las vías aéreas, con la participación de células inmunológicas como eosinófilos y linfocitos⁴⁶⁵. Entre estos procesos, algunos son significativos en la patogénesis del asma, como la señalización por el receptor de células B (BCR; del inglés, *B-Cells Receptor*), la activación del BCR mediada por antígeno, la señalización del receptor FcεRI, y la activación de NF-κB, MAPK y la movilización de calcio (Ca²⁺) mediadas por FcεRI.

La señalización del receptor FcεRI involucra la colaboración de señales de diacilglicerol (DAG) y Ca²⁺ intracelular, activando proteínas cinasas C (PKCs; del inglés, *Kinase Protein(s) C*) y, a su vez, otras vías como la de NF-κB. La fosforilación de proteínas en la cascada de señalización del receptor FcεRI resulta en el reclutamiento y la activación de otras proteínas, entre ellas MAPK, lo que provoca la degranulación de mastocitos y la producción de citocinas³⁰¹. En relación con la activación del BCR mediada por antígeno, se destaca que la concentración de antígeno juega un rol crítico en la acción de las células B en el asma alérgica desencadenada por ácaros del polvo doméstico⁴⁶⁶.

Por otra parte, en la categoría hemostasia, aunque se limita al proceso de interacciones de la superficie celular en la pared vascular, tiene un papel crucial en enfermedades pulmonares como el asma. Las células inflamatorias deben migrar a través de las células endoteliales para llegar al tejido pulmonar, lo que conlleva la adhesión inicial de los leucocitos a las células endoteliales en sitios inflamatorios, seguida de su desplazamiento entre las células endoteliales, donde proteínas como CD44 cumplen una función clave en esta interacción^{467,468}.

Las proteínas de los exosomas de sobrenadante de esputo intervienen en más procesos biológicos, algunos íntimamente asociados con la patología asmática. Las tres categorías predominantes son metabolismo, ciclo celular y transducción de señales. Estas categorías, que superan el 10% cada una y comprenden cerca del 50% de todos los procesos, están fuertemente relacionadas con procesos de marcada actividad, sugiriendo que los exosomas de sobrenadante de esputo están conformados por proteínas de notable actividad. Entre los procesos de estas categorías, se resaltan el metabolismo del glucógeno, la respuesta al daño en el ADN dependiente de p53 y las cascadas de señalización de la familia MAPK, los cuales están ligados a la afección asmática. El empleo prolongado de GCs ha demostrado generar alteraciones importantes en el metabolismo del glucógeno en el músculo esquelético, dando lugar a un incremento en la acumulación del mismo⁴⁶⁹. Asimismo, el daño en el ADN, fundamentalmente de doble cadena, desencadena una respuesta caracterizada por la activación de quinasas sensoras, la formación de focos de daño en el ADN con la histona H2AX fosforilada y la inducción de proteínas reguladoras del ciclo celular como p53 y p21. Estos sucesos culminan en la detención del ciclo celular, vinculándose con procesos de senescencia celular y evidenciando su

Discusión

relevancia en el asma⁴⁷⁰. Dentro del grupo de proteínas MAPK, el subgrupo p38 sobresale por su contribución a la inflamación de las vías respiratorias y los procesos pulmonares asociados al asma y la EPOC. Por consiguiente, la inhibición farmacológica de la cascada de señalización de p38 MAPK podría ofrecer perspectivas prometedoras para mejorar el tratamiento del asma y la EPOC⁴⁷¹.

En línea con lo observado en los exosomas del suero, las proteínas contenidas en los exosomas de sobrenadante de esputo, como las proteínas básicas o catiónicas del eosinófilo (PRG2, EPX y RNASE2), y otras mencionadas previamente, están implicadas en procesos del sistema inmune, siendo esta la cuarta categoría más representada. Ejemplos de procesos relacionados con la condición asmática dentro de la categoría sistema inmune incluyen el sistema inmune innato, la degranulación de neutrófilos, la señalización no canónica de NF- κ B (--> NIK o mediada por dectina-1), la señalización por el BCR, la señalización aguas abajo del TCR, el sistema inmune adaptativo y la respuesta inmunitaria innata antivírica.

Los neutrófilos, células efectoras esenciales en la respuesta inmunitaria innata y posibles protagonistas en el asma no T2 (T2-bajo), combaten a los patógenos mediante la fagocitosis y la liberación de sus contenidos granulares (degranulación). La formación excesiva de trampas extracelulares de neutrófilos, estructuras liberadas para defenderse de patógenos invasores, pueden contribuir al daño de las vías respiratorias y agravar el asma⁴⁷². Por otro lado, la inflamación T2 en el asma se origina por la compleja interacción entre el epitelio de las vías aéreas y los sistemas inmunes innato y adaptativo⁴⁷³. El sistema ubiquitina-proteasoma regula la actividad de NF- κ B, un factor de transcripción vital en la expresión de genes proinflamatorios, conduciendo a la producción de citocinas, moléculas de adhesión, quimiocinas, factores de crecimiento y enzimas cruciales en trastornos pulmonares inflamatorios como el asma⁴⁷⁴. Se ha constatado una regulación negativa de la señalización del BCR en la exacerbación del asma⁴⁷⁵. Además, en modelos de ratón de asma, las células Th2 *Dennd1b^{-/-}* muestran retrasos en la modulación descendente del TCR, una señalización del TCR aumentada y un aumento en la secreción de citocinas efectoras⁴⁷⁶. En el asma desencadenada por virus, se registra un incremento en los niveles séricos de CXCL10, los cuales correlacionan con la gravedad de la enfermedad⁴⁷⁷.

En otras categorías, con una menor presencia de procesos biológicos, como las categorías de respuestas celulares a estímulos y muerte celular programada, se destacan, respectivamente, los procesos biológicos vía KEAP1-NFE2L2 (o NRF2) y apoptosis, que involucran al proteasoma⁴⁷⁸⁻⁴⁸⁰. En la categoría de motilidad celular, se resalta el proceso del movimiento del cilio epitelial, fundamental en la circulación del líquido extracelular. Los cilios de las células epiteliales de las vías respiratorias son móviles y tienen funciones sensoriales, respondiendo a estímulos mecánicos y químicos. La motilidad ciliar se ve influenciada por factores como el pH y la viscosidad del medio líquido extracelular circundante, entre otros⁴⁸¹. Para terminar, en la categoría de enzimas, se encuentra el proceso de actividad catalítica, donde participan proteínas clásicas de eosinófilos, como EPX y RNASE2^{482,483}.

En el diagrama de Venn se mostró que solo 1 proceso biológico, la señalización del receptor Fc ϵ RI, era común a las proteínas de los exosomas de suero (23 procesos biológicos) y a las del sobrenadante de esputo (248 procesos biológicos). Este proceso, asociado a la patología asmática, especialmente al asma alérgica³⁰¹, apunta a que las proteínas presentes en los exosomas de ambos tipos de muestras

desempeñan un papel destacado en la afección asmática a niveles sistémico y local, indicando una conexión en este proceso específico a distintos niveles.

En resumen, los resultados logrados en esta Tesis Doctoral (figura resumen) evidencian el cumplimiento de los objetivos al descubrir dos perfiles séricos de miARNs diferenciales entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como entre estos dos fenotipos, considerando además la obesidad como comorbilidad del asma (2 miARNs: hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p), y entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs (5 miARNs: hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p). También se observaron diferencias en la expresión de hsa-miR-148b-3p en suero entre individuos con asma (asma grave tratados y no tratados con GCOs) y sujetos sin asma (individuos sanos control). Estos miARNs circulantes podrían servir como biomarcadores del asma, ayudando en el diagnóstico y la categorización de pacientes con diferentes fenotipos de la enfermedad. Además, la expresión diferencial de 3 de estos miARNs (hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p y hsa-miR-769-5p) en biopsias pulmonares entre sujetos con asma e individuos sin diagnóstico de asma (sujetos control) acentúa su vínculo con la condición asmática. Por último, las variaciones en el contenido proteico de los exosomas de suero y de sobrenadante de esputo, tanto entre los grupos de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica como entre los dos tipos de muestras, aluden a que las proteínas, además de los miARNs, podrían ser útiles como marcadores para discriminar entre distintos fenotipos del asma.

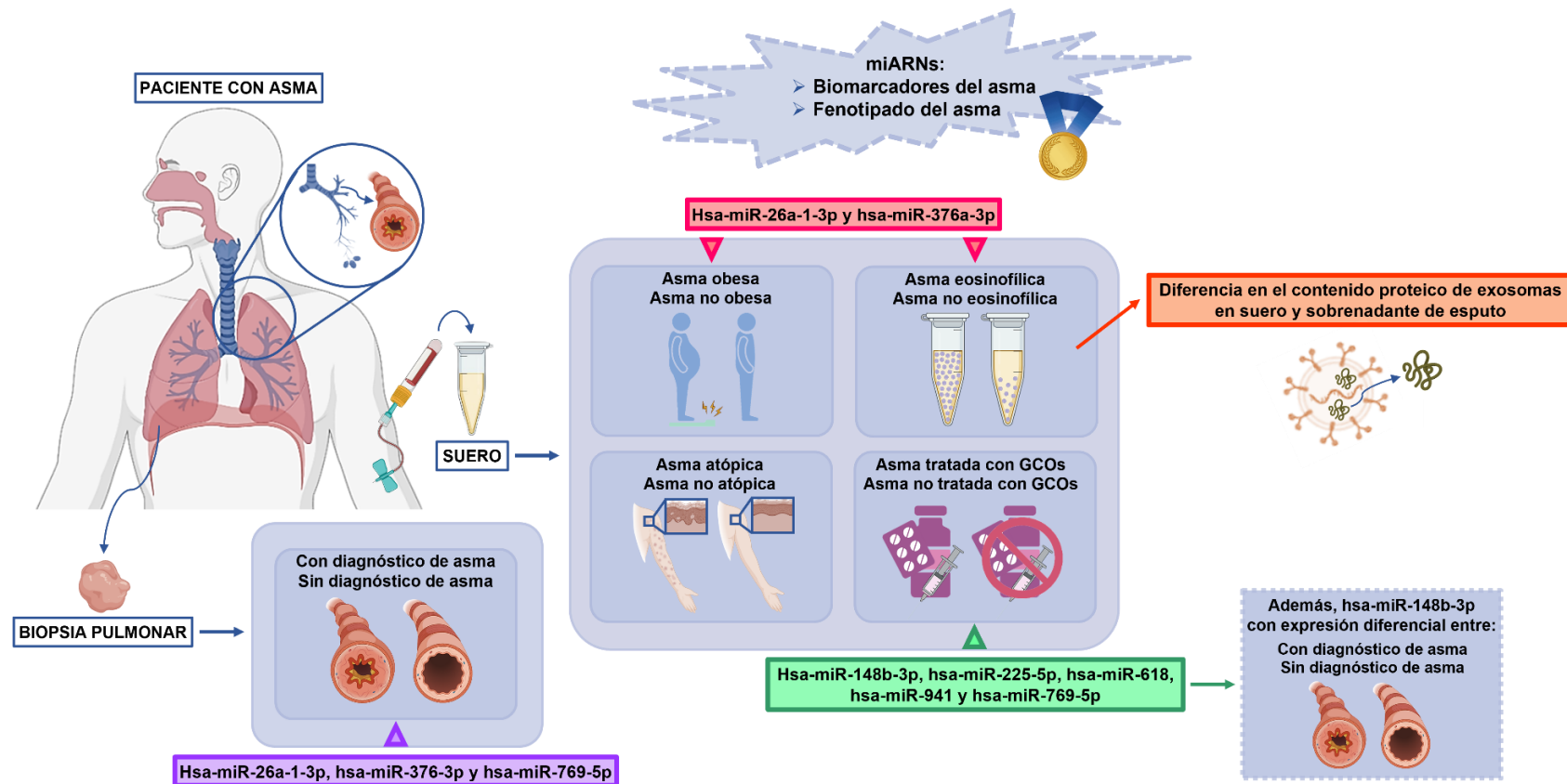
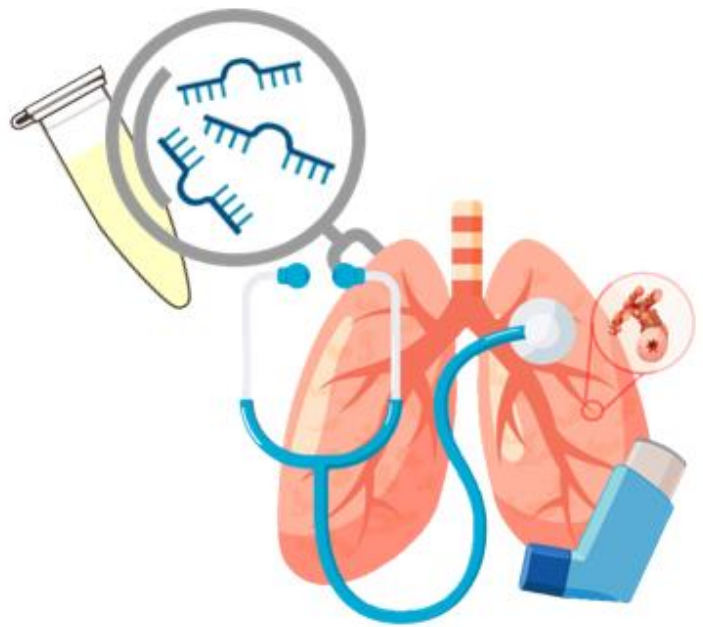


Figura resumen. Infografía de los resultados significativos de esta Tesis Doctoral. Se identificaron dos perfiles de miARNs circulantes usando muestras de suero. El primero incorpora los miARNs hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p, con diferencias de expresión entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, así como entre estos dos fenotipos, considerando además la obesidad como comorbilidad del asma. Se observaron diferencias en el perfil proteico de los exosomas de suero y de sobrenadante de esputo entre el asma eosinofílica y no eosinofílica. El segundo perfil incluye los miARNs hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p, con expresión diferencial entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs. Igualmente, se detectaron diferencias de expresión de hsa-miR-148b-3p entre individuos con asma (asma grave tratados y no tratados con GCOs) y sin diagnóstico de asma (sujetos sanos control). Estos hallazgos sugieren que la expresión de estos miARNs podría ser útil tanto en el diagnóstico como en la diferenciación de fenotipos del asma. Estos miARNs se postulan como biomarcadores prometedores para esta patología. Además, se vio una expresión diferencial de 3 de los miARNs séricos (hsa-miR-26a-1-3p, hsa-miR-376a-3p y hsa-miR-769-5p) en biopsias pulmonares entre individuos con asma y sin diagnóstico de asma (sujetos control), fortaleciendo su asociación con la condición asmática y destacando su relevancia en la comprensión y evaluación de la afección, especialmente considerando la inflamación pulmonar. Figura creada con BioRender (BioRender.com).



Limitaciones

8. LIMITACIONES

Esta Tesis Doctoral representa un avance significativo en la investigación de la patología asmática al identificar mediadores, como miARNs y otras moléculas señalizadoras, no previamente descritas en la clasificación del asma. Estos hallazgos permiten categorizar a los pacientes en subgrupos más específicos según características clínicas, inflamatorias, fisiológicas y genéticas, simplificando el camino hacia tratamientos personalizados y más eficaces. Aunque los datos son preliminares, proporcionan una base para futuras investigaciones. Es crucial validar las moléculas en estudios con un mayor número de muestras, confirmar su utilidad como biomarcadores y explorar los mecanismos moleculares para encontrar posibles dianas terapéuticas. Este enfoque no solo mejoraría la comprensión de la enfermedad asmática, sino que también conduciría al desarrollo de estrategias terapéuticas más eficientes y dirigidas.

Reclutar pacientes con asma y obtener muestras clínicas para estudios clínicos es una tarea exigente que demanda un esfuerzo significativo. Se necesita colaboración y coordinación entre diversas disciplinas en el ámbito sanitario, como médicos, enfermeros, investigadores y personal especializado. Esto implica una planificación cuidadosa y una comunicación efectiva entre todos los involucrados.

A pesar de los notables avances en esta Tesis Doctoral, se deben considerar limitaciones importantes. La disponibilidad limitada de recursos y de tiempo afectó a la recopilación y el análisis de datos, influenciando el tamaño de la muestra y la posibilidad de realizar experimentos adicionales. La complejidad intrínseca al área de estudio también planteó desafíos en la interpretación de los resultados y su extrapolación a contextos más amplios. Además, la pandemia de la Enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) impactó marcadamente la adquisición de material de laboratorio y la ejecución de experimentos debido a medidas de distanciamiento social y protocolos de seguridad, especialmente aquellos relacionados con la obtención de muestras de esputo.

Es fundamental reconocer las limitaciones de este proyecto, tanto las generales anteriormente señaladas como las específicas, que se detallarán a continuación, teniendo en cuenta su potencial repercusión en la interpretación de los hallazgos y en la formulación de conclusiones de la investigación. No obstante, enfrentarse a estas limitaciones puede dar lugar a avances y mejoras sustanciales en el trabajo científico. Además, estas limitaciones crean oportunidades para investigaciones posteriores, motivando a los investigadores a resolver cuestiones pendientes y buscar enfoques más holísticos en el campo de estudio.

8.1. Variabilidad en las características de los sujetos del estudio y, por ende, en sus muestras clínicas

En todas las comparaciones se incluyeron muestras de individuos diagnosticados con asma. La heterogeneidad de los pacientes asmáticos es esencial para comprender y abordar esta afección respiratoria crónica⁴⁸⁴. La diversidad en los perfiles clínicos ha llevado a la identificación de diferentes fenotipos y endotipos, contribuyendo a un mejor entendimiento de la patología y facilitando una atención médica personalizada⁴⁸⁵. Estos subtipos se basan en características clínicas, inflamatorias, fisiológicas y genéticas, clasificando a los pacientes con asma en subgrupos más específicos con necesidades particulares⁴⁸⁶. Sin embargo, la heterogeneidad, especialmente al utilizar grupos de muestras pequeñas, puede percibirse como una limitación. Esta variabilidad, al emplear cohortes de muestras de pequeña

Limitaciones

magnitud, dificulta la generalización y la extrapolación de los resultados a la población asmática en su conjunto. Los datos obtenidos podrían no haber reflejado completamente la variabilidad y la complejidad global del asma. En el proyecto MEGA²⁵⁷, se intentó minimizar esta limitación mediante una selección aleatoria, pero manteniendo una proporcionalidad en las características poblacionales dentro de cada grupo de comparación. A pesar de ello, estratificar entre variables para formar subgrupos homogéneos habría supuesto una disminución en la potencia estadística debido a la falta de conjuntos de sujetos lo suficientemente grandes. Respecto a los individuos asmáticos de los que se usaron muestras de biopsia pulmonar provistas por el Consorcio Biobanco Pulmonar CIBERES, el problema se superó al examinar todas las muestras disponibles.

La variabilidad biológica mencionada, sumada a factores no controlables como el entorno y las diferencias en la exposición a alérgenos y otros factores ambientales²⁵, complicó la detección de diferencias significativas en la expresión de miARNs entre pacientes con asma alérgica/atópica y no alérgica/atópica (proyecto MEGA²⁵⁷). La restricción en el tamaño de los grupos estudiados y la metodología utilizada también pudieron contribuir a esta dificultad⁴⁸⁷⁻⁴⁸⁹.

En relación con los pacientes con asma del proyecto MEGA²⁵⁷, se emplearon muestras de suero y de sobrenadante de esputo recolectadas en la VB. Estas muestras corresponden a pacientes diagnosticados con asma antes de ingresar al estudio, algunos de los cuales ya estaban bajo tratamiento, el cual fue suspendido o interrumpido (incluidos los GCOs y otros tratamientos) antes de la toma de muestras. El tratamiento, no uniforme entre los pacientes^{490,491}, podría haber influido en las mediciones de las moléculas analizadas¹¹². Además, la carencia de muestras pretratamiento impidió determinar si las diferencias en los perfiles de miARNs entre grupos de sujetos con asma grave tratados y no tratados con GCOs eran consecuencia del tratamiento en sí mismo o evidenciaban características basales inherentes a la enfermedad que incidieron en la elección del tratamiento.

En el proceso de investigación, se presentaron desafíos adicionales, como las discrepancias en la obtención de muestras de sangre periférica y esputo inducido, que fue llevada a cabo en dos Servicios diferentes (Alergología y Neumología) en distintos hospitales. Esta diversidad en los métodos o condiciones de recolección podría haber afectado la consistencia de las muestras recopiladas. Además, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la edad entre los grupos de individuos diagnosticados con asma y sujetos sin diagnóstico de asma que suministraron muestras de biopsia pulmonar para el análisis. Aunque esta diferencia no se consideró como un factor de confusión debido a la ausencia de significación estadística en comparaciones más amplias, como en el suero, donde se incorporaron muestras de más individuos, es probable que la edad no haya tenido un impacto considerable en la expresión de miARNs.

En último lugar, se destacó como contratiempo la carencia de muestras de sujetos control (individuos sanos sin diagnóstico de asma) en ciertas evaluaciones, como en el caso de sujetos con asma eosinofílica y no eosinofílica *versus* (vs.) individuos control. Se indicó que las muestras de suero de sujetos control provenían principalmente de médicos residentes del Servicio de Alergología (HUFJD) o miembros (sobre todo, investigadores predoctorales y postdoctorales) del Departamento de Inmunología (IIS-FJD), lo que limitaba el rango de edad a edades más jóvenes. Se enfatizó en el requerimiento de más muestras de individuos de edades más adultas para lograr una representación equitativa de todas las edades. Además,

se subrayó que los sujetos sin diagnóstico de asma de los cuales se usaron muestras de biopsia pulmonar mostraban otras afecciones pulmonares, lo que podría haber condicionado la ausencia de percepción de diferencias significativas en las moléculas examinadas.

8.2. Datos incompletos y aspectos clínicos no registrados de los individuos del estudio

Se analizó información de dos bases de datos clínicas. La base de datos de los sujetos asmáticos del proyecto MEGA²⁵⁷ incluye datos demográficos y clínicos detallados, mientras que la base de datos de los individuos de los que se utilizaron muestras de biopsia pulmonar es más escueta, abarcando características demográficas y ciertas variables clínicas para los sujetos diagnosticados con asma y solo parámetros poblacionales para los individuos sin diagnóstico de asma. Hubo restricciones en la disponibilidad de información completa de todos los sujetos en ambas bases de datos. Además, la falta de incorporación de algunos datos clínicos dificultó efectuar un análisis más exhaustivo. Finalmente, en lo que respecta a los individuos sanos de los cuales se emplearon muestras de suero, no se pudo acceder a una base de datos clínica específica. Sin embargo, se contó con un documento que ofrecía características demográficas y parámetros clínicos vinculados a la patología asmática. Pese a esto, al igual que en los dos casos anteriores, no se tenía la totalidad de los datos de todos los sujetos.

8.3. Uso de un número reducido de muestras en la investigación

La utilización de cohortes de muestras pequeñas, particularmente en el examen de la expresión de miARNs por miARNs-seq en suero y en biopsia pulmonar, así como la determinación del contenido proteico de los exosomas, supuso retos notables en términos de representatividad, generalización (a nuevos conjuntos de datos) y apreciación de la incertidumbre. Para contrarrestar esta limitación, se validaron los resultados en cohortes de muestras más grandes y diversas. A pesar de esto, la cantidad limitada de muestras, junto con la dedicación de tiempo en el estudio, comprometió la posibilidad de manejar conjuntos más extensos.

Además, la subdivisión de grupos de individuos según una característica concreta, como la eosinofilia en sangre periférica, basada en otra condición, como la obesidad (comorbilidad del asma), pudo haber generado grupos no homogéneos, lo que habría complicado la consistencia de los resultados, incluso con un número sustancial de participantes.

8.4. Calidad y cantidad de las muestras

La restricción en la accesibilidad y la delicadeza de muestras como el suero o las biopsias pulmonares, estas últimas también de difícil obtención debido a su naturaleza invasiva, constituyeron obstáculos en la investigación, donde la cantidad y calidad de las muestras son esenciales. El agotamiento de suero y de biopsias pulmonares de algunos sujetos impidió su inclusión en todas las aproximaciones realizadas. Aunque se contaba con muestras adicionales de suero como reserva, las muestras de biopsia pulmonar eran irremplazables.

La calidad de las muestras pudo haber repercutido en la precisión, confiabilidad y validez de los resultados conseguidos. Factores como la contaminación, deterioro o artefactos en una muestra de baja calidad

Limitaciones

podrían haber entorpecido la interpretación de los resultados. Fue crucial cumplir con procedimientos rigurosos en la recolección, almacenamiento y procesamiento de muestras para preservar su calidad y minimizar posibles sesgos o errores.

Respecto a las muestras de suero procesadas a partir de sangre periférica, se resalta la hemólisis como un elemento negativo que influye en la calidad de las muestras. La hemólisis, que implica la ruptura de los glóbulos rojos y la liberación de hemoglobina⁴⁹², pudo interferir con las mediciones y los análisis subsiguientes, impactando las concentraciones de las proteínas séricas y la integridad del ADN o del ARN en las muestras^{493,494}. En cuanto a las muestras de sobrenadante de esputo, una elevada contaminación y una viabilidad celular reducida conllevan a una calidad inferior del esputo, restringiendo su utilidad en estudios futuros⁴⁹⁵. Se priorizó la selección de muestras de suero no hemolizadas para la determinación de la expresión de los miARNs, descartando aquellas con hemólisis (miARNs de eritrocitos)⁴⁹⁶. Para ello, se cuantificó la expresión de hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-451a, miARNs que miden hemólisis, y se determinó el índice de hemólisis mediante la fórmula $Ct_{hsa-miR-23a-3p} - Ct_{hsa-miR-451a} < 7$ (en valor absoluto), garantizando así la integridad de las muestras. Además, en el caso de las muestras de sobrenadante de esputo, se procuró escoger aquellas con buena calidad, poca contaminación ($\leq 15\%$) y alta viabilidad celular ($\geq 70\%$).

Por último, la calidad de las biopsias pulmonares, relacionada con la integridad y la representatividad del tejido, varió entre las muestras. Identificamos factores importantes que afectan la calidad de las biopsias, como el tamaño y la cantidad, la conservación del tejido y ausencia de impurezas.

8.5. Aspectos limitantes en la evaluación de la expresión de los miARNs

A lo largo de los apartados previos se destacan dificultades en los análisis de la expresión de miARNs por miARNs-seq, como diferencias intragrupalas, conjuntos de individuos acotados y la técnica de detección empleada. Estas limitaciones pudieron contribuir a no reconocer miARNs con expresión diferencial en la comparativa entre pacientes con asma alérgica/atópica y no alérgica/atópica. Además, las diferencias en las muestras dentro de un mismo grupo incidieron en los resultados de la expresión de miARNs mediante qPCR, donde cohortes más amplias no exhibieron cambios significativos entre grupos en la expresión de miARNs, que sí fueron diferencialmente expresados por miARNs-seq. Asimismo, dos miARNs hallados mediante miARNs-seq no fueron detectados por qPCR.

8.6. Incompatibilidad de los controles internos en la normalización de la expresión de los miARNs (qPCR)

Para estandarizar la expresión de los miARNs analizados en las diversas comparaciones entre grupos, se usó inicialmente la prueba de homogeneidad de \bar{X} de Ct, utilizando los programas estadísticos GraphPad InStat v3.0 y GraphPad Prism® v6.0. Se optó por una o varias moléculas endógenas (y exógenas; miARNs y ARNs) como controles internos. En caso de no poder establecer controles internos de esta manera, se recurrió a la herramienta estadística Bestkeeper²⁷⁵. En consecuencia, en las diferentes comparativas entre grupos, no se emplearon los mismos miARNs o ARNs como controles internos. Además, algunos de los miARNs designados como controles internos han sido anteriormente identificados como dianas en enfermedades⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹.

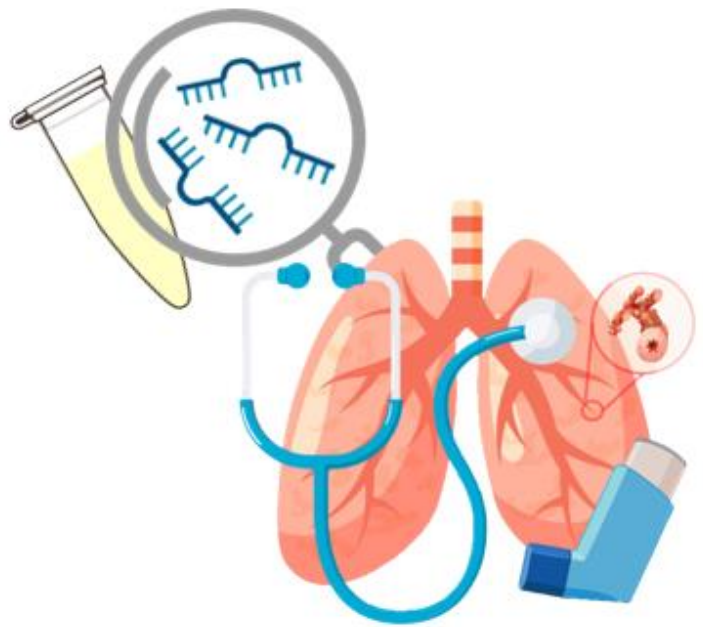
8.7. Uso de equipos distintos en la ultracentrifugación de las muestras de suero y de sobrenadante de esputo para la purificación de los exosomas

El proceso de aislamiento de exosomas para el estudio de su perfil proteómico comenzó utilizando muestras de suero, que fueron sometidas a dos ciclos de ultracentrifugación en una ultracentrífuga XL-80 con el rotor 70Ti y suplementadas con PBS 1X estéril hasta alcanzar un volumen de 20 mL en ambas ocasiones. Para obtener exosomas de muestras de sobrenadante de esputo, se empleó una micro-ultracentrífuga Sorvall™ serie MX 120 Plus con el rotor S140-AT. Estas muestras fueron ultracentrifugadas una única vez, con la agregación de PBS 1X estéril hasta completar un volumen de 1,3 mL. Es relevante señalar que el uso de diferentes equipos de ultracentrifugación pudo ocasionar alteraciones en la cantidad o poblaciones de exosomas purificados de los dos tipos de muestras. Adicionalmente, se añadió EDTA (5 nM) al disolvente de ambas muestras (PBS 1X) para prevenir la agregación de exosomas⁵⁰⁰ y evitar posibles variaciones en el contenido proteico como efecto de la congelación necesaria para el transporte.

8.8. Problemas asociados a la investigación de la expresión de los miARNs y los genes *in vitro* en SAEC y BSMC

En los ensayos *in vitro*, se consideraron para su utilización dos tipos fundamentales de células de las vías respiratorias: las células epiteliales y las células del músculo liso¹⁷⁵. Se llevaron a cabo pruebas *in vitro* de expresión de miARNs y genes para evaluar la influencia de la dexametasona en SAEC y BSMC. La falta de evidencia clara, con o sin dexametasona, en la expresión de miARNs en los dos tipos celulares no puede extrapolarse a otras células, como las inflamatorias, que presentan diferencias en estructura, función y composición. Asimismo, los resultados obtenidos en SAEC no se pueden proyectar directamente a BSMC ni viceversa.

Por otro lado, surgió otra complejidad relacionada con los tiempos de incubación con el estímulo. Se definieron dos lapsos temporales, a las 4 h y a las 24 h después de la aplicación de la dexametasona, con el propósito de observar el impacto a corto y largo plazo en la expresión de miARNs y genes en SAEC y BSMC. No obstante, es factible que al contemplar otros periodos de incubación con el estímulo, como menos de 4 h, entre 4 h y 24 h, o más de 24 h, los hallazgos podrían haber sido distintos.



Conclusiones/conclusions

9. CONCLUSIONES

Se describe la existencia de miARNs específicos desregulados, con expresión diferencial entre pacientes asmáticos de diferentes fenotipos. Estos miARNs facilitan la identificación y discriminación de los pacientes con asma.

Esta conclusión principal se fundamenta en las siguientes conclusiones parciales:

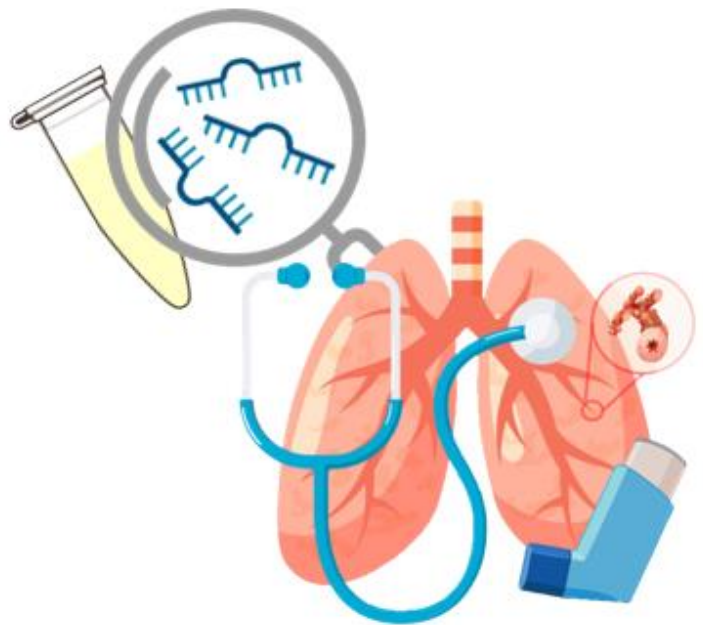
1. Se identificó en el suero un perfil de 2 miARNs, hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p, con expresión diferencial entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, lo que posibilita la diferenciación entre ambos fenotipos.
2. Se evidenciaron diferencias de expresión de hsa-miR-26a-1-3p y hsa-miR-376a-3p en suero entre pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica, considerando la obesidad como comorbilidad del asma. Estos miARNs permiten, por tanto, distinguir entre pacientes asmáticos según su estado inflamatorio, influenciado por la eosinofilia, la obesidad, ambas (o ninguna de ellas). Además, se vio un cambio en la expresión de estos miARNs en biopsias pulmonares entre sujetos con y sin diagnóstico de asma, consolidando su asociación con la enfermedad asmática.
3. La comparación de los exosomas purificados de suero y de sobrenadante de esputo de pacientes con asma eosinofílica y no eosinofílica puso de manifiesto diferencias en su composición proteica.
4. Se detectó en el suero un perfil de 5 miARNs, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p, con expresión diferencial entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con GCOs, ofreciendo la posibilidad de discernir entre ambos fenotipos.
5. La expresión sérica de hsa-miR-148b-3p varió, además, entre individuos con diagnóstico de asma y sujetos no diagnosticados de asma (individuos sanos control), consolidando su potencial como biomarcador específico para el diagnóstico del asma. De los 5 miARNs encontrados en el suero (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p), se apreció un cambio en la expresión de hsa-miR-769-5p en biopsias pulmonares entre sujetos con y sin diagnóstico de asma, fortaleciendo su vínculo con la patología asmática. Dado que el pulmón es el foco inflamatorio central en el asma, este miARN juega un papel esencial en su comprensión y evaluación.
6. La ausencia de modificaciones remarcables en la expresión de los miARNs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 y hsa-miR-769-5p) en respuesta a la dexametasona en modelos celulares *in vitro* (SAEC y BSMC) sugiere que las diferencias en su expresión en el suero entre pacientes con asma grave tratados y no tratados con glucocorticoides (GCOs) podrían estar más relacionadas con la gravedad intrínseca del asma u otros factores que con el tratamiento con GCOs.
7. El análisis computacional de las vías de señalización y rutas metabólicas reguladas por los miARNs alterados destacó su contribución a la patogénesis del asma, influyendo en procesos relacionados con esta afección. Además, la correlación entre la expresión de los miARNs y las variables clínicas respaldó su importancia y su capacidad para caracterizar los distintos fenotipos del asma.

10. CONCLUSIONS

We report the existence of specific deregulated miRNAs, differentially expressed between asthma patients of different phenotypes. These miRNAs facilitate asthma patient identification and discrimination.

This main conclusion is supported by the following partial conclusions:

1. A profile of 2 miRNAs, hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p, with differential expression between patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma was identified in serum, enabling differentiation between both phenotypes.
2. Differences in serum hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p expression were found between patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma, considering obesity as an asthma comorbidity. These miRNAs, therefore, allow to distinguish between asthma patients according to their inflammatory status, influenced by eosinophilia, obesity, both (or none of them). In addition, a change in the expression of these miRNAs was seen in lung biopsies between subjects with and without a diagnosis of asthma, consolidating their association with asthmatic disease.
3. Comparison of purified exosomes from both serum and sputum of patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma revealed differences in their protein composition.
4. A profile of 5 miRNAs, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 and hsa-miR-769-5p, with differential expression between OCS-treated and non-OCS-treated patients with severe asthma was detected in serum, offering the possibility to discern between both phenotypes.
5. Serum expression of hsa-miR-148b-3p also varied between individuals diagnosed with asthma and subjects not diagnosed with asthma (healthy control individuals), consolidating its potential as a specific biomarker for the diagnosis of asthma. Of the 5 miRNAs found in serum (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 and hsa-miR-769-5p), a change in the expression of hsa-miR-769-5p was observed in lung biopsies between subjects with and without a diagnosis of asthma, strengthening their link to asthmatic pathology. Given that the lung is the central inflammatory focus in asthma, this miRNA plays an essential role in its understanding and assessment.
6. The absence of remarkable modifications in the expression of miRNAs (hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-221-5p, hsa-miR-618, hsa-miR-941 and hsa-miR-769-5p) in response to dexamethasone in *in vitro* cell models (SAEC and BSMC) suggests that differences in their expression in serum between patients with severe asthma treated and not treated with glucocorticoids (OCS) may be more related to the intrinsic severity of asthma or other factors than to treatment with OCS.
7. Computational analysis of the signalling pathways and metabolic pathways regulated by altered miRNAs highlighted their contribution to asthma pathogenesis, influencing asthma-related processes. Furthermore, the correlation between the expression of these miRNAs and clinical variables supported their importance and their ability to characterise different asthma phenotypes.



Bibliografía

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Reynolds, R., Dennis, S., Hasan, I., Slewa, J., Chen, W., Tian, D., Bobba, S., & Zwar, N. (2018). A systematic review of chronic disease management interventions in primary care. *BMC Fam Pract*, 19(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12875-017-0692-3>.
2. Bernell, S., & Howard, S. W. (2016). Use Your Words Carefully: What Is a Chronic Disease?. *Front Public Health*, 4, 159. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00159>.
3. Gould, G. S., Hurst, J. R., Trofor, A., Alison, J. A., Fox, G., Kulkarni, M. M., Wheelock, C. E., Clarke, M., & Kumar, R. (2023). Recognising the importance of chronic lung disease: a consensus statement from the Global Alliance for Chronic Diseases (Lung Diseases group). *Respir Res*, 24(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02297-y>.
4. The Lancet (2018). GBD 2017: a fragile world. *Lancet*, 392(10159), 1683. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32858-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32858-7).
5. Ranu, H., Wilde, M., & Madden, B. (2011). Pulmonary function tests. *Ulster Med J*, 80(2), 84-90. PMID: 22347750.
6. Robinson, H. C. (2016). Respiratory Conditions Update: Restrictive Lung Disease. *FP Essent*, 448, 29-34. PMID: 27576233.
7. Nakawah, M. O., Hawkins, C., & Barbandi, F. (2013). Asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and the overlap syndrome. *J Am Board Fam Med*, 26(4), 470-477. <https://doi.org/10.3122/jabfm.2013.04.120256>.
8. Marketos, S. G., & Ballas, C. N. (1982). Bronchial asthma in the medical literature of Greek antiquity. *J Asthma*, 19(4), 263-269. <https://doi.org/10.3109/02770908209104771>.
9. Rosner F. (1981). Moses Maimonides' treatise on asthma. *Thorax*, 36(4), 245-251. <https://doi.org/10.1136/thx.36.4.245>.
10. Terminology, Definitions, and Classification of Chronic Pulmonary Emphysema and Related Conditions: A Report of the Conclusions of a Ciba Guest Symposium. (1959). *Thorax*, 14(4), 286-299. PMID: PMC1018516.
11. Porter, R., & Birch, J. (1971). Ciba Foundation Study Group No. 38: Identification of asthma. Churchill Livingstone.
12. Serebrisky, D., & Wiznia, A. (2019). Pediatric Asthma: A Global Epidemic. *Ann Glob Health*, 85(1), 6. <https://doi.org/10.5334/aogh.2416>.
13. Stucky, B. D., Sherbourne, C. D., Edelen, M. O., & Eberhart, N. K. (2015). Understanding asthma-specific quality of life: moving beyond asthma symptoms and severity. *Eur Respir J*, 46(3), 680-687. <https://doi.org/10.1183/09031936.00225014>.
14. Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S. E., & Reddel, H. K. (2018). Asthma. *Lancet*, 391(10122), 783-800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33311-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33311-1).
15. Dharmage, S. C., Perret, J. L., & Custovic, A. (2019). Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr*, 7, 246. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00246>.
16. Kaplan, A., Szeffler, S. J., & Halpin, D. M. G. (2020). Impact of comorbid conditions on asthmatic adults and children. *NPJ Prim Care Respir Med*, 30(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41533-020-00194-9>.
17. Ebmeier, S., Thayabaran, D., Braithwaite, I., Bénamara, C., Weatherall, M., & Beasley, R. (2017). Trends in international asthma mortality: analysis of data from the WHO Mortality Database from 46 countries (1993-2012). *Lancet*, 390(10098), 935-945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31448-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31448-4).
18. Côté, A., Godbout, K., & Boulet, L. P. (2020). The management of severe asthma in 2020. *Biochem Pharmacol*, 179, 114112. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114112>.

Bibliografía

19. Nunes, C., Pereira, A. M., & Morais-Almeida, M. (2017). Asthma costs and social impact. *Asthma Res Pract*, 3, 1. <https://doi.org/10.1186/s40733-016-0029-3>.
20. Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) 5.3. Accessed on November 6, 2023. Available online at: <https://www.gemasma.com/>.
21. Global Initiative for Asthma (GINA). Accessed on November 6, 2023. Available online at: <https://ginasthma.org/>.
22. Zhang, W., & Ram, S. (2020). A Comprehensive Analysis of Triggers and Risk Factors for Asthma Based on Machine Learning and Large Heterogeneous Data Sources. *MIS Q*, 44(1b), 305-349. <https://doi.org/10.25300/MISQ/2020/15106>.
23. Toskala, E., & Kennedy, D. W. (2015). Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol*, 5 Suppl 1(Suppl 1), S11-S16. <https://doi.org/10.1002/alr.21557>.
24. Murray, B., & O'Neill, M. (2018). Supporting self-management of asthma through patient education. *Br J Nurs*, 27(7), 396-401. <https://doi.org/10.12968/bjon.2018.27.7.396>.
25. Murrison, L. B., Brandt, E. B., Myers, J. B., & Hershey, G. K. K. (2019). Environmental exposures and mechanisms in allergy and asthma development. *J Clin Invest*, 129(4), 1504-1515. <https://doi.org/10.1172/JCI124612>.
26. Yaneva, M., & Darlenski, R. (2021). The link between atopic dermatitis and asthma- immunological imbalance and beyond. *Asthma Res Pract*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40733-021-00082-0>.
27. Borak, J., & Lefkowitz, R. Y. (2016). Bronchial hyperresponsiveness. *Occup Med (Lond)*, 66(2), 95-105. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqv158>.
28. Castro-Rodriguez J. A. (2016). A new childhood asthma phenotype: obese with early menarche. *Paediatr Respir Rev*, 18, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2015.10.006>.
29. Tohidinik, H. R., Mallah, N., & Takkouche, B. (2019). History of allergic rhinitis and risk of asthma; a systematic review and meta-analysis. *World Allergy Organ J*, 12(10), 100069. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100069>.
30. Ma, T., Chen, Y., Pang, Y., Wang, X., Dai, D., Zhuang, Y., Shi, H., Zheng, M., Zhang, R., Jin, W., Yang, X., Wang, Y., Shan, G., Yan, Y., Wang, D., Wang, X., Wei, Q., Yin, J., Wang, X., & Zhang, L. (2021). Prevalence and risk factors of allergic rhinitis and asthma in the southern edge of the plateau grassland region of northern China: A cross-sectional study. *World Allergy Organ J*, 14(7), 100537. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2021.100537>.
31. Ferrante, G., & La Grutta, S. (2018). The Burden of Pediatric Asthma. *Front Pediatr*, 6, 186. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00186>.
32. Papandreou, D., Pavlidou, E., Tyrovolas, S., Mantzorou, M., Andreou, E., Psara, E., Antasouras, G., Vasios, G. K., Poullos, E., & Giaginis, C. (2023). Relation of Maternal Pre-Pregnancy Factors and Childhood Asthma: A Cross-Sectional Survey in Pre-School Children Aged 2-5 Years Old. *Medicina (Kaunas)*, 59(1), 179. <https://doi.org/10.3390/medicina59010179>.
33. Wypych-Ślusarska, A., Niewiadomska, E., Oleksiuk, K., Krupa-Kotara, K., Głogowska-Ligus, J., & Słowiński, J. (2021). Caesarean delivery and risk of childhood asthma development: meta-analysis. *Postepy Dermatol Alergol*, 38(5), 819-826. <https://doi.org/10.5114/ada.2020.96703>.
34. Rivas-Juesas, C., Monge, L. F., Vicente, A. D., García, A. L., Crespo, M. G., & Sinisterra, A. C. (2021). Maternal smoking during pregnancy and asthma during the first year of life: a comparative study between smokers and nonsmoker mothers. *Allergol Immunopathol*, 49(5), 32-41. <https://doi.org/10.15586/aei.v49i5.439>.
35. Baiz, N., Just, J., Chastang, J., Forhan, A., de Lauzon-Guillain, B., Magnier, A. M., Annesi-Maesano, I., & EDEN Mother-Child Cohort Study Group (2019). Maternal diet before and during pregnancy and risk

- of asthma and allergic rhinitis in children. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 15, 40. <https://doi.org/10.1186/s13223-019-0353-2>.
36. Klopp, A., Vehling, L., Becker, A. B., Subbarao, P., Mandhane, P. J., Turvey, S. E., Lefebvre, D. L., Sears, M. R., CHILD Study Investigators, & Azad, M. B. (2017). Modes of Infant Feeding and the Risk of Childhood Asthma: A Prospective Birth Cohort Study. *J Pediatr*, 190, 192-199.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.07.012>.
37. Amara, Y. T., Baldeh, A. K., Ali, M. M., Goksör, E., Wennergren, G., & Nwaru, B. I. (2020). Maternal age at delivery and risk of allergy and asthma in the offspring: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open*, 10(10), e039288. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-039288>.
38. Gau, C. C., Lee, W. F., Lu, I. C., Lin, L. L., Wu, C. Y., Tsai, H. J., & Yao, T. C. (2018). Neonatal Jaundice and Risk of Allergic Diseases By 6 Years of Age: A Cohort Study. *J Allergy Clin Immunol*, 141(2), AB5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.015>.
39. Mirzakhani, H., Carey, V. J., McElrath, T. F., Qiu, W., Hollis, B. W., O'Connor, G. T., Zeiger, R. S., Bacharier, L., Litonjua, A. A., & Weiss, S. T. (2019). Impact of Preeclampsia on the Relationship between Maternal Asthma and Offspring Asthma. An Observation from the VDAART Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 199(1), 32-42. <https://doi.org/10.1164/rccm.201804-0770OC>.
40. Zhang, J., Ma, C., Yang, A., Zhang, R., Gong, J., & Mo, F. (2018). Is preterm birth associated with asthma among children from birth to 17 years old? - A study based on 2011-2012 US National Survey of Children's Health. *Ital J Pediatr*, 44(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0583-9>.
41. Devine, R., Sheikh, A., & Nwaru, B. (2016). Acid-suppressive medications during pregnancy and risk of asthma and allergy in the offspring: protocol for a systematic review. *NPJ Prim Care Respir Med*, 26, 16001. <https://doi.org/10.1038/npjpcrm.2016.1>.
42. Duran, H. E., & Fratesi, U. (2023). Economic resilience and regionally differentiated cycles: Evidence from a turning point approach in Italy. *Pap Reg Sci*, 102(2), 219-252. <https://doi.org/10.1111/pirs.12725>.
43. Triasih, R., Setyowireni, D., Nurani, N., & Setyati, A. (2023). Prevalence, Management, and Risk Factors of Asthma Among School-Age Children in Yogyakarta, Indonesia. *J Asthma Allergy*, 16, 23-32. <https://doi.org/10.2147/JAA.S392733>.
44. Tiotiu, A. I., Novakova, P., Nedeva, D., Chong-Neto, H. J., Novakova, S., Steiropoulos, P., & Kowal, K. (2020). Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes. *Int J Environ Res Public Health*, 17(17), 6212. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176212>.
45. Erbas, B., Jazayeri, M., Lambert, K. A., Katelaris, C. H., Prendergast, L. A., Tham, R., Parrodi, M. J., Davies, J., Newbiggin, E., Abramson, M. J., & Dharmage, S. C. (2018). Outdoor pollen is a trigger of child and adolescent asthma emergency department presentations: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 73(8), 1632-1641. <https://doi.org/10.1111/all.13407>.
46. Eguiluz-Gracia, I., Palomares, F., Salas, M., Testera-Montes, A., Ariza, A., Davila, I., Bartra, J., Mayorga, C., Torres, M. J., & Rondon, C. (2020). Precision Medicine in House Dust Mite-Driven Allergic Asthma. *J Clin Med*, 9(12), 3827. <https://doi.org/10.3390/jcm9123827>.
47. van Tilburg Bernardes, E., Gutierrez, M. W., & Arrieta, M. C. (2020). The Fungal Microbiome and Asthma. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 583418. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.583418>.
48. Mthembu, N., Ikwegbue, P., Brombacher, F., & Hadebe, S. (2021). Respiratory Viral and Bacterial Factors That Influence Early Childhood Asthma. *Front Allergy*, 2, 692841. <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.692841>.
49. Jartti, T., Bønnelykke, K., Elenius, V., & Feleszko, W. (2020). Role of viruses in asthma. *Semin Immunopathol*, 42(1), 61-74. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00781-5>.

50. Rodríguez-Jiménez, J. C., Moreno-Paz, F. J., Terán, L. M., & Guaní-Guerra, E. (2018). Aspirin exacerbated respiratory disease: Current topics and trends. *Respir Med*, 135, 62-75. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.01.002>.
51. Nwaru, B. I., Ekström, M., Hasvold, P., Wiklund, F., Telg, G., & Janson, C. (2020). Overuse of short-acting β 2-agonists in asthma is associated with increased risk of exacerbation and mortality: a nationwide cohort study of the global SABINA programme. *Eur Respir J*, 55(4), 1901872. <https://doi.org/10.1183/13993003.01872-2019>.
52. di Palma, E., Gallucci, M., Cipriani, F., Bertelli, L., Giannetti, A., & Ricci, G. (2019). Asthma and Food Allergy: Which Risks?. *Medicina (Kaunas)*, 55(9), 509. <https://doi.org/10.3390/medicina55090509>.
53. Perčič, S., Bojanić, L., Košnik, M., & Kukec, A. (2022). Natural History of the Hymenoptera Venom Sensitivity Reactions in Adults: Study Design. *Int J Environ Res Public Health*, 19(7), 4319. <https://doi.org/10.3390/ijerph19074319>.
54. Roio, L. C. D., Mizutani, R. F., Pinto, R. C., Terra-Filho, M., & Santos, U. P. (2021). Work-related asthma. *J Bras Pneumol*, 47(4), e20200577. <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20200577>.
55. Tsui, H. C., Ronsmans, S., Hoet, P. H. M., Nemery, B., & Vanoirbeek, J. A. J. (2022). Occupational Asthma Caused by Low-Molecular-Weight Chemicals Associated With Contact Dermatitis: A Retrospective Study. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 10(9), 2346-2354.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.05.014>.
56. Tiotiu, A. I., Novakova, S., Labor, M., Emelyanov, A., Mihaicuta, S., Novakova, P., & Nedeva, D. (2020). Progress in Occupational Asthma. *Int J Environ Res Public Health*, 17(12), 4553. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124553>.
57. Vandenplas, O., Godet, J., Hurdubaea, L., Riffart, C., Suojalehto, H., Wiszniewska, M., Munoz, X., Sastre, J., Klusackova, P., Moore, V., Merget, R., Talini, D., Svanes, C., Mason, P., dell'Omo, M., Cullinan, P., Moscato, G., Quirce, S., Hoyle, J., Sherson, D. L., ... European network for the PHenotyping of OCCupational ASThma (E-PHOCAS) investigators (2019). Are high- and low-molecular-weight sensitizing agents associated with different clinical phenotypes of occupational asthma?. *Allergy*, 74(2), 261-272. <https://doi.org/10.1111/all.13542>.
58. Lu, C., Liu, Z., Yang, W., Liao, H., Liu, Q., Li, Q., & Deng, Q. (2023). Early life exposure to outdoor air pollution and indoor environmental factors on the development of childhood allergy from early symptoms to diseases. *Environ Res*, 216(Pt 2), 114538. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114538>.
59. Gillissen, A., & Paparoupa, M. (2015). Inflammation and infections in asthma. *Clin Respir J*, 9(3), 257-269. <https://doi.org/10.1111/crj.12135>.
60. Fahy J. V. (2015). Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 57-65. <https://doi.org/10.1038/nri3786>.
61. Frey, A., Lunding, L. P., Ehlers, J. C., Weckmann, M., Zissler, U. M., & Wegmann, M. (2020). More Than Just a Barrier: The Immune Functions of the Airway Epithelium in Asthma Pathogenesis. *Front Immunol*, 11, 761. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00761>.
62. Morales, E., & Duffy, D. (2019). Genetics and Gene-Environment Interactions in Childhood and Adult Onset Asthma. *Front Pediatr*, 7, 499. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00499>.
63. Arora, P., & Ansari, S. H. (2019). Role of Various Mediators in Inflammation of Asthmatic Airways. *Asthma - Biol Evidences*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84357>.
64. Hartung, F., & Esser-von Bieren, J. (2022). Trained immunity in type 2 immune responses. *Mucosal Immunol*, 15(6), 1158-1169. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00557-0>.
65. Mubarak, B., Shakoor, H., & Masood, F. (2019). Eosinophilic Asthma. *Asthma - Biol Evidences*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84297>.

66. Ricciardolo, F. L. M., Sprio, A. E., Baroso, A., Gallo, F., Riccardi, E., Bertolini, F., Carriero, V., Arrigo, E., & Ciprandi, G. (2021). Characterization of T2-Low and T2-High Asthma Phenotypes in Real-Life. *Biomedicines*, *9*(11), 1684. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111684>.
67. Tai, J., Kwak, J., Han, M., & Kim, T. H. (2022). Different Roles of Dendritic Cells for Chronic Rhinosinusitis Treatment According to Phenotype. *Int J Mol Sci*, *23*(14), 8032. <https://doi.org/10.3390/ijms23148032>.
68. Humeniuk, P., Dubiela, P., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2017). Dendritic Cells and Their Role in Allergy: Uptake, Proteolytic Processing and Presentation of Allergens. *Int J Mol Sci*, *18*(7), 1491. <https://doi.org/10.3390/ijms18071491>.
69. Whetstone, C. E., Ranjbar, M., Omer, H., Cusack, R. P., & Gauvreau, G. M. (2022). The Role of Airway Epithelial Cell Alarmins in Asthma. *Cells*, *11*(7), 1105. <https://doi.org/10.3390/cells11071105>.
70. Chapoval, S. P., & Chapoval, A. I. (2022). Costimulation in Allergic Asthma: The Roles of B7 and Semaphorin Molecules. *Recent Adv Asthma Res Treat*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102631>.
71. Morianos, I., & Semitekolou, M. (2020). Dendritic Cells: Critical Regulators of Allergic Asthma. *Int J Mol Sci*, *21*(21), 7930. <https://doi.org/10.3390/ijms21217930>.
72. Hong, W., Yang, B., He, Q., Wang, J., & Weng, Q. (2022). New Insights of CCR7 Signaling in Dendritic Cell Migration and Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol*, *13*, 841687. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.841687>.
73. Stark, J. M., Tibbitt, C. A., & Coquet, J. M. (2019). The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation. *Front Immunol*, *10*, 2318. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02318>.
74. Pelaia, C., Heffler, E., Crimi, C., Maglio, A., Vatrella, A., Pelaia, G., & Canonica, G. W. (2022). Interleukins 4 and 13 in Asthma: Key Pathophysiologic Cytokines and Druggable Molecular Targets. *Front Pharmacol*, *13*, 851940. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.851940>.
75. Rodriguez-Rodriguez, N., Gogoi, M., & McKenzie, A. N. J. (2021). Group 2 Innate Lymphoid Cells: Team Players in Regulating Asthma. *Annu Rev Immunol*, *39*, 167-198. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-110119-091711>.
76. Zheng, H., Zhang, Y., Pan, J., Liu, N., Qin, Y., Qiu, L., Liu, M., & Wang, T. (2021). The Role of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Diseases. *Front Immunol*, *12*, 586078. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.586078>.
77. Gurram, R. K., & Zhu, J. (2019). Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. *Cell Mol Immunol*, *16*(3), 225-235. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0210-8>.
78. Juntila I. S. (2018). Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol*, *9*, 888. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>.
79. Liravi, B., Piedrafita, D., Nguyen, G., & Bischof, R. J. (2015). Dynamics of IL-4 and IL-13 expression in the airways of sheep following allergen challenge. *BMC Pulm Med*, *15*, 101. <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0097-9>.
80. Poto, R., Criscuolo, G., Marone, G., Brightling, C. E., & Varricchi, G. (2022). Human Lung Mast Cells: Therapeutic Implications in Asthma. *Int J Mol Sci*, *23*(22), 14466. <https://doi.org/10.3390/ijms232214466>.
81. Pelaia, C., Paoletti, G., Puggioni, F., Racca, F., Pelaia, G., Canonica, G. W., & Heffler, E. (2019). Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Front Physiol*, *10*, 1514. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01514>.
82. Larose, M. C., Archambault, A. S., Provost, V., Laviolette, M., & Flamand, N. (2017). Regulation of Eosinophil and Group 2 Innate Lymphoid Cell Trafficking in Asthma. *Front Med*, *4*, 136. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00136>.

83. Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H., & Lee, S. (2018). Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci*, *19*(4), 1057. <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>.
84. Bakakos, A., Loukides, S., & Bakakos, P. (2019). Severe Eosinophilic Asthma. *J Clin Med*, *8*(9), 1375. <https://doi.org/10.3390/jcm8091375>.
85. Chen, W., Cao, Y., Zhong, Y., Sun, J., & Dong, J. (2022). The Mechanisms of Effector Th Cell Responses Contribute to Treg Cell Function: New Insights into Pathogenesis and Therapy of Asthma. *Front Immunol*, *13*, 862866. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.862866>.
86. Papaioannou, A. I., Fouka, E., Ntontsi, P., Stratakos, G., & Papiris, S. (2022). Paucigranulocytic Asthma: Potential Pathogenetic Mechanisms, Clinical Features and Therapeutic Management. *J Pers Med*, *12*(5), 850. <https://doi.org/10.3390/jpm12050850>.
87. Chetty, A., & Nielsen, H. C. (2021). Targeting Airway Smooth Muscle Hypertrophy in Asthma: An Approach Whose Time Has Come. *J Asthma Allergy*, *14*, 539-556. <https://doi.org/10.2147/JAA.S280247>.
88. Rodrigo-Muñoz, J. M., Cañas, J. A., Sastre, B., Gil-Martínez, M., García Latorre, R., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2022). Role of miR-185-5p as modulator of periostin synthesis and smooth muscle contraction in asthma. *J Cell Physiol*, *237*(2), 1498-1508. <https://doi.org/10.1002/jcp.30620>.
89. Banno, A., Reddy, A. T., Lakshmi, S. P., & Reddy, R. C. (2020). Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma. *Clin Sci (Lond)*, *134*(9), 1063-1079. <https://doi.org/10.1042/CS20191309>.
90. Hough, K. P., Curtiss, M. L., Blain, T. J., Liu, R. M., Trevor, J., Deshane, J. S., & Thannickal, V. J. (2020). Airway Remodeling in Asthma. *Front Med*, *7*, 191. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00191>.
91. Kuruvilla, M. E., Lee, F. E., & Lee, G. B. (2019). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*, *56*(2), 219-233. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>.
92. Quirt, J., Hildebrand, K. J., Mazza, J., Noya, F., & Kim, H. (2018). Asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol*, *14*(Suppl 2), 50. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0279-0>.
93. Fitzpatrick, A. M., Chipps, B. E., Holguin, F., & Woodruff, P. G. (2020). T2-"Low" Asthma: Overview and Management Strategies. *J Allergy Clin Immunol Pract*, *8*(2), 452-463. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.006>.
94. Akar-Ghibril, N., Casale, T., Custovic, A., & Phipatanakul, W. (2020). Allergic Endotypes and Phenotypes of Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*, *8*(2), 429-440. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.008>.
95. Trivedi, M., & Denton, E. (2019). Asthma in Children and Adults-What Are the Differences and What Can They Tell us About Asthma?. *Front Pediatr*, *7*, 256. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00256>.
96. Pakkasela, J., Ilmarinen, P., Honkamäki, J., Tuomisto, L. E., Andersén, H., Piirilä, P., Hisinger-Mölkänen, H., Sovijärvi, A., Backman, H., Lundbäck, B., Rönmark, E., Kankaanranta, H., & Lehtimäki, L. (2020). Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma. *BMC Pulm Med*, *20*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-1040-2>.
97. Chung, K. F., & Adcock, I. M. (2013). How variability in clinical phenotypes should guide research into disease mechanisms in asthma. *Ann Am Thorac Soc*, *10* Suppl(Suppl), S109-S117. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201304-087AW>.
98. Han, C. H., Chung, J. H., & Kim, S. R. (2022). STROBE: The relationship between asthma and early menarche in Korean adolescents. *Medicine*, *101*(20), e29301. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000029301>.

99. Colas, L., Hassoun, D., & Magnan, A. (2020). Needs for Systems Approaches to Better Treat Individuals With Severe Asthma: Predicting Phenotypes and Responses to Treatments. *Front Med*, 7, 98. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00098>.
100. Ricciardolo, F. L. M., Sprio, A. E., Baroso, A., Gallo, F., Riccardi, E., Bertolini, F., Carriero, V., Arrigo, E., & Ciprandi, G. (2021). Characterization of T2-Low and T2-High Asthma Phenotypes in Real-Life. *Biomedicines*, 9(11), 1684. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111684>.
101. Lacwik, P., & Kupczyk, M. (2021). Asthma Phenotype Overlap: More May Be Less. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 9(1), 363-364. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.10.032>.
102. Porpodis, K., Tsiouprou, I., Apostolopoulos, A., Ntontsi, P., Fouka, E., Papakosta, D., Vliagoftis, H., & Domvri, K. (2022). Eosinophilic Asthma, Phenotypes-Endotypes and Current Biomarkers of Choice. *J Pers Med*, 12(7), 1093. <https://doi.org/10.3390/jpm12071093>.
103. Corren J. (2013). Asthma Phenotypes and Endotypes: An Evolving Paradigm for Classification. *Discov Med*, 15(83), 243-249. PMID: 23636141.
104. Canonica, G. W., Ferrando, M., Baiardini, I., Puggioni, F., Racca, F., Passalacqua, G., & Heffler, E. (2018). Asthma: personalized and precision medicine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 18(1), 51-58. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000416>.
105. Runnstrom, M., Pitner, H., Xu, J., Lee, F. E., & Kuruvilla, M. (2022). Utilizing Predictive Inflammatory Markers for Guiding the Use of Biologicals in Severe Asthma. *J Inflamm Res*, 15, 241-249. <https://doi.org/10.2147/JIR.S269297>.
106. Licari, A., Brambilla, I., Marseglia, A., De Filippo, M., Paganelli, V., & Marseglia, G. L. (2018). Difficult vs. Severe Asthma: Definition and Limits of Asthma Control in the Pediatric Population. *Front Pediatr*, 6, 170. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00170>.
107. Agondi, R. C., Menechino, N., Marinho, A. K. B. B., Kalil, J., & Giavina-Bianchi, P. (2022). Worsening of asthma control after COVID-19. *Front Med*, 9, 882665. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.882665>.
108. Jeong, J. S., Kim, S. R., Cho, S. H., & Lee, Y. C. (2019). A Novel Insight on Endotyping Heterogeneous Severe Asthma Based on Endoplasmic Reticulum Stress: Beyond the "Type 2/Non-Type 2 Dichotomy". *Int J Mol Sci*, 20(3), 713. <https://doi.org/10.3390/ijms20030713>.
109. Heaney, L. G., Perez de Llano, L., Al-Ahmad, M., Backer, V., Busby, J., Canonica, G. W., Christoff, G. C., Cosio, B. G., FitzGerald, J. M., Heffler, E., Iwanaga, T., Jackson, D. J., Menzies-Gow, A. N., Papadopoulos, N. G., Papaioannou, A. I., Pfeffer, P. E., Popov, T. A., Porsbjerg, C. M., Rhee, C. K., Sadatsafavi, M., ... Price, D. B. (2021). Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma: An Expert Consensus Framework to Characterize Phenotypes in a Global Real-Life Severe Asthma Cohort. *Chest*, 160(3), 814-830. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.04.013>.
110. Vatrella, A., Maglio, A., Pelaia, C., Ciampo, L., Pelaia, G., & Vitale, C. (2022). Eosinophilic inflammation: An Appealing Target for Pharmacologic Treatments in Severe Asthma. *Biomedicines*, 10(9), 2181. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092181>.
111. Rodrigo-Muñoz, J. M., Gil-Martínez, M., Sastre, B., & Del Pozo, V. (2021). Emerging Evidence for Pleiotropism of Eosinophils. *Int J Mol Sci*, 22(13), 7075. <https://doi.org/10.3390/ijms22137075>.
112. Guida, G., Bagnasco, D., Carriero, V., Bertolini, F., Ricciardolo, F. L. M., Nicola, S., Brussino, L., Nappi, E., Paoletti, G., Canonica, G. W., & Heffler, E. (2022). Critical evaluation of asthma biomarkers in clinical practice. *Front Med*, 9, 969243. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.969243>.
113. Tiotiu A. (2018). Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Res Pract*, 4, 10. <https://doi.org/10.1186/s40733-018-0047-4>.
114. Yilmaz İ. (2019). Eosinophilic asthma with chronic rhinosinusitis/nasal polyps and biologic agents. *Tuberk Toraks*, 67(4), 292-299. <https://doi.org/10.5578/tt.68953>.

115. Cunha, L., Dias, G., Giavina-Bianchi, P., Kalil, J., & Agondi, R. (2020). Eosinophilia in asthmatic patients and its relationship with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *J Allergy Clin Immunol*, *145*(2), AB118. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.576>.
116. de Groot, J. C., Ten Brinke, A., & Bel, E. H. (2015). Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. *ERJ Open Res*, *1*(1), 00024-2015. <https://doi.org/10.1183/23120541.00024-2015>.
117. Rogliani, P., Calzetta, L., Matera, M. G., Laitano, R., Ritondo, B. L., Hanania, N. A., & Cazzola, M. (2020). Severe Asthma and Biological Therapy: When, Which, and for Whom. *Pulm Ther*, *6*(1), 47-66. <https://doi.org/10.1007/s41030-019-00109-1>.
118. Busse, W. W., Melén, E., & Menzies-Gow, A. N. (2022). Holy Grail: the journey towards disease modification in asthma. *Eur Respir Rev*, *31*(163), 210183. <https://doi.org/10.1183/16000617.0183-2021>.
119. Louis, R., Satia, I., Ojanguren, I., Schleich, F., Bonini, M., Tonia, T., Rigau, D., Ten Brinke, A., Buhl, R., Loukides, S., Kocks, J. W. H., Boulet, L. P., Bourdin, A., Coleman, C., Needham, K., Thomas, M., Idzko, M., Papi, A., Porsbjerg, C., Schuermans, D., ... Usmani, O. S. (2022). European Respiratory Society Guidelines for the Diagnosis of Asthma in Adults. *Eur Respir J*, 2101585. <https://doi.org/10.1183/13993003.01585-2021>.
120. Wilkinson, A. J. K., & Anderson, G. (2020). Sustainability in Inhaled Drug Delivery. *Pharmaceut Med*, *34*(3), 191-199. <https://doi.org/10.1007/s40290-020-00339-8>.
121. Gelfand M. L. (1951). Administration of cortisone by the aerosol method in the treatment of bronchial asthma. *N Engl J Med*, *245*(8), 293-294. <https://doi.org/10.1056/NEJM195108232450804>.
122. Wadhwa, R., Dua, K., Adcock, I. M., Horvat, J. C., Kim, R. Y., & Hansbro, P. M. (2019). Cellular mechanisms underlying steroid-resistant asthma. *Eur Respir Rev*, *28*(153), 190096. <https://doi.org/10.1183/16000617.0096-2019>.
123. Ramos-Ramírez, P., & Tliba, O. (2022). Glucocorticoid Insensitivity in Asthma: The Unique Role for Airway Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci*, *23*(16), 8966. <https://doi.org/10.3390/ijms23168966>.
124. Billington, C. K., Penn, R. B., & Hall, I. P. (2017). β 2 Agonists. *Handb Exp Pharmacol*, *237*, 23-40. https://doi.org/10.1007/164_2016_64.
125. Fruh S. M. (2017). Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract*, *29*(S1), S3-S14. <https://doi.org/10.1002/2327-6924.12510>.
126. Malik, V. S., Willet, W. C., & Hu, F. B. (2020). Nearly a decade on - trends, risk factors and policy implications in global obesity. *Nat Rev Endocrinol*, *16*(11), 615-616. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00411-y>.
127. Tashiro, H., & Shore, S. A. (2019). Obesity and severe asthma. *Allergol Int*, *68*(2), 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.10.004>.
128. Fuseini, H., & Newcomb, D. C. (2017). Mechanisms Driving Gender Differences in Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, *17*(3), 19. <https://doi.org/10.1007/s11882-017-0686-1>.
129. Peters, U., Dixon, A. E., & Forno, E. (2018). Obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *141*(4), 1169-1179. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.004>.
130. Xu, S., Gilliland, F. D., & Conti, D. V. (2019). Elucidation of causal direction between asthma and obesity: a bi-directional Mendelian randomization study. *Int J Epidemiol*, *48*(3), 899-907. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz070>.
131. Gomez-Llorente, M. A., Romero, R., Chueca, N., Martinez-Cañavate, A., & Gomez-Llorente, C. (2017). Obesity and Asthma: A Missing Link. *Int J Mol Sci*, *18*(7), 1490. <https://doi.org/10.3390/ijms18071490>.

132. Scott, H. A., Ng, S. H., McLoughlin, R. F., Valkenborghs, S. R., Nair, P., Brown, A. C., Carroll, O. R., Horvat, J. C., & Wood, L. G. (2023). Effect of obesity on airway and systemic inflammation in adults with asthma: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*, *78*(10), 957-965. <https://doi.org/10.1136/thorax-2022-219268>.
133. Roshan Lal, T., Cechinel, L. R., Freishtat, R., & Rastogi, D. (2023). Metabolic Contributions to Pathobiology of Asthma. *Metabolites*, *13*(2), 212. <https://doi.org/10.3390/metabo13020212>.
134. Farzan, S., Coyle, T., Coscia, G., Rebaza, A., & Santiago, M. (2022). Clinical Characteristics and Management Strategies for Adult Obese Asthma Patients. *J Asthma Allergy*, *15*, 673-689. <https://doi.org/10.2147/JAA.S285738>.
135. Kaplan, A. G., & Kim, J. W. (2022). Asthma Exacerbations and Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists: a Review of the Current Evidence. *Pulm Ther*, *8*(4), 343-358. <https://doi.org/10.1007/s41030-022-00203-x>.
136. Wang, Y., & Hu, C. (2022). Leptin and Asthma: What Are the Interactive Correlations?. *Biomolecules*, *12*(12), 1780. <https://doi.org/10.3390/biom12121780>.
137. Dixon, A. E., & Peters, U. (2018). The effect of obesity on lung function. *Expert Rev Respir Med*, *12*(9), 755-767. <https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1506331>.
138. Shailesh, H., & Janahi, I. A. (2022). Role of Obesity in Inflammation and Remodeling of Asthmatic Airway. *Life (Basel)*, *12*(7), 948. <https://doi.org/10.3390/life12070948>.
139. Brumpton, B. M., Camargo, C. A., Jr, Romundstad, P. R., Langhammer, A., Chen, Y., & Mai, X. M. (2013). Metabolic syndrome and incidence of asthma in adults: the HUNT study. *Eur Respir J*, *42*(6), 1495-1502. <https://doi.org/10.1183/09031936.00046013>.
140. Serafino-Agrusa, L., Spatafora, M., & Scichilone, N. (2015). Asthma and metabolic syndrome: Current knowledge and future perspectives. *World J Clin Cases*, *3*(3), 285-292. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i3.285>.
141. Peters, M. C., McGrath, K. W., Hawkins, G. A., Hastie, A. T., Levy, B. D., Israel, E., Phillips, B. R., Mager, D. T., Comhair, S. A., Erzurum, S. C., Johansson, M. W., Jarjour, N. N., Coverstone, A. M., Castro, M., Holguin, F., Wenzel, S. E., Woodruff, P. G., Bleecker, E. R., Fahy, J. V., & National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program (2016). Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction, and asthma severity: a cross-sectional analysis of two cohorts. *Lancet Respir Med*, *4*(7), 574-584. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30048-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30048-0).
142. Sharma, N., Akkoyunlu, M., & Rabin, R. L. (2018). Macrophages-common culprit in obesity and asthma. *Allergy*, *73*(6), 1196-1205. <https://doi.org/10.1111/all.13369>.
143. Kaur, H., Muhlhausler, B. S., Roberts, C. T., & Gattford, K. L. (2021). The growth hormone-insulin like growth factor axis in pregnancy. *J Endocrinol*, *251*(3):R23-R39. <https://doi.org/10.1530/JOE-21-0087>.
144. Vélez, E. J., & Unniappan, S. (2021). A Comparative Update on the Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone in Vertebrates. *Front Endocrinol*, *11*, 614981. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.614981>.
145. Takahashi Y. (2017). The Role of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in the Liver. *Int J Mol Sci*, *18*(7), 1447. <https://doi.org/10.3390/ijms18071447>.
146. AsghariHanjani, N., & Vafa, M. (2019). The role of IGF-1 in obesity, cardiovascular disease, and cancer. *Med J Islam Repub Iran*, *33*, 56. <https://doi.org/10.34171/mjiri.33.56>.
147. Bailes, J., & Soloviev, M. (2021). Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) and Its Monitoring in Medical Diagnostic and in Sports. *Biomolecules*, *11*(2), 217. <https://doi.org/10.3390/biom11020217>.

148. Rieger, L., & O'Connor, R. (2021). Controlled Signaling-Insulin-Like Growth Factor Receptor Endocytosis and Presence at Intracellular Compartments. *Front Endocrinol*, *11*, 620013. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.620013>.
149. Allard, J. B., & Duan, C. (2018). IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many?. *Front Endocrinol*, *9*, 117. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00117>.
150. Blum, W. F., Alherbish, A., Alsagheir, A., El Awwa, A., Kaplan, W., Koledova, E., & Savage, M. O. (2018). The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in the diagnosis and treatment of growth disorders. *Endocr Connect*, *7*(6), R212-R222. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0099>.
151. Ruiz, S., Vázquez, F., Pellitero, S., & Puig-Domingo, M. (2022). ENDOCRINE OBESITY: Pituitary dysfunction in obesity. *Eur J Endocrinol*, *186*(6), R79-R92. <https://doi.org/10.1530/EJE-21-0899>.
152. Juiz-Valiña, P., Pena-Bello, L., Cordido, M., Outeiriño-Blanco, E., Pértega, S., Varela-Rodríguez, B., Garcia-Brao, M. J., Mena, E., Sangiao-Alvarellos, S., & Cordido, F. (2020). Altered GH-IGF-1 Axis in Severe Obese Subjects is Reversed after Bariatric Surgery-Induced Weight Loss and Related with Low-Grade Chronic Inflammation. *J Clin Med*, *9*(8), 2614. <https://doi.org/10.3390/jcm9082614>.
153. Wang, Z., Li, W., Guo, Q., Wang, Y., Ma, L., & Zhang, X. (2018). Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling in Lung Development and Inflammatory Lung Diseases. *Biomed Res Int*, *2018*, 6057589. <https://doi.org/10.1155/2018/6057589>.
154. Lee, H., Kim, S. R., Oh, Y., Cho, S. H., Schleimer, R. P., & Lee, Y. C. (2014). Targeting insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling pathways. A novel therapeutic approach for asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *50*(4), 667-677. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0397TR>.
155. Hoshino, M., Nakamura, Y., Sim, J. J., Yamashiro, Y., Uchida, K., Hosaka, K., & Isogai, S. (1998). Inhaled corticosteroid reduced lamina reticularis of the basement membrane by modulation of insulin-like growth factor (IGF)-I expression in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*, *28*(5), 568-577. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00277.x>.
156. Piñeiro-Hermida, S., López, I. P., Alfaro-Arnedo, E., Torrens, R., Iñiguez, M., Alvarez-Erviti, L., Ruíz-Martínez, C., & Pichel, J. G. (2017). IGF1R deficiency attenuates acute inflammatory response in a bleomycin-induced lung injury mouse model. *Sci Rep*, *7*(1), 4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04561-4>.
157. Frystyk, J., Schou, A. J., Heuck, C., Vorum, H., Lyngholm, M., Flyvbjerg, A., & Wolthers, O. D. (2012). Prednisolone reduces the ability of serum to activate the IGF1 receptor in vitro without affecting circulating total or free IGF1. *Eur J Endocrinol*, *168*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0518>.
158. Jones, J. I., & Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, *16*(1), 3-34. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-1-3>.
159. Conover, C. A., & Powell, D. R. (1991). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 blocks IGF-I-induced receptor down-regulation and cell desensitization in cultured bovine fibroblasts. *Endocrinology*, *129*(2), 710-716. <https://doi.org/10.1210/ENDO-129-2-710>.
160. O'Byrne, P., Fabbri, L. M., Pavord, I. D., Papi, A., Petruzzelli, S., & Lange, P. (2019). Asthma progression and mortality: the role of inhaled corticosteroids. *Eur Respir J*, *54*(1), 1900491. <https://doi.org/10.1183/13993003.00491-2019>.
161. Keskin, O., Farzan, N., Birben, E., Akel, H., Karaaslan, C., Maitland-van der Zee, A. H., Wechsler, M. E., Vijverberg, S. J., & Kalayci, O. (2019). Genetic associations of the response to inhaled corticosteroids in asthma: a systematic review. *Clin Transl Allergy*, *9*, 2. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0239-2>.
162. Bleecker, E. R., Menzies-Gow, A. N., Price, D. B., Bourdin, A., Sweet, S., Martin, A. L., Alacqua, M., & Tran, T. N. (2020). Systematic Literature Review of Systemic Corticosteroid Use for Asthma Management. *Am J Respir Crit Care Med*, *201*(3), 276-293. <https://doi.org/10.1164/rccm.201904-0903SO>.

163. Enríquez-Matas, A., Fernández-Rodríguez, C., Andrés Esteban, E. M., & Fernández-Crespo, J. (2020). Main Contributory Factors on Asthma Control and Health-Related Quality of Life in Elderly Asthmatics. *J Investig Allergol Clin Immunol*, *30*(4), 264-271. <https://doi.org/10.18176/JIACI.0430>.
164. Bourdin, A., Bjermer, L., Brightling, C., Brusselle, G. G., Chanez, P., Chung, K. F., Custovic, A., Diamant, Z., Diver, S., Djukanovic, R., Hamerlijnck, D., Horváth, I., Johnston, S. L., Kanniess, F., Papadopoulos, N., Papi, A., Russell, R. J., Ryan, D., Samitas, K., Tonia, T., ... Gaga, M. (2019). ERS/EAACI statement on severe exacerbations in asthma in adults: facts, priorities and key research questions. *Eur Respir J*, *54*(3), 1900900. <https://doi.org/10.1183/13993003.00900-2019>.
165. Patel, R., Naqvi, S. A., Griffiths, C., & Bloom, C. I. (2020). Systemic adverse effects from inhaled corticosteroid use in asthma: a systematic review. *BMJ Open Respir Res*, *7*(1), e000756. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2020-000756>.
166. Kardas, G., Panek, M., Kuna, P., Damiański, P., & Kupczyk, M. (2022). Monoclonal antibodies in the management of asthma: Dead ends, current status and future perspectives. *Front Immunol*, *13*, 983852. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.983852>.
167. Hardtstock, F., Krieger, J., Wilke, T., Lukas, M., Ultsch, B., Welte, R., Quinzler, R., Maywald, U., & Timmermann, H. (2022). Use of Biologic Therapies in the Treatment of Asthma - A Comparative Real World Data Analysis on Healthcare Resource Utilization and Costs Before and After Therapy Initiation. *J Asthma Allergy*, *15*, 407-418. <https://doi.org/10.2147/JAA.S354062>.
168. Mateju, D., & Chao, J. A. (2022). Stress granules: regulators or by-products?. *FEBS J*, *289*(2), 363-373. <https://doi.org/10.1111/febs.15821>.
169. Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(5), 328-335. <https://doi.org/10.1038/nrm3335>.
170. Berumen Sánchez, G., Bunn, K. E., Pua, H. H., & Rafat, M. (2021). Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease. *Cell Commun Signal*, *19*(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00787-y>.
171. Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O., & Lewis, N. E. (2021). Deciphering cell-cell interactions and communication from gene expression. *Nat Rev Genet*, *22*(2), 71-88. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00292-x>.
172. Mortaz, E., Alipoor, S. D., Varahram, M., Jamaati, H., Garssen, J., Mumby, S. E., & Adcock, I. M. (2018). Exosomes in Severe Asthma: Update in Their Roles and Potential in Therapy. *Biomed Res Int*, *2018*, 2862187. <https://doi.org/10.1155/2018/2862187>.
173. Gil-Martínez, M., Lorente-Sorolla, C., Naharro, S., Rodrigo-Muñoz, J. M., & Del Pozo, V. (2023). Advances and Highlights of miRNAs in Asthma: Biomarkers for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci*, *24*(2), 1628. <https://doi.org/10.3390/ijms24021628>.
174. Sastre, B., Cañas, J. A., Rodrigo-Muñoz, J. M., & Del Pozo, V. (2017). Novel Modulators of Asthma and Allergy: Exosomes and MicroRNAs. *Front Immunol*, *8*, 826. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00826>.
175. Cañas, J. A., Rodrigo-Muñoz, J. M., Gil-Martínez, M., Sastre, B., & del Pozo, V. (2021). Exosomes: A Key Piece in Asthmatic Inflammation. *Int J Mol Sci*, *22*(2), 963. <https://doi.org/10.3390/ijms22020963>.
176. Nederveen, J. P., Warnier, G., Di Carlo, A., Nilsson, M. I., & Tarnopolsky, M. A. (2021). Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science. *Front Physiol*, *11*, 604274. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.604274>.
177. Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*, *19*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>.

178. Hough, K. P., & Deshane, J. S. (2019). Exosomes in Allergic Airway Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*, 19(5), 26. <https://doi.org/10.1007/s11882-019-0857-3>.
179. Horbay, R., Hamraghani, A., Ermini, L., Holcik, S., Beug, S. T., & Yeganeh, B. (2022). Role of Ceramides and Lysosomes in Extracellular Vesicle Biogenesis, Cargo Sorting and Release. *Int J Mol Sci*, 23(23), 15317. <https://doi.org/10.3390/ijms232315317>.
180. Hu, Y. B., Dammer, E. B., Ren, R. J., & Wang, G. (2015). The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener*, 4, 18. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0041-1>.
181. Gruenberg J. (2020). Life in the lumen: The multivesicular endosome. *Traffic*, 21(1), 76-93. <https://doi.org/10.1111/tra.12715>.
182. Karim, M. A., Samyn, D. R., Mattie, S., & Brett, C. L. (2018). Distinct features of multivesicular body-lysosome fusion revealed by a new cell-free content-mixing assay. *Traffic*, 19(2), 138-149. <https://doi.org/10.1111/tra.12543>.
183. Tenchov, R., Sasso, J. M., Wang, X., Liaw, W. S., Chen, C. A., & Zhou, Q. A. (2022). Exosomes-Nature's Lipid Nanoparticles, a Rising Star in Drug Delivery and Diagnostics. *ACS Nano*, 16(11), 17802-17846. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c08774>.
184. Pollet, H., Conrard, L., Cloos, A. S., & Tyteca, D. (2018). Plasma Membrane Lipid Domains as Platforms for Vesicle Biogenesis and Shedding?. *Biomolecules*, 8(3), 94. <https://doi.org/10.3390/biom8030094>.
185. Wu, R., Gao, W., Yao, K., & Ge, J. (2019). Roles of Exosomes Derived From Immune Cells in Cardiovascular Diseases. *Front Immunol*, 10, 648. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00648>.
186. Liu, C., & Su, C. (2019). Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. *Theranostics*, 9(4), 1015-1028. <https://doi.org/10.7150/thno.30853>.
187. Lobasso, S., Tanzarella, P., Mannavola, F., Tucci, M., Silvestris, F., Felici, C., Ingrosso, C., Corcelli, A., & Lopalco, P. (2021). A Lipidomic Approach to Identify Potential Biomarkers in Exosomes From Melanoma Cells With Different Metastatic Potential. *Front Physiol*, 12, 748895. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.748895>.
188. Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavík, J., Machala, M., & Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*, 5, 3477. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>.
189. Li, X. X., Yang, L. X., Wang, C., Li, H., Shi, D. S., & Wang, J. (2023). The Roles of Exosomal Proteins: Classification, Function, and Applications. *Int J Mol Sci*, 24(4), 3061. <https://doi.org/10.3390/ijms24043061>.
190. Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428-445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>.
191. Liu, Q., Li, S., Dupuy, A., Mai, H. L., Sailliet, N., Logé, C., Robert, J. H., & Brouard, S. (2021). Exosomes as New Biomarkers and Drug Delivery Tools for the Prevention and Treatment of Various Diseases: Current Perspectives. *Int J Mol Sci*, 22(15), 7763. <https://doi.org/10.3390/ijms22157763>.
192. Purgè, B., Manfredi, M., Ragnoli, B., Baldanzi, G., & Malerba, M. (2021). Exosomes in chronic respiratory diseases. *Biomed Pharmacother*, 144, 112270. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112270>.
193. Wu, X. B., Wang, M. Y., Zhu, H. Y., Tang, S. Q., You, Y. D., & Xie, Y. Q. (2014). Overexpression of microRNA-21 and microRNA-126 in the patients of bronchial asthma. *Int J Clin Exp Med*, 7(5), 1307-1312. PMID: 24995087.

194. Sanz Rubio, D., Remacha, A. R., Pastor, L., Cubero, P., Vera, E., & Marin, J. M. (2020). Micro-RNA Exosome Cargo from Induced Sputum: New Tool for Approaching Asthma Research. *ATS 2020 Int Conf Am Thorac Soc Int Conf Meet Abstr*, A7411-A7411. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2020.201.1_MeetingAbstracts.A7411.
195. Francisco-García, A. S., Garrido-Martín, E. M., Rupani, H., Lau, L. C. K., Martínez-Núñez, R. T., Howarth, P. H., & Sánchez-Elsner, T. (2019). Small RNA Species and microRNA Profiles are Altered in Severe Asthma Nanovesicles from Broncho Alveolar Lavage and Associate with Impaired Lung Function and Inflammation. *Non-coding RNA*, 5(4), 51. <https://doi.org/10.3390/ncrna5040051>.
196. Suzuki, M., Konno, S., Makita, H., Shimizu, K., Kimura, H., Kimura, H., & Nishimura, M. (2016). Altered circulating exosomal RNA profiles detected by next-generation sequencing in patients with severe asthma. *Eur Respir J*, 48(Suppl 60), PA3410. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2016.PA3410>.
197. Hough, K. P., Wilson, L. S., Trevor, J. L., Strenkowski, J. G., Maina, N., Kim, Y. I., Spell, M. L., Wang, Y., Chanda, D., Dager, J. R., Sharma, N. S., Curtiss, M., Antony, V. B., Dransfield, M. T., Chaplin, D. D., Steele, C., Barnes, S., Duncan, S. R., Prasain, J. K., Thannickal, V. J., ... Deshane, J. S. (2018). Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. *Sci Rep*, 8(1), 10340. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28655-9>.
198. Lässer, C., O'Neil, S. E., Shelke, G. V., Sihlbom, C., Hansson, S. F., Ghosh, Y. S., Lundbäck, B., & Lötvall, J. (2016). Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation. *J Transl Med*, 14(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0927-4>.
199. Xia, Y. C., Harris, T., Stewart, A. G., & Mackay, G. A. (2013). Secreted factors from human mast cells trigger inflammatory cytokine production by human airway smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 160(1), 75-85. <https://doi.org/10.1159/000339697>.
200. Mazzeo, C., Cañas, J. A., Zafra, M. P., Rojas Marco, A., Fernández-Nieto, M., Sanz, V., Mittelbrunn, M., Izquierdo, M., Baixauli, F., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2015). Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 135(6), 1603-1613. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.026>.
201. Cañas, J. A., Sastre, B., Mazzeo, C., Fernández-Nieto, M., Rodrigo-Muñoz, J. M., González-Guerra, A., Izquierdo, M., Barranco, P., Quirce, S., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2017). Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *J Leukoc Biol*, 101(5), 1191-1199. <https://doi.org/10.1189/jlb.3AB0516-233RR>.
202. Cañas, J. A., Sastre, B., Rodrigo-Muñoz, J. M., Fernández-Nieto, M., Barranco, P., Quirce, S., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2018). Eosinophil-derived exosomes contribute to asthma remodelling by activating structural lung cells. *Clin Exp Allergy*, 48(9), 1173-1185. <https://doi.org/10.1111/cea.13122>.
203. Esser, J., Gehrmann, U., D'Alexandri, F. L., Hidalgo-Estévez, A. M., Wheelock, C. E., Scheynius, A., Gabrielsson, S., & Rådmark, O. (2010). Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J Allergy Clin Immunol*, 126(5), 1032-1040.e10404. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.039>.
204. Huang, L., Zhang, X., Wang, M., Chen, Z., Yan, Y., Gu, W., Tan, J., Jiang, W., & Ji, W. (2019). Exosomes from Thymic Stromal Lymphopoietin-Activated Dendritic Cells Promote Th2 Differentiation through the OX40 Ligand. *Pathobiology*, 86(2-3), 111-117. <https://doi.org/10.1159/000493013>.
205. Shefler, I., Salamon, P., Reshef, T., Mor, A., & Mekori, Y. A. (2010). T cell-induced mast cell activation: a role for microparticles released from activated T cells. *J Immunol*, 185(7), 4206-4212. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000409>.
206. Kulshreshtha, A., Ahmad, T., Agrawal, A., & Ghosh, B. (2013). Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 131(4), 1194-203, 1203.e1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1565>.

207. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).
208. Brown, K. C., Svendsen, J. M., Tucci, R. M., Montgomery, B. E., & Montgomery, T. A. (2017). ALG-5 is a miRNA-associated Argonaute required for proper developmental timing in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Nucleic Acids Res*, *45*(15), 9093-9107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx536>.
209. Woldemariam, N. T., Agafonov, O., Høyheim, B., Houston, R. D., Taggart, J. B., & Andreassen, R. (2019). Expanding the miRNA Repertoire in Atlantic Salmon; Discovery of IsomiRs and miRNAs Highly Expressed in Different Tissues and Developmental Stages. *Cells*, *8*(1), 42. <https://doi.org/10.3390/cells8010042>.
210. Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*, *51*(4), 759-774. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>.
211. Ambros V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, *431*(7006), 350-355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>.
212. Bartel D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, *173*(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>.
213. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol*, *9*, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
214. Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2009). Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med*, *13*(1), 24-38. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00534.x>.
215. Eulalio, A., Schulte, L., & Vogel, J. (2012). The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol*, *9*(6), 742-750. <https://doi.org/10.4161/rna.20018>.
216. Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige, A., Szemes, T., & Nagy, B. (2020). Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci*, *21*(18), 6827. <https://doi.org/10.3390/ijms21186827>.
217. Chen, X., Zhao, W., Yuan, Y., Bai, Y., Sun, Y., Zhu, W., & Du, Z. (2017). MicroRNAs tend to synergistically control expression of genes encoding extensively-expressed proteins in humans. *PeerJ*, *5*, e3682. <https://doi.org/10.7717/peerj.3682>.
218. Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suci, N., Cretoiu, S. M., & Voinea, S. C. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*, *9*(2), 276. <https://doi.org/10.3390/cells9020276>.
219. Taka, S., Tzani-Tzanopoulou, P., Wanstall, H., & Papadopoulos, N. G. (2020). MicroRNAs in Asthma and Respiratory Infections: Identifying Common Pathways. *Allergy Asthma Immunol Res*, *12*(1), 4-23. <https://doi.org/10.4168/aaair.2020.12.1.4>.
220. Wang, J., Chen, J., & Sen, S. (2016). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol*, *231*(1), 25-30. <https://doi.org/10.1002/jcp.25056>.
221. Pozniak, T., Shcharbin, D., & Bryszewska, M. (2022). Circulating microRNAs in Medicine. *Int J Mol Sci*, *23*(7), 3996. <https://doi.org/10.3390/ijms23073996>.
222. Heffler, E., Allegra, A., Pioggia, G., Picardi, G., Musolino, C., & Gangemi, S. (2017). MicroRNA Profiling in Asthma: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *57*(6), 642-650. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0231TR>.
223. Angulo, M., Lecuona, E., & Sznajder, J. I. (2012). Role of MicroRNAs in lung disease. *Arch Bronconeumol*, *48*(9), 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2012.04.011>.

224. Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5).
225. Jiang, S., & Yan, W. (2016). Current View of microRNA Processing. *Sign Transduct Insights*, 5, 9-13. <https://doi.org/10.4137/STI.S12317>.
226. Macfarlane, L. A., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11(7), 537-561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>.
227. Vilimova, M., Contrant, M., Randrianjafy, R., Dumas, P., Elbasani, E., Ojala, P. M., Pfeffer, S., & Fender, A. (2021). Cis regulation within a cluster of viral microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 49(17), 10018-10033. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab731>.
228. Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2022). A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-coding RNA*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.3390/ncrna8010010>.
229. Dexheimer, P. J., & Cochella, L. (2020). MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol*, 8, 409. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00409>.
230. Wang, X., Xu, X., Ma, Z., Huo, Y., Xiao, Z., Li, Y., & Wang, Y. (2011). Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA*, 17(8), 1511-1528. <https://doi.org/10.1261/rna.2732611>.
231. Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 12(3), e1627. <https://doi.org/10.1002/wrna.1627>.
232. Elkayam, E., Kuhn, C. D., Tocilj, A., Haase, A. D., Greene, E. M., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*, 150(1), 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.017>.
233. Quévillon Huberdeau, M., & Simard, M. J. (2019). A guide to microRNA-mediated gene silencing. *FEBS J*, 286(4), 642-652. <https://doi.org/10.1111/febs.14666>.
234. Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B., & Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab*, 30(4), 656-673. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.011>.
235. Alipoor, S. D., Adcock, I. M., Garsen, J., Mortaz, E., Varahram, M., Mirsaiedi, M., & Velayati, A. (2016). The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *Eur J Pharmacol*, 791, 395-404. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.015>.
236. Sharma, R., Tiwari, A., & McGeachie, M. J. (2022). Recent miRNA Research in Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 22(12), 231-258. <https://doi.org/10.1007/s11882-022-01050-1>.
237. Jiang, C., Guo, Y., Yu, H., Lu, S., & Meng, L. (2019). Pleiotropic microRNA-21 in pulmonary remodeling: novel insights for molecular mechanism and present advancements. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 15, 33. <https://doi.org/10.1186/s13223-019-0345-2>.
238. Martinez-Nunez, R. T., Bondanese, V. P., Louafi, F., Francisco-Garcia, A. S., Rupani, H., Bedke, N., Holgate, S., Howarth, P. H., Davies, D. E., & Sanchez-Elsner, T. (2014). A microRNA network dysregulated in asthma controls IL-6 production in bronchial epithelial cells. *PLoS One*, 9(10), e111659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111659>.
239. Siddiqui, S., Johansson, K., Joo, A., Bonser, L. R., Koh, K. D., Le Tonqueze, O., Bolourchi, S., Bautista, R. A., Zlock, L., Roth, T. L., Marson, A., Bhakta, N. R., Ansel, K. M., Finkbeiner, W. E., Erle, D. J., & Woodruff, P. G. (2021). Epithelial miR-141 regulates IL-13-induced airway mucus production. *JCI Insight*, 6(5), e139019. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.139019>.
240. Comer, B. S., Camoretti-Mercado, B., Kogut, P. C., Halayko, A. J., Solway, J., & Gerthoffer, W. T. (2014). MicroRNA-146a and microRNA-146b expression and anti-inflammatory function in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307(9), L727-L734. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00174.2014>.

241. Simpson, L. J., Patel, S., Bhakta, N. R., Choy, D. F., Brightbill, H. D., Ren, X., Wang, Y., Pua, H. H., Baumjohann, D., Montoya, M. M., Panduro, M., Remedios, K. A., Huang, X., Fahy, J. V., Arron, J. R., Woodruff, P. G., & Ansel, K. M. (2014). A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production. *Nat Immunol*, *15*(12), 1162-1170. <https://doi.org/10.1038/ni.3026>.
242. Lu, T. X., Lim, E. J., Besse, J. A., Itskovich, S., Plassard, A. J., Fulkerson, P. C., Aronow, B. J., & Rothenberg, M. E. (2013). MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation. *J Immunol*, *190*(4), 1576-1582. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202897>.
243. Rodrigo-Muñoz, J. M., Cañas, J. A., Sastre, B., Rego, N., Greif, G., Rial, M., Mínguez, P., Mahillo-Fernández, I., Fernández-Nieto, M., Mora, I., Barranco, P., Quirce, S., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2019). Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy*, *74*(3), 507-517. <https://doi.org/10.1111/all.13570>.
244. ElKashef, S. M. M. A. E., Ahmad, S. E., Soliman, Y. M. A., & Mostafa, M. S. (2021). Role of microRNA-21 and microRNA-155 as biomarkers for bronchial asthma. *Innate Immun*, *27*(1), 61-69. <https://doi.org/10.1177/1753425920901563>.
245. Suojalehto, H., Lindström, I., Majuri, M. L., Mitts, C., Karjalainen, J., Wolff, H., & Alenius, H. (2014). Altered microRNA expression of nasal mucosa in long-term asthma and allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*, *163*(3), 168-178. <https://doi.org/10.1159/000358486>.
246. Bush A. (2019). Pathophysiological Mechanisms of Asthma. *Front Pediatr*, *7*, 68. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00068>.
247. Cañas, J. A., Sastre, B., Rodrigo-Muñoz, J. M., & Del Pozo, V. (2019). Exosomes: A new approach to asthma pathology. *Clin Chim Acta*, *495*, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.04.055>.
248. Agache, I., & Akdis, C. A. (2019). Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J Clin Invest*, *129*(4), 1493-1503. <https://doi.org/10.1172/JCI124611>.
249. Weidner, J., Malmhäll, C., & Rådinger, M. (2019). MicroRNAs in asthma pathogenesis - from mouse to man. *J Transl Genet Genomics*, *3*, 2. <https://doi.org/10.20517/JTGG.2018.30>.
250. Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci*, *23*(13), 7167. <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>.
251. Jirak, P., Wernly, B., Lichtenauer, M., Franz, M., Knost, T., Abusamrah, T., Kelm, M., Bimpong-Buta, N. Y., & Jung, C. (2020). Next-generation sequencing analysis of circulating micro-RNA expression in response to parabolic flight as a spaceflight analogue. *NPJ Microgravity*, *6*(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-00121-9>.
252. Ortiz-Quintero B. (2020). Extracellular MicroRNAs as Intercellular Mediators and Noninvasive Biomarkers of Cancer. *Cancers*, *12*(11), 3455. <https://doi.org/10.3390/cancers12113455>.
253. Kho, A. T., McGeachie, M. J., Moore, K. G., Sylvia, J. M., Weiss, S. T., & Tantisira, K. G. (2018). Circulating microRNAs and prediction of asthma exacerbation in childhood asthma. *Respir Res*, *19*(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0828-6>.
254. Khamina, K., Diendorfer, A. B., Skalicky, S., Weigl, M., Pultar, M., Krammer, T. L., Fournier, C. A., Schofield, A. L., Otto, C., Smith, A. T., Buchtele, N., Schoergenhofer, C., Jilma, B., Frank, B. J. H., Hofstaetter, J. G., Grillari, R., Grillari, J., Ruprecht, K., Goldring, C. E., Rehrauer, H., ... Hackl, M. (2022). A MicroRNA Next-Generation-Sequencing Discovery Assay (miND) for Genome-Scale Analysis and Absolute Quantitation of Circulating MicroRNA Biomarkers. *Int J Mol Sci*, *23*(3), 1226. <https://doi.org/10.3390/ijms23031226>.
255. Potla, P., Ali, S. A., & Kapoor, M. (2020). A bioinformatics approach to microRNA-sequencing analysis. *Osteoarthr Cartil Open*, *3*(1), 100131. <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100131>.

256. Cani, A. K., Hovelson, D. H., Demirci, H., Johnson, M. W., Tomlins, S. A., & Rao, R. C. (2017). Next generation sequencing of vitreoretinal lymphomas from small-volume intraocular liquid biopsies: new routes to targeted therapies. *Oncotarget*, *8*(5), 7989-7998. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14008>.
257. Muñoz, X., Álvarez-Puebla, M. J., Arismendi, E., Arochena, L., Ausín, M. D. P., Barranco, P., Bobolea, I., Cañas, J. A., Cardaba, B., Crespo, A., Del Pozo, V., Domínguez-Ortega, J., Fernandez-Nieto, M. D. M., Giner, J., González-Barcala, F. J., Luna, J. A., Mullol, J., Ojanguren, I., Olaguibel, J. M., Picado, C., ... Cruz, M. J. (2018). 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*, *S0300-2896(18)30009-7*. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.12.012>.
258. Sekerel, B. E., Sahiner, U. M., Bousquet, J., Demoly, P., Zuberbier, T., Carlsen, K. H., & Wickman, M. (2012). Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens: some concerns. *Allergy*, *67*(3), 442-443. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02772.x>.
259. Steering Committee Authors, & Review Panel Members (2020). A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organ J*, *13*(2), 100091. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100091>.
260. Vandenplas, O., Suojalehto, H., Aasen, T. B., Baur, X., Burge, P. S., de Blay, F., Fishwick, D., Hoyle, J., Maestrelli, P., Muñoz, X., Moscato, G., Sastre, J., Sigsgaard, T., Suuronen, K., Walusiak-Skorupa, J., Cullinan, P., & ERS Task Force on Specific Inhalation Challenges with Occupational Agents (2014). Specific inhalation challenge in the diagnosis of occupational asthma: consensus statement. *Eur Respir J*, *43*(6), 1573-1587. <https://doi.org/10.1183/09031936.00180313>.
261. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects – WMA - The World Medical Association. Accessed on November 20, 2023. Available online at: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>.
262. Pizzichini, E., Pizzichini, M. M., Efthimiadis, A., Evans, S., Morris, M. M., Squillace, D., Gleich, G. J., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1996). Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*, *154*(2 Pt 1), 308-317. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.2.8756799>.
263. Sastre, B., Fernández-Nieto, M., Mollá, R., López, E., Lahoz, C., Sastre, J., del Pozo, V., & Quirce, S. (2008). Increased prostaglandin E2 levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. *Allergy*, *63*(1), 58-66. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01515.x>.
264. Guiot, J., Demarche, S., Henket, M., Paulus, V., Graff, S., Schleich, F., Corhay, J. L., Louis, R., & Moermans, C. (2017). Methodology for Sputum Induction and Laboratory Processing. *J Vis Exp*, (130), 56612. <https://doi.org/10.3791/56612>.
265. Manual de Procedimientos SEPAR, 11. Accessed on November 20, 2023. Available online at: <https://issuu.com/separ/docs/procedimientos11>.
266. Bobolea, I., Barranco, P., Del Pozo, V., Romero, D., Sanz, V., López-Carrasco, V., Canabal, J., Villasante, C., & Quirce, S. (2015). Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. *Allergy*, *70*(5), 540-546. <https://doi.org/10.1111/all.12580>.
267. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, *162*(1), 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
268. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, *17*(1), 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
269. Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, *9*(4), 357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

270. Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166-169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
271. Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, *47*(D1), D155-D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
272. Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res*, *21*(12), 2213-2223. <https://doi.org/10.1101/gr.124321.111>.
273. Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
274. R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Accessed on November 22, 2023. Available online at: <https://www.r-project.org/>.
275. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, *26*(6), 509-515. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000019559.84305.47>.
276. Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teilum, M., & Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, *59*(1), S1-S6. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015>.
277. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
278. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, *150*(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
279. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, *43*(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
280. Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Vilo, J., & Peterson, H. (2020). gprofiler2 - an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g: Profiler. *F1000Res*, *9*, ELIXIR-709. <https://doi.org/10.12688/f1000research.24956.2>.
281. Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., Eilbeck, K., Lewis, S., Marshall, B., Mungall, C., Richter, J., Rubin, G. M., Blake, J. A., Bult, C., Dolan, M., Drabkin, H., Eppig, J. T., Hill, D. P., Ni, L., Ringwald, M., ... Gene Ontology Consortium (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*, *32*(Database issue), D258-D261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh036>.
282. Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, *28*(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
283. Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., Beckman, L., ... D'Eustachio, P. (2022). The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res*, *50*(D1), D687-D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>.
284. Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*, *43*(W1), W460-W466. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>.
285. Vlachos, I. S., Paraskevopoulou, M. D., Karagkouni, D., Georgakilas, G., Vergoulis, T., Kanellos, I., Anastasopoulos, I. L., Maniou, S., Karathanou, K., Kalfakakou, D., Fevgas, A., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally

- supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D153-D159. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1215>.
286. Andreu, Z., Masiá, E., Charbonnier, D., & Vicent, M. J. (2023). A Rapid, Convergent Approach to the Identification of Exosome Inhibitors in Breast Cancer Models. *Nanotheranostics*, 7(1), 1-21. <https://doi.org/10.7150/ntno.73606>.
287. Vigelsø, A., Dybboe, R., Hansen, C. N., Dela, F., Helge, J. W., & Guadalupe Grau, A. (2015). GAPDH and β -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 118(3), 386-394. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00840.2014>.
288. Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4(9), 429-434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
289. Vedula, P., Kurosaka, S., MacTaggart, B., Ni, Q., Papoian, G., Jiang, Y., Dong, D. W., & Kashina, A. (2021). Different translation dynamics of β - and γ -actin regulates cell migration. *Elife*, 10, e68712. <https://doi.org/10.7554/eLife.68712>.
290. Vedula, P., & Kashina, A. (2018). The makings of the “actin code”: regulation of actin’s biological function at the amino acid and nucleotide level. *J Cell Sci*, 131(9), jcs215509. <https://doi.org/10.1242/jcs.215509>.
291. Paskevicius, T., Farraj, R. A., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2023). Calnexin, More Than Just a Molecular Chaperone. *Cells*, 12(3), 403. <https://doi.org/10.3390/cells12030403>.
292. Qadir, F., Aziz, M. A., Sari, C. P., Ma, H., Dai, H., Wang, X., Raithatha, D., Da Silva, L. G. L., Hussain, M., Poorkasreyi, S. P., Hutchison, I. L., Waseem, A., & Teh, M. T. (2018). Transcriptome reprogramming by cancer exosomes: identification of novel molecular targets in matrix and immune modulation. *Mol Cancer*, 17(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0846-5>.
293. Wang, X., Huang, J., Chen, W., Li, G., Li, Z., & Lei, J. (2022). The updated role of exosomal proteins in the diagnosis, prognosis, and treatment of cancer. *Exp Mol Med*, 54(9), 1390-1400. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00855-4>.
294. Kugeratski, F. G., Hodge, K., Lilla, S., McAndrews, K. M., Zhou, X., Hwang, R. F., Zanivan, S., & Kalluri, R. (2021). Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol*, 23(6), 631-641. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00693-y>.
295. Bonsergent, E., Grisard, E., Buchrieser, J., Schwartz, O., Théry, C., & Lavieu, G. (2021). Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat Commun*, 12(1), 1864. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y>.
296. Baskoro, H., Sato, T., Karasutani, K., Suzuki, Y., Mitsui, A., Arano, N., Nurwidya, F., Kato, M., Takahashi, F., Kodama, Y., Seyama, K., & Takahashi, K. (2018). Regional heterogeneity in response of airway epithelial cells to cigarette smoke. *BMC Pulm Med*, 18(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0715-4>.
297. Xiang, L. L., Wan, Q. Q., Wang, Y. M., He, S. J., Xu, W. J., Ding, M., Zhang, J. J., Sun, Y. L., Dong, X., Zhou, Y., Cui, Y. B., & Gao, Y. D. (2022). IL-13 Regulates Orai1 Expression in Human Bronchial Smooth Muscle Cells and Airway Remodeling in Asthma Mice Model via LncRNA H19. *J Asthma Allergy*, 15, 1245-1261. <https://doi.org/10.2147/JAA.S360381>.
298. Gao, W., Gong, J., Mu, M., Zhu, Y., Wang, W., Chen, W., Han, G., Hu, H., & Bao, P. (2021). The Pathogenesis of Eosinophilic Asthma: A Positive Feedback Mechanism That Promotes Th2 Immune Response via Filaggrin Deficiency. *Front Immunol*, 12, 672312. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672312>.

299. Katoh S. (2022). Critical Involvement of CD44 in T Helper Type 2 Cell-Mediated Eosinophilic Airway Inflammation in a Mouse Model of Acute Asthma. *Front Immunol*, 12, 811600. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.811600>.
300. Acharya, K. R., & Ackerman, S. J. (2014). Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem*, 289(25), 17406-17415. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.546218>.
301. Wu L. C. (2011). Immunoglobulin E receptor signaling and asthma. *J Biol Chem*, 286(38), 32891-32897. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.205104>.
302. Eyerich, S., Metz, M., Bossios, A., & Eyerich, K. (2020). New biological treatments for asthma and skin allergies. *Allergy*, 75(3), 546-560. <https://doi.org/10.1111/all.14027>.
303. Kim, A. S., & Doherty, T. A. (2016). New and emerging therapies for asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 116(1), 14-17. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2015.08.001>.
304. Calhoun, W. J., & Chupp, G. L. (2022). The new era of add-on asthma treatments: where do we stand?. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 18(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13223-022-00676-0>.
305. Gelfand E. W. (2009). Pediatric asthma: a different disease. *Proc Am Thorac Soc*, 6(3), 278-282. <https://doi.org/10.1513/pats.200808-090RM>.
306. Ober, C., & Yao, T. C. (2011). The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev*, 242(1), 10-30. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x>.
307. Enilari, O., & Sinha, S. (2019). The Global Impact of Asthma in Adult Populations. *Ann Glob Health*, 85(1), 2. <https://doi.org/10.5334/aogh.2412>.
308. Berdine, G., Alexander, R., & Nugent, K. (2020). Clinical entities, phenotypes, causation, and endotypes based on selected asthma publications. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 33(4), 580-585. <https://doi.org/10.1080/08998280.2020.1793444>.
309. Akindele, A., Daines, L., Cavers, D., Pinnock, H., & Sheikh, A. (2019). Qualitative study of practices and challenges when making a diagnosis of asthma in primary care. *NPJ Prim Care Respir Med*, 29(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41533-019-0140-z>.
310. Mäkikyrö, E. M., Jaakkola, M. S., & Jaakkola, J. J. (2017). Subtypes of asthma based on asthma control and severity: a latent class analysis. *Respir Res*, 18(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0508-y>.
311. Zhu, X., Cui, J., Yi, L., Qin, J., Tulake, W., Teng, F., Tang, W., Wei, Y., & Dong, J. (2020). The Role of T Cells and Macrophages in Asthma Pathogenesis: A New Perspective on Mutual Crosstalk. *Mediators Inflamm*, 2020, 7835284. <https://doi.org/10.1155/2020/7835284>.
312. Bijanzadeh, M., Mahesh, P. A., & Ramachandra, N. B. (2011). An understanding of the genetic basis of asthma. *Indian J Med Res*, 134(2), 149-161. PMID: 21911966.
313. Yawn B. P. (2008). Factors accounting for asthma variability: achieving optimal symptom control for individual patients. *Prim Care Respir J*, 17(3), 138-147. <https://doi.org/10.3132/pcrj.2008.00004>.
314. Scelfo, C., Galeone, C., Bertolini, F., Caminati, M., Ruggiero, P., Facciolongo, N., & Menzella, F. (2018). Towards precision medicine: The application of omics technologies in asthma management. *F1000Res*, 7, 423. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14309.2>.
315. Bakakos P. (2022). Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine. *J Pers Med*, 12(11), 1853. <https://doi.org/10.3390/jpm12111853>.
316. Kaur, R., & Chupp, G. (2019). Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol*, 144(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.031>.
317. Svenningsen, S., & Nair, P. (2017). Asthma Endotypes and an Overview of Targeted Therapy for Asthma. *Front Med*, 4, 158. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00158>.

318. Canonica, G. W., Blasi, F., Crimi, N., Paggiaro, P., Papi, A., Fanelli, F., Stassaldi, A., & Furneri, G. (2021). Defining type 2 asthma and patients eligible for dupilumab in Italy: a biomarker-based analysis. *Clin Mol Allergy*, 19(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12948-021-00146-9>.
319. Moore, W. C., & Peters, S. P. (2006). Severe asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*, 117(3), 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.01.033>.
320. Lommatzsch, M., & Virchow, J. C. (2014). Severe asthma: definition, diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 111(50), 847-855. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0847>.
321. Van Hulst, G., Bureau, F., & Desmet, C. J. (2021). Eosinophils as Drivers of Severe Eosinophilic Asthma: Endotypes or Plasticity?. *Int J Mol Sci*, 22(18), 10150. <https://doi.org/10.3390/ijms221810150>.
322. Maspero, J. F., Cruz, A. A., Beltran, C. F. P., Ali Munive, A., Montero-Arias, F., Hernandez Pliego, R., & Farouk, H. (2023). The use of systemic corticosteroids in asthma management in Latin American countries. *World Allergy Organ J*, 16(4), 100760. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2023.100760>.
323. Scichilone, N., Barnes, P. J., Battaglia, S., Benfante, A., Brown, R., Canonica, G. W., Caramori, G., Cazzola, M., Centanni, S., Cianferoni, A., Corsico, A., De Carlo, G., Di Marco, F., Gaga, M., Hawrylowicz, C., Heffler, E., Matera, M. G., Matucci, A., Paggiaro, P., Papi, A., ... Boulet, L. P. (2020). The Hidden Burden of Severe Asthma: From Patient Perspective to New Opportunities for Clinicians. *J Clin Med*, 9(8), 2397. <https://doi.org/10.3390/jcm9082397>.
324. Borish L. (2016). The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 117(2), 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.04.022>.
325. Taunk, S. T., Cardet, J. C., & Ledford, D. K. (2022). Clinical implications of asthma endotypes and phenotypes. *Allergy Asthma Proc*, 43(5), 375-382. <https://doi.org/10.2500/aap.2022.43.220047>.
326. Lin, T. Y., Poon, A. H., & Hamid, Q. (2013). Asthma phenotypes and endotypes. *Curr Opin Pulm Med*, 19(1), 18-23. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32835b10ec>.
327. Skloot G. S. (2016). Asthma phenotypes and endotypes: a personalized approach to treatment. *Curr Opin Pulm Med*, 22(1), 3-9. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000225>.
328. Carr, T. F., & Kraft, M. (2018). Use of biomarkers to identify phenotypes and endotypes of severe asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 121(4), 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.07.029>.
329. Bielska, A., Niemira, M., Bauer, W., Sidorkiewicz, I., Szałkowska, A., Skwarska, A., Raczowska, J., Ostrowski, D., Gugala, K., Dobrzycki, S., & Krętowski, A. (2022). Serum miRNA Profile in Diabetic Patients With Ischemic Heart Disease as a Promising Non-Invasive Biomarker. *Front Endocrinol*, 13, 888948. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.888948>.
330. Pattnaik, B., Pattnaik, N., Mittal, S., Mohan, A., Agrawal, A., Guleria, R., & Madan, K. (2022). Micro RNAs as potential biomarkers in tuberculosis: A systematic review. *Non-coding RNA Res*, 7(1), 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2021.12.005>.
331. Soccio, P., Moriondo, G., Lacedonia, D., Tondo, P., Quarato, C. M. I., Foschino Barbaro, M. P., & Scioscia, G. (2022). EVs-miRNA: The New Molecular Markers for Chronic Respiratory Diseases. *Life (Basel)*, 12(10), 1544. <https://doi.org/10.3390/life12101544>.
332. Weidner, J., Bartel, S., Kılıç, A., Zissler, U. M., Renz, H., Schwarze, J., Schmidt-Weber, C. B., Maes, T., Rebane, A., Krauss-Etschmann, S., & Rådinger, M. (2021). Spotlight on microRNAs in allergy and asthma. *Allergy*, 76(6), 1661-1678. <https://doi.org/10.1111/all.14646>.
333. Cha, S., Seo, E. H., Lee, S. H., Kim, K. S., Oh, C. S., Moon, J. S., & Kim, J. K. (2021). MicroRNA Expression in Extracellular Vesicles from Nasal Lavage Fluid in Chronic Rhinosinusitis. *Biomedicines*, 9(5), 471. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050471>.

334. Coenen-Stass, A. M. L., Magen, I., Brooks, T., Ben-Dov, I. Z., Greensmith, L., Hornstein, E., & Fratta, P. (2018). Evaluation of methodologies for microRNA biomarker detection by next generation sequencing. *RNA Biol*, *15*(8), 1133-1145. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1514236>.
335. Gil-Martínez, M., Rodrigo-Muñoz, J. M., Sastre, B., Cañas, J. A., García-Latorre, R., Redondo, N., de la Fuente, L., Mínguez, P., Mahillo-Fernández, I., Sastre, J., Quirce, S., Caballero, M. L., Olaguibel, J. M., & Del Pozo, V. (2022). Serum microRNAs Catalog Asthma Patients by Phenotype. *J Investig Allergol Clin Immunol*, *32*(6), 471-478. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0753>.
336. Gil-Martínez, M., Lorente-Sorolla, C., Rodrigo-Muñoz, J. M., Lendínez, M. Á., Núñez-Moreno, G., de la Fuente, L., Mínguez, P., Mahillo-Fernández, I., Sastre, J., Valverde-Monge, M., Quirce, S., Caballero, M. L., González-Barcala, F. J., Arismendi, E., Bobolea, I., Valero, A., Muñoz, X., Cruz, M. J., Martínez-Rivera, C., Plaza, V., ... Del Pozo, V. (2023). Analysis of Differentially Expressed MicroRNAs in Serum and Lung Tissues from Individuals with Severe Asthma Treated with Oral Glucocorticoids. *Int J Mol Sci*, *24*(2), 1611. <https://doi.org/10.3390/ijms24021611>.
337. Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, *12*(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>.
338. Jones, T. L., Neville, D. M., & Chauhan, A. J. (2018). Diagnosis and treatment of severe asthma: a phenotype-based approach. *Clin Med (Lond)*, *18*(Suppl 2), s36-s40. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-2-s36>.
339. Holguin, F., Cardet, J. C., Chung, K. F., Diver, S., Ferreira, D. S., Fitzpatrick, A., Gaga, M., Kellermeyer, L., Khurana, S., Knight, S., McDonald, V. M., Morgan, R. L., Ortega, V. E., Rigau, D., Subbarao, P., Tonia, T., Adcock, I. M., Bleecker, E. R., Brightling, C., Boulet, L. P., ... Bush, A. (2020). Management of severe asthma: a European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline. *Eur Respir J*, *55*(1), 1900588. <https://doi.org/10.1183/13993003.00588-2019>.
340. Kostakou, E., Kaniaris, E., Filiou, E., Vasileiadis, I., Katsaounou, P., Tzortzaki, E., Koulouris, N., Koutsoukou, A., & Rovina, N. (2019). Acute Severe Asthma in Adolescent and Adult Patients: Current Perspectives on Assessment and Management. *J Clin Med*, *8*(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/jcm8091283>.
341. Chung, K. F., Wenzel, S. E., Brozek, J. L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P. J., Adcock, I. M., Bateman, E. D., Bel, E. H., Bleecker, E. R., Boulet, L. P., Brightling, C., Chanaz, P., Dahlen, S. E., Djukanovic, R., Frey, U., Gaga, M., Gibson, P., Hamid, Q., Jajour, N. N., ... Teague, W. G. (2014). International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*, *43*(2), 343-373. <https://doi.org/10.1183/09031936.00202013>.
342. Backman, H., Jansson, S. A., Stridsman, C., Eriksson, B., Hedman, L., Eklund, B. M., Sandström, T., Lindberg, A., Lundbäck, B., & Rönmark, E. (2019). Severe asthma-A population study perspective. *Clin Exp Allergy*, *49*(6), 819-828. <https://doi.org/10.1111/cea.13378>.
343. Song, W. J., Lee, J. H., Kang, Y., Joung, W. J., & Chung, K. F. (2019). Future Risks in Patients With Severe Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*, *11*(6), 763-778. <https://doi.org/10.4168/air.2019.11.6.763>.
344. Rönnebjerg, L., Axelsson, M., Kankaanranta, H., Backman, H., Rådinger, M., Lundbäck, B., & Ekerljung, L. (2021). Severe Asthma in a General Population Study: Prevalence and Clinical Characteristics. *J Asthma Allergy*, *14*, 1105-1115. <https://doi.org/10.2147/JAA.S327659>.
345. Maule, M., Olivieri, B., Guarnieri, G., De Franceschi, L., Martinelli, N., Vaia, R., Argentino, G., Vianello, A., Senna, G., & Caminati, M. (2023). Hidden Comorbidities in Asthma: A Perspective for a Personalized Approach. *J Clin Med*, *12*(6), 2294. <https://doi.org/10.3390/jcm12062294>.
346. Garcia-Rio, F., Alvarez-Puebla, M. J., Esteban-Gorgojo, I., Barranco, P., & Olaguibel, J. M. (2019). Obesity and Asthma: Key Clinical Questions. *J Investig Allergol Clin Immunol*, *29*(4), 262-271. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0316>.

347. Ronco, L., Folino, A., Goia, M., Crida, B., Esposito, I., & Bignamini, E. (2022). Do not forget asthma comorbidities in pediatric severe asthma!. *Front Pediatr*, *10*, 932366. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.932366>.
348. Dávila González, I., Moreno Benítez, F., & Quirce, S. (2019). Benralizumab: A New Approach for the Treatment of Severe Eosinophilic Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*, *29*(2), 84-93. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0385>.
349. Mormile, M., Mormile, I., Fuschillo, S., Rossi, F. W., Lamagna, L., Ambrosino, P., de Paulis, A., & Maniscalco, M. (2023). Eosinophilic Airway Diseases: From Pathophysiological Mechanisms to Clinical Practice. *Int J Mol Sci*, *24*(8), 7254. <https://doi.org/10.3390/ijms24087254>.
350. Patel, S. S., Casale, T. B., & Cardet, J. C. (2018). Biological therapies for eosinophilic asthma. *Expert Opin Biol Ther*, *18*(7), 747-754. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1492540>.
351. Syabbalo, N. (2020). Clinical Features and Management of Eosinophilic Asthma. *J Respir Dis Treat*, *1*(1), 105. <https://doi.org/10.15744/2767-4649.1.105>.
352. Corren, J., Du, E., Gubbi, A., & Vanlandingham, R. (2021). Variability in Blood Eosinophil Counts in Patients with Eosinophilic Asthma. *J allergy Clin Immunol Pract*, *9*(3), 1224-1231.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.10.033>.
353. Hizawa N. (2023). The understanding of asthma pathogenesis in the era of precision medicine. *Allergol Int*, *72*(1), 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2022.09.001>.
354. Bleecker, E. R., Al-Ahmad, M., Bjermer, L., Caminati, M., Canonica, G. W., Kaplan, A., Papadopoulos, N. G., Roche, N., Ryan, D., Tohda, Y., Yáñez, A., & Price, D. (2022). Systemic corticosteroids in asthma: A call to action from World Allergy Organization and Respiratory Effectiveness Group. *World Allergy Organ J*, *15*(12), 100726. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2022.100726>.
355. Pérez de Llano, L. A., García Rivero, J. L., Pallares, A., Mengual, N., & Golpe, R. (2015). Cortico-dependent Asthma: Our Clinical Experience. *Arch Bronconeumol*, *51*(12), 660-661. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2015.02.017>.
356. Henderson, I., Caiazzo, E., McSharry, C., Guzik, T. J., & Maffia, P. (2020). Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy?. *Pharmacol Res*, *160*, 105189. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105189>.
357. Voorham, J., Xu, X., Price, D. B., Golam, S., Davis, J., Zhi Jie Ling, J., Kerkhof, M., Ow, M., & Tran, T. N. (2019). Healthcare resource utilization and costs associated with incremental systemic corticosteroid exposure in asthma. *Allergy*, *74*(2), 273-283. <https://doi.org/10.1111/all.13556>.
358. Busby, J., Holweg, C. T. J., Chai, A., Bradding, P., Cai, F., Chaudhuri, R., Mansur, A. H., Lordan, J. L., Matthews, J. G., Menzies-Gow, A., Niven, R., Staton, T., & Heaney, L. G. (2019). Change in type-2 biomarkers and related cytokines with prednisolone in uncontrolled severe oral corticosteroid dependent asthmatics: an interventional open-label study. *Thorax*, *74*(8), 806-809. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212709>.
359. Alhamdan, F., Marsh, L. M., Pedersen, F., Alhamwe, B. A., Thölken, C., Pfefferle, P. I., Bahmer, T., Greulich, T., Potaczek, D. P., & Garn, H. (2021). Differential Regulation of Interferon Signaling Pathways in CD4⁺ T Cells of the Low Type-2 Obesity-Associated Asthma Phenotype. *Int J Mol Sci*, *22*(18), 10144. <https://doi.org/10.3390/ijms221810144>.
360. Luthe, S. K., Hirayama, A., Goto, T., Faridi, M. K., Camargo, C. A., Jr, & Hasegawa, K. (2018). Association Between Obesity and Acute Severity Among Patients Hospitalized for Asthma Exacerbation. *J allergy Clin Immunol Pract*, *6*(6), 1936-1941.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.02.001>.
361. Kiernan, K., & Maclver, N. J. (2021). The Role of the Adipokine Leptin in Immune Cell Function in Health and Disease. *Front Immunol*, *11*, 622468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622468>.

Bibliografia

362. Otelea, M. R., Arghir, O. C., Zugravu, C., & Rascu, A. (2021). Adiponectin and Asthma: Knowns, Unknowns and Controversies. *Int J Mol Sci*, 22(16), 8971. <https://doi.org/10.3390/ijms22168971>.
363. Verbout, N. G., Benedito, L., Williams, A. S., Kasahara, D. I., Wurmbrand, A. P., Si, H., Halayko, A. J., Hug, C., & Shore, S. A. (2013). Impact of adiponectin overexpression on allergic airways responses in mice. *J Allergy*, 2013, 349520. <https://doi.org/10.1155/2013/349520>.
364. Sharma, V., Ricketts, H. C., Steffensen, F., Goodfellow, A., & Cowan, D. C. (2023). Obesity affects type 2 biomarker levels in asthma. *J Asthma*, 60(2), 385-392. <https://doi.org/10.1080/02770903.2022.2051548>.
365. Wang, B., Yan, L., Yao, Z., & Roskos, L. K. (2017). Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Benralizumab in Healthy Volunteers and Patients With Asthma. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 6(4), 249-257. <https://doi.org/10.1002/psp4.12160>.
366. Cazzola, M., Ora, J., Cavalli, F., Rogliani, P., & Matera, M. G. (2021). Treatable Mechanisms in Asthma. *Mol Diagnosis Ther*, 25(2), 111-121. <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00514-w>.
367. Carr, T. F., Zeki, A. A., & Kraft, M. (2018). Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 197(1), 22-37. <https://doi.org/10.1164/rccm.201611-2232PP>.
368. Fouka, E., Domvri, K., Gkakou, F., Alevizaki, M., Steiropoulos, P., Papakosta, D., & Porpodis, K. (2022). Recent insights in the role of biomarkers in severe asthma management. *Front Med*, 9, 992565. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.992565>.
369. Szeffler, S. J., Wenzel, S., Brown, R., Erzurum, S. C., Fahy, J. V., Hamilton, R. G., Hunt, J. F., Kita, H., Liu, A. H., Panettieri, R. A., Jr, Schleimer, R. P., & Minnicozzi, M. (2012). Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*, 129(3 Suppl), S9-S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.979>.
370. Habib, N., Pasha, M. A., & Tang, D. D. (2022). Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells*, 11(17), 2764. <https://doi.org/10.3390/cells11172764>.
371. Syabbalo, N. (2020). Clinical Features And Management Of Neutrophilic Asthma. *J Pulm Med Respir Res*, 6, 036. <https://doi.org/10.24966/PMRR-0177/100036>.
372. Alexandrova, E., Miglino, N., Hashim, A., Nassa, G., Stellato, C., Tamm, M., Baty, F., Brutsche, M., Weisz, A., & Borger, P. (2016). Small RNA profiling reveals deregulated phosphatase and tensin homolog (PTEN)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in bronchial smooth muscle cells from asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 137(1), 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.031>.
373. Guan, Y., Ma, Y., Tang, Y., Liu, X., Zhao, Y., & An, L. (2021). MiRNA-221-5p suppressed the Th17/Treg ratio in asthma via RORyt/Foxp3 by targeting SOCS1. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 17(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s13223-021-00620-8>.
374. Guiot, J., Struman, I., Louis, E., Louis, R., Malaise, M., & Njock, M. S. (2019). Exosomal miRNAs in Lung Diseases: From Biologic Function to Therapeutic Targets. *J Clin Med*, 8(9), 1345. <https://doi.org/10.3390/jcm8091345>.
375. Liu, P. F., Yan, P., Zhao, D. H., Shi, W. F., Meng, S., Liu, Y., Liu, B., Li, G. F., & Xie, L. X. (2018). The effect of environmental factors on the differential expression of miRNAs in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a pilot clinical study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 13, 741-751. <https://doi.org/10.2147/COPD.S156865>.
376. Salimian, J., Mirzaei, H., Moridikia, A., Harchegani, A. B., Sahebkar, A., & Salehi, H. (2018). Chronic obstructive pulmonary disease: MicroRNAs and exosomes as new diagnostic and therapeutic biomarkers. *J Res Med Sci*, 23, 27. https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_1054_17.
377. Pavlidis, S., Takahashi, K., Ng Kee Kwong, F., Xie, J., Hoda, U., Sun, K., Elyasigomari, V., Agapow, P., Loza, M., Baribaud, F., Chanez, P., Fowler, S. J., Shaw, D. E., Fleming, L. J., Howarth, P. H., Sousa, A. R., Corfield, J., Auffray, C., De Meulder, B., Knowles, R., ... on behalf of the U-BIOPRED Study Group

- (2019). "T2-high" in severe asthma related to blood eosinophil, exhaled nitric oxide and serum periostin. *Eur Respir J*, 53(1), 1800938. <https://doi.org/10.1183/13993003.00938-2018>.
378. Krishnan, J. A., Lazarus, S. C., Blake, K. V., Sorkness, C. A., Covar, R., Dyer, A. M., Lang, J. E., Lugogo, N. L., Mauger, D. T., Wechsler, M. E., Wenzel, S. E., Cardet, J. C., Castro, M., Israel, E., Phipatanakul, W., & King, T. S. (2022). Biomarkers to Predict Response to Inhaled Corticosteroids and Long-Acting Muscarinic Antagonists in Adolescents and Adults with Mild Persistent Asthma. *Ann Am Thorac Soc*, 19(3), 372-380. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202105-613OC>.
379. Choi, Y., Kim, M., Kim, S. J., Yoo, H. J., Kim, S. H., & Park, H. S. (2020). Metabolic shift favoring C18:0 ceramide accumulation in obese asthma. *Allergy*, 75(11), 2858-2866. <https://doi.org/10.1111/all.14366>.
380. Huo, X., Zhang, K., Yi, L., Mo, Y., Liang, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Xu, Y., & Zhen, G. (2016). Decreased epithelial and plasma miR-181b-5p expression associates with airway eosinophilic inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy*, 46(10), 1281-1290. <https://doi.org/10.1111/cea.12754>.
381. Xu, W., Wang, Y., Ma, Y., & Yang, J. (2020). MiR-223 plays a protecting role in neutrophilic asthmatic mice through the inhibition of NLRP3 inflammasome. *Respir Res*, 21(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01374-4>.
382. Cay, P., Singer, C. A., & Ba, M. A. (2022). Gene network analysis for identification of microRNA biomarkers for asthma. *Respir Res*, 23(1), 378. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02304-2>.
383. Joseph, C., & Tatler, A. L. (2022). Pathobiology of Airway Remodeling in Asthma: The Emerging Role of Integrins. *J Asthma Allergy*, 15, 595-610. <https://doi.org/10.2147/JAA.S267222>.
384. Dave, V. P., Ngo, T. A., Pernestig, A. K., Tilevik, D., Kant, K., Nguyen, T., Wolff, A., & Bang, D. D. (2019). MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics. *Lab Invest*, 99(4), 452-469. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0143-3>.
385. Cañas, J. A., Rodrigo-Muñoz, J. M., Sastre, B., Gil-Martinez, M., Redondo, N., & Del Pozo, V. (2021). MicroRNAs as Potential Regulators of Immune Response Networks in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Immunol*, 11, 608666. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608666>.
386. Haj-Salem, I., Plante, S., Gounni, A. S., Rouabhia, M., & Chakir, J. (2018). Fibroblast-derived exosomes promote epithelial cell proliferation through TGF- β 2 signalling pathway in severe asthma. *Allergy*, 73(1), 178-186. <https://doi.org/10.1111/all.13234>.
387. Xu, L., Yi, M., Tan, Y., Yi, Z., & Zhang, Y. (2020). A comprehensive analysis of microRNAs as diagnostic biomarkers for asthma. *Ther Adv Respir Dis*, 14, 1753466620981863. <https://doi.org/10.1177/1753466620981863>.
388. Wardzyńska, A., Pawelczyk, M., Rywaniak, J., Makowska, J., Jamroz-Brzeska, J., & Kowalski, M. L. (2021). Circulating miRNA expression in asthmatics is age-related and associated with clinical asthma parameters, respiratory function and systemic inflammation. *Respir Res*, 22(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01769-x>.
389. Roffel, M. P., Boudewijn, I. M., van Nijnatten, J. L. L., Faiz, A., Vermeulen, C. J., van Oosterhout, A. J., Affleck, K., Timens, W., Bracke, K. R., Maes, T., Heijink, I. H., Brandsma, C. A., & van den Berge, M. (2022). Identification of asthma-associated microRNAs in bronchial biopsies. *Eur Respir J*, 59(3), 2101294. <https://doi.org/10.1183/13993003.01294-2021>.
390. Gil-Martínez, M., Lorente-Sorolla, C., Rodrigo-Muñoz, J. M., Naharro, S., García-de Castro, Z., Sastre, J., Valverde-Monge, M., Quirce, S., Caballero, M. L., Olaguibel, J. M., & Del Pozo, V. (2023). Obese Asthma Phenotype Is Associated with hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p Modulating the IGF Axis. *Int J Mol Sci*, 24(14), 11620. <https://doi.org/10.3390/ijms241411620>.

391. Wouters, E. F., Reynaert, N. L., Dentener, M. A., & Vernooy, J. H. (2009). Systemic and local inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection?. *Proc Am Thorac Soc*, 6(8), 638-647. <https://doi.org/10.1513/pats.200907-073DP>.
392. Holgate S. T. (2011). Asthma: a simple concept but in reality a complex disease. *Eur J Clin Invest*, 41(12), 1339-1352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02534.x>.
393. Kierbiedź-Guzik, N., & Sozańska, B. (2023). miRNAs as Modern Biomarkers in Asthma Therapy. *Int J Mol Sci*, 24(14), 11499. <https://doi.org/10.3390/ijms241411499>.
394. Kyyaly, M. A., Sanchez-Elsner, T., He, P., Sones, C. L., Arshad, S. H., & Kurukulaaratchy, R. J. (2021). Circulating miRNAs-A potential tool to identify severe asthma risk?. *Clin Transl Allergy*, 11(4), e12040. <https://doi.org/10.1002/ct2.12040>.
395. Saglani, S., & Lloyd, C. M. (2015). Novel concepts in airway inflammation and remodelling in asthma. *Eur Respir J*, 46(6), 1796-1804. <https://doi.org/10.1183/13993003.01196-2014>.
396. Rodrigo-Muñoz, J. M., Gil-Martínez, M., Lorente-Sorolla, C., García-Latorre, R., Valverde-Monge, M., Quirce, S., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2022). miR-144-3p Is a Biomarker Related to Severe Corticosteroid-Dependent Asthma. *Front Immunol*, 13, 858722. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.858722>.
397. Kyyaly, M. A., Vorobeva, E. V., Kothalawala, D. M., Fong, W. C. G., He, P., Sones, C. L., Al-Zahrani, M., Sanchez-Elsner, T., Arshad, S. H., & Kurukulaaratchy, R. J. (2022). MicroRNAs-A Promising Tool for Asthma Diagnosis and Severity Assessment: A Systematic Review. *J Pers Med*, 12(4), 543. <https://doi.org/10.3390/jpm12040543>.
398. Alashkar Alhamwe, B., Potaczek, D. P., Miethe, S., Alhamdan, F., Hintz, L., Magomedov, A., & Garn, H. (2021). Extracellular Vesicles and Asthma-More Than Just a Co-Existence. *Int J Mol Sci*, 22(9), 4984. <https://doi.org/10.3390/ijms22094984>.
399. Hazrati, A., Soudi, S., Malekpour, K., Mahmoudi, M., Rahimi, A., Hashemi, S. M., & Varma, R. S. (2022). Immune cells-derived exosomes function as a double-edged sword: role in disease progression and their therapeutic applications. *Biomark Res*, 10(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00374-4>.
400. Zhang, A., Sun, H., & Wang, X. (2012). Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. *Anal Bioanal Chem*, 404(4), 1239-1245. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6117-1>.
401. Luna, D., Miranda, M., Minervino, A. H. H., Piñeiro, V., Herrero-Latorre, C., & López-Alonso, M. (2019). Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum. *PLoS One*, 14(2), e0211859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211859>.
402. He, L., Liu, J., Wang, X., Wang, Y., Zhu, J., & Kang, X. (2022). Identifying a novel serum microRNA biomarker panel for the diagnosis of childhood asthma. *Exp Biol Med (Maywood)*, 247(19), 1732-1740. <https://doi.org/10.1177/15353702221114870>.
403. Kierbiedź-Guzik, N., & Sozańska, B. (2023). The Potential Role of Serum and Exhaled Breath Condensate miRNAs in Diagnosis and Predicting Exacerbations in Pediatric Asthma. *Biomedicines*, 11(3), 763. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030763>.
404. Shaik, N. A., Nasser, K., Mohammed, A., Mujalli, A., Obaid, A. A., El-Harouni, A. A., Elango, R., & Banaganapalli, B. (2022). Identification of miRNA-mRNA-TFs regulatory network and crucial pathways involved in asthma through advanced systems biology approaches. *PLoS One*, 17(10), e0271262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271262>.
405. Kok, M. G. M., de Ronde, M. W. J., Moerland, P. D., Ruijter, J. M., Creemers, E. E., & Pinto-Sietsma, S. J. (2017). Small sample sizes in high-throughput miRNA screens: A common pitfall for the identification of miRNA biomarkers. *Biomol Detect Quantif*, 15, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.002>.

406. Duan, X., Qiao, S., Li, D., Li, S., Zheng, Z., Wang, Q., & Zhu, X. (2021). Circulating miRNAs in Serum as Biomarkers for Early Diagnosis of Non-small Cell Lung Cancer. *Front Genet*, *12*, 673926. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.673926>.
407. Guo, L., Zhao, Y., Yang, S., Cai, M., Wu, Q., & Chen, F. (2013). Genome-wide screen for aberrantly expressed miRNAs reveals miRNA profile signature in breast cancer. *Mol Biol Rep*, *40*(3), 2175-2186. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2277-5>.
408. Ouyang, T., Liu, Z., Han, Z., & Ge, Q. (2019). MicroRNA Detection Specificity: Recent Advances and Future Perspective. *Anal Chem*, *91*(5), 3179-3186. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05909>.
409. Gurtan, A. M., & Sharp, P. A. (2013). The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Bio*, *425*(19), 3582-3600. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.007>.
410. Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F. C., & Werge, T. (2009). MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One*, *4*(10), e7225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007225>.
411. Rial, M. J., Cañas, J. A., Rodrigo-Muñoz, J. M., Valverde-Monge, M., Sastre, B., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2021). Changes in Serum MicroRNAs after Anti-IL-5 Biological Treatment of Severe Asthma. *Int J Mol Sci*, *22*(7), 3558. <https://doi.org/10.3390/ijms22073558>.
412. Bem, J., Grabowska, I., Daniszewski, M., Zawada, D., Czerwinska, A. M., Bugajski, L., Piwocka, K., Fogtman, A., & Ciemerych, M. A. (2018). Transient MicroRNA Expression Enhances Myogenic Potential of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, *36*(5), 655-670. <https://doi.org/10.1002/stem.2772>.
413. Hu, Z., Gao, S., Lindberg, D., Panja, D., Wakabayashi, Y., Li, K., Kleinman, J. E., Zhu, J., & Li, Z. (2019). Temporal dynamics of miRNAs in human DLPFC and its association with miRNA dysregulation in schizophrenia. *Transl Psychiatry*, *9*(1), 196. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0538-y>.
414. Sullivan, G. M., & Feinn, R. (2012). Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ*, *4*(3), 279-282. <https://doi.org/10.4300/JGME-D-12-00156.1>.
415. Lindquist, M. A., & Mejia, A. (2015). Zen and the art of multiple comparisons. *Psychosom Med*, *77*(2), 114-125. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000148>.
416. Moutsopoulos, I., Maischak, L., Lauzikaite, E., Vasquez Urbina, S. A., Williams, E. C., Drost, H. G., & Mohorianu, I. I. (2021). noisyR: enhancing biological signal in sequencing datasets by characterizing random technical noise. *Nucleic Acids Res*, *49*(14), e83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab433>.
417. Guo, S., Huang, S., Jiang, X., Hu, H., Han, D., Moreno, C. S., Fairbrother, G. L., Hughes, D. A., Stoneking, M., & Khaitovich, P. (2021). Variation of microRNA expression in the human placenta driven by population identity and sex of the newborn. *BMC Genomics*, *22*(1), 286. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07542-0>.
418. Sullivan, R., Montgomery, A., Scipioni, A., Jhaveri, P., Schmidt, A. T., & Hicks, S. D. (2022). Confounding Factors Impacting microRNA Expression in Human Saliva: Methodological and Biological Considerations. *Genes*, *13*(10), 1874. <https://doi.org/10.3390/genes13101874>.
419. Ye, J., Xu, M., Tian, X., Cai, S., & Zeng, S. (2019). Research advances in the detection of miRNA. *J Pharm Anal*, *9*(4), 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.05.004>.
420. Witherspoon, D. J., Wooding, S., Rogers, A. R., Marchani, E. E., Watkins, W. S., Batzer, M. A., & Jorde, L. B. (2007). Genetic similarities within and between human populations. *Genetics*, *176*(1), 351-359. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.067355>.
421. Tota, M., Łacwik, J., Laska, J., Sędek, Ł., & Gomułka, K. (2023). The Role of Eosinophil-Derived Neurotoxin and Vascular Endothelial Growth Factor in the Pathogenesis of Eosinophilic Asthma. *Cells*, *12*(9), 1326. <https://doi.org/10.3390/cells12091326>.

422. Liu, B., Wang, J., & Ren, Z. (2021). SKP2-Promoted Ubiquitination of FOXO3 Promotes the Development of Asthma. *J Immunol*, *206*(10), 2366-2375. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000387>.
423. Wu, Y., Lu, Y., Zou, F., Fan, X., Li, X., Zhang, H., Chen, H., Sun, X., & Liu, Y. (2020). PTEN participates in airway remodeling of asthma by regulating CD38/Ca²⁺/CREB signaling. *Aging*, *12*(16), 16326-16340. <https://doi.org/10.18632/aging.103664>.
424. Qasim, M., Abdullah, M., Ali Ashfaq, U., Noor, F., Nahid, N., Alzamami, A., Alturki, N. A., & Khurshid, M. (2023). Molecular mechanism of *Ferula asafoetida* for the treatment of asthma: Network pharmacology and molecular docking approach. *Saudi J Biol Sci*, *30*(2), 103527. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103527>.
425. Song, R., Liu, Q., Liu, T., & Li, J. (2015). Connecting rules from paired miRNA and mRNA expression data sets of HCV patients to detect both inverse and positive regulatory relationships. *BMC Genomics*, *16* Suppl 2(Suppl 2), S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S2-S11>.
426. Guo, L., Zhao, Y., Yang, S., Zhang, H., & Chen, F. (2014). Integrative analysis of miRNA-mRNA and miRNA-miRNA interactions. *Biomed Res Int*, *2014*, 907420. <https://doi.org/10.1155/2014/907420>.
427. Brummer, O., Pölönen, P., Mustjoki, S., & Brück, O. (2023). Computational textural mapping harmonises sampling variation and reveals multidimensional histopathological fingerprints. *Br J Cancer*, *129*(4), 683-695. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02329-4>.
428. Esparza-Gordillo, J., Soria, J. M., Buil, A., Almasy, L., Blangero, J., Fontcuberta, J., & Rodríguez de Córdoba, S. (2004). Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics*, *56*(2), 77-82. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0660-7>.
429. Ying, S. Y., Chang, D. C., & Lin, S. L. (2008). The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Mol Biotechnol*, *38*(3), 257-268. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9013-8>.
430. Teumer, A., Qi, Q., Nethander, M., Aschard, H., Bandinelli, S., Beekman, M., Berndt, S. I., Bidlingmaier, M., Broer, L., CHARGE Longevity Working Group, Cappola, A., Ceda, G. P., Chanock, S., Chen, M. H., Chen, T. C., Chen, Y. D., Chung, J., Del Greco Miglianico, F., Eriksson, J., Ferrucci, L., ... Kaplan, R. C. (2016). Genomewide meta-analysis identifies loci associated with IGF-I and IGFBP-3 levels with impact on age-related traits. *Aging Cell*, *15*(5), 811-824. <https://doi.org/10.1111/accel.12490>.
431. Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, *75*(1), 59-72. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80084-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80084-4).
432. Gomes, B. C., Peixinho, N., Pisco, R., Gromicho, M., Pronto-Laborinho, A. C., Rueff, J., de Carvalho, M., & Rodrigues, A. S. (2023). Differential Expression of miRNAs in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Mol Neurobiol*, *60*(12), 7104-7117. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03520-7>.
433. Zehavi, L., Avraham, R., Barzilai, A., Bar-Ilan, D., Navon, R., Sidi, Y., Avni, D., & Leibowitz-Amit, R. (2012). Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol Cancer*, *11*, 44. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-44>.
434. Veraldi, K. L., Gibson, B. T., Yasuoka, H., Myerburg, M. M., Kelly, E. A., Balzar, S., Jarjour, N. N., Pilewski, J. M., Wenzel, S. E., & Feghali-Bostwick, C. A. (2009). Role of insulin-like growth factor binding protein-3 in allergic airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, *180*(7), 611-617. <https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1555OC>.
435. Alfaro-Arnedo, E., López, I. P., Piñeiro-Hermida, S., Uceros, Á. C., González-Barcala, F. J., Salgado, F. J., & Pichel, J. G. (2021). IGF1R as a Potential Pharmacological Target in Allergic Asthma. *Biomedicines*, *9*(8), 912. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080912>.

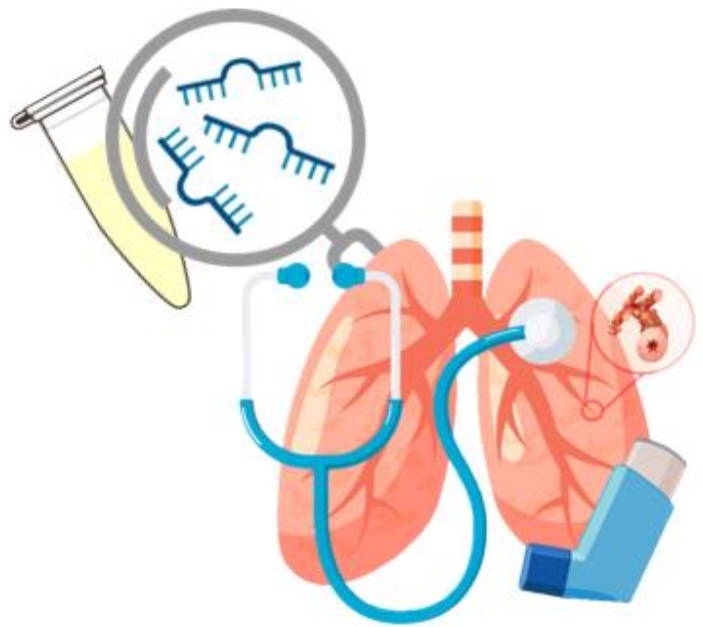
436. Ricco, R. C., Ricco, R. G., Queluz, M. C., de Paula, M. T. S., Atique, P. V., Custódio, R. J., Tourinho Filho, H., Del Roio Liberatori, R., Jr, & Martinelli, C. E., Jr (2018). IGF-1R mRNA expression is increased in obese children. *Growth Horm IGF Res*, *39*, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2017.11.001>.
437. Haywood, N. J., Slater, T. A., Matthews, C. J., & Wheatcroft, S. B. (2019). The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes. *Mol Metab*, *19*, 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.10.008>.
438. Weidner, J., Ekerljung, L., Malmhäll, C., Miron, N., & Rådinger, M. (2020). Circulating microRNAs correlate to clinical parameters in individuals with allergic and non-allergic asthma. *Respir Res*, *21*(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01351-x>.
439. Zhou, Y., Duan, Q., & Yang, D. (2023). In vitro human cell-based models to study airway remodeling in asthma. *Biomed Pharmacother*, *159*, 114218. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114218>.
440. Al-Muhsen, S., Johnson, J. R., & Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *128*(3), 451-464. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.047>.
441. Baillie-Benson, P., Moris, N., & Martinez Arias, A. (2020). Pluripotent stem cell models of early mammalian development. *Curr Opin Cell Biol*, *66*, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.010>.
442. Lichou, F., & Trynka, G. (2020). Functional studies of GWAS variants are gaining momentum. *Nat Commun*, *11*, 6283. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20188-y>.
443. Salehi-Reyhani, A., Ces, O., & Elani, Y. (2017). Artificial cell mimics as simplified models for the study of cell biology. *Exp Biol Med (Maywood)*, *242*(13), 1309-1317. <https://doi.org/10.1177/1535370217711441>.
444. Blandino, G., & Lo Sardo, F. (2019). In vivo experimental models account for higher complexity than in vitro preclinical settings in cancer. *J Thorac Dis*, *11*(Suppl 3), S461-S464. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.11.17>.
445. Xu, Y., Shrestha, N., Préat, V., & Beloqui, A. (2021). An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Adv Drug Deliv Rev*, *175*, 113795. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.005>.
446. Huang, F., Jia, H., Zou, Y., Yao, Y., & Deng, Z. (2020). Exosomes: an important messenger in the asthma inflammatory microenvironment. *J Int Med Res*, *48*(2), 300060520903220. <https://doi.org/10.1177/0300060520903220>.
447. Chen, C., Wang, J., Pan, D., Wang, X., Xu, Y., Yan, J., Wang, L., Yang, X., Yang, M., & Liu, G. P. (2023). Applications of multi-omics analysis in human diseases. *MedComm*, *4*(4), e315. <https://doi.org/10.1002/mco2.315>.
448. Cufaro, M. C., Pieragostino, D., Lanuti, P., Rossi, C., Cicalini, I., Federici, L., De Laurenzi, V., & Del Boccio, P. (2019). Extracellular Vesicles and Their Potential Use in Monitoring Cancer Progression and Therapy: The Contribution of Proteomics. *J Oncol*, *2019*, 1639854. <https://doi.org/10.1155/2019/1639854>.
449. Bandu, R., Oh, J. W., & Kim, K. P. (2019). Mass spectrometry-based proteome profiling of extracellular vesicles and their roles in cancer biology. *Exp Mol Med*, *51*(3), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0218-2>.
450. Huang, D., Rao, D., Xi, X., Zhang, Z., & Zhong, T. (2022). Application of extracellular vesicles proteins in cancer diagnosis. *Front cell Dev Biol*, *10*, 1007360. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1007360>.
451. Han, Q. F., Li, W. J., Hu, K. S., Gao, J., Zhai, W. L., Yang, J. H., & Zhang, S. J. (2022). Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*, *21*(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>.
452. Zhang, W., Ou, X., & Wu, X. (2019). Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *Int J Oncol*, *54*(5), 1719-1733. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4742>.

453. Wilkerson, E. M., Johansson, M. W., Hebert, A. S., Westphall, M. S., Mathur, S. K., Jarjour, N. N., Schwantes, E. A., Mosher, D. F., & Coon, J. J. (2016). The Peripheral Blood Eosinophil Proteome. *J Proteome Res*, *15*(5), 1524-1533. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00006>.
454. Sano, K., Yamauchi, K., Hoshi, H., Honma, M., Tamura, G., & Shirato, K. (1997). CD44 expression on blood eosinophils is a novel marker of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, *114 Suppl 1*, 67-71. <https://doi.org/10.1159/000237722>.
455. Weller, P. F., & Spencer, L. A. (2017). Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol*, *17*(12), 746-760. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.95>.
456. Chua, J. C., Douglass, J. A., Gillman, A., O'Hehir, R. E., & Meeusen, E. N. (2012). Galectin-10, a potential biomarker of eosinophilic airway inflammation. *PLoS One*, *7*(8), e42549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042549>.
457. Osiecka, O., Skrzeczynska-Moncznik, J., Morytko, A., Mazur, A., Majewski, P., Bilaska, B., Kapinska-Mrowiecka, M., Kosalka-Wegiel, J., Pastuszczak, M., Pyza, E., & Cichy, J. (2022). Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Is Present in Circulating and Tissue-Recruited Human Eosinophils and Regulates Their Migratory Function. *Front Immunol*, *12*, 737231. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.737231>.
458. Raundhal, M., Morse, C., Khare, A., Oriss, T. B., Milosevic, J., Trudeau, J., Huff, R., Pilewski, J., Holguin, F., Kolls, J., Wenzel, S., Ray, P., & Ray, A. (2015). High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J Clin Invest*, *125*(8), 3037-3050. <https://doi.org/10.1172/JCI80911>.
459. Wiese, A. V., Duhn, J., Korkmaz, R. Ü., Quell, K. M., Osman, I., Ender, F., Schröder, T., Lewkowich, I., Hogan, S., Huber-Lang, M., Gumprecht, F., König, P., Köhl, J., & Laumonnier, Y. (2023). C5aR1 activation in mice controls inflammatory eosinophil recruitment and functions in allergic asthma. *Allergy*, *78*(7), 1893-1908. <https://doi.org/10.1111/all.15670>.
460. Nakagome, K., & Nagata, M. (2018). Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front Immunol*, *9*, 2220. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02220>.
461. Baines, K. J., Simpson, J. L., Bowden, N. A., Scott, R. J., & Gibson, P. G. (2010). Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. *Eur Respir J*, *35*(3), 522-531. <https://doi.org/10.1183/09031936.00027409>.
462. Liu, H., Ni, S., Zhang, Y., Ding, L., & Zhang, Y. (2013). Identification of proteasome subunit beta type 3 involved in the potential mechanism of corticosteroid protective effectiveness on beta-2 adrenoceptor desensitization by a proteomics approach. *J Thorac Dis*, *5*(6), 797-805. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.42>.
463. Arathimos, R., Granell, R., Haycock, P., Richmond, R. C., Yarmolinsky, J., Relton, C. L., & Tilling, K. (2019). Genetic and observational evidence supports a causal role of sex hormones on the development of asthma. *Thorax*, *74*(7), 633-642. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212207>.
464. Ben Anes, A., Ben Nasr, H., Garrouch, A., Bennour, S., Bchir, S., Hachana, M., Benzarti, M., Tabka, Z., & Chahed, K. (2018). Alterations in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in chronic obstructive pulmonary disease: relationships with oxidative and inflammatory markers. *Mol Cell Biochem*, *445*(1-2), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3246-z>.
465. Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2021). The basic immunology of asthma. *Cell*, *184*(6), 1469-1485. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.016>.
466. Dullaers, M., Schuijs, M. J., Willart, M., Fierens, K., Van Moorlegghem, J., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2017). House dust mite-driven asthma and allergen-specific T cells depend on B cells when the amount of inhaled allergen is limiting. *J Allergy Clin Immunol*, *140*(1), 76-88.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.020>.
467. Green, C. E., & Turner, A. M. (2017). The role of the endothelium in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Res*, *18*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0505-1>.

468. Johnson, P., Maiti, A., Brown, K. L., & Li, R. (2000). A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response?. *Biochem Pharmacol*, *59*(5), 455-465. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00266-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00266-x).
469. Fernandez-Sola, J., Cusso, R., Picado, C., Vernet, M., Grau, J. M., & Urbano-Marquez, A. (1993). Patients with chronic glucocorticoid treatment develop changes in muscle glycogen metabolism. *J Neurol Sci*, *117*(1-2), 103-106. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(93\)90161-q](https://doi.org/10.1016/0022-510x(93)90161-q).
470. Wan, R., Srikaram, P., Guntupalli, V., Hu, C., Chen, Q., & Gao, P. (2023). Cellular senescence in asthma: from pathogenesis to therapeutic challenges. *EBioMedicine*, *94*, 104717. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104717>.
471. Pelaia, C., Vatrella, A., Gallelli, L., Lombardo, N., Sciacqua, A., Savino, R., & Pelaia, G. (2021). Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Asthma and COPD: Pathogenic Aspects and Potential Targeted Therapies. *Drug Des Devel Ther*, *15*, 1275-1284. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S300988>.
472. Jo, A., & Kim, D. W. (2023). Neutrophil Extracellular Traps in Airway Diseases: Pathological Roles and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*, *24*(5), 5034. <https://doi.org/10.3390/ijms24055034>.
473. Caminati, M., Pham, D. L., Bagnasco, D., & Canonica, G. W. (2018). Type 2 immunity in asthma. *World Allergy Organ J*, *11*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40413-018-0192-5>.
474. Edwards, M. R., Bartlett, N. W., Clarke, D., Birrell, M., Belvisi, M., & Johnston, S. L. (2009). Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther*, *121*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.09.003>.
475. Altman, M. C., Gill, M. A., Whalen, E., Babineau, D. C., Shao, B., Liu, A. H., Jepson, B., Gruchalla, R. S., O'Connor, G. T., Pongracic, J. A., Kerckmar, C. M., Khurana Hershey, G. K., Zoratti, E. M., Johnson, C. C., Teach, S. J., Kattan, M., Bacharier, L. B., Beigelman, A., Sigelman, S. M., Presnell, S., ... Jackson, D. J. (2019). Transcriptome networks identify mechanisms of viral and nonviral asthma exacerbations in children. *Nat Immunol*, *20*(5), 637-651. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0347-8>.
476. Yang, C. W., Hojer, C. D., Zhou, M., Wu, X., Wuster, A., Lee, W. P., Yaspan, B. L., & Chan, A. C. (2016). Regulation of T Cell Receptor Signaling by DENND1B in TH2 Cells and Allergic Disease. *Cell*, *164*(1-2), 141-155. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.052>.
477. Nakagome, K., & Nagata, M. (2022). Innate Immune Responses by Respiratory Viruses, Including Rhinovirus, During Asthma Exacerbation. *Front Immunol*, *13*, 865973. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.865973>.
478. Lee, J., Jang, J., Park, S. M., & Yang, S. R. (2021). An Update on the Role of Nrf2 in Respiratory Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, *22*(16), 8406. <https://doi.org/10.3390/ijms22168406>.
479. Liu, L., Zhou, L., Wang, L. L., Zheng, P. D., Zhang, F. Q., Mao, Z. Y., Zhang, H. J., & Liu, H. G. (2023). Programmed Cell Death in Asthma: Apoptosis, Autophagy, Pyroptosis, Ferroptosis, and Necroptosis. *J Inflamm Res*, *16*, 2727-2754. <https://doi.org/10.2147/JIR.S417801>.
480. Wójcik C. (2002). Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med*, *6*(1), 25-48. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00309.x>.
481. Yaghi, A., & Dolovich, M. B. (2016). Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease. *Cells*, *5*(4), 40. <https://doi.org/10.3390/cells5040040>.
482. Wang, Z., DiDonato, J. A., Buffa, J., Comhair, S. A., Aronica, M. A., Dweik, R. A., Lee, N. A., Lee, J. J., Thomassen, M. J., Kavuru, M., Erzurum, S. C., & Hazen, S. L. (2016). Eosinophil Peroxidase Catalyzed Protein Carbamylation Participates in Asthma. *J Biol Chem*, *291*(42), 22118-22135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.750034>.
483. Grozdanovic, M. M., Doyle, C. B., Liu, L., Maybruck, B. T., Kwatia, M. A., Thiyagarajan, N., Acharya, K. R., & Ackerman, S. J. (2020). Charcot-Leyden crystal protein/galectin-10 interacts with cationic

- ribonucleases and is required for eosinophil granulogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 146(2), 377-389.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.01.013>.
484. Agache, I., Akdis, C. A., Akdis, M., Canonica, G. W., Casale, T., Chivato, T., Corren, J., Chu, D. K., Del Giacco, S., Eiwegger, T., Flood, B., Firinu, D., Gern, J. E., Hamelmann, E., Hanania, N., Hernández-Martín, I., Knibb, R., Mäkelä, M., Nair, P., O'Mahony, L., ... Jutel, M. (2021). EAACI Biologicals Guidelines-Recommendations for severe asthma. *Allergy*, 76(1), 14-44. <https://doi.org/10.1111/all.14425>.
485. Cevhertas, L., Ogulur, I., Maurer, D. J., Burla, D., Ding, M., Jansen, K., Koch, J., Liu, C., Ma, S., Mitamura, Y., Peng, Y., Radzikowska, U., Rinaldi, A. O., Satitsuksanoa, P., Globinska, A., van de Veen, W., Sokolowska, M., Baerenfaller, K., Gao, Y. D., Agache, I., ... Akdis, C. A. (2020). Advances and recent developments in asthma in 2020. *Allergy*, 75(12), 3124-3146. <https://doi.org/10.1111/all.14607>.
486. Yılmaz, İ., & Paçacı Çetin, G. (2021). Asthma phenotype and endotype definitions. *Tuberk Toraks*, 69(2), 288-290. <https://doi.org/10.5578/tt.20219821>.
487. Moldovan, L., Batte, K. E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C. B., & Piper, M. (2014). Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med*, 18(3), 371-390. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12236>.
488. Maes, T., Cobos, F. A., Schleich, F., Sorbello, V., Henket, M., De Preter, K., Bracke, K. R., Conickx, G., Mesnil, C., Vandesompele, J., Lahousse, L., Bureau, F., Mestdagh, P., Joos, G. F., Ricciardolo, F. L., Brusselle, G. G., & Louis, R. (2016). Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J Allergy Clin Immunol*, 137(5), 1433-1446. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.018>.
489. Precazzini, F., Detassis, S., Imperatori, A. S., Denti, M. A., & Campomenosi, P. (2021). Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*, 22(3), 1176. <https://doi.org/10.3390/ijms22031176>.
490. Agache, I., Eguiluz-Gracia, I., Cojanu, C., Laculiceanu, A., Del Giacco, S., Zemelka-Wiacek, M., Kosowska, A., Akdis, C. A., & Jutel, M. (2021). Advances and highlights in asthma in 2021. *Allergy*, 76(11), 3390-3407. <https://doi.org/10.1111/all.15054>.
491. Witt, A., Douglass, J. A., & Harun, N. S. (2022). Overview of recent advancements in asthma management. *Intern Med J*, 52(9), 1478-1487. <https://doi.org/10.1111/imj.15904>.
492. Bhargava, S., Singla, P., Manocha, A., Kankra, M., Sharma, A., Ahirwar, A., Ralhan, R., Thapliyal, U., & Mehra, P. (2020). The Hemolyzed Sample: To Analyse Or Not To Analyse. *Indian J Clin Biochem*, 35(2), 232-238. <https://doi.org/10.1007/s12291-019-00821-4>.
493. Kirschner, M. B., Edelman, J. J., Kao, S. C., Valley, M. P., van Zandwijk, N., & Reid, G. (2013). The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet*, 4, 94. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00094>.
494. Nishimura, F., Uno, N., Chiang, P. C., Kaku, N., Morinaga, Y., Hasegawa, H., & Yanagihara, K. (2019). The Effect of In Vitro Hemolysis on Measurement of Cell-Free DNA. *J Appl Lab Med*, 4(2), 235-240. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027953>.
495. Pedersen, F., Trinkmann, F., Abdo, M., Kirsten, A. M., Rabe, K. F., Watz, H., Baraldo, S., Saetta, M., Hohlfeld, J. M., & Holz, O. (2021). Influence of Cell Quality on Inflammatory Biomarkers in COPD Sputum Supernatant. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 16, 487-493. <https://doi.org/10.2147/COPD.S284938>.
496. Sun, L., Yu, Y., Niu, B., & Wang, D. (2020). Red Blood Cells as Potential Repositories of MicroRNAs in the Circulatory System. *Front Genet*, 11, 442. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00442>.
497. Liu, H., Bian, Q. Z., Zhang, W., & Cui, H. B. (2022). Circulating microRNA-103a-3p could be a diagnostic and prognostic biomarker for breast cancer. *Oncol Lett*, 23(1), 38. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13156>.

498. El Fatimy, R., Zhang, Y., Deforz, E., Ramadas, M., Saravanan, H., Wei, Z., Rabinovsky, R., Teplyuk, N. M., Uhlmann, E. J., & Krichevsky, A. M. (2022). A nuclear function for an oncogenic microRNA as a modulator of snRNA and splicing. *Mol Cancer*, *21*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01494-z>.
499. Leite, A. K., Saito, K. C., Theodoro, T. R., Pasini, F. S., Camilo, L. P., Rossetti, C. A., Cavaleiro, B. G., Alves, V. A. F., Kowalski, L. P., Pinhal, M. A. S., Kimura, E. T., & Matos, L. L. (2023). Profile of MicroRNAs Associated with Death Due to Disease Progression in Metastatic Papillary Thyroid Carcinoma Patients. *Cancers*, *15*(3), 869. <https://doi.org/10.3390/cancers15030869>.
500. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, *94*(11), 3791-3799. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.11.3791>.

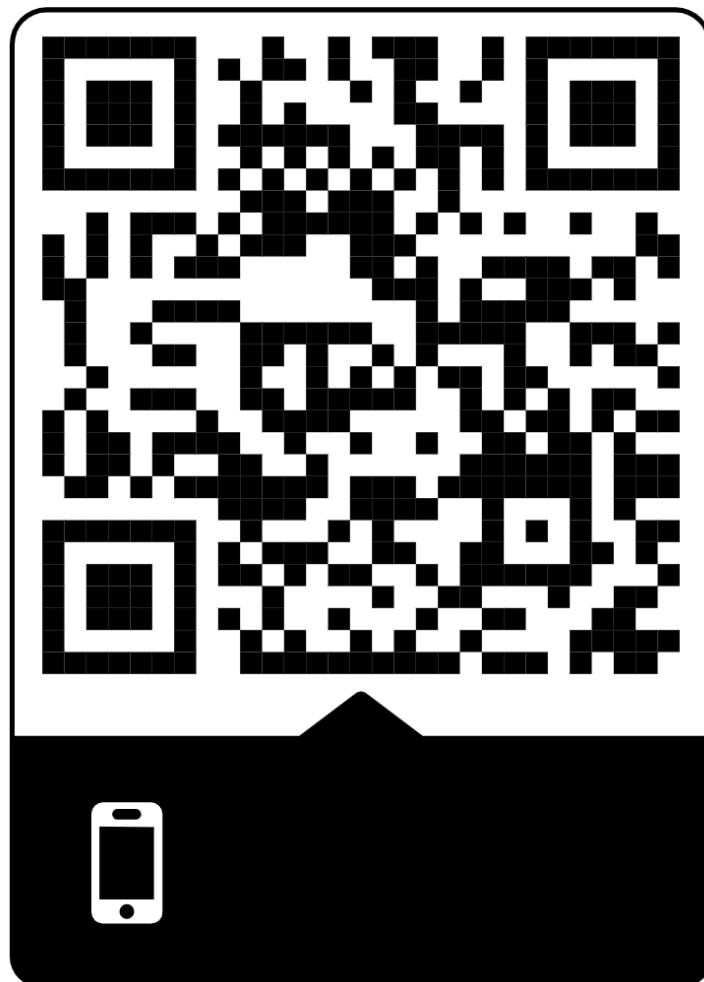


Anexos

12. ANEXOS

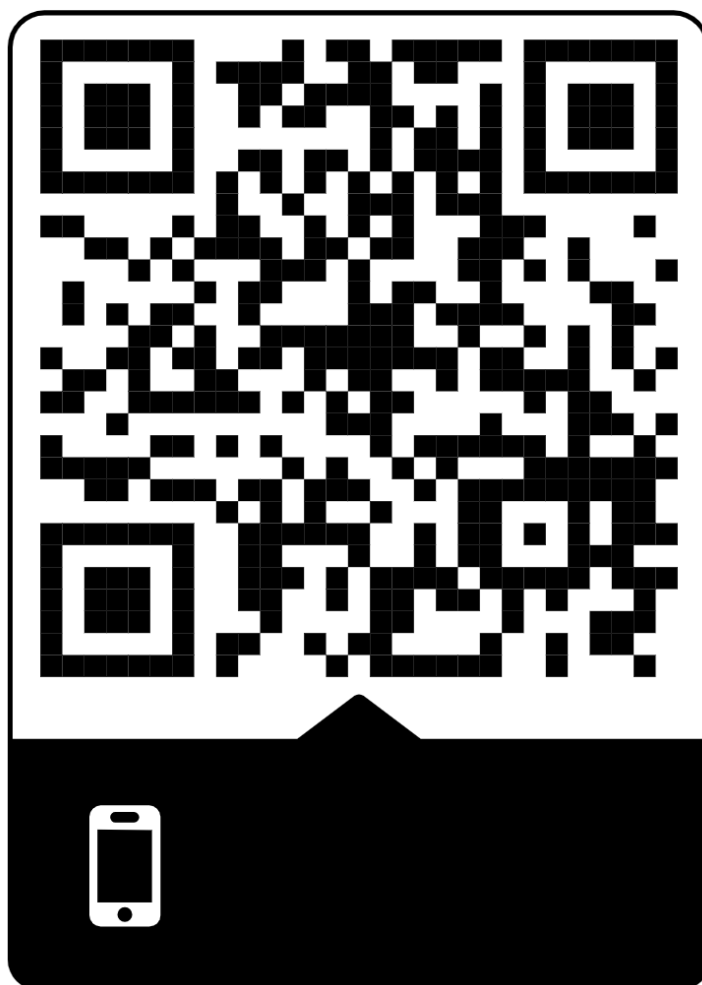
12.1. Anexos de la sección materiales y métodos

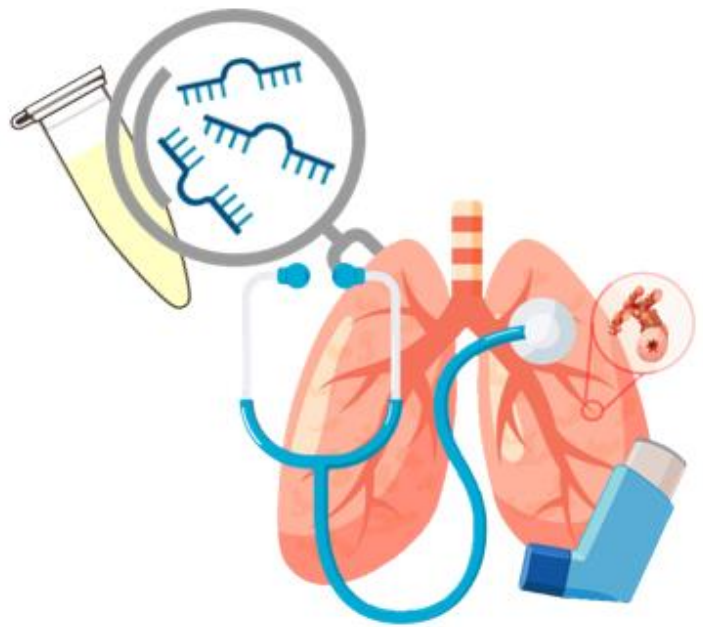
Los anexos de la sección materiales y métodos pueden descargarse escaneado el siguiente código QR:



12.2. Anexos de la sección resultados

Los anexos de la sección resultados pueden descargarse escaneado el siguiente código QR:





Publicaciones

13. PUBLICACIONES

13.1. Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral

1. **Gil-Martínez M**, Lorente-Sorolla C, Rodrigo-Muñoz JM, Naharro S, García-de Castro Z, Sastre J, Valverde-Monge M, Quirce S, Caballero ML, Olaguibel JM, Del Pozo V. Obese Asthma Phenotype Is Associated with hsa-miR-26a-1-3p and hsa-miR-376a-3p Modulating the IGF Axis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 18;24(14):11620. doi: 10.3390/ijms241411620.
2. **Gil-Martínez M**, Lorente-Sorolla C, Naharro S, Rodrigo-Muñoz JM, Del Pozo V. Advances and Highlights of miRNAs in Asthma: Biomarkers for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 13;24(2):1628. doi: 10.3390/ijms24021628.
3. **Gil-Martínez M**, Lorente-Sorolla C, Rodrigo-Muñoz JM, Lendínez MÁ, Núñez-Moreno G, de la Fuente L, Mínguez P, Mahillo-Fernández I, Sastre J, Valverde-Monge M, Quirce S, Caballero ML, González-Barcala FJ, Arismendi E, Bobolea I, Valero A, Muñoz X, Cruz MJ, Martínez-Rivera C, Plaza V, Olaguibel JM, Del Pozo V. Analysis of Differentially Expressed MicroRNAs in Serum and Lung Tissues from Individuals with Severe Asthma Treated with Oral Glucocorticoids. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 13;24(2):1611. doi: 10.3390/ijms24021611.
4. **Gil-Martínez M**, Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, Cañas JA, García-Latorre R, Redondo N, de la Fuente L, Mínguez P, Mahillo-Fernández I, Sastre J, Quirce S, Caballero ML, Olaguibel JM, Del Pozo V. Serum microRNAs Catalog Asthma Patients by Phenotype. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2022 Jul 9;32(6):471-478. doi: 10.18176/jiaci.0753.

13.2. Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral

1. Naharro-González S, Lorente-Sorolla C, Rodrigo-Muñoz JM, Valverde-Monge M, Pinillos-Robles EJ, Betancor D, Fernández-Nieto M, Sánchez-Mellado D, **Gil-Martínez M**, Santillán Coello JM, Villacampa-Aubá JM, Mahillo-Fernández I, Herrero-González A, Perez-González A, Rodríguez-Nieto MJ, Del Pozo V. Moderate-High Blood Eosinophilia Is Associated with Increased Hospitalization and Other Asthma Comorbidities. *Biomolecules.* 2024 Jan 18; 14(1):126. doi: 10.3390/biom14010126.
2. Lorente-Sorolla C, Bernaola J, Sánchez-Mellado D, **Gil-Martínez M**, Naharro-González S, Betancor D, Fernández-Nieto M, Pinillos-Robles EJ, Santillán Coello JM, Villacampa-Aubá JM, Rodríguez-Nieto MJ, Sastre J, Valverde-Monge M, Rodrigo-Muñoz JM, Del Pozo V. Long-term immune response accompanies clinical outcomes in severe asthmatics treated with anti-IL-5/IL-5R biologics. *Allergy.* 2023 Aug 29;78(11):3027-3031. doi: 10.1111/all.15872.
3. Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, Sánchez-García L, García-García ML, Gonzalez-Carrasco E, Fabra C, **Gil-Martínez M**, Lorente-Sorolla C, García-Latorre R, Alcolea S, Casas I, Calvo C, Del Pozo V. Filaggrin and cytokines in respiratory samples of preterm infants at risk for respiratory viral infection. *Sci Rep.* 2022 Dec 8;12(1):21278. doi: 10.1038/s41598-022-25897-6.
4. Rodrigo-Muñoz JM, **Gil-Martínez M**, Lorente-Sorolla C, Sastre B, García-García ML, Calvo C, Casas I, Del Pozo V. Reduced miR-146a-5p Is a Biomarker of Infant Respiratory Diseases Contributing to Immune Dysregulation in Small Airway Epithelial Cells. *Cells.* 2022 Sep 2;11(17):2746. doi: 10.3390/cells11172746.

5. Rodrigo-Muñoz JM, **Gil-Martínez M**, Lorente-Sorolla C, García-Latorre R, Valverde-Monge M, Quirce S, Sastre J, Del Pozo V. miR-144-3p Is a Biomarker Related to Severe Corticosteroid-Dependent Asthma. *Front Immunol*. 2022 Apr 1;13:858722. doi: 10.3389/fimmu.2022.858722.
6. Rodrigo-Muñoz JM, Cañas JA, Sastre B, **Gil-Martínez M**, García Latorre R, Sastre J, Del Pozo V. Role of miR-185-5p as modulator of periostin synthesis and smooth muscle contraction in asthma. *J Cell Physiol*. 2022 Feb;237(2):1498-1508. doi: 10.1002/jcp.30620.
7. Rodrigo-Muñoz JM, **Gil-Martínez M**, Sastre B, Del Pozo V. Emerging Evidence for Pleiotropism of Eosinophils. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 30;22(13):7075. doi: 10.3390/ijms22137075.
8. Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, Cañas JA, **Gil-Martínez M**, Redondo N, Del Pozo V. Eosinophil Response Against Classical and Emerging Respiratory Viruses: COVID-19. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021 Apr 20;31(2):94-107. doi: 10.18176/jiaci.0624.
9. Cañas JA, Valverde-Monge M, Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, **Gil-Martínez M**, García-Latorre R, Rial MJ, Gómez-Cardenosa A, Fernández-Nieto M, Pinillos-Robles EJ, Rodríguez-Nieto MJ, González-Mangado N, Sastre J, del Pozo V. Serum microRNAs as Tool to Predict Early Response to Benralizumab in Severe Eosinophilic Asthma. *J Pers Med*. 2021 Jan 28;11(2):76. doi: 10.3390/jpm11020076.
10. Cañas JA, Rodrigo-Muñoz JM, **Gil-Martínez M**, Sastre B, del Pozo V. Exosomes: A Key Piece in Asthmatic Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 19;22(2):963. doi: 10.3390/ijms22020963.
11. Cañas JA, Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, **Gil-Martínez M**, Redondo N, Del Pozo V. MicroRNAs as Potential Regulators of Immune Response Networks in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease [published correction appears in *Front Immunol*. 2022 Oct 13;13:1051260]. *Front Immunol*. 2021 Jan 8;11:608666. doi: 10.3389/fimmu.2020.608666.