

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Puesta a punto de un modelo de rinosinusitis crónica asociada a poliposis nasal monitorizado mediante técnicas de análisis de imágenes micro CT-PET

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: D. SERGIO RIUS ROCABERT

TUTOR: D. RAFAEL SIRERA PÉREZ

DIRECTOR DE TRABAJO: D. JAVIER MILARA PAYÁ

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2014

Puesta a punto de un modelo de rinosinusitis crónica asociada a poliposis nasal monitorizado mediante técnicas de análisis de imágenes micro CT-PET

Resumen

La rinosinusitis es un proceso inflamatorio que afecta a la cavidad y senos nasales obstruyéndolos. Se denomina rinosinusitis crónica (RSC) cuando la enfermedad perdura más allá de las 12 semanas. La RSC puede verse asociada a pólipos nasales (RSC-PN) o no (RSC-SP), siendo la poliposis nasal una enfermedad con una morbilidad muy alta caracterizada por la existencia de estructuras neoplásicas que provocan la obstrucción de las vías aéreas. Los pólipos están formados por el infiltrado de células inflamatorias. Los tratamientos actuales no son efectivos en gran parte de los pacientes, teniendo que someterse a repetidas intervenciones quirúrgicas siendo necesario el desarrollo de nuevos fármacos más efectivos. La investigación en modelos animales se encuentra actualmente limitada por la inexistencia de métodos diagnósticos y de seguimiento de la enfermedad que no impliquen sacrificar los animales. Este estudio evalúa la eficacia del análisis de imágenes realizado empleando las técnicas de tomografía computarizada (CT) y tomografía por emisión de positrones (PET) en el diagnóstico de la RSC-PN y el seguimiento de su evolución sobre un modelo animal de la enfermedad desarrollado mediante instilaciones con ovoalbúmina como sensibilizador y enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* como agente inductor de la misma. La técnica CT se basa en la capacidad de penetración de los rayos X para detectar cambios en la densidad de los tejidos, mientras que la técnica PET tiene la capacidad de calcular la captación de la glucosa mediante un radiomarcador homólogo. Ambas propiedades se ven alteradas en el transcurso de un proceso inflamatorio severo. Los resultados obtenidos avalan la validez de estas técnicas para determinar la existencia de un proceso inflamatorio y estructuras neoplásicas en el modelo de la enfermedad desarrollado. Los resultados obtenidos por las técnicas de análisis histológico post-mortem corroboraron esta conclusión, permitiendo afirmar que la monitorización mediante las técnicas de CT y PET es un método efectivo para la determinación y seguimiento de la evolución de la RSC-PN en los modelos animales *in vivo* y posibilitando la investigación de tratamientos eficaces de la enfermedad.

Palabras clave: Rinosinusitis crónica, Pólipo nasal, inflamación, Tomografía computarizada, Tomografía por emisión de positrones, modelo animal.

Alumno: D. Sergio Rius Rocabert

Valencia, septiembre de 2014

Tutor académico: D. Rafael Sirera Pérez

Director del Trabajo: D. Javier Milara Payá

Licencia: Creative Commons

Commissioning of a model of chronic rhinosinusitis associated with nasal polyposis monitored by image analysis techniques micro CT-PET

Abstract

Rhinosinusitis is an inflammatory and obstructive process that affects the nasal cavity and sinuses. It's called chronic rhinosinusitis (CRS) when the disease lasts beyond 12 weeks. CRS can be associated with nasal polyps (CRSwNP) or not (CRSSNP). CRSwNP is a disease with high morbidity characterized by the existence of neoplastic structures that cause airways obstruction. Polyps are formed by the infiltration of inflammatory cells. Current treatments are ineffective in many of the patients having to undergo repeated surgical procedures therefore the developing of new and more effective drugs are necessary. Research in animal models is currently limited by the lack of diagnostic and disease monitoring methods without sacrificing animals. This study evaluates the effectiveness of the analysis of images carried out by computed tomography (CT) and positron emission tomography (PET) techniques in the diagnosis and monitoring of CSR-PN in an animal model. This animal model of the disease was obtained by an instillations protocol with ovalbumin as a sensitizer and *Staphylococcus aureus* enterotoxin B as inducing agent. CT technique is based on the ability of penetration of x-rays for detecting changes in tissue density. PET technique has the ability to calculate the glucose uptake by a homologous radiolabel. Tissue density and glucose uptake are properties that are altered in the course of a severe inflammatory process. The results obtained confirm the validity of these techniques to determine the existence of an inflammatory process and neoplastic structures in the developed disease model. The results obtained by the histological post-mortem analysis techniques corroborated this conclusion. It can be said that the use of CT and PET techniques is an effective method for determining and monitoring the evolution of CSRwPN in animal models *in vivo*, allowing the research into effective treatments for the disease.

Key words: Chronic rhinosinusitis, nasal polyp, Inflammation, Computed tomography, Positron emission tomography, Animal model.

Student: D. Sergio Rius Rocabert

Valencia, September 2014

Academic tutor: D. Rafael Sirera Pérez

Project Director: D. Javier Milara Payá

Licence: Creative Commons

Agradecimientos

Este trabajo es posible gracias a Xavi, quien creyó desde un primer momento que yo era la persona indicada para llevarlo a cabo y siempre sacó un momento para guiarme y aconsejarme en cada uno de los pasos de su realización.

Mi agradecimiento, también, a los compañeros de la Fundación, que tanto me han ayudado a conseguir terminar un proyecto tan largo como este, en el tiempo estipulado, permitiéndome compaginarlo con el curso, así como prestándome su ayuda incondicional cuando me surgía alguna duda o me faltaba algún dato para poder seguir avanzando.

A Rafa por ofrecerse a tutorizar este trabajo, permitiéndome poder desarrollarlo y defenderlo ante un tribunal.

Por supuesto necesito también agradecer su apoyo a mi familia y amigos, especialmente a mi madre y a mi novia, Inma, pues sin su ayuda me hubiera sido mucho más difícil avanzar durante este largo periodo de trabajo, animándome siempre, ayudando cuando podían hacerlo y recordándome que a veces lo mejor para seguir a delante es despejarse un poco.

Por último quiero dar gracias a mi padre por enseñarme, junto a mi madre, a ser lo que soy hoy en día, inculcarme el valor del trabajo hecho con esfuerzo y dedicación y por acompañarme en cada paso que he dado en mi vida, incluido este.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Definición.....	1
1.2.	Fisiopatología.....	1
1.3.	Epidemiología de la enfermedad.....	3
1.4.	Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.....	5
1.5.	Tratamiento.....	6
2.	OBJETIVOS.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1.	Animales experimentales.....	7
3.2.	Inducción poliposis.....	7
3.3.	Monitorización micro CT-PET.....	9
3.4.	Análisis histológico.....	12
4.	RESULTADOS.....	14
4.1.	Cornetes nasales.....	14
4.1.1.	Análisis de imágenes.....	14
4.1.2.	Análisis histológico.....	19
4.2.	Pulmones.....	21
4.2.1.	Análisis de imágenes.....	21
4.2.2.	Análisis histológico.....	26
5.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	28
6.	CONCLUSIONES.....	30
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Dibujo esquemático de los procesos principales con los que cursa la RSC-PN.....	1
Figura 2.	Ejemplo de enmascarado del cerebro y el ojo de uno de los sujetos.....	11
Figura 3.	Toma de las regiones de interés de los pulmones de un sujeto en CT (izquierda) y su uso como plantilla en la imagen de PET (derecha).....	11
Figura 4.	Valores que toman las unidades Hounsfield para diferentes tejidos en humanos.....	14
Figura 5.	La imagen 1 muestra la sección coronal de los cornetes nasales de un sujeto control tomada mediante tomografía computarizada (CT) a día 104. La imagen 2 muestra la misma sección de un sujeto experimental a día 104. La zona señalada se corresponde con una invasión del espacio aéreo.....	15
Figura 6.	El gráfico de la izquierda muestra la comparación de las unidades HU obtenidas para los sujetos control y los experimentales a día 104. El gráfico de la derecha muestra la comparación de las unidades HU obtenidas en los cornetes a los diferentes días del proceso de inducción de la RSC-PN.....	16
Figura 7.	Imagen obtenida mediante técnica PET de los cortes coronal, axial y sagital de uno de los sujetos control a día 104 del proceso de inducción.....	17
Figura 8.	Imagen obtenida mediante técnica PET de los cortes coronal, axial y sagital de uno de los sujetos que recibió las instilaciones con EBS a día 104 del protocolo de inducción. Las zonas señaladas muestran múltiples focos hipercaptantes de 18-FDG.....	18
Figura 9.	El gráfico de la izquierda muestra la comparación entre la captación de 18-FDG corregido por el peso y la dosis de los sujetos instilados con OVA y EBS entre los días 0 y 104 de inducción. El gráfico de la derecha muestra la comparación de la captación de 18-FDG corregido por el peso y la dosis entre sujetos experimentales y control a día 104 del experimento.....	18

Figura 10.	Fotografías de cortes histológicos de sujetos control teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 μm , la de las imágenes inferiores con 50 μm	19
Figura 11.	Fotografía de cortes histológicos de sujetos instilados con OVA y EBS teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 μm , la de las imágenes inferiores con 50 μm	20
Figura 12.	Fotografías de cortes histológicos de los cornetes nasales de sujetos instilados con OVA y EBS. Los pólipos nasales han sido marcados con un asterisco.....	20
Figura 13.	Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica CT de un sujeto control a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.....	21
Figura 14.	Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica CT de un sujeto experimental a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.....	22
Figura 15.	El gráfico 1 muestra la evolución a lo largo del periodo de inducción de la enfermedad de diferentes sujetos instilados con OVA y EBS. El gráfico 2 muestra la comparativa de las unidades HU obtenidas por sujetos control y los sujetos instilados por OVA y EBS a día 104, nombrados como OVA. El gráfico 3 compara las unidades HU obtenidas durante los diferentes días del protocolo de instilación por los sujetos instilados con OVA y EBS, nombrados como OVA, con las obtenidas por los sujetos control.....	23
Figura 16.	Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica PET de un sujeto control a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.....	24
Figura 17.	Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica PET de un sujeto experimental a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.....	25
Figura 18.	El gráfico 1 representa la comparación de la captación de radiofármaco de los sujetos experimentales a día 0 y día 104 del protocolo de inducción de la poliposis. Los gráficos 2 y 3 representan la comparación de la captación de 18-FDG entre los sujetos control y los sujetos experimentales, nombrados como OVA, a día 104 del protocolo de inducción.....	26
Figura 19.	Fotografías de cortes histológicos de tejido pulmonar de sujetos control teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 μm , la de las imágenes inferiores con 50 μm	27
Figura 20.	Fotografías de cortes histológicos de tejido pulmonar de sujetos experimentales teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 μm , la de las imágenes inferiores con 50 μm	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Dosis de anestesia a administrar por individuo en función del peso del animal.....	9
Tabla 2.	Protocolo de deshidratación previo a la inclusión en parafina	12
Tabla 3.	Pasos de la rehidratación rápida en el protocolo de tinción mediante hematoxilina y eosina.....	13

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición

La rinosinusitis se define como una patología del sistema respiratorio superior que se caracteriza por la existencia de un proceso inflamatorio dentro de la cavidad nasal y los senos paranasales, y que viene acompañada de dos o más síntomas uno de los cuales debe ser congestión, bloqueo, obstrucción o secreción nasal y el otro puede ser o bien dolor o presión facial o bien una pérdida total o parcial de la capacidad olfativa [1].

Se determina rinosinusitis crónica (RSC) cuando los síntomas perduran pasadas las 12 semanas. La RSC puede dividirse en aquellos casos en los que la enfermedad aparece asociada a pólipos nasales (RSC-PN) o sin dicha asociación (RSC-SP). La poliposis nasal es una enfermedad de la vía aérea superior que cursa con una inflamación crónica de la misma. En su asociación con la RSC, la poliposis nasal es la culpable de que se produzca una obstrucción física de la vía aérea [2].

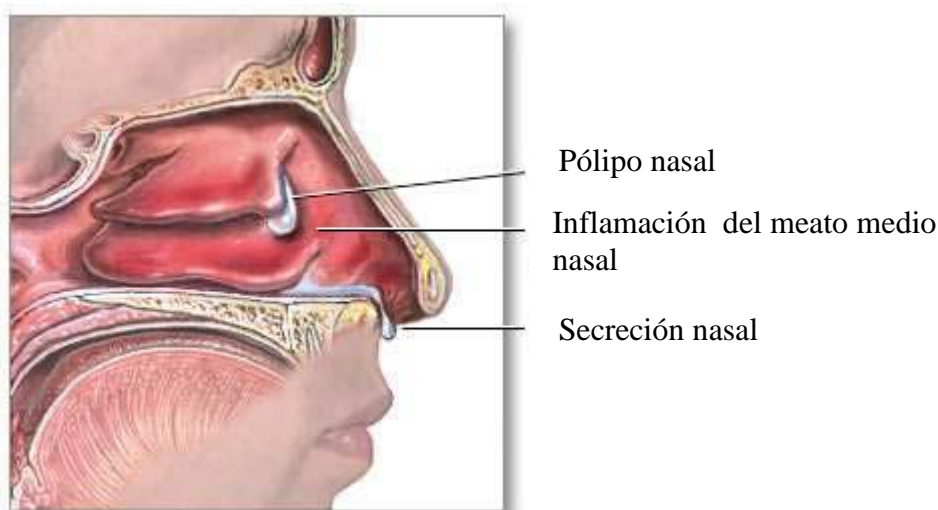


Figura 1. Dibujo esquemático de los procesos principales con los que cursa la RSC-PN

1.2. Fisiopatología

La RSC-PN, a nivel histológico, se manifiesta mediante lesiones en la mucosa de las fosas nasales y senos paranasales caracterizada por la generación de estructuras hipertróficas del tejido con forma parecida a la de una uva [1]. Estas estructuras manifiestan un proceso de engrosamiento de la membrana basal, de producción de un edema y en ocasiones de fibrosis del tejido que forma el estroma. El estroma del pólipo es de tipo edematoso y está formado, en su mayor parte, por un infiltrado de células inflamatorias, en su mayoría eosinófilos, y una matriz de fibrocitos que actúa como sostén de la estructura. Aunque los eosinófilos constituyen la mayor parte del proceso inflamatorio dentro del pólipo, también se observa un aumento sustancial de los neutrófilos, los mastocitos, los linfocitos, los monocitos y células plasmáticas respecto de los sujetos sanos. El número de vasos sanguíneos en el interior de la estructura es reducido y de, forma habitual, no presentan tejido nervioso [3].

La inflamación general que presentan las fosas nasales y los senos paranasales en la RSC-PN se caracteriza por poseer una menor cantidad de linfocitos CD4 activados en el epitelio y una cantidad mayor de linfocitos CD8 activados en la lámina propia, siendo la proporción CD4+/CD8+ inversa a la de los sujetos control [4]. Por otra parte, se determinó la asociación de esta situación a superantígenos (SAGs) de *S. aureus*, como posible desencadenante, en cierto grado, del proceso inflamatorio. Los SAGs se unen al TDR de los linfocitos en su región Vbeta. Diferentes estudios, mediante el uso de técnicas de citometría de flujo, determinaron que los linfocitos CD4+ y CD8+ de pacientes de RSC-PN poseían sesgos en las Vbeta asociadas a superantígenos de *S. aureus* [5].

La interacción de linfocitos T con superantígenos se muestra como causa directa de la eosinofilia existente en los tejidos nasales y paranasales de pacientes de RSC que presentan poliposis nasal. Los linfocitos CD4 activados de tipo Th2 en respuesta a diferentes reacciones alérgicas o ante la unión de superantígenos secretan citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10. Concretamente la interleucina 5 se vio significativamente aumentada en los tejidos que presentaban poliposis nasal. Esta citocina es un homodímero esencial en la maduración de los eosinófilos en la médula ósea y su paso al torrente sanguíneo, una vez esta maduración se ha completado. Diferentes estudios han demostrado que esta citocina tiene un papel autocrino importante para la activación de los eosinófilos y en la elongación de su vida en el tejido en el que se encuentran. Estos mismos estudios determinan una correlación entre las concentraciones de IL-5 y la proteína catiónica eosinofílica (PCE), convirtiendo esta interleucina en un factor clave en el aumento de la abundancia de este tipo celular en el tejido de las fosas nasales y paranasales de los pacientes de RSC-PN [6,7].

Por otra parte la interleucina 4, así como también la 13 producen la estimulación y la secreción de VCAM-1 por parte de las células del tejido endotelial. VCAM-1 es un factor que posee un importante poder de reclutamiento de eosinófilos y linfocitos T de forma preferencial, aumentando así la presencia de estos en el tejido [8].

Se ha demostrado también que las células del epitelio nasal humano interactúan con diferentes toxinas produciendo la liberación de IL-8, GM-CSF, eotaxina, eotaxina-2 y RANTES [9]. Todos ellos poseen la capacidad de atraer mediante quimiotaxis a los eosinófilos, linfocitos y otras células inflamatorias al lugar donde son secretados, promoviendo así su acumulación. El GM-CSF, por su parte, es un factor que favorece la supervivencia de eosinófilos siendo, no obstante, menos selectivo que la interleucina 5, pues poseen también la capacidad de aumentar la proliferación de otros tipos celulares como mastocitos o neutrófilos [10].

Si bien es cierto que el conjunto de todos estos eventos es el responsable directo de la eosinofilia en las fosas nasales y los senos paranasales de los pacientes de la enfermedad, parece ser que el factor principal de la promoción de la misma es la interleucina 5, teniendo el resto de factores un efecto sumatorio al papel de esta citocina. Así lo demuestra un estudio *in vitro* de tejido polipoide infiltrado por gran cantidad de eosinófilos y tratado con anticuerpos monoclonales anti-IL-5, pero no anti-GM-CSF u otros factores atrayentes, cuyos resultados mostraron una apoptosis generalizada de los eosinófilos y una disminución, por tanto, de la eosinofilia en el tejido [11].

Además del fenómeno de eosinofilia y del reclutamiento de linfocitos activados a la zona epitelial y la lámina propia del tejido nasal también se produce de forma menos acusada el reclutamiento de otros tipos celulares inflamatorios. Según parece, el

número de macrófagos es mayor en el estroma de los pólipos nasales y expresan mayores cantidades de receptores de manosa macrofágicos, poseyendo estas capacidades de reconocimiento innato, fagocitosis de antígenos y trasducción de señales proinflamatorias [12]. Los mastocitos no se encuentran significativamente aumentados en el estroma de los pólipos nasales respecto de los tejidos de los sujetos control, sin embargo se ha observado una mayor degranulación de los mismos, proceso que es debido a la interacción con las IgE presentes en el tejido y que conlleva la liberación de diferentes factores proinflamatorios entre los que se encuentra IL-13, que, como ya se describió anteriormente, tiene un papel importante en el reclutamiento de eosinófilos [13]. Los neutrófilos, por otra parte, se vieron aumentados en los sujetos que sufrían de poliposis nasal respecto a los controles, si bien es cierto que se desconoce el papel que poseen en el desarrollo de la enfermedad [1].

Se ha descrito que las células endoteliales expresan de forma significativamente mayor el factor de permeabilidad vascular/crecimiento endotelial vascular (VPF/VEGF) y sus receptores en las zonas de la membrana basal, zonas perivasculares e incluso células epiteliales de los sujetos que padecen de poliposis nasal respecto de los sujetos control [14]. Este factor tiene un papel primordial en la angiogénesis y en la permeabilidad vascular. Estos datos sugieren que el VPG/VEGF pueda ser una de las causas principales de la formación de los pólipos nasales, así como, del importante edema tisular que los caracteriza [15].

1.3. Epidemiología de la enfermedad

En cuanto a la epidemiología de la enfermedad los estudios se han basado en los resultados obtenidos a partir de endoscopias nasales de pacientes que sufrían los síntomas propios de la rinosinusitis por un periodo de tiempo superior a 12 semanas, asumiéndose así como crónica la enfermedad [1]. Este sistema de evaluación es vital para determinar la prevalencia de RSC-PN, puesto que no todos los pacientes que aseguran sufrir el cuadro sintomático que caracteriza a la enfermedad muestran, al ser analizados mediante este sistema, la presencia de pólipos nasales. Por otra parte, la presencia de PN puede venir acompañada de la sintomatología propia de los mismos o, por el contrario, de forma silente, siendo este último tipo de pólipos de carácter permanente o transitorio. Este hecho implica que existe una clase de pacientes en los que no se contempla la existencia de PN hasta que son descubiertos mediante exploración clínica [16]. A estos pacientes que por carecer de sintomatología no son propensos a diagnosticarles la existencia de PN se debe añadir el hecho de que aproximadamente un tercio de los pacientes sintomáticos de la enfermedad no solicitan atención médica al aparecer los síntomas nasosinuales [17]. La razón principal de este hecho es que este tipo de pacientes sufren cuadros sintomatológicos más leves que los que si acuden al médico y por tanto no ven la necesidad de este tipo de ayuda. Todo este cúmulo de circunstancias impide por tanto determinar la prevalencia de la enfermedad de forma absolutamente precisa. Los resultados en los diferentes estudios epidemiológicos realizados mediante endoscopia varían entre un 0,5% [18] y un 4,3% [19] de la población general, encontrándose la mayoría en valores situados entre el 2 y el 3% [16,17]. Si bien es cierto que los resultados son muy diversos, todos ellos recogen valores similares en cuanto a la distribución poblacional de la enfermedad, mostrando

que existen aproximadamente el doble de casos de RSC-PN en sujetos varones de los que se dan en mujeres, así como que existe un aumento de la incidencia de esta enfermedad en personas que han superado los 60 años de edad.

Por otra parte se han determinado diversos factores que se encuentran asociados al padecimiento de RSC-NP.

En diferentes estudios realizados sobre la relación entre alergias alimentarias y respiratorias y pacientes de RSC-NP se ha determinado, en rangos muy dispares, cierta asociación entre ambas enfermedades, mostrando la prevalencia de alergias en hasta el 64% [20] de los pacientes que padecían PN, otros estudios, en cambio, no consiguieron demostrar este tipo de relación. Otros estudios han determinado que existe una relación entre las concentraciones de IgE, característicos de procesos alérgicos y la existencia de infiltrado de eosinófilos en PN [21]. Todos estos indicios, pese a las contradicciones entre los resultados de diversos estudios, nos sugieren una asociación entre estas dos enfermedades, si bien se hace patente la necesidad de un mayor número de estudios en este campo para aclarar las circunstancias en las que se asocian dichas patologías y como pueden las alergias actuar en la iniciación y evolución de la poliposis nasal.

En cuanto a la asociación de la RSC-NP y el asma, encontramos evidencias más claras [22]. Se ha determinado la presencia de molestias respiratorias en un 42% de los pacientes de RSC-PN y sibilantes en un 31% de ellos, declarándose, a su vez, un 26% de los mismos como asmático, siendo la prevalencia entre individuos sanos de un 6% [17]. Al contrario, un 7% de los sujetos asmáticos presentan a su vez PN, manteniéndose esta cifra también alejada de los resultados sobre prevalencia de esta enfermedad en la población general. De los casos en los que los pacientes sufren ambas enfermedades un 69% de ellos padecen el asma en primer lugar, un 21% desarrollan primero RSC-PN y el 10% restante los hace de forma prácticamente simultánea [23]. Además se ha determinado que los casos de pacientes femeninos que padecen ambas enfermedades duplican el de masculinos, al contrario de lo que ocurría en casos de RSC-PN generales, teniendo las pacientes femeninas que padecen PN una probabilidad 1,6 veces mayor de ser asmáticas y 2,7 veces mayor de ser alérgicas [24].

Los estudios de asociación de RSC-NP con la intolerancia al ácido acetilsalicílico muestran resultados, que aunque siguen siendo muy dispares, nos dan una evidencia sólida de la existencia de una relación entre ambas afecciones. La intolerancia se muestra en entre un 36 y un 96% de los pacientes de RSC-NP, aumentando la prevalencia a partir de los 40 años de edad [25,26].

Por último, diferentes estudios realizados con familiares enfermos muestran un factor genético de predisposición a sufrir la enfermedad. El 52% de los participantes enfermos de un estudio, poseía familiares o antecedentes de padecimiento de la enfermedad [27]. Otros estudios determinan una cifra menor pero que sigue siendo significativa, por ejemplo Greisner y cols. sitúan el porcentaje en el 14% [28].

Por otro lado, estudios de gemelos homocigóticos han determinado que no siempre aparecen en ambos hermanos, determinando que si bien existe una predisposición genética, muy posiblemente deban darse situaciones ambientales para que finalmente se produzca la aparición de PN [29].

1.4. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad

El diagnóstico de la rinosinusitis crónica en un paciente comienza por una evaluación subjetiva de los síntomas que se realiza cuando este solicita la atención primaria. Se basa, principalmente en la presencia de obstrucción, congestión u oclusión nasal; dolor facial o sensación de presión; rinorrea o secreción posnasal y pérdida total o parcial del sentido del olfato. A estos síntomas locales se les pueden sumar otros como irritación de las vías respiratorias, dolor de garganta, afonía y tos, así como, somnolencia, malestar general y fiebre, pero la presencia de este tipo de síntomas varía notablemente entre pacientes [2]. Todos estos síntomas son comunes tanto en rinosinusitis aguda como en crónica, diferenciándose entre ellas en la duración de los mismos [1].

Cuando la RSC cursa mediante poliposis nasal puede evidenciar otros síntomas derivados de la obstrucción nasal física producida por los pólipos, como una sensación valvular cuando, por su disposición física, únicamente dejan circular el aire en una dirección. Pero no todos los casos de poliposis nasal presentan sintomatología particular, siendo frecuente que los pacientes presenten la sintomatología común de la RSC [30].

Además de la determinación de la presencia de los síntomas existen diferentes cuestionarios que evalúan la gravedad con la que aparecen. Uno de los cuestionarios más utilizados es el *Sinonal Outcome Test 20* (SNOT-20) que se basa en el análisis de 20 elementos y es un instrumento fácil de utilizar y útil en el seguimiento de la enfermedad así como en la evaluación de la gravedad de la misma [31]. El inconveniente que presenta es que no posee preguntas en lo referente a obstrucción nasal ni pérdida del olfato. Este inconveniente ha sido resuelto por el SNOT-22 pero todavía no se encuentra validado.

Todos estos métodos, sin embargo, no son por sí mismos suficientes para el diagnóstico de la enfermedad, pues la evaluación sintomatológica puede ser similar o igual en pacientes con diferentes tipos de rinosinusitis, es por ello necesaria la evaluación mediante exploraciones que permitan determinar la existencia o no de poliposis nasal. La endoscopia es un método diagnóstico poco invasivo y muy útil para la determinación de la RSC-PN en pacientes que no presentan sintomatología propia de la poliposis nasal o para la confirmación de la misma en pacientes que sí los padecen [1].

La endoscopia se puede utilizar con vasoconstrictores o sin ellos y se utilizan puntuaciones semicuantitativas donde se valora la existencia de pólipos, su localización y la obstrucción o no de las cavidades nasales producidas por los mismos. Se puede evaluar también mediante este sistema la presencia de edema, la rinorrea, la formación de costras y la cicatrización después de un proceso de extirpación [32].

La tomografía computarizada (CT) es la técnica de obtención de imágenes utilizada en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad como apoyo para la endoscopia. Este sistema permite determinar alteraciones en el complejo nasosinusal, la presencia de obstrucciones y cuantificar la gravedad de la misma evaluando la opacidad que presenta la imagen mediante diferentes software diseñados para este fin. Estas alteraciones cuantificables y visibles a través de la técnica TC se han descrito tan importantes para la determinación de la enfermedad como la presencia de cambios inflamatorios [33].

Mediante la combinación de estas técnicas se puede determinar un diagnóstico completo de la enfermedad así como evaluar la gravedad de la misma y proceder, posteriormente, al seguimiento de la evaluación del paciente durante el tratamiento o tras las operaciones quirúrgicas con el fin de determinar si se ha producido una reaparición de la poliposis, circunstancia habitual en este tipo de enfermedad.

1.5. Tratamiento

Los tratamientos farmacológicos más utilizados de forma tradicional en el tratamiento de la RSC-PN son los glucocorticoides [1]. El empleo de los mismos puede realizarse de forma tópica o sistémica. Los glucocorticoides actúan reduciendo la respuesta inmunológica y, por tanto, el infiltrado de células inflamatorias. Se ha determinado mediante diferentes estudios que este tipo de tratamientos reducen en cierto modo el tamaño de los pólipos nasales y actúa sobre diferentes síntomas asociados a la enfermedad como son los estornudos o la rinorrea, pero no en otros como la capacidad olfatoria [34]. Los problemas principales de este tipo de tratamientos son la escasa efectividad en un porcentaje muy alto de los pacientes sobre los que se aplican y que no consiguen eliminar todos los síntomas derivados de la enfermedad, así como los efectos secundarios que producen [35]. Los efectos secundarios principales del uso de glucocorticoides son supresión del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, osteoporosis o cambios en la densidad mineral ósea, retraso del crecimiento en niños, cataratas, y glaucoma [36].

Aquellos pacientes que no obtienen una respuesta eficiente a los tratamientos farmacológicos deben someterse a la cirugía para eliminar la obstrucción nasal producida por la enfermedad y aliviar los síntomas que conlleva. Este tipo de tratamiento de la enfermedad tiene una efectividad de entre el 70 y el 90% de los pacientes, necesitando revisiones quirúrgicas antes de los tres años en hasta un 10% debido a la recurrencia de los pólipos en una gran cantidad de los enfermos. Los tratamientos quirúrgicos implican molestias adicionales al desarrollo de la enfermedad y el 1% de los mismos deriva en problemas graves para el enfermo [1].

Los problemas y la baja efectividad que poseen los tratamientos actuales en gran cantidad de pacientes de RSC-PN hacen evidente la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con capacidad para tratar la enfermedad en un mayor número de pacientes, reduciendo los efectos secundarios asociados a su uso y evitándoles someterse a las intervenciones quirúrgicas repetidas.

2. OBJETIVOS

La hipótesis de partida de este proyecto de basa en los siguientes antecedentes:

- 1- La RSC asociada a PN es una enfermedad con una muy alta morbilidad.
- 2- Los tratamientos actuales para la enfermedad no son efectivos para un alto porcentaje de los pacientes por lo que muchos de ellos deben someterse a repetidas operaciones quirúrgicas para eludir la sintomatología y las dificultades que la RSC-PN conlleva.
- 3- El diagnóstico de la RSC-PN en pacientes humanos se basa en el análisis de la sintomatología, la endoscopia nasal y el análisis de imágenes a través de la técnica CT únicamente en casos excepcionales.

- 4- La diagnosis de los modelos animales de RSC-PN realizados hasta la fecha está basada en los análisis histológicos de los tejidos nasales realizados post mortem.
- 5- Actualmente la investigación de tratamientos nuevos y efectivos para la RSC-PN se encuentra limitada por la ausencia de modelos animales que permitan llevar un seguimiento de la evolución de la enfermedad mediante técnicas *in vivo*.

Los antecedentes descritos permiten establecer la siguiente hipótesis:

- Un modelo animal de la enfermedad monitorizado mediante micro CT-PET permitiría realizar un seguimiento efectivo de la evolución de RSC-PN, permitiendo la investigación de nuevos y mejores tratamientos.

Por tanto, el objetivo de este proyecto es la puesta a punto de un modelo animal de RSC-PN y el seguimiento de su evolución *in vivo* mediante una monitorización llevada a cabo con las técnicas de análisis de imágenes micro CT-PET y realizando una comparativa con las técnicas de análisis histológicas convencionales para evaluar la efectividad del seguimiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales experimentales

Para el modelo murino de poliposis nasal se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6. Los sujetos se mantuvieron en una cámara libre de patógenos y de temperatura y luminosidad controlada durante todo el experimento.

3.2. Inducción poliposis

La inducción de la rinosinusitis alérgica asociada a poliposis nasal se realizó basándose en el modelo descrito por Dae Woo Kim y *col.* con ciertas modificaciones [37].

Se prepararon tres experimentos independientes, nombrados como experimento 1, experimento 2 y experimento 3. Se utilizó ovoalbúmina (OVA, grado V; Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) en los sujetos de los grupos experimentales para sensibilizarlos y solución salina con tampón fosfato (PBS) sobre los sujetos control. Los ratones de los grupos experimentales recibieron una inyección intraperitoneal con una solución compuesta por 25 µg de OVA diluida en 2 mg de gel de hidróxido de aluminio (Alhydrogel, Invivogen, San Diego, CA, EE.UU.) en los días 0 y 5 del experimento para inmunizarlos.

Los sujetos experimentales del experimento uno recibieron instilaciones diarias de OVA al 3% diluida en 40 µl de PBS desde el día 12 de experimento hasta el día 19. Una vez pasados estos siete días las instilaciones pasaron de ser diarias a realizarse únicamente tres días a la semana hasta la semana 12, fecha de finalización del protocolo, para continuar con el proceso inflamatorio producido en los sujetos experimentales. Desde la semana 5 hasta finalizar el experimento, en la semana 12, se adicionó una instilación semanal con Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (EBS,

Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) en cantidad 10 µg como inductor de la eosinofilia y, de esta forma, elemento generador de la poliposis nasal.

Los sujetos experimentales del experimento 2 recibieron instilaciones diarias de OVA al 3% en 40 µl de PBS entre los días 12 y 19 y posteriormente 3 días a la semana hasta la 5ª semana. Tras finalizar esta 5ª semana se redujo la dosis de OVA al 1% para mantener la inflamación de forma menos agresiva y se adicionó una instilación semanal de 10 µg de EBS hasta la finalización del experimento en la semana 12, día 104.

Los sujetos experimentales del experimento 3 recibieron instilaciones diarias de OVA al 1% en 40 µl de PBS durante la semana que comprendía los días entre 12 y 19 de experimento. Pasada esta semana se redujeron las instilaciones a 3 por semana hasta la finalización del proceso en la semana 12. A partir de la 5ª semana se aplicó una instilación semanal de 10 µg de EBS.

Los controles de los experimentos 1, 2 y 3 recibieron instilaciones diarias de PBS entre los días 12 y 19 y posteriormente 3 instilaciones semanales hasta finalizar el experimento en el día 104.

Para poder realizar las instilaciones de tanto controles como sujetos experimentales los ratones fueron anestesiados mediante la inhalación de isoflurano (Baxter, Deerfield, IL, EE.UU.). El proceso de anestesiado se llevó a cabo en un equipo de anestesia para animales pequeños Flow-Meter (Medical supplies and services int. Ltd, Keighley, R.U.) consistente en un carro móvil de acero inoxidable, un vaporizador para isoflurano, un soporte Idea Selectatec para conexión-desconexión rápida, caja de distribución de tres vías, mascarilla para ratones de metacrilato, sistema de aspiración cibertec con filtro y llaves de paso y una caja de inducción. Los sujetos se mantuvieron en atmósfera de isoflurano durante aproximadamente 30 segundos y una vez anestesiados se procedió a pipetear la dosis de instilación gota a gota sobre sus fosas nasales de modo que mediante la respiración normal del animal esta fuera adquirida por el mismo. Una vez realizada la instilación se esperó a que los sujetos se recuperasen del efecto de la anestesia antes de ser devueltos a las jaulas.

Todos los días del experimento se pesó a todos los sujetos, tanto controles como experimentales, con el fin de proporcionarles un suplemento alimenticio, suministrado directamente en el esófago mediante una jeringuilla, si se detectaban signos de desnutrición. El control de la alimentación de los sujetos, en especial los experimentales, es necesario debido al alto impacto que tiene el protocolo de inducción de la poliposis sobre las fosas nasales y, por tanto, en la capacidad olfativa. El ratón basa gran parte de su alimentación en esta capacidad olfativa, motivo por el cual, si esta se ve afectada seriamente, puede llevar al sujeto a un periodo de inanición que haga peligrar su vida.

3.3. Monitorización micro CT-PET

La monitorización de los sujetos se realizó durante el desarrollo del proceso de inducción de la poliposis antes descrito. Los análisis CT fueron realizadas a días 0, 47, 57, 77, 96 y 104 del protocolo de inducción, mientras que los análisis PET se realizaron a día 0 y a día 104, realizando de forma sucesiva los análisis los días en los que coinciden los dos.

Los sujetos se pesaron y se sedaron antes de realizar los análisis de imágenes. Para ello se les administró una solución de Ketamina y Metomidina (Ketolar, oficina de farmacia) vía intraperitoneal a los sujetos cuyas dosis se adaptaron a cada uno de ellos

en función a su peso en el momento de la inyección siguiendo las cantidades estándar que se presenta en la tabla 1. El efecto de la anestesia fue inmediato y todos los sujetos despertaron satisfactoriamente de ella.

Tabla 1. Dosis de anestesia a administrar por individuo en función del peso del animal

KETAMINA 40 mg/Kg --- MEDETOMIDINA 0,5 mg/Kg Anestesia por volumen administrado 1000 µL				
KETAMINA []i 100 mg/mL			MEDETOMIDINA []i 1 mg/mL	
PESO g	mg/g	µL	mg/g	µL
200	8,000	80	0,100	100
210	8,400	84	0,105	105
220	8,800	88	0,110	110
230	9,200	92	0,115	115
240	9,600	96	0,120	120
250	10,000	100	0,125	125
260	10,400	104	0,130	130
270	10,800	108	0,135	135
280	11,200	112	0,140	140
290	11,600	116	0,145	145
300	12,000	120	0,150	150
310	12,400	124	0,155	155
320	12,800	128	0,160	160
330	13,200	132	0,165	165
340	13,600	136	0,170	170
350	14,000	140	0,175	175
360	14,400	144	0,180	180
370	14,800	148	0,185	185
380	15,200	152	0,190	190
390	15,600	156	0,195	195
400	16,000	160	0,200	200
410	16,400	164	0,205	205
420	16,800	168	0,210	210
430	17,200	172	0,215	215
440	17,600	176	0,220	220
450	18,000	180	0,225	225
460	18,400	184	0,230	230
470	18,800	188	0,235	235
480	19,200	192	0,240	240
490	19,600	196	0,245	245
500	20,000	200	0,250	250

Los días que había programado un análisis por PET, se les inyectó a los sujetos vía intraperitoneal una dosis de 18-fluorodesoxiglucosa (18FDG, Iba-Molypharma, Alcobendas, Madrid, ES). Este compuesto es un radiofármaco análogo a la glucosa pero no metabolizable por el organismo al poseer un átomo de ¹⁸Fluor en posición 2. La tecnología PET basa su funcionamiento en la detección de los positrones emitidos por la acumulación del radiofármaco, pudiendo cuantificar la cantidad del mismo captado por cada zona de la anatomía del sujeto y detectando aquellos tejidos donde existe un cambio positivo o negativo del metabolismo de la glucosa respecto a la situación normal. La cantidad de 18-FDG inyectada fue de entre 350 y 500 µCi de actividad. La jeringuilla

con el radiofármaco se introdujo antes y después de la inyección al sujeto en un activímetro Isomed 2010 (Sphymo, Saint-Aubin, FR), determinando mediante la diferencia entre la actividad existente en la jeringuilla antes y después la actividad exacta introducida al sujeto. Una vez introducido el radiofármaco se debe esperar entre 30 y 40 minutos para que la distribución del mismo sea completa, permitiendo su captación por los tejidos de interés.

Una vez anestesiados los sujetos, y distribuido el radiofármaco en el caso de realizarse un análisis por PET, los individuos se introdujeron en la camilla para ratones del micro PET-SPECT-CT Albira II (ONCOVISION GEM imaging S.A., Valencia, Comunidad Valenciana, ES). Los sujetos fueron colocados en posición prono y se inició en software Albira SUITE de ONCOVISION con el cual se realizaron las adquisiciones. Los parámetros elegidos para el análisis por CT fueron de alta dosis de rayos X (0,4 mAmp), alta resolución de la imagen, aplicando 600 proyecciones, y alto voltaje (45kV). Estos parámetros permiten mejorar la calidad de las imágenes obtenidas pero implican un mayor nivel de radiación para el individuo. Los días en los que estaba previsto un análisis por PET se realizó una adquisición del cuerpo entero y se introdujeron los datos correspondientes al peso y a la dosis de radiofármaco suministrado a cada animal para que el software realizase la corrección de los datos obtenidos en función a ellos.

Una vez finalizada la adquisición se realizó la reconstrucción de las imágenes con el mismo Software, se empleó una reconstrucción normal para obtener las imágenes de cuerpo entero de los individuos tanto para el CT como el PET y adicionalmente se realizó una reconstrucción avanzada del CT de la zona de los cornetes para obtener imágenes más resolutivas de esta zona en concreto.

El análisis de las reconstrucciones obtenidas fue llevado a cabo mediante el uso del Software visualizador de imágenes PMOD 2.0. Mediante este programa se obtuvieron las imágenes de los diferentes sujetos y se realizaron las cuantificaciones. Las imágenes representativas de la técnica CT fueron obtenidas sin necesidad de modificaciones para su correcta visualización. Las imágenes representativas del PET se obtuvieron a partir de la superposición de este análisis a la guía estructural que proporciona el CT con el fin de permitir la identificación de la localización proporcionada por las señales. Para la obtención de las imágenes de los cornetes del análisis por PET fue necesario eliminar la señal producida por el cerebro y el ojo, órganos que necesitan altos aportes de glucosa en condiciones normales y que impedían obtener de forma adecuada los resultados obtenidos para los cornetes nasales a partir de las imágenes sin modificar. La herramienta máscara del software permite eliminar de la imagen la señal producida por un tejido del sujeto sin que la representación del resto del mismo se vea alterada, como se ve en la figura 2.

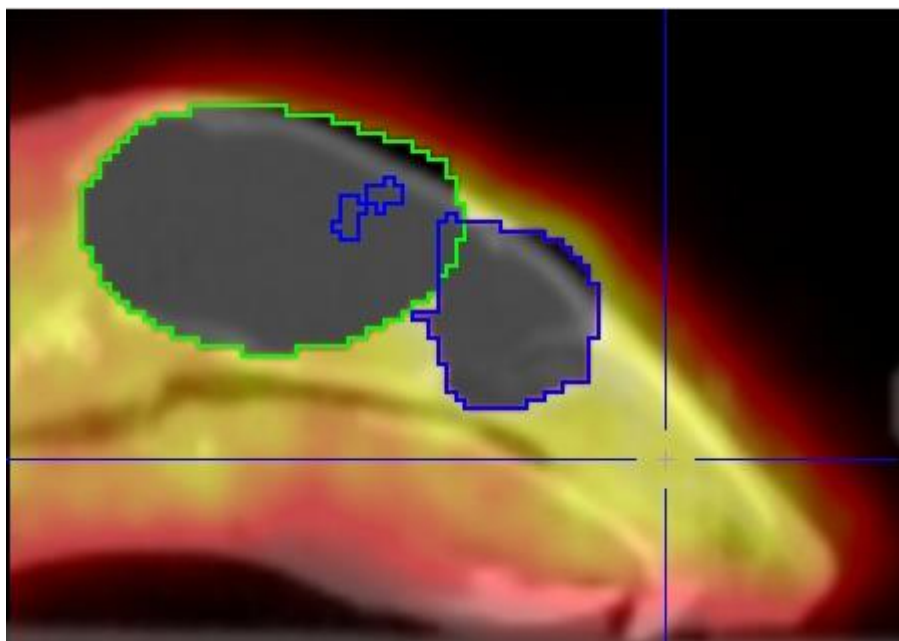


Figura 2. Ejemplo de enmascaramiento del cerebro y el ojo de uno de los sujetos.

Para la obtención de las cuantificaciones se delimitó un área o región de interés sobre diferentes cortes de pulmón y cornetes nasales en la imagen de CT obteniendo así la cuantificación de los parámetros recogidos para esa región. Estas mismas regiones se aplicaron sobre el análisis PET obtenido en la misma sesión.

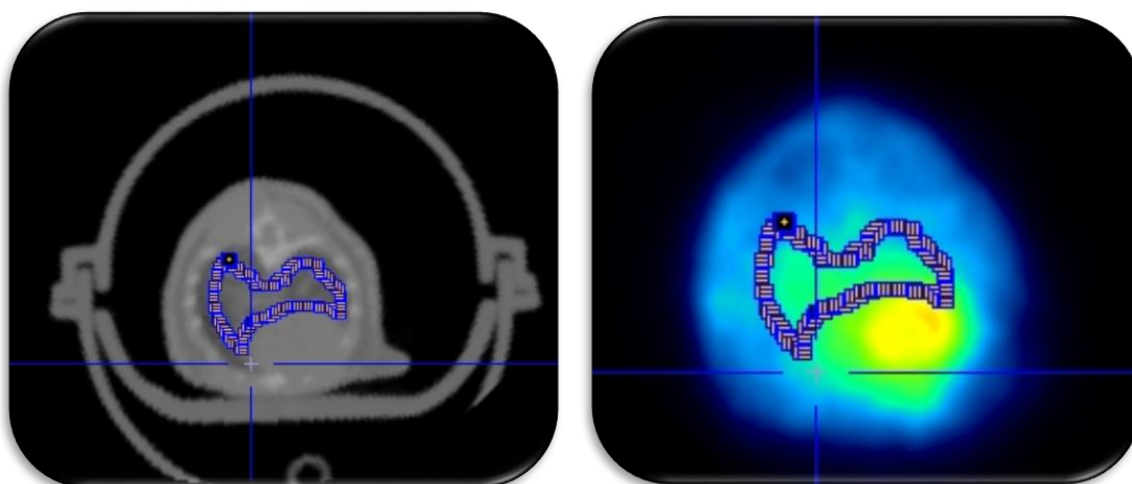


Figura 3. Toma de las regiones de interés de los pulmones de un sujeto en CT (izquierda) y su uso como plantilla en la imagen de PET (derecha).

A partir de estas regiones de interés el software calculó las unidades obtenidas por las técnicas para permitir la comparación numérica entre los diferentes sujetos que componen el estudio.

3.4. Análisis histológico

Una vez finalizado los protocolos de inducción de la poliposis y la monitorización del proceso mediante el análisis de imágenes, se inició el análisis histológico de los tejidos de los sujetos. Este procedimiento se ideó como apoyo al análisis por micro CT-PET y medio de verificar los resultados obtenidos por este y por tanto su utilidad como herramienta diagnóstica de la enfermedad.

A día 105 del experimento de inducción de la poliposis los sujetos fueron sacrificados. Para ello se los colocó en una superficie plana y lisa, se les mantuvo sujeta la cabeza por la parte trasera del cráneo y se realizó un tirón firme de la base de la cola, de forma que los animales quedaron desnucados y murieron en el acto.

Una vez sacrificados fueron decapitados y se extrajeron los pulmones. De las cabezas se eliminó la mandíbula inferior, la zona craneal y los tejidos blandos de los costados de las fosas nasales, de esta forma se limitó el tejido existente a la zona correspondiente a los cornetes nasales y se facilitó tanto la posterior inclusión en parafina como el análisis de los resultados. Las muestras de tejido se lavaron en un tubo de 50 ml con solución salina pre-enfriada a 4°C. Los lavados se repitieron dos veces más para que fueran completos. Después se introdujeron en un vaso de orina con una solución de formol al 4% donde se mantuvieron durante 24h de modo que quedasen fijados. Con el fin de descalcificarlos, las muestras de tejido correspondiente a los cornetes nasales, se introdujeron durante 5 días en un vaso de orina con una solución de ácido nítrico al 5% manteniéndose a una temperatura de 4°C. Las muestras de pulmón no necesitaron pasar por este paso de descalcificación. Posteriormente se introdujeron las muestras de tejido en casetes de inclusión en parafina siendo cada uno correspondientemente marcado con el código identificativo del sujeto y el tipo de muestra que poseían. Los casetes con los fragmentos de tejido siguieron posteriormente el proceso de deshidratación progresiva estándar pero modificado en los tiempos de estancia en las diferentes soluciones. La deshidratación progresiva es un proceso que consta de 8 pasos que se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Protocolo de deshidratación previo a la inclusión en parafina.

Pasos	Solución	Tiempo
1	Etano 70%	60 minutos
2	Etanol 96%	3 horas
3	Etanol 96%	90 minutos
4	Etanol 100%	60 mininutos
5	Etanol 100%	2 horas
6	Etanol 100%	6-8 horas
7	Xilol	60 minutos
8	Xilol	60 minutos

Todo el proceso fue llevado a cabo en una campana de extracción OR-ST 1500 (Burdinola, Amoroto, Bizkaia, España.).

Una vez finalizado el proceso de deshidratación, los casetes se introdujeron en un baño de parafina líquida realizado en bañera con estufa Leica EG 1150H y se dejaron enfriar en un campo frío Leica EG 1150 C para que solidificase.

Utilizando un micrótopo Leica RM 2135 se realizaron cortes de 4 µm de grosor en el caso de las muestras de cornetes y de 5 µm de los fragmentos de pulmón. Los cortes de los cornetes se realizaron colocando la muestra en posición coronal. Las muestras obtenidas fueron extendidas en una piscina Leica HI 1210 con el agua a 39°C y posteriormente depositados en portaobjetos previamente identificados por el sujeto, el tipo de muestra, la zona de corte y un número de corte secuencial con el que conocer, en el caso de los cornetes, que región es la que se encuentra representada. Los cortes correspondientes a los cornetes nasales se recogieron de las regiones posteriores a los incisivos y hasta el término del meato medio nasal. Los cortes de las muestras pulmonares se recogieron indistintamente de todo el órgano.

Una vez depositados en el portaobjetos identificado, se dejaron secar durante 48 horas para evitar desprendimientos de la muestra en el proceso de tinción.

Todos los cortes indistintamente del tipo de muestra, pulmón o cornetes nasales, se tiñeron mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina estándar de la Fundación Investigación Hospital General Universitario de Valencia con ligeras modificaciones. El protocolo consta de un proceso de deshidratación representado en la tabla 3.

Tabla 3. Pasos de la rehidratación rápida en el protocolo de tinción mediante hematoxilina y eosina.

Pasos	Solución	Tiempo
1	Xilol	3 minutos
2	Xilol	3 minutos
3	Etanol 100%	1 minuto
4	Etanol 96%	1 minuto
5	Etanol 80%	1 minuto
6	Etanol 70%	1 minuto
7	Agua corriente	1 minuto

Posteriormente se introdujeron las muestras en hematoxilina de Ehrlich (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) durante un tiempo de 5 minutos 30 segundos, en vez de los 7 minutos estipulados en el protocolo estándar. El tiempo de estancia en la hematoxilina fue reducido debido al alto número de células inflamatorias del tejido que impedía la visión correcta de la muestra a través del microscopio óptico tras el tiempo de estancia normal. Tras la inmersión en hematoxilina se realizó un lavado abundante en agua corriente. Posteriormente se produjo una diferenciación en una cubeta que contenía agua corriente con unas gotas de ácido clorhídrico al 37% hasta que el color general de la muestra viró hacia el rojizo y el cristal del portaobjetos mostraba un aspecto limpio y transparente. Después de la primera diferenciación se produjo una segunda, esta vez en una cubeta con una solución de carbonato de litio saturado en agua destilada, hasta que la muestra tomó un color ligeramente azulado, seguido de un lavado breve en agua corriente. Una vez realizados los virajes se introdujo la muestra en una solución al 0,5% de eosina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), en tampón de ácido acético con un pH de 5,5 durante, 5 segundos seguido de un lavado rápido en agua corriente. Por último se realizó un deshidratado mediante dos pasos rápidos por etanol al 96%, dos pasos rápidos por etanol absoluto y tres pasos rápidos por xilol.

Los portaobjetos una vez deshidratados se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos para eliminar el exceso de xilol y se montaron añadiendo una gota de DPX entre la muestra y el cubreobjetos.

Todos los pasos de la tinción, incluyendo el rehidratado, deshidratado rápido y secado de las muestras, así como el montaje con DPX se realizó dentro de una campana de extracción OR-ST 1500 (Burdinola, Amoroto, Bizcaia, España.) por seguridad.

Las muestras teñidas fueron meticulosamente analizadas en busca de estructuras que se correspondiesen con pólipos nasales en las muestras de la zona de los cornetes nasales obtenidas de los sujetos experimentales y una inflamación acusada en las muestras de pulmón de los sujetos experimentales que sirviese como apoyo de que la inflamación y poliposis desarrollada por los sujetos en las fosas nasales no es un suceso fortuito. Para ello se utilizó un microscopio óptico Leica CTR 6000 acoplado a una cámara Leica DFC 480 con la que realizar las fotografías documentales.

4. RESULTADOS

4.1. Cornetes nasales

4.1.1. Análisis de imágenes

La técnica de toma de imágenes por tomografía computarizada (CT) utiliza radiación X para formar imágenes del cuerpo de los sujetos y muestra sus estructuras internas en función de su densidad. La densidad de los tejidos analizados se mide en unidades Hounsfield (HU) con un rango entre +1000, que representa la máxima densidad y -1000, que representa la mínima densidad [38].

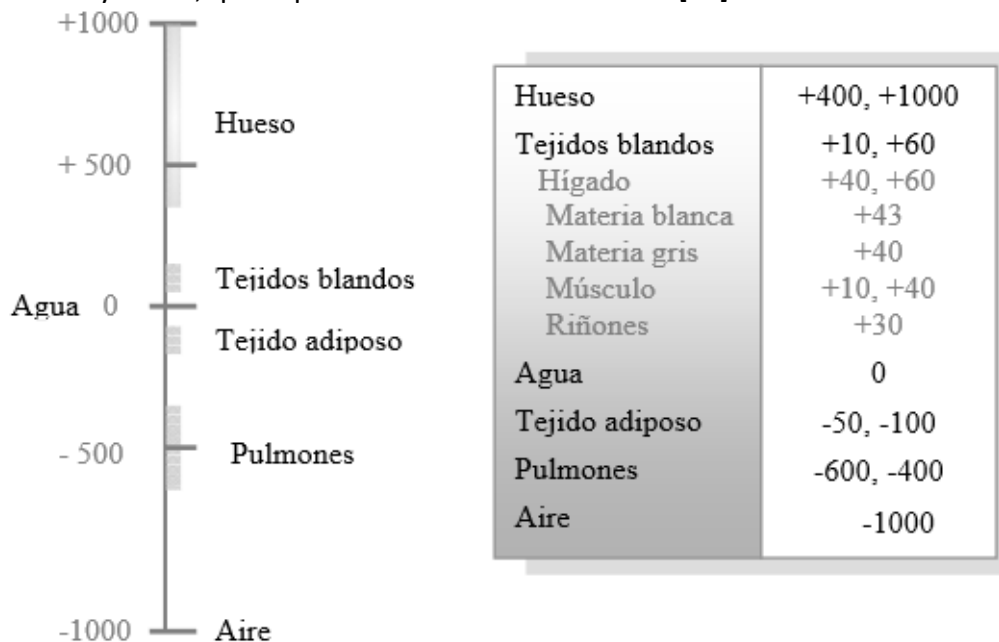


Figura 4. Valores que toman las unidades Hounsfield para diferentes tejidos en humanos.

El programa informático tiene la capacidad de contabilizar las unidades HU medias de una zona seleccionada o de generar una imagen a partir de estos datos numérico traduciéndolos en código de color donde el valor -1000 toma el color negro,

el valor +1000 toma el color blanco y a los valores intermedios se les adjudican colores intermedios de la escala de grises.

El análisis de las imágenes obtenidas a partir de la representación visual de los datos tomados mediante la técnica CT de los sujetos control a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis muestra una morfología normal de los meatos nasales, presentando el dibujo laberíntico típico de las vías aéreas de los cornetes nasales.

Por el contrario, las imágenes correspondientes a los sujetos que se sometieron a las instilaciones con EBS y OVA tomadas al mismo día presentan una morfología alterada de la zona, presentando una mayor densidad del tejido de forma general, visible en la imagen por la predominancia de un ligero aumento de la intensidad del color blanco. Se observa un engrosamiento de todo el tejido y como, en ciertas zonas del meato medio de los individuos instilados con OVA y EBS, el espacio aéreo de las fosas nasales ha sido invadido por parte del tejido nasal cambiando la morfología natural del mismo. Estas circunstancias determinan la existencia de una acumulación celular en los sujetos experimentales, respecto a los sujetos control, que reduce el espacio aéreo de la zona, llegando a bloquearla en algunas regiones. Los resultados no muestran diferencias entre los diferentes grupos experimentales, observándose las mismas alteraciones para todos los individuos que recibieron instilaciones de OVA y EBS, independientemente del porcentaje de OVA suministrado.

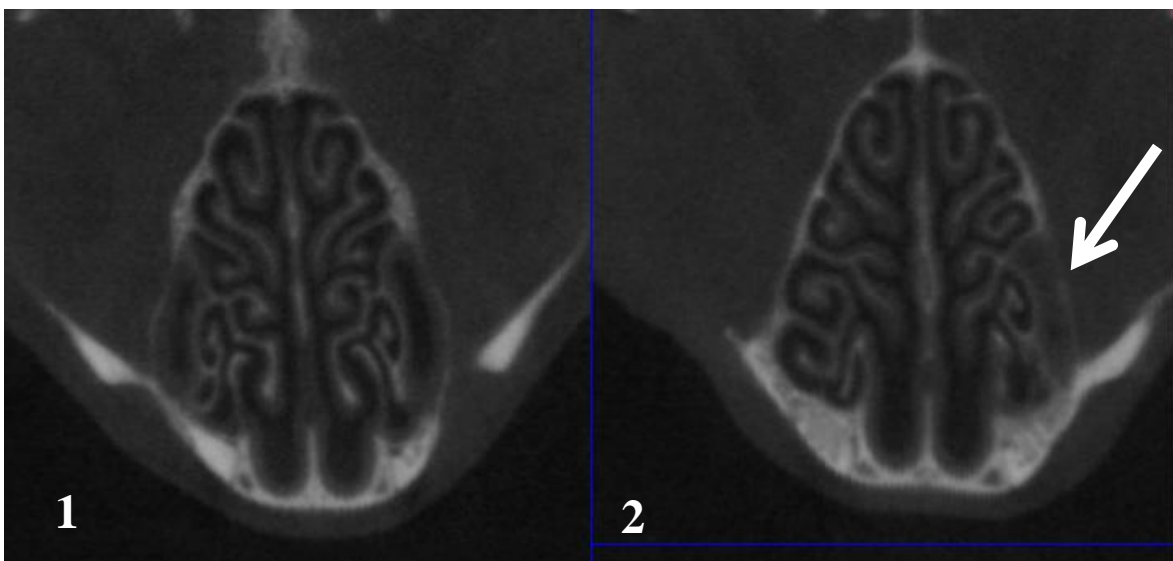


Figura 5. La imagen 1 muestra la sección coronal de los cornetes nasales de un sujeto control tomada mediante tomografía computarizada (CT) a día 104. La imagen 2 muestra la misma sección de un sujeto experimental a día 104. La zona señalada se corresponde con una invasión del espacio aéreo.

Las cuantificaciones de las medias de las unidades Hounsfield, realizadas para cada uno de los tres experimentos mostraron un aumento significativo en las mismas de los sujetos experimentales respecto de los sujetos control. En la figura 6 se observa un aumento significativo de las unidades Hounsfield en la comparación de los sujetos instilados con OVA y EBS a día 104 del protocolo de inducción.

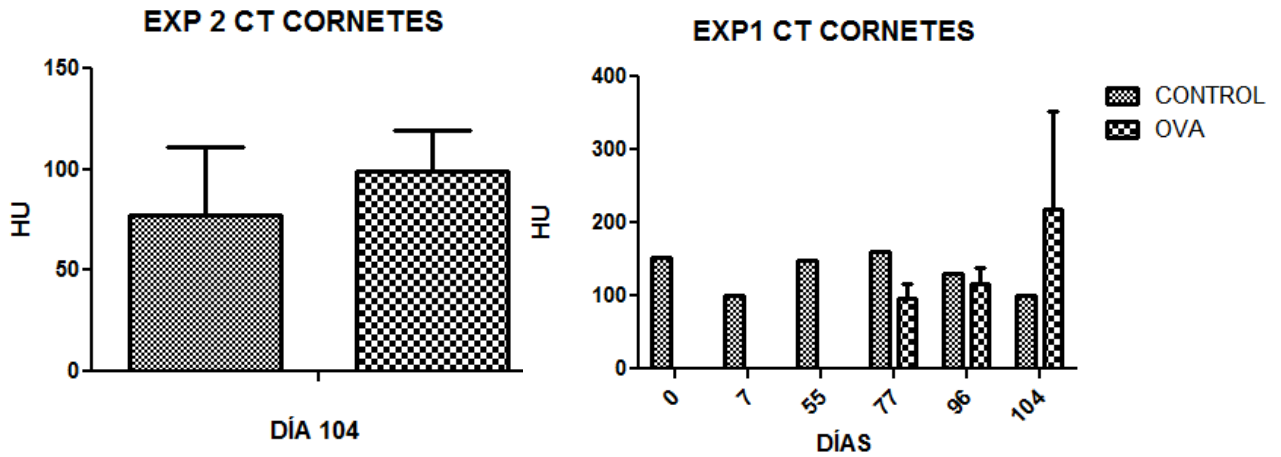


Figura 6. El gráfico de la izquierda muestra la comparación de las unidades HU obtenidas para los sujetos control y los experimentales a día 104. El gráfico de la derecha muestra la comparación de las unidades HU obtenidas en los cornetes a los diferentes días del proceso de inducción de la RSC-PN.

Las imágenes obtenidas utilizando la técnica de tomografía de emisión de positrones, de las mismas regiones de los sujetos control a día 104 del protocolo de inducción, representadas por la figura 7, muestran una captación homogénea del radiofármaco 18-FDG de la zona. Los colores cálidos, en la imagen, representan captaciones elevadas de 18-FDG y, por tanto, un consumo elevado de glucosa por los tejidos que representan. Los colores fríos en la imagen representan una captación baja del radiofármaco, correspondiendo a un consumo relativamente bajo de glucosa en las regiones que los toman. No se observan puntos o zonas hipercaptantes en los tejidos del cornete nasal que de una forma natural no requieren un alto aporte de glucosa, lo que indica ausencia de un proceso inflamatorio severo en el meato medio de los sujetos control analizados.

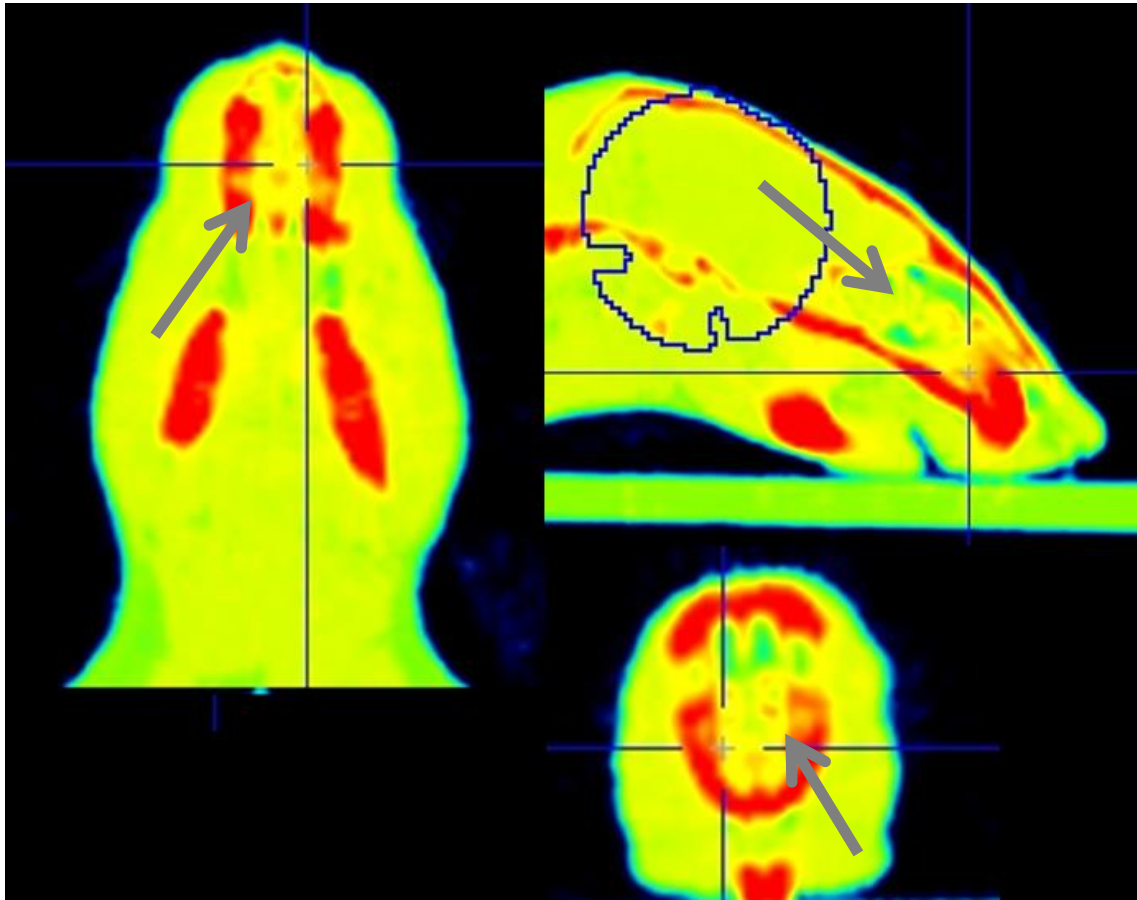


Figura 7. Imagen obtenida mediante técnica PET de los cortes coronal, axial y sagital de uno de los sujetos control a día 104 del proceso de inducción.

Las imágenes obtenidas utilizando la técnica de tomografía de emisión de positrones, de la zona nasal a día 104 del procedimiento de inducción de la poliposis, representadas por la figura 8, muestran un aumento de la captación del radiofármaco 18-FDG en diferentes puntos localizados de las fosas nasales y los cornetes de los sujetos que fueron sometidos al tratamiento con EBS. La existencia de un proceso inflamatorio severo aumenta los requerimientos de glucosa del tejido en el que se produce e implica un aumento en la cantidad de 18-FDG captada por el mismo al ser analizado mediante la técnica PET. El hecho de que este aumento de captación del radiofármaco se presente en forma múltiples puntos hipercaptantes en ciertas zonas localizadas y de relativamente pequeño tamaño se corresponde con una acumulación de células inflamatorias que se determinó igual a la que presentan el interior de los cuerpos que integran los pólipos nasales en la RSC-PN. Estos resultados obtenidos a partir del análisis de imágenes mediante la técnica PET fueron los mismos para cada uno de los tres grupos experimentales del proceso de inducción, sin sufrir variaciones por el diferente porcentaje de OVA empleado en cada uno de ellos.

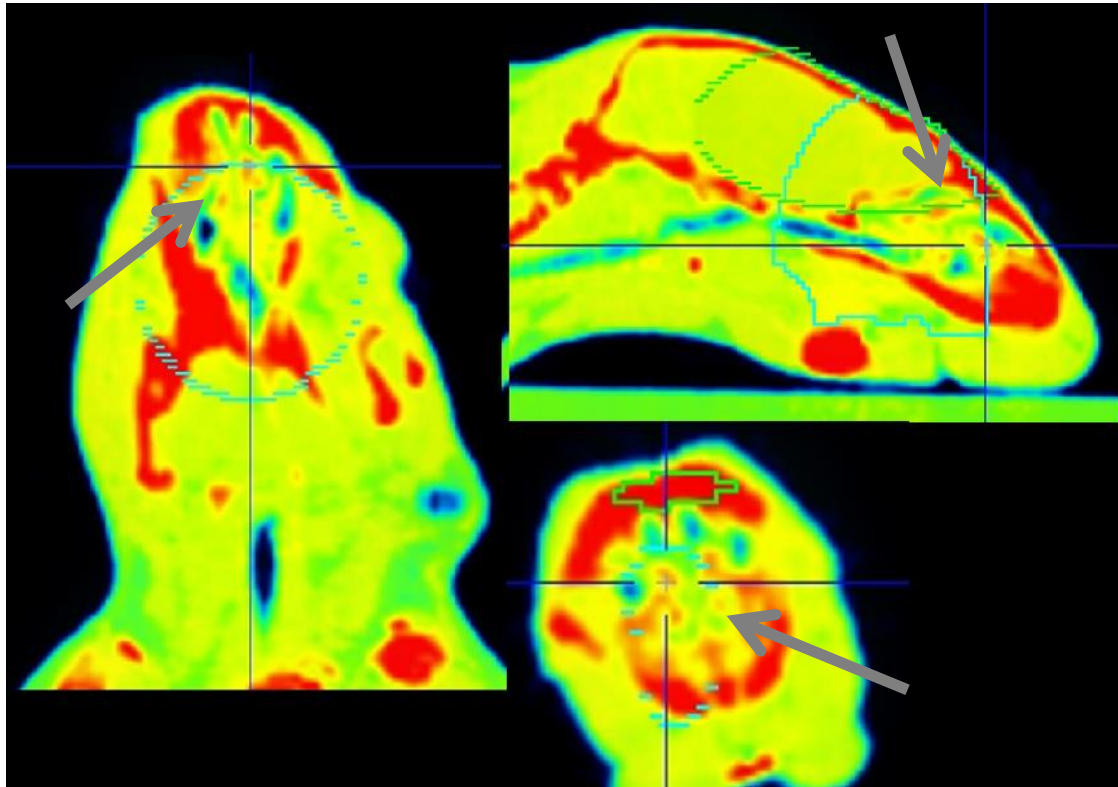


Figura 8. Imagen obtenida mediante técnica PET de los cortes coronal, axial y sagital de uno de los sujetos que recibió las instilaciones con EBS a día 104 del protocolo de inducción. Las zonas señaladas muestran múltiples focos hipercaptantes de 18-FDG.

El análisis de las cuantificaciones de la captación de radiofármaco 18-FDG en los tejidos correspondientes a los cornetes nasales de los diferentes sujetos mostro un incremento significativo de la captación de la misma en los sujetos sometidos a las instilaciones con OVA y EBS respecto de los sujetos controles a último día de procedimiento de inducción de la poliposis. Se puede observar también un aumento acusado de la captación de radiofármaco en los sujetos instilados con OVA y EBS a día 104 respecto de los mismos individuos a día 0 del procedimiento de inducción, permitiendo afirmar que se ha producido con éxito.

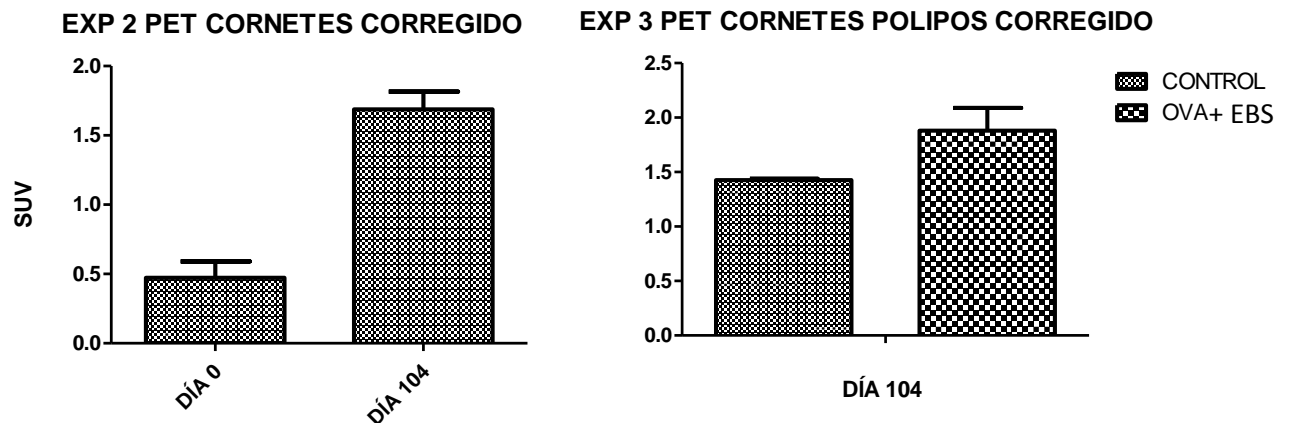


Figura 9. El gráfico de la izquierda muestra la comparación entre la captación de 18-FDG corregido por el peso y la dosis de los sujetos instilados con OVA y EBS entre los días 0 y 104 de inducción. El gráfico de la derecha muestra la comparación de la captación de 18-FDG corregido por el peso y la dosis entre sujetos experimentales y control a día 104 del experimento.

4.1.2 Análisis histológico

El análisis bajo microscopio de las tinciones de hematoxilina y eosina de las diferentes muestras del tejido de los cornetes nasales ratificó los resultados obtenidos mediante las técnicas basadas en el análisis de imágenes.

Los cortes histológicos de los cornetes nasales de los sujetos control muestran una morfología normal en sus tejidos. El epitelio mantiene su morfología y características normales, sin presentar engrosamiento ni un aumento de la secreción. No se observan alteraciones subepiteliales ni el infiltrado de células inflamatorias propio de un proceso de infección.

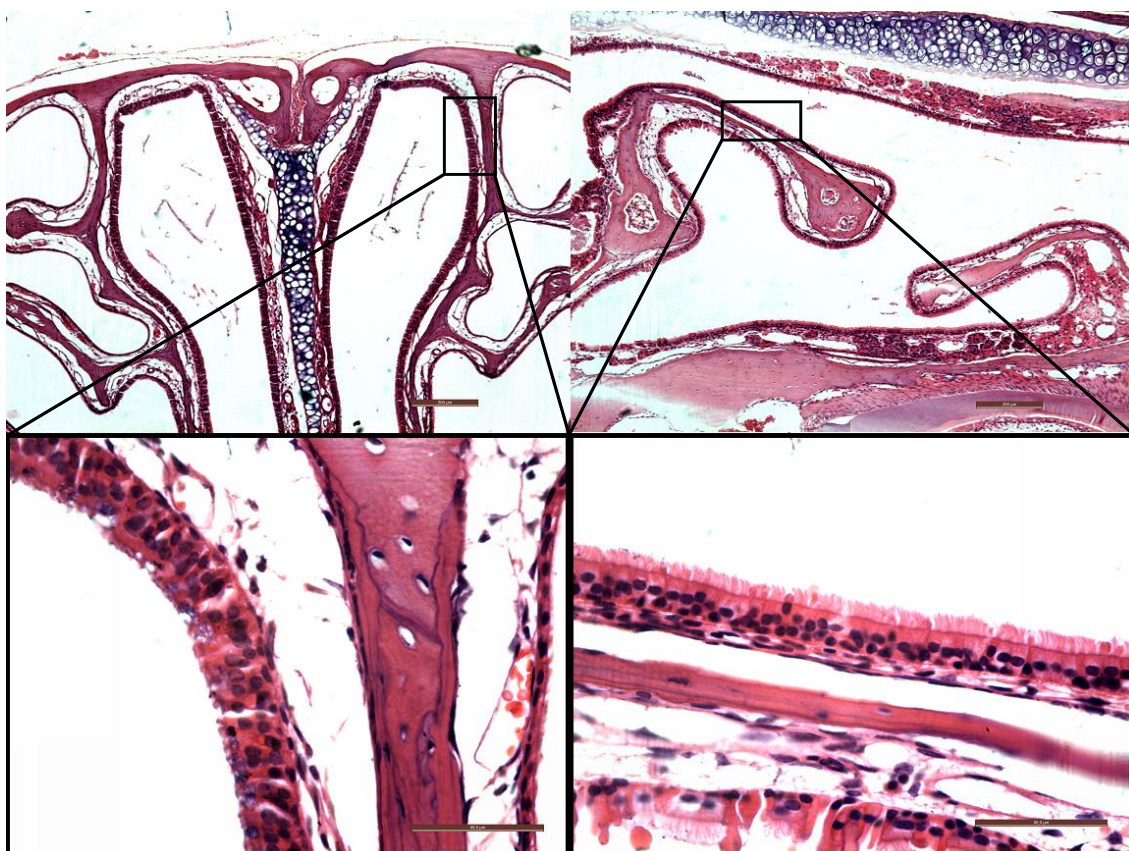


Figura 10. Fotografías de cortes histológicos de sujetos control teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 μm , la de las imágenes inferiores con 50 μm .

Las muestras histológicas obtenidas a partir de sujetos experimentales mostraron, de forma general, la existencia de una inflamación severa general de todo el meato medio de las fosas nasales que produce, en ciertas zonas de las muestras, un engrosamiento del tejido por infiltración de gran cantidad de células inflamatorias, siendo las más frecuentes los eosinófilos y en menor medida los neutrófilos. Se observa, a su vez un engrosamiento de las células secretoras, así como una fibrosis subepitelial en la mayor parte del tejido.

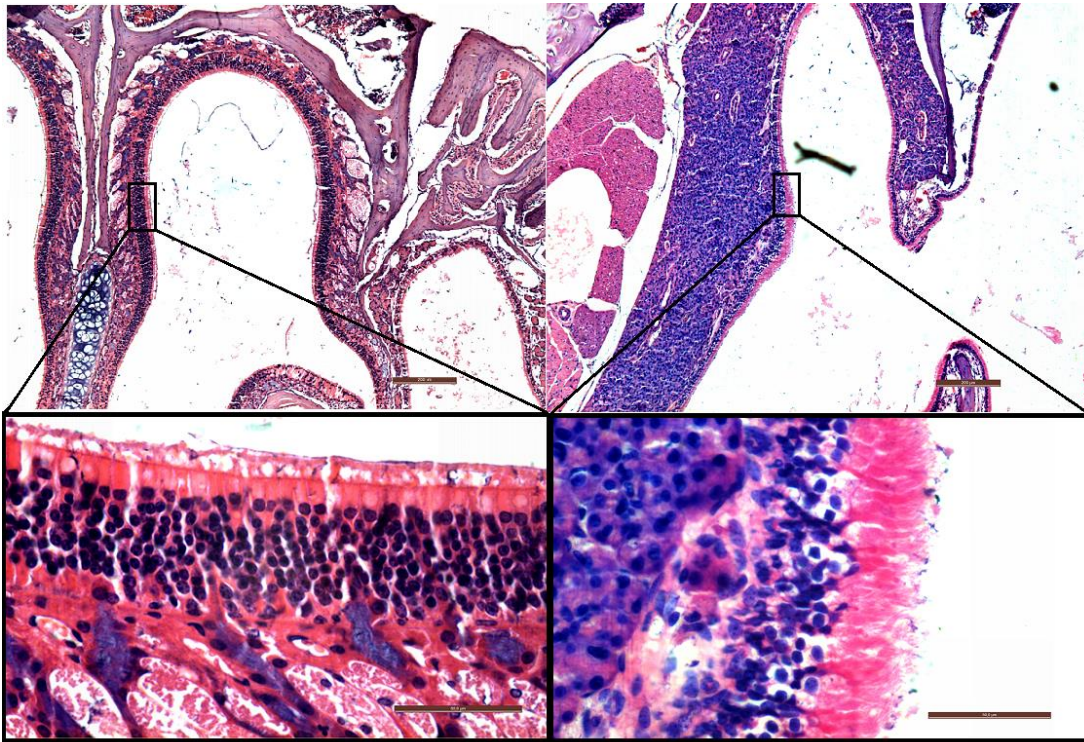


Figura 11. Fotografía de cortes histológicos de sujetos instilados con OVA y EBS teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 µm, la de las imágenes inferiores con 50 µm.

En los cortes histológicos de estos sujetos se observa también la existencia de pólipos nasales. Estos se presentan como estructuras hipertróficas formadas por la infiltración de numerosas células inflamatorias en el tejido del meato medio nasal que deforma la morfología típica del epitelio nasal formando prolongaciones de formas digitales o de montículos. El infiltrado celular inflamatorio está formado en un 80% de eosinófilos y se observa una mayor secreción de las células epiteliales adyacentes.

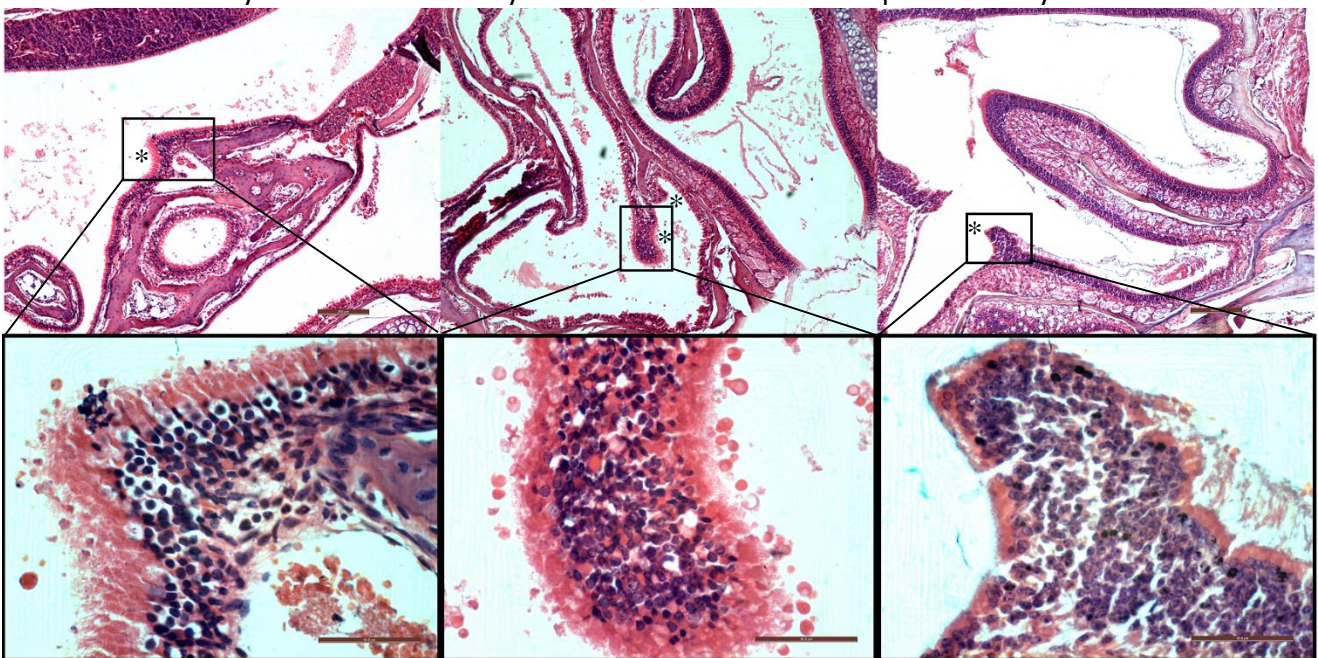


Figura 12. Fotografías de cortes histológicos de los cornetes nasales de sujetos instilados con OVA y EBS. Los pólipos nasales han sido marcados con un asterisco.

La aparición de pólipos nasales en los sujetos que recibieron las instilaciones con OVA y EBS, así como el número de ellos encontrados por individuo, no guardo relación con el porcentaje de ovoalbúmina utilizado en la inducción de la enfermedad siendo 3 el número máximo pólipos nasales encontrados en un mismo individuo.

4.2. Pulmones

4.2.1. Análisis de imágenes

El análisis de las imágenes tomadas por las técnicas CT y PET de los pulmones de los sujetos sirve de apoyo a los resultados verdaderamente relevantes obtenidos de los cornetes nasales, puesto que permiten corroborar en otra región del individuo, también expuesta al agente inductor de la poliposis, que se obtienen evidencias de un proceso inflamatorio severo y que estas pueden ser detectadas de forma eficiente mediante ambas técnicas.

El análisis de las imágenes obtenidas mediante la técnica CT de la zona del tórax de los sujetos utilizados como control a día 104 del protocolo de inducción muestra una morfología normal de los pulmones, así como una intensidad del color, aplicado a las unidades Hounsfield obtenidas por la técnica, adecuada para las circunstancias normales de un pulmón sano.

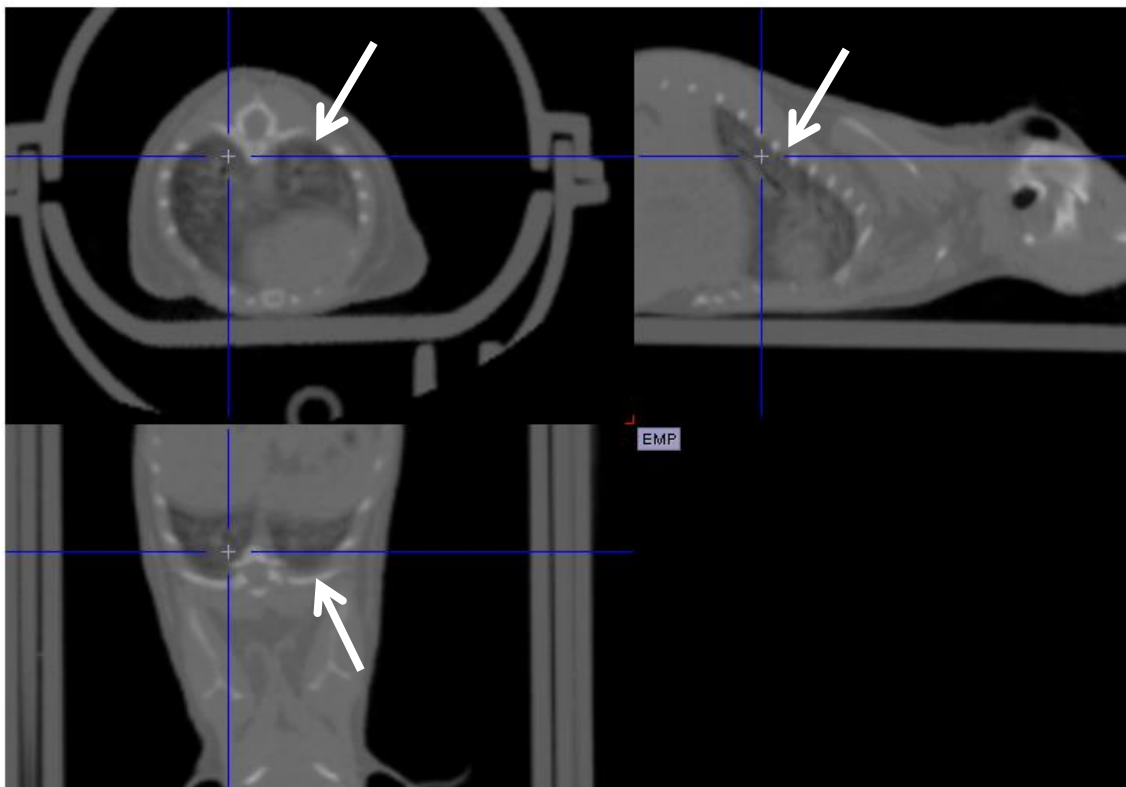


Figura 13. Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica CT de un sujeto control a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.

El análisis de las imágenes obtenidas en las mismas condiciones y de la misma zona de todos los sujetos que fueron sometidos a las instilaciones con EBS y OVA presenta un aumento notable de la intensidad del color blanco, forma de representar un aumento sustancial de la densidad del tejido. Esta circunstancia se debe a la presencia de una inflamación severa de todo el tejido pulmonar que cambia la morfología del mismo al infiltrarse gran cantidad de células inflamatorias en él. La infiltración de este tipo de células produce la invasión de los espacios aéreos y su oclusión, reduciendo el volumen de aire en el interior de los pulmones y dificultando la respiración del individuo. Estos cambios se observaron para todos los individuos instilados con EBS, sin existir cambios significativos entre los que recibieron porcentajes diferentes de OVA.

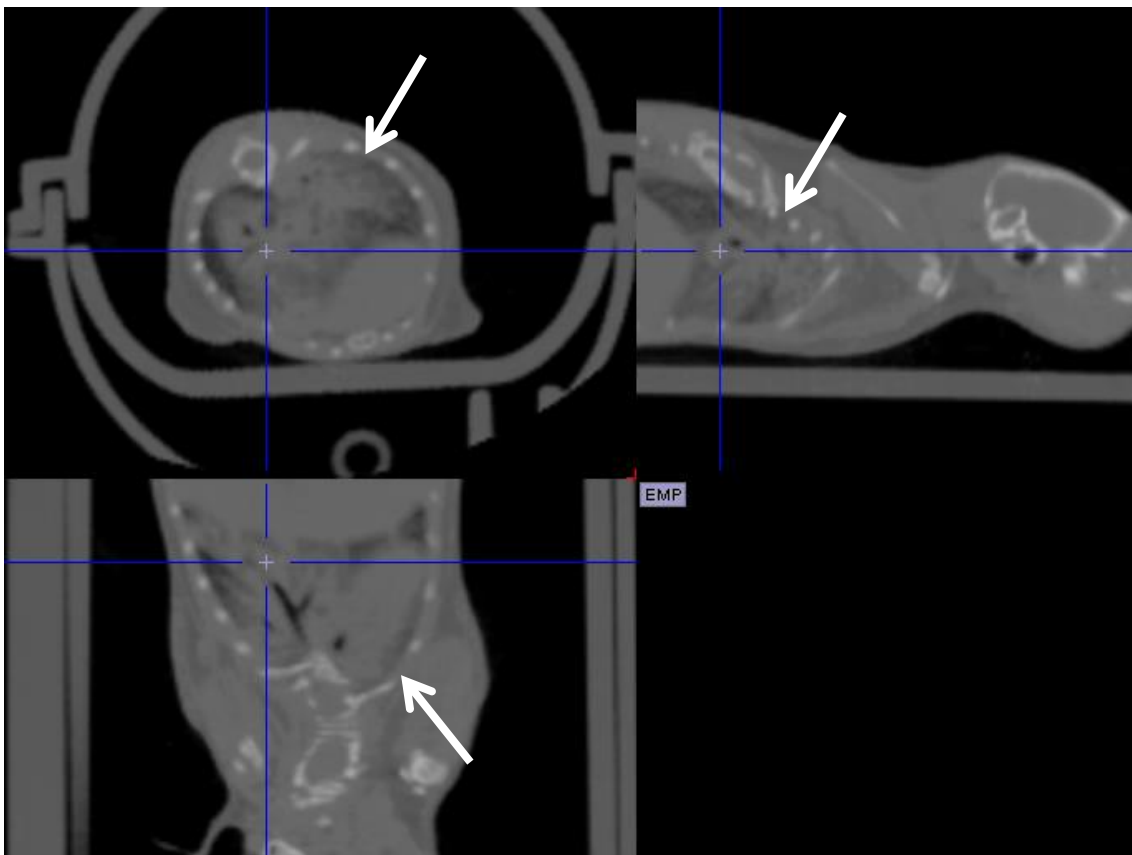


Figura 14. Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica CT de un sujeto experimental a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.

El análisis de las cuantificaciones de las unidades Hounsfield obtenidas para los pulmones de los individuos control a día 104 del procedimiento de inducción presenta resultados dentro de la normalidad, siendo los valores claramente negativos en todos los individuos.

Los sujetos experimentales, en las mismas condiciones, muestran un aumento significativo del número de unidades Hounsfield obtenido para la región de los pulmones, llegando a sobrepasar en algunos casos el valor 0, circunstancia que en un órgano donde naturalmente existe un volumen muy alto del aire, representa una alteración grave de sus funciones.

Se puede observar en la figura 15, como la técnica CT permite realizar un seguimiento de la evolución de la enfermedad en los sujetos durante el proceso de inducción de la RSC-PN, permitiendo una evaluación del alcance de la inflamación en cada momento.

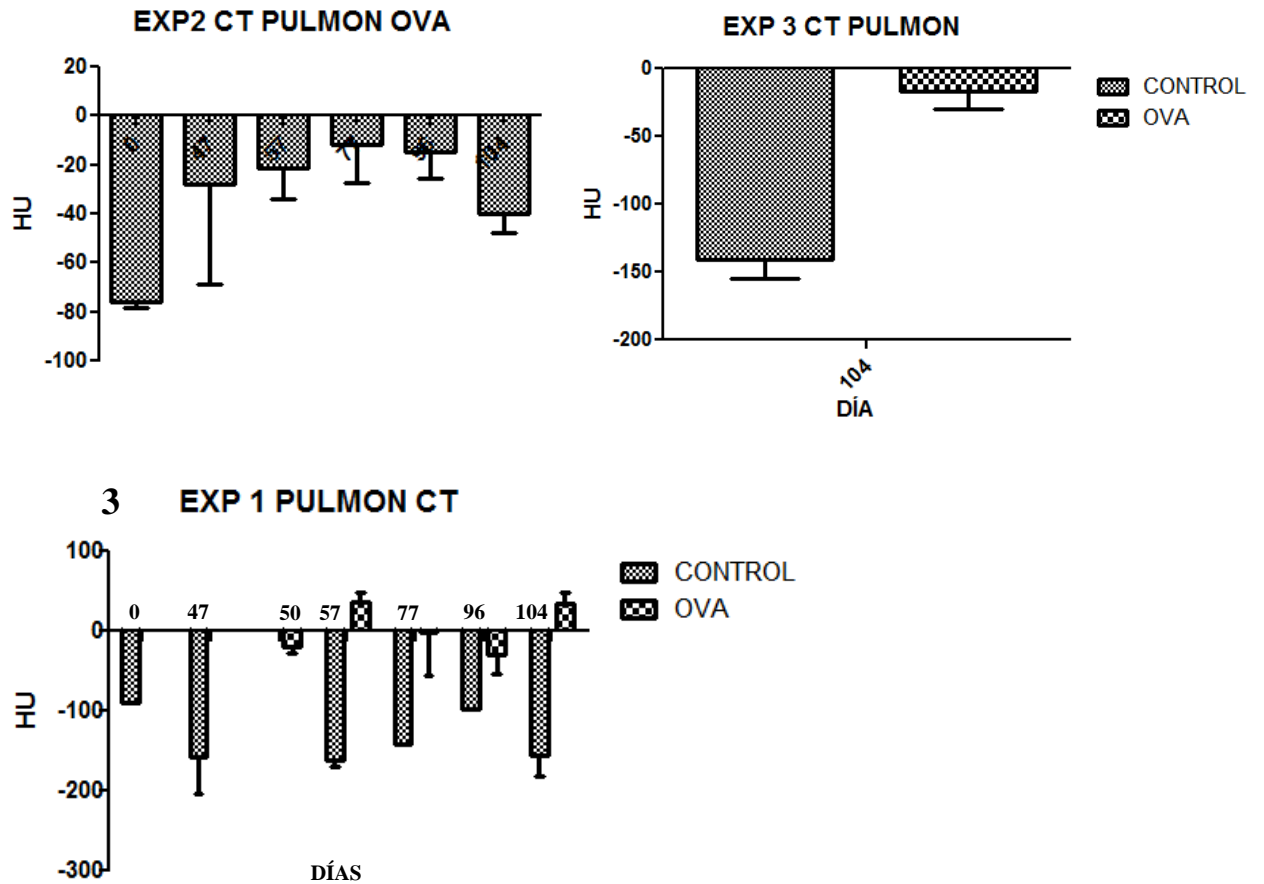


Figura 15. El gráfico 1 muestra la evolución a lo largo del periodo de inducción de la enfermedad de diferentes sujetos instilados con OVA y EBS. El gráfico 2 muestra la comparativa de las unidades HU obtenidas por sujetos control y los sujetos instilados por OVA y EBS a día 104, nombrados como OVA. El gráfico 3 compara las unidades HU obtenidas durante los diferentes días del protocolo de instilación por los sujetos instilados con OVA y EBS, nombrados como OVA, con las obtenidas por los sujetos control.

El análisis de las imágenes obtenidas mediante la técnica PET de la zona del tórax de los sujetos control a día 104 del protocolo de inducción muestra una captación de la 18-FDG normal en los pulmones para un sujeto sano. Los colores cálidos representan captaciones mayores del radiofármaco que los colores fríos. Se observa una captación homogénea y sustancialmente inferior a la de otros órganos que poseen naturalmente una demanda superior de glucosa como el hígado o el cerebro.

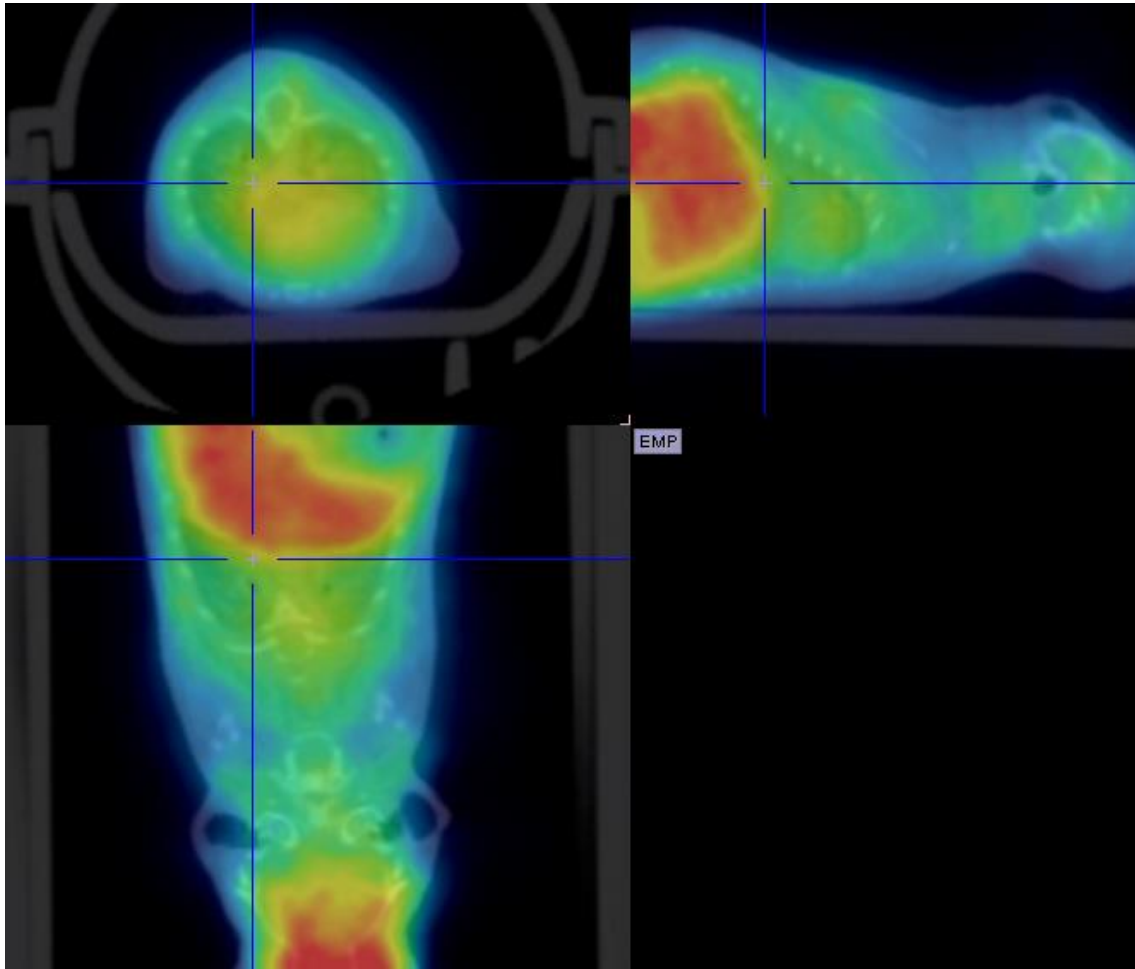


Figura 16. Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica PET de un sujeto control a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.

El análisis de las imágenes obtenidas mediante la técnica PET de la zona del tórax de los sujetos que recibieron las instilaciones con OVA y EBS a día 104 del protocolo de inducción muestra una captación de la 18-FDG en los pulmones muy superior a la que presentan los sujetos control. Se observa que mientras en los pulmones de los animales control el color predominante es el verde y en menor medida el amarillo, en los sujetos que recibieron las instilaciones con EBS predomina el color anaranjado y el rojo, símbolo de captaciones altas del radiofármaco. El aumento de la captación es debido al infiltrado de gran cantidad de células inflamatorias en un proceso de inflamación severa repartido por todo el órgano.

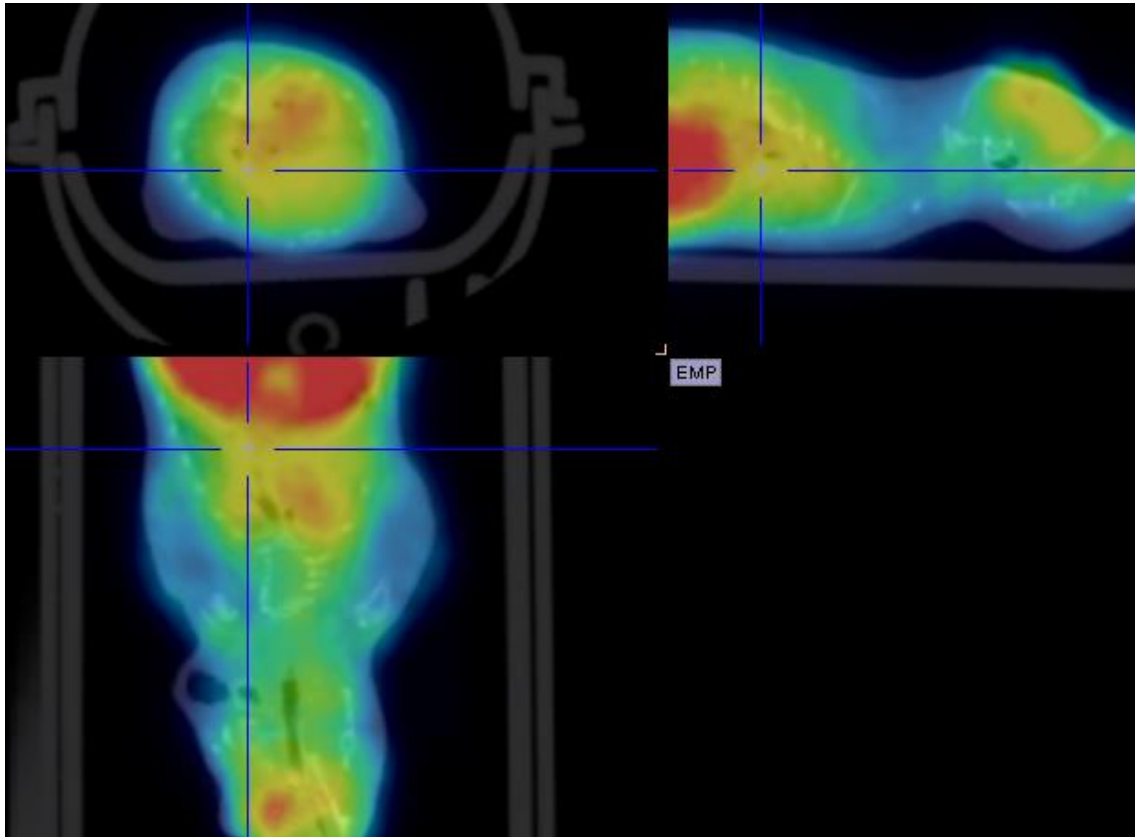


Figura 17. Imagen de los cortes axial, sagital y coronal de una sección de la reconstrucción de la información obtenida por la técnica PET de un sujeto experimental a día 104 del protocolo de inducción de la poliposis nasal.

Las cuantificaciones obtenidas a partir de las imágenes correspondientes al PET mostraron una diferencia significativa entre la captación del radiofármaco de los sujetos instilados con OVA y EBS y aquellos que actuaron como controles en estudio como se puede constatar en la figura 18. Se observa a su vez un aumento significativo en las captaciones de los sujetos experimentales a día 104 respecto de las que obtuvieron a día 0 del protocolo de inducción de la enfermedad. Estos aumentos son causados por la infiltración de células inflamatorias y el aumento de la demanda de glucosa que supone.

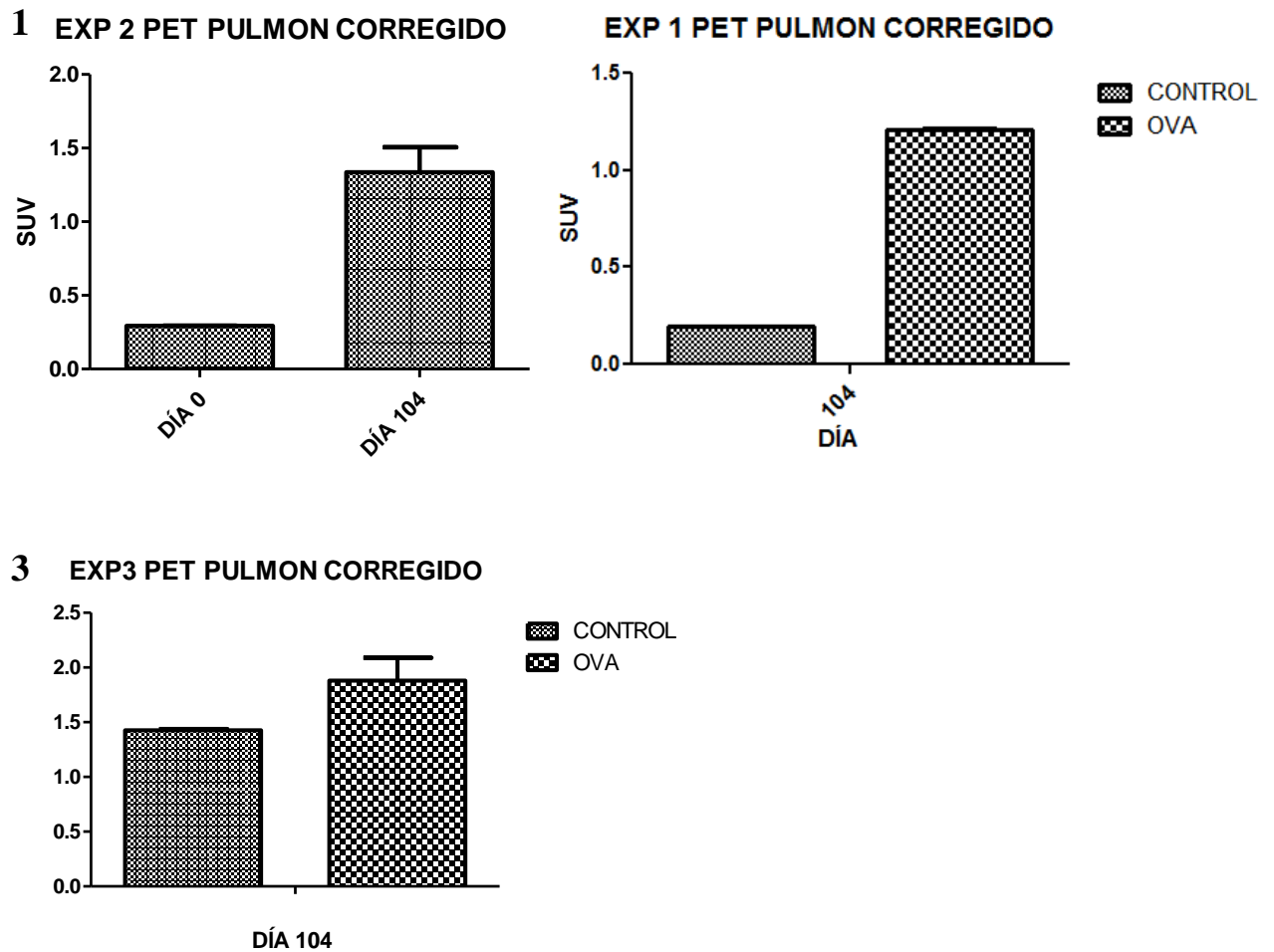


Figura 18. El gráfico 1 representa la comparación de la captación de radiofármaco de los sujetos experimentales a día 0 y día 104 del protocolo de inducción de la poliposis. Los gráficos 2 y 3 representan la comparación de la captación de 18-FDG entre los sujetos control y los sujetos experimentales, nombrados como OVA, a día 104 del protocolo de inducción.

4.2.2. Análisis histológico

El análisis bajo microscopio óptico de los cortes histológicos de tejido pulmonar de los sujetos del experimento teñidos con eosina y hematoxilina ratificó los resultados obtenidos por las técnicas de análisis de imágenes.

Las muestras del tejido pulmonar de los sujetos control, tras terminar el proceso de inducción, mostraban una morfología normal del tejido en un sujeto sano. Presentan gran cantidad de espacios aéreos, propios del tejido pulmonar y ausencia de infiltrado de células inflamatorias en la mayor parte de la muestra, pudiendo verse de forma aislada un reducido número de células inflamatorias adyacentes a ciertos vasos sanguíneos de la misma.

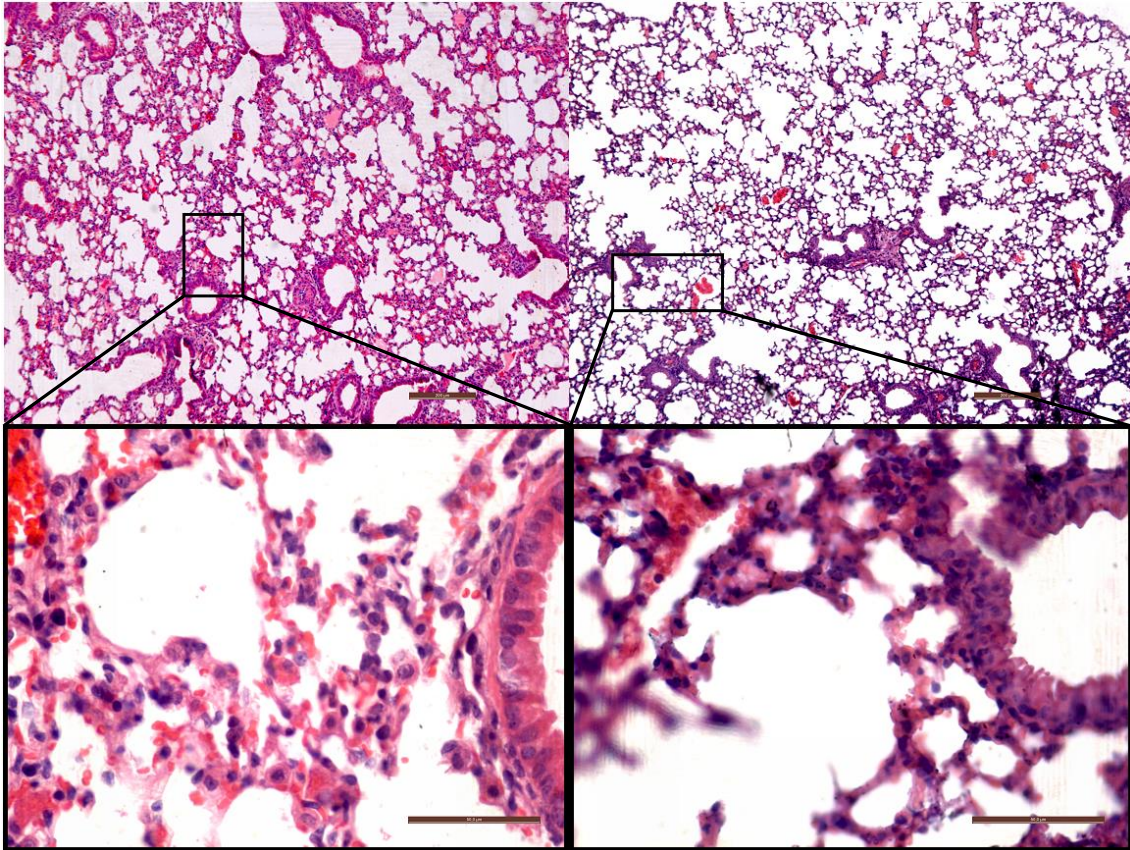


Figura 19. Fotografías de cortes histológicos de tejido pulmonar de sujetos control teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 μm , la de las imágenes inferiores con 50 μm .

Las muestras del tejido pulmonar de todos los sujetos instilados con EBS y OVA, sin importar el porcentaje de esta que se les administrara, muestran una morfología gravemente alterada de la totalidad del tejido analizado, reduciendo significativamente la función respiratoria del mismo. Se observa un infiltrado masivo de células inflamatorias que invaden por completo todo el tejido pulmonar. Los espacios aéreos existentes en una muestra pulmonar sana, se ven seriamente reducidos en la totalidad de la muestra debido a esta infiltración de células inflamatorias, siendo inexistentes en gran parte de los cortes de la muestra. Los neutrófilos son predominantes en el tejido pulmonar inflamado y se encuentra gran cantidad de tejido fibrótico.

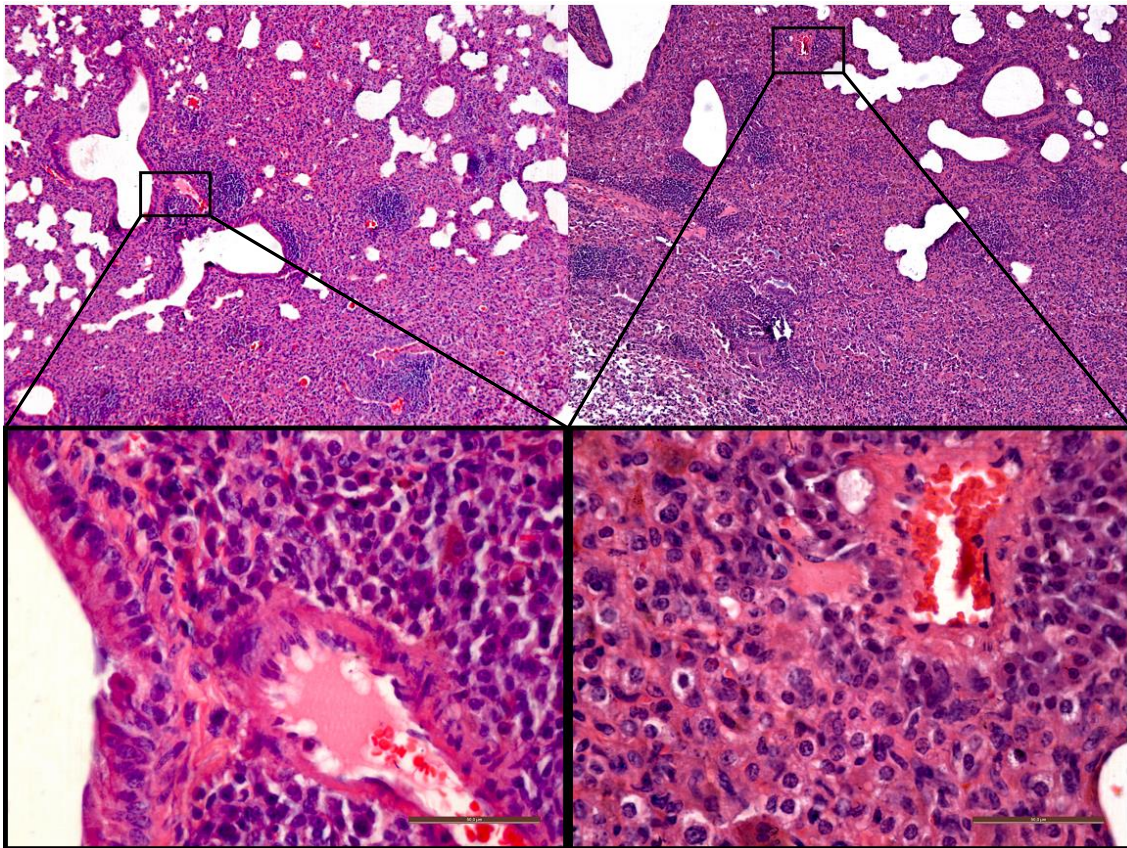


Figura 20. Fotografías de cortes histológicos de tejido pulmonar de sujetos experimentales teñidos con hematoxilina y eosina. La escala de las imágenes superiores se corresponde con 200 μm , la de las imágenes inferiores con 50 μm .

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Este estudio, es el primero en realizar en un modelo animal de la RSC-PN un seguimiento del desarrollo y la evolución de la enfermedad *in vivo* utilizando las técnicas de análisis de imágenes CT y PET. Los resultados obtenidos por la técnica CT para las muestras correspondientes tanto a cornetes como pulmón revelaron un aumento de la densidad del tejido de los sujetos sometidos al tratamiento de inducción con EBS y OVA respecto de los sujetos controles y un cambio de la morfología normal del tejido. Estos cambios existentes en los sujetos experimentales respecto de los controles son causados por un infiltrado de células inflamatorias en el tejido en pulmones y cornetes, así como por la formación de lesiones polipoides en el caso de los cornetes nasales debido al efecto del superantígeno EBS. Los resultados obtenidos mediante la técnica PET para las muestras de tejido pulmonar revelaron un aumento de la captación general del tejido de los sujetos experimentales respecto de los sujetos control, mientras que los resultados correspondientes a las muestras de cornetes nasales de los sujetos instilados con OVA y EBS mostraron la aparición de zonas hipercaptantes, así como un aumento de la captación general del tejido respecto de los sujetos control. El aumento de la captación es debido al infiltrado de células inflamatorias, caracterizadas por necesitar un alto aporte de glucosa, mientras que los puntos hipercaptantes se

corresponden con la existencia de estructuras polipoides. Los resultados del análisis histológico respaldaron la existencia de la inflamación, observándose una acusada eosinofilia y los pólipos nasales detectados por las técnicas de análisis de imágenes, pudiendo demostrar este estudio la validez de este tipo de técnicas en la detección de los procesos inflamatorios y las estructuras polipoides correspondientes al curso de la RSC-PN en ratones C57BL/6, pudiendo ser utilizada para el seguimiento y diagnóstico de la misma.

La técnica de análisis de imagen por CT ha sido utilizada de forma habitual en pacientes humanos de RSC-PN con el fin de corroborar los resultados de la endoscopia o comprobar la evolución de la enfermedad tras la administración de un tratamiento analizando mediante esta técnica su posible efectividad, pero no es utilizada como primera opción diagnóstica [1]. En modelos animales el empleo de esta técnica ha sido utilizado en estudios relacionados con la rinosinusitis aguda para realizar un seguimiento de la enfermedad [39], pero la aplicación de la técnica CT en modelos animales para estudiar patologías del sistema respiratorio se ha centrado principalmente en diagnóstico y la evolución del cáncer pulmonar [40, 41, 42]. Este estudio aporta la novedad de usar esta técnica en un modelo animal para diagnosticar y seguir la evolución de la rinosinusitis crónica asociada a poliposis nasal con el fin de evitar la necesidad de sacrificar a los sujetos.

La técnica de análisis de imágenes PET es utilizada principalmente en el seguimiento de la evolución de enfermedades oncológicas debido a su alta capacidad para detectar procesos neoplásicos [43], pero también se ha realizado diferentes estudios que apoyan su uso en el estudio de las emociones y detección de patologías emocionales [44]. El estudio oncológico, la detección de enfermedades neurodegenerativas y el estudio génico son las aplicaciones principales en los estudios que emplean la tecnología PET con modelos animales [43, 45, 46]. Este estudio es el primero en aplicar esta técnica, junto con la técnica de tomografía computarizada, en la zona de los cornetes nasales y en los pulmones sin fines oncológicos, basándose en su eficacia en la detección de procesos neoplásicos para detectar la formación de estructuras polipoides y los procesos inflamatorios propios de la RSC-PN.

El análisis histológico es una técnica de diagnóstico ampliamente empleada para la determinación de la enfermedad, siendo utilizada a partir de muestras de biopsias del tejido nasal en pacientes humanos como método de corroborar el diagnóstico de la RSC-PN por endoscopia en casos excepcionales [1], o como método único para la determinación de la poliposis en los modelos animales actuales de la enfermedad [37, 47]. Este trabajo no aporta ninguna novedad sustancial en el uso del análisis histológico para el diagnóstico de la RSC-PN, si no que se vale de esta técnica diagnóstica ya contrastada por multitud de publicaciones en esta enfermedad para corroborar la validez de los resultados obtenidos por las técnicas de análisis de imagen, permitiendo conocer si son una alternativa útil a las herramientas actuales.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de este estudio nos permiten afirmar que el análisis de las imágenes y de las cuantificaciones de las unidades HU y de captación de 18-FDG, obtenidas mediante las técnicas de tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones, es un método eficaz para el diagnóstico y seguimientos de la RSC-PN en modelos animales.

Las técnicas de análisis de imagen posibilitan el diagnóstico de la enfermedad en este tipo de modelos animales de una forma no invasiva y sin necesidad de sacrificar a los individuos. En este sentido, la posibilidad de realizar el diagnóstico *in vivo* de la RSC-PN es un requisito fundamental para la investigación de la enfermedad.

Los resultados aportados por este trabajo permiten el desarrollo de modelos animales con la finalidad de estudiar la progresión de la enfermedad en las diferentes etapas que cursa durante su avance o bien el desarrollo de nuevos posibles tratamientos efectivos para la misma que puedan ser aplicables al tratamiento de pacientes humanos, permitiendo presentar una alternativa terapéutica a los procesos quirúrgicos repetidos a los que deben someterse actualmente gran parte de ellos.

Por otra parte, este estudio también concluye que el protocolo de instilaciones para el desarrollo de la poliposis nasal en un modelo animal murino desarrollado por Dae Woo Kim *y col.* [37] y basado en las instilaciones con EBS como inductor principal de la enfermedad, es efectivo también sobre ratones del tipo C57BL/6 y alcanza su objetivo aun con concentraciones de OVA del 1%. La reducción de la cantidad de OVA del 3% al 1% permite la puesta en marcha de un protocolo de inducción de la enfermedad menos agresivo para el individuo, reduciendo el riesgo de muerte durante este procedimiento.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fokkens W, Lund V, Mullol J. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology*. 2007;Suppl 20:1-144.
2. Dykewicz MS. Rhinitis and sinusitis. *Journal Allergy Clinic Immunology*. 2003;111(2 Suppl):520-529.
3. Taylor M. Histochemical studies on nasal polypi. *The Journal of Laryngology & Otology*. 1963;77:326-341.
4. Hao J, Pang YT, Wang DY. Diffuse mucosal inflammation in nasal polyps and adjacent middle turbinate. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery*. 2006;134(2):267-275.
5. Conley DB, Tripathi A, Seiberling KA, Schleimer RP, Suh LA, Harris K, et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: skewing of T-cell receptor V beta-distributions in polyp-derived CD4+ and CD8+ T cells. *American Journal Rhinology*. 2006 Sep-Oct;20(5):534-539.
6. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. Th2 cytokines and asthma - The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respiratory Research*. 2001;2:71-79.
7. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge PL. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *Journal Allergy Clinic Immunology*. 2001;107(4):607-614.

8. Myginda N, Dahla R, Bachert C. Nasal polyposis, eosinophil dominated inflammation, and allergy. *Thorax*. 2000;55:79-83.
9. O'Brien GJ, Riddell G, Elborn JS, Ennis M, Skibinski G. Staphylococcus aureus enterotoxins induce IL-8 secretion by human nasal epithelial cells. *Respiratory Research*. 2006;7(1):115-115.
10. Watanabe K, Shirasaki H, Kanaizumi E, Himi T. Effects of glucocorticoids on infiltrating cells and epithelial cells of nasal polyps. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. 2004 Jun;113(6):465-473.
11. Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *Journal Immunology*. 1997 158 (8):3902-3908.
12. Claeys S, Be Belder T, Holtappels G, Gevaert P, Verhasselt B, Van Cauwenberge P, et al. Macrophage mannose receptor in chronic sinus disease. *Allergy*. 2004;59(6):606-612.
13. Kowalski ML, Lewandowska-Polak A, Wozniak J, Ptasinska A, Jankowski A, Wagrowska-Danilewicz M, et al. Association of stem cell factor expression in nasal polyp epithelial cells with aspirin sensitivity and asthma. *Allergy*. 2005;60(5):631-637.
14. Wittekindt C, Hess A, Bloch W, Sultanie S, Michel O. Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF receptors in nasal polyps as compared to normal turbinate mucosa. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2002;259(6):294-298.
15. Gosepath J, Brieger J, Lehr HA, Mann WJ. Expression, localization, and significance of vascular permeability/vascular endothelial growth factor in nasal polyps. *American Journal of Rhinology*. 2005;19(1):7-13.
16. Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melen I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skovde population-based study. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. 2003;112(7):625-629.
17. Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Serrano E, Chanal I, et al. Prevalence of nasal polyposis in France: A cross-sectional, case-control study. *Allergy*. 2005;(2):233-237.
18. Min YG, Jung HW, Kim HS, Park SK, Yoo KY. Prevalence and risk factors of chronic sinusitis in Korea: results of a nationwide survey. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 1996;253(7):435-439.
19. Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *International Journal of Epidemiology*. 1999;28(4):717-722.
20. English G. Nasal polyposis, in: *Otolaryngology*. Ed. Harper and Row. Philadelphia 1-30; 1985.
21. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge PI. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001;107(4):607-614.
22. Downing E, Braman S, Settiple GA. Bronchial reactivity in patients with nasal polyposis before and after polypectomy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1982;69(2):102.

23. Szczeklik A, Nizankowska, E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *European Respiratory Journal*. 2000;16(3):432-436.
24. Collins MM, Pang YT, Loughran S, Wilson JA. Environmental risk factors and gender in nasal polyposis. *Clinical Otolaryngology*. 2002;27(5):314-317.
25. Settipane GA, Chafee FH, Klein DE. Aspirin intolerance. II. A prospective study in an atopic and normal population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1974;53(4):200-204.
26. Ogino S, Harada T, Okawachi I, Irifune M, Matsunaga T, Nagano T. Aspirin-induced asthma and nasal polyps. *Acta Oto-laryngologica*. 1986;430:21-27.
27. Rugina M, Serrano E, Klossek JM, Crampette L, Stoll D, Bebear JP, et al. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. *Rhinology*. 2002;40(2):75-79.
28. Greisner WA, Settipane GA. Hereditary factor for nasal polyps. *Allergy and Asthma Proceedings*. 1996;17(5):283-286.
29. Lockey RF, Rucknagel DL, Vanselow NA. Familial occurrence of asthma, nasal polyps and aspirin intolerance. *Annals of Internal Medicine*. 1973;78(1):57-63.
30. Vento SI, Ertama LO, Hytonen ML, Wolff CH, Malmberg CH. Nasal polyposis: clinical course during 20 years. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2000;85(3):209-214.
31. Piccirillo JF, Merritt MG, Jr., Richards ML. Psychometric and clinimetric validity of the 20-Item Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-20). *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;126(1):41-47.
32. Lund VJ, Kennedy DW. Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 1995;Suppl, 167:17-21.
33. Kazkayasi M, Karadeniz Y, Arikan, OK. Anatomic variations of the sphenoid sinus on computed tomography. *Rhinology*. 2005;43(2):109-214.
34. Aukema AAC, Mulder PGH, Fokkens WJ. Treatment of nasal polyposis and chronic rhinosinusitis with fluticasone propionate nasal drops reduces need for sinus surgery. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*. 2005;115(5):1017-1023.
35. Bielory L, Blaiss M, Fineman SM, Ledford, DK, Lieberman P, Simons FE, et al. Concerns about intranasal corticosteroids for over-the-counter use: position statement of the Joint Task Force for the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96(4):514-525.
36. Cave A, Arlett P, Lee E. Inhaled and nasal corticosteroids: factors affecting the risks of systemic adverse effects. *Pharmacology & Therapeutics*. 1999;83(3):153-179.
37. Kim DW, Khalmuratova R, Hur DG, Jeon SY, Kim SW, Shin HW, Lee CH, Rhee CS. Staphylococcus aureus enterotoxin B contributes to induction of nasal polypoid lesions in an allergic rhinosinusitis murine model. *American Journal Rhinology & Allergy*. 2011;25:255-261.
38. Ramírez JC, Arboleda C, McCollough CH. Tomografía computarizada por rayos X: fundamentos y actualidad. *Ingeniería Biomédica*. 2008;2(4):54-72.
39. Kerschner JE, Cruz MJ, Beste DJ, Donahue KM, Kehl KS. Computed tomography vs. magnetic resonance imaging of acute bacterial sinusitis: A rabbit model. *American Journal of Otolaryngology*. 2000;21(5):298-305

40. Kennel SJ, Davis IA, Branning J, Pan H, Kabalka GW, Paulus MJ. High resolution computed tomography and MRI for monitoring lung tumor growth in mice undergoing radioimmunotherapy: Correlation with histology. *Medical Physics*. 2000;27(5):1101-1107.
41. Goldberg SN, Gazelle GS, Compton CC, Mueller PR, McLoud TC. Radio-frequency tissue ablation of VX2 tumor nodules in the rabbit lung. *Academic Radiology*. 1996;(11):929-935.
42. Wahl R L, Quint LE, Greenough RL, Meyer CR, White RI, Orringer MB. Staging of mediastinal non-small cell lung cancer with FDG PET, CT, and fusion images: preliminary prospective evaluation. *Radiology*. 1994;191(2):371-377.
43. Rigo P, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, Benoit T, Foidart-Willems J. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1996;(12):1641-1674.
44. Reiman EM. The application of positron emission tomography to the study of normal and pathologic emotions. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 1997;58 Suppl 16:4-12.
45. Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M, Suhara T. Longitudinal, Quantitative Assessment of Amyloid, Neuroinflammation, and Anti-Amyloid Treatment in a Living Mouse Model of Alzheimer's Disease Enabled by Positron Emission Tomography. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(41):10957-10968.
46. Haubner R, Wester HJ, Weber, WA, Mang C, Ziegler SI, Goodman SL, Senekowitsch-Schmidtke, R, Kessler, H, Schwaiger M. Noninvasive Imaging of $\alpha\beta 3$ Integrin Expression Using 18F-labeled RGD-containing Glycopeptide and Positron Emission Tomography. *Cancer Research*. 2001;61:1781-1785.
47. Shin HW, Cho K, Kim DW, Han DH, Khalmuratova R, Kim SW, Jeon SY, Min YG, Lee CH, Rhee CS, Park JW. Hypoxia-inducible Factor 1 Mediates Nasal Polypogenesis by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012;185(9):944-954.