



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**Variación de la flora bacteriana en pacientes con
EPOC agudizado y tras su posterior
estabilización: caracterización molecular
mediante metagenómica.**

TESIS DOCTORAL

Doctorando: Juan Carlos López Caro

Abril 2017



D. Miguel Santibáñez Margüello, Doctor en Medicina, Ayudante doctor en el Departamento de Enfermería (UC) y D. Antonio José Galiana Cabrera, Doctor en Investigación en Medicina Clínica, Investigador contratado de la Fundación para el fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO):

CERTIFICAN:

*Que el trabajo titulado, **Variación de la flora bacteriana en pacientes con EPOC agudizado y tras su posterior estabilización: caracterización molecular mediante metagenómica**, que presenta D. Juan Carlos López Caro para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne las características de originalidad y rigor científico requeridas.*

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Santander, a 3 de Abril de dos mil diecisiete.

D. Miguel Santibáñez Margüello

D. Antonio J. Galiana Cabrera



**DEPARTAMENTO DE ENFERMERIA
ESCUELA UNIVERSITARIA DE ENFERMERIA**

**Variación de la flora bacteriana en pacientes con EPOC
agudizado y tras su posterior estabilización:
caracterización molecular mediante metagenómica.**

Memoria presentada por

Juan Carlos López López Caro

para optar al grado de

Doctor en Ciencias de la Salud

Directores

Dr. Miguel Santibáñez Margüello

Dr. Antonio José Galiana Cabrera

Santander, Abril 2017

Agradecimientos

A lo largo de nuestra vida nos enfrentamos día a día a innumerables desafíos. Muchos de ellos los afrontamos solos, con nuestra incertidumbre, experiencias, fuerza de voluntad y saber hacer. Otros, los afrontamos con la ayuda y colaboración de familia, amigos, compañeros de trabajo, etc., también con cierta incertidumbre, pero con la tranquilidad de sentirnos acompañados durante dichos desafíos.

Esta tesis es uno de ellos. Hace dos años, cuando comencé a trabajar en su desarrollo y realización, parecía una obra inalcanzable y desmesurada que gracias a la ayuda y colaboración incondicional de muchos de vosotros ha sido posible finalizarla. Muchas gracias y un abrazo enorme para todos ellos.

En primer lugar, quisiera dejar constancia de mi más profundo agradecimiento al Dr. Miguel Santibáñez por su paciencia, disponibilidad y sabios consejos. Sin él, esta tesis no hubiese visto la luz, seguro. Da gusto poder contar con un excelente profesional, persona y amigo, con gran capacidad de trabajo y conocimiento del que he aprendido muchísimo y estoy seguro, seguiré aprendiendo. Muchísimas gracias, Miguel.

Mi gratitud y reconocimiento también para el Dr. Antonio José Galiana por aceptar codirigir esta tesis doctoral. Su capacidad y experiencia en el área de la microbiología así como en el terreno de la investigación, ha supuesto completar el puzzle necesario para la finalización de esta tesis. Mil gracias y un fuerte abrazo, Antonio.

A mis compañeros médicos que han colaborado en la recogida de las muestras y de los datos clínicos de los pacientes, especialmente a los de Cantabria

(Juan Luis, Nica, Jesús, Pablo, Margarita, Mariano y Ricardo), al grupo de Burgos (Lourdes, M^a Carmen, Nuria, Raquel, Sonia y Belén) y al asturiano Manuel Villanueva. Un pedacito de esta tesis es también vuestra. Muchas gracias y un abrazo sincero para todos.

No quisiera dejar de mencionar al Dr. Juan Luis García Rivero, presidente de “Acinar”, neumólogo, compañero y amigo. Agradecerle su entusiasmo, energía y amistad, valores esenciales para que naciera Acinar y por lo tanto, esta tesis. Muchísimas gracias, amigo.

Dentro del grupo de Cantabria, mencionar a los miembros de “Acinar” que también mostraron su interés por participar en este proyecto y no pudieron incluir pacientes. Gracias.

A mis compañeros del centro de salud Cotolino Sur (II), por aguantar todas las dificultades de recogida de muestras y del dichoso congelador que todavía sigue en el almacén y no sabemos que hacer con él. Desde los auxiliares, celadores, administrativos, fisioterapeutas, t. social, matrona, hasta las enfermeras y médicos de familia. Muchas gracias a todos.

A todos los compañeros de la Gerencia de Atención Primaria del Servicio Cántabro de Salud y de la Consejería de Sanidad por su colaboración y facilidades para el buen desarrollo de este trabajo, muchas gracias.

A todos vosotros, mi más profundo y sincero agradecimiento.

Con todo mi afecto, para toda mi familia.

A mi padre, ya fallecido, y a mi madre, por inculcarme los valores imprescindibles para el desarrollo profesional como el esfuerzo, el trabajo y la superación, así como para el desarrollo personal. A mis hermanos, cuñados suegros y sobrinos, por estar siempre ahí. La familia es lo más importante.

Pero sobretodo y especialmente a mi mujer Sonia y a mi hija Carla, porque son las personas que realmente me soportan y me han sufrido durante este periodo largo e intenso de trabajo y dedicación que no he podido compartir con ellas. Espero poder compensároslo algún día.

A todos vosotros, muchísimas gracias, de corazón.

“Todo parece imposible hasta que se hace”

(Nelson Mandela)

ÍNDICE GENERAL

INDICE	Pág
ABREVIATURAS	21
RESUMEN	25
SUMMARY	29
I. INTRODUCCION.	33
I.1. Importancia	35
I.2. Concepto	36
I.3. Epidemiología.	38
I.3.1. Prevalencia.	38
I.3.2. Mortalidad	40
I.3.3. Impacto económico	41
I.4. Diagnóstico.	42
I.5. Fisiopatología.	48
I.5.1. Etiopatogenia	48
I.5.2. Colonización vs infección bronquial crónica (IBC).	52
I.5.3. Papel del sistema inmunológico de la mucosa bronquial.	58
I.6. Agudizaciones en la EPOC	60
I.6.1. Definición de agudización en la EPOC. etiología	60
I.6.2. Fenotipo agudizador y factores predictores del riesgo de agudizaciones futuras.	63
I.7. Tratamiento y vacunas en la EPOC.	65
I.8. Metagenómica y microbioma humano.	67
I.8.1. Estudio de metagenomas.	68
I.8.2. Estudio de comunidades microbianas.	73
I.8.3. Tecnologías de secuenciación masiva.	76
I.8.4. Microbioma y microbiota. Diferencias.	78
I.8.5. Microbiota en la EPOC y justificación.	79
II. HIPÓTESIS.	85
III. OBJETIVOS.	89
III.1. Objetivo general.	91
III.2. Objetivos específicos.	91
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	93
IV.1. Diseño.	95
IV.2. Población a estudio.	95

INDICE (continuación)	Pág
IV.3. Recogida y análisis de los datos.	96
IV.4. Protocolo de trabajo	97
IV.4.1. Obtención de muestras y procesamiento de muestras	97
IV.4.2. Extracción de ácidos nucleicos (Hospital de Alicante)	97
IV.4.3. Secuenciación del microbioma bacteriano representado en muestra de esputo de pacientes con EPOC	97
IV.4.4. Análisis ecológico de las comunidades microbianas identificadas en esputo	100
IV.4.5. Detección de virus respiratorios	101
IV.4.6. Identificación molecular de Haemophilus NTHi	101
IV.5. Variables.	101
IV.6. Estrategia de análisis de resultados	104
IV.7. Consideraciones éticas	106
V. RESULTADOS	107
V.1. Características de los pacientes EPOC (al menos un esputo de calidad analizado)	109
V.1.1. Edad, hábito tabáquico y peso IMC de los pacientes a estudio	109
V.1.2. Variables clínicas	111
V.1.3. Comorbilidades	113
V.1.4. Tratamientos	114
V.2. Análisis Bioinformático de la microbiota de la mucosa respiratoria	115
V.2.1. Características en cuanto a la calidad de las muestras empleadas para el estudio de microbiota	115
V.2.2. Análisis de la microbiota según la categoría clínica de “Estable” y “Agudizado”	118
V.2.3. Primera estrategia de análisis. Estrategia de análisis de resultados en microbioma predefinida	124
V.2.3.1. Análisis de la microbiota según deterioro funcional en base al FEV1 (grados GOLD de gravedad)	124
V.2.3.2. Análisis de la microbiota atendiendo al resto de variables epidemiológicas: sexo, edad, IMC, tabaquismo, sintomatología (mMRC, CAT) y riesgo de desarrollar exacerbaciones (fenotipo agudizador)	127
V.2.4. Segunda estrategia de análisis. Identificación de los clusters que tuvieron un microbioma de similar composición a través del Análisis de Componentes Principales	129
V.2.5. Estudio de la etiología vírica de las agudizaciones de los pacientes con EPOC del Cluster 4	134
V.2.6. Estudio de factores asociados a las agudizaciones en los pacientes con EPOC del Cluster 4 clasificadas como No ineciosas	1139
VI. DISCUSIÓN	143
VI.1. Discusión	145
VI.2. Limitaciones	154

INDICE (continuación)	Pág
VII. CONCLUSIONES	157
VIII. BIBLIOGRAFÍA	161
IX. ANEXOS	195

ÍNDICE DE TABLAS y FIGURAS

INDICE DE TABLAS	Pág
Tabla 1. Edad, hábito tabáquico y peso-IMC de los pacientes, en función del sexo.	111
Tabla 2. Características clínicas de los pacientes EPOC, en función del sexo.	112
Tabla 3. Comorbilidades de los pacientes EPOC, en función del sexo.	114
Tabla 4. Tratamientos de los pacientes EPOC, en función del sexo.	115
Tabla 5. Datos bioinformáticos de las muestras incluidas en el estudio.	117
Tabla 6. OTU's, Abundancia Relativa (AR), índice de Shannon-Wiener (H'), índice de riqueza (Chao1) y su comparación entre las categorías clínicas "Estable" y "Agudizado".	121
Tabla 7. Diferencias en la AR del género <i>Haemophilus</i> entre la categoría "Estable" y "Agudizado".	121
Tabla 8. OTU's, Abundancia Relativa (AR), índice de Shannon-Wiener (H'), índice de riqueza (Chao1) y su comparación entre las categorías clínicas "GOLD 1-2" y "GOLD 3-4" en categoría clínica "Agudizado".	126
Tabla 9. Distribución de las muestras en función de su pertenencia a la categoría clínica "Estable" o "Agudizado" y cada uno de los Clusters identificados en el Análisis de Componentes Principales.	128
Tabla 10. OTU's, Abundancia Relativa (AR), índice de Shannon-Wiener (H'), índice de riqueza (Chao1) y su comparación entre los distintos Clusters identificados.	131
Tabla 11. Comparación de los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1) entre los distintos Clúster identificados.	132
Tabla 12. Diferencias en la AR del género <i>Haemophilus</i> entre el Cluster 1 (C1) y el Cluster 4 (C4).	133
Tabla 13. Descriptivo de los microorganismos considerados con implicación directa en el proceso de agudización con cada una de las muestras de los Clusters 1, 2 y 3.	133
Tabla 14. Causas de la agudización y Cluster al que pertenece en el total de las muestras en Agudización (60 pacientes).	135
Tabla 15. Abundancias relativas (AR) de los géneros bacterianos (OTU) por encima de un valor de 0 y los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1), atendiendo a la categoría clínica "Estable" o "Agudizado" de las muestras del Cluster 4, y a la identificación de virus en las mismas.	138

Tabla 16. Comparación de la AR del género <i>Veillonella</i> entre muestras del Cluster 4 (C4) agudizadas por infección vírica, y el resto de muestras del mismo clúster.	139
Tabla 17. Tipo de agudización, en función de la disponibilidad de información clínica sobre el diagnóstico concomitante de Asma y EPOC.	141

INDICE DE FIGURAS	Pág
Figura 1. Espirometria en paciente normal (izqda.) o con enfermedad obstructiva (Dcha.). Modificado de GOLD report 2013.	43
Figura 2. Clasificación en fenotipos del paciente EPOC. Guía GesEPOC 2012.	44
Figura 3. Clasificación de la gravedad de la obstrucción en función del FEV1 post-broncodilatador en pacientes EPOC. (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2017 Report).	45
Figura 4. Clasificación GOLD. Modificado de GOLD (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2017 Report).	46
Figura 5. Escala de disnea modificada del MRC (mMRC).	46
Figura 6. Cuestionario de calidad de vida CAT (COPD Assessment test).	47
Figura 7. Índice BODE e Índice BODEx.	48
Figura. 8. Mecanismos de defensa de la respuesta inmune.	50
Figura 9. Células inflamatorias y sus principales mediadores químicos en la EPOC. La respuesta inflamatoria característica de la EPOC engloba células de la inmunidad innata y de la adquirida.	52
Figura 10. Impacto de la infección en la patogénesis de la EPOC en fase estable y durante las agudizaciones.	57
Figura 11. Círculo vicioso de la infección bronquial.	58
Figura 12. Formación de la Ig A secretora (sIgA) en la mucosa.	60
Figura 13. Agudización, fracaso terapéutico, recaída y recurrencia. Guía GesEPOC 2012.	62
Figura 14. Taxonomía y nomenclatura bacteriana.	70
Figura 15. Regiones conservadas e hipervariables (V1-V9) del gen 16S ARNr.	71
Figura 16. Método de secuenciación de Sanger (1977).	72
Figura 17. Método de secuenciación masiva de nueva generación 454 (Roche).	76
Figura 18. Método de secuenciación masiva de nueva generación Solexa (Illumina).	77
Figura 19. Detalle de la amplificación en puente en la superficie de cristal y creación de las agrupaciones de ADN. Método de secuenciación masiva Solexa (Illumina).	98
Figura 20. Secuenciación masiva Solexa (Illumina). Se añaden los cuatro nucleótidos con los extremos 3' bloqueados y unidos a un marcador fluorescente, que compiten entre sí para unirse complementariamente a la secuencia.	99
Figura 21. Histograma de frecuencia del tamaño del amplicón empleado para la clasificación taxonómica.	116
Figura 22 Curvas de rarefacción para las categorías clínicas "Estable" y "Agudizado".	117

Figura 23. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, para las categorías clínicas “Estable” y “Agudizado.”	119
Figura 24. Composición de la microbiota de las muestras pertenecientes a la categoría clínica “Estable”.	122
Figura 25. Composición de la microbiota de las muestras pertenecientes a la categoría clínica “Agudizada”.	124
Figura 26. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, para los “grados GOLD 1-2” y “grados GOLD 3-4” en la categoría clínica “Agudizado”.	125
Figura 27. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, atendiendo a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” y a la pertenencia de cada una de las 4 microbiotas distintas identificadas (Clusters).	129
Figura 28. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, atendiendo a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” de las muestras del Cluster 4, y a la identificación de virus en las mismas.	137
Figura 29. Análisis de Componentes Principales donde aparecen marcadas en blanco las muestras agudizadas del cluster 4 de pacientes asmáticos (N=6), junto con el total de muestras de la categoría clínica “Estable” (N=58), todas ellas pertenecientes también al cluster (C4).	141

ABREVIATURAS

ACOS. Asthma copd overlap syndrome

ACP: análisis de componentes principales.

AEPOC: agudización de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

AR: abundancia relativa.

BAL: lavado bronco-alveolar.

BDLD: broncodilatadores de larga duración.

BODE: body obstruction dyspnea exercise index.

BODEx: body obstruction dyspnea exacerbation index.

CAT: COPD assessment test.

CI: corticoides inhalados.

COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

CVF: capacidad vital forzada.

CVRS: calidad de vida relacionada con la salud.

CXCL 1: ligando quimioquina CXC 1.

CXCL 8: ligando quimioquina CXC 8.

DALY: disability-adjusted lost years.

DE: desviación estándar.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EPI-SCAN: epidemiology study of COPD in Spain.

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

ERGE: enfermedad por reflujo gastro-esofágico.

FA: fenotipo agudizador.

FEV1: volumen espiratorio forzado en 1 segundo.

FNA: fenotipo no agudizador.

GBD: global burden of diseases.

GesEPOC: guía española de la EPOC.

GINA: global initiative for asthma.

GOLD: global initiative of obstruction lung disease. (International Science Committee of COPD).

HNE: elastasa de neutrófilos humana

HTA: hipertensión arterial.

IBC: infección bronquial crónica.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.

IF- γ : interferón gamma.

IgA: inmunoglobulina A.

IL-1: interleukina 1.

IL-10: interleukina 10.

IL-17: interleukina 17.

IL-6: interleukina 6.

IL-8: interleukina 8.

IMC: índice de masa corporal.

LABA: betaadrenérgicos de acción larga.

LAMA: anticolinérgicos de acción larga.

LTB4: leucotrieno B4

m: metro.

ml: mililitro.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1;

MEC: matriz extra-celular.

MMP: metaloproteinasas de matriz.

mMRC: modified medical research council.

MPC-1: mitochondrial pyruvate carrier 1.

MPPs: microorganismos potencialmente patógenos.

nMPPs: microorganismos no reconocidos potencialmente patógenos.

NTHi: Haemophilus Influenzae No Tipable.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORa: odds ratio ajustada.

ORc: odds ratio cruda.

OTU: operational taxonomic unit.

PAF: factor activador de plaquetas.

PB: postbroncodilatación.

PCR: polymerase chain reaction.

PCoA: análisis de coordenadas principales.

PG-D2: prostaglandina D2.

qPCR: quantitative polymerase chain reaction. (PCR cuantitativa).

RNA: ácido ribonucleico.

RNAr: ácido ribonucleico ribosómico.

SABA: betaadrenérgicos de acción corta.

SAMA: anticolinérgicos de acción corta.

SC: componente secretor.

SEMERGEN: Sociedad Española de Medicina Rural y Generalista.

SEMFYC: Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria.

SEPAR: Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio.

slgA: Inmunoglobulina A secretora.

SNS: sistema nacional de salud.

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TNF- β : factor de necrosis tumoral beta.

UFC: unidades formadoras de colonias.

WHO: world health organization.

YLD: years lived with disease.

RESUMEN

ANTECEDENTES

A pesar de la importancia de las agudizaciones en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), sabemos relativamente poco de su microbiota caracterizada mediante metagenómica.

OBJETIVO

Caracterizar la microbiota de la vía respiratoria baja de pacientes con EPOC en estado clínico estable vs agudizado.

MATERIAL Y METODOS

Se estudió la microbiota respiratoria de 60 pacientes con EPOC. A cada paciente se le tomó una muestra de esputo en estado estable de la enfermedad y otra en estado agudizado.

Tras la extracción del DNA a partir de las muestras de esputo se realizó la síntesis de las librerías de amplicones del gen 16s ribosomal utilizando oligonucleótidos universales. La región amplificada fue la comprendida entre la posición 27 y la 533 del gen 16s rRNA bacteriano empleando la tecnología Illumina miseq. Después del ensamblado y filtrado por calidad de las secuencias obtenidas solo se emplearon para el estudio secuencias de un tamaño mínimo de 400 bp.

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se hizo con el programa qiime v1.8.0, con el cual se realizaron las anotaciones taxonómicas de las lecturas y sus asignaciones a cada paciente desde Fíllum hasta Género, empleando para ello la última versión disponible de la base de datos "Ribosomal Database Project".

Se realizaron histogramas de composición taxonómica, y análisis de alfa y beta diversidad determinando los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y

riqueza de especies (Chao1) para cada muestra y para las agrupaciones de muestras (cluster) con una microbiota similar identificados a través de un Análisis de Componentes Principales.

Por último, se realizó una qPCR en las muestras de esputo del grupo “agudizado” para la identificación de los virus respiratorios Influenza A y B, Metapneumovirus, Rhinovirus, Enterovirus, Parainfluenza A y Virus Respiratorio Sincitial.

RESULTADOS

De las 120 muestras de esputo pertenecientes a los 60 pacientes incluidos en el estudio, finalmente se obtuvieron un total de 118 muestras de esputo con calidad suficiente para poder ser sometidas a los análisis bioinformáticos pertinentes: 60 procedentes de la categoría clínica “agudizado” y 58 obtenidas tras la posterior estabilización.

La microbiota fue menos diversa en las muestras de los pacientes en agudización.

La abundancia relativa (AR) del genero *Haemophilus* pasó de un 6º lugar en estable (AR=3,75%) a un primer lugar en agudizado (AR=17%), siendo la diferencia en las abundancias relativas estadísticamente significativa ($p=0.014$).

El Análisis de Componentes Principales reveló que las 118 muestras se distribuyeron agrupándose en 4 clusters diferenciados a nivel de microbiota (Clusters 1-4).

La microbiota del Cluster 1 (n=7/60 muestras de la categoría clínica “agudizado”) estuvo compuesta mayoritariamente por *Haemophilus* (73,6% abundancia relativa), principalmente *Haemophilus* del tipo “No Tipable” (NTHi), presentando la disbiosis más alta desplazando al resto de especies bacterianas $H'=1,57$; Chao1=6,61.

La del Cluster 2 (n=12/60 “agudizado”) estuvo compuesta por Haemophilus (AR=35,5%), Streptococcus spp. (AR=18,2%) y 30 géneros más (AR=46,3%). El Haemophilus más prevalente fue el no encapsulado, siendo la disbiosis menor, desplazando en menor medida al resto de especies: $H'=2,31$; $Chao1=14,67$.

La microbiota del Cluster 3 (n=3/60 “agudizado”) estuvo compuesta por Pseudomonas (46,2%), Enterobacteriaceae (Serratia) (16,1%), Streptococcus spp (9,1%) y 13 géneros más (28,6%).

En el Cluster 4 se encontraron todas las muestras de la categoría “estable” (n=58/58) como el resto de la categoría “agudizado” (n=38/60). La microbiota del cuarto cluster de pacientes agudizados fue la que más diversidad manifestó, siendo similar a la microbiota en fase estable de todos los pacientes. En global, la microbiota del cluster 4 estuvo formada por Streptococcus (32,8%), Prevotella (9,1%), Veillonella (5,8%) y 42 géneros más (52,3%) con un índice $H'=2,73$ y un índice $Chao1=20,53$.

En 10 de las 38 muestras agudizadas de este Cluster 4 se encontró al menos un virus respiratorio. Los virus encontrados en este Cluster 4 fueron en orden de frecuencia: Rhinovirus (n=4), Influenza A (n=3), Metapneumovirus (n=2) y Coronavirus OC43 (n=1). En las 28 muestras agudizadas restantes no se determinó una causa infecciosa de las agudizaciones. En pacientes asmáticos la presencia de agudizaciones de causa no infecciosa fue superior, si bien las diferencias no alcanzaron significación estadística.

Los agentes bacterianos causantes de las agudizaciones fueron los mismos en grados GOLD 1-2 versus 3-4. Fueron asimismo similares en los pacientes con más o menos sintomatología en base a escala mMRC y Cuestionario CAT, y en pacientes con un historial de al menos dos agudizaciones el año previo frente a los que sufrieron una o ninguna el año previo.

CONCLUSIONES

A través del Análisis de Componentes Principales, se han identificado 4 microbiotas distintas en esputos de pacientes con EPOC en estado estable y agudizado. Las microbiotas 1, 2 y 3 son específicas de pacientes agudizados siendo la causa de la agudización bacteriana, mientras que la microbiota 4 es compartida por los pacientes en estado estable y los pacientes en estado agudizado (38/60).

El género *Haemophilus* pasó de un 6º lugar en muestras estables a un primer lugar en agudizadas, siendo la diferencia en las abundancias relativas estadísticamente significativa. El microbioma con mayor abundancia relativa de *Haemophilus* del tipo “No Tipable” (NTHi) agrupado en el Cluster 1, presentó la disbiosis más alta desplazando al resto de especies bacterianas.

En 10 de los 38 pacientes agudizados con microbiota 4 se pudo atribuir a una agudización de origen vírica y en el resto (28/38) la agudización probablemente se debió a una etiología no infecciosa. La agudización vírica, no modificó la microbiota, siendo similar a la microbiota de las agudizaciones de etiología no infecciosa y a la de las muestras en fase estable, más allá de un aumento de la abundancia relativa de microorganismos consumidores de lactato.

SUMMARY

BACKGROUND

Despite the importance of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), we know relatively little about their microbiota characterized by metagenomic.

OBJECTIVE

To characterize the microbiota of the low respiratory tract of COPD patients during exacerbation and posterior stabilization.

METHODS

Samples and patients employed: The respiratory microbiota of 60 patients with COPD was studied. A sample of good quality expectorated sputum during exacerbation and posterior stabilization was obtained from each patient. After DNA extraction, 16S rRNA gene libraries were synthesized using universal primers. A region between position 27 and 533 of the 16S rRNA gene was amplified and then sequenced by NGS illumina miseq. Only sequences of a minimum size of 400 bp were used for the study.

Bioinformatics analysis of the obtained sequences was performed by using QIIME v18.0, with which they were made the taxonomic groupings and their assignments to each patient from Fillum to Gender, using the latest available version of the database "Ribosomal Database Project".

Histograms of taxonomic composition and alpha and beta diversity analyzes were performed, determining the Shannon-Wiener (H') and species richness indexes (Chao1) for each sample and for clusters of samples with a similar identified microbiota through a Principal Components Analysis.

A qPCR was lastly performed on sputum samples from the "acute" group for the detection of respiratory viruses as Influenza A and B, Metapneumovirus, Rhinovirus, Enterovirus, Parainfluenza A and Respiratory Syncytial Virus.

RESULTS

Of the 120 sputum samples belonging to the 60 patients included in the study, a total of 118 sputum samples of sufficient quality were finally included for bioinformatics analysis: 60 from the "exacerbated" clinical category and 58 obtained after posterior stabilization.

The microbiota was less diverse in the samples of patients in exacerbation.

The relative abundance (RA) of the genus *Haemophilus* went from a 6th place in stable (RA=3.75%) to a first place (RA=17%) in exacerbated sputum samples, with the difference in relative abundances being statistically significant ($p=0.014$).

Principal component analysis revealed that all 118 samples were grouped into four clusters differentiated at the microbiota level.

The cluster 1 microbiota ($n=7/60$ sputum from exacerbation) was mostly composed of *Haemophilus* (73.6% relative abundance), mainly of the "No Tipable *Haemophilus influenzae* (NTHi)", presenting the highest dysbiosis and displacing the rest of bacterial species $H' \text{ index} = 1.57$; Chao1 index = 6.61.

Cluster 2 ($n=12/60$ "exacerbated") was composed of *Haemophilus* (35.5%), *Streptococcus* spp. (18.2%) and other 30 genus (46.3%). The most prevalent *Haemophilus* was the non-encapsulated, being the dysbiosis smaller and displacing to a lesser extent the rest of species: $H' = 2.31$; Chao1 = 14.67.

Cluster 3 ($n=3/60$ "exacerbated") comprised *Pseudomonas* (46.2%), *Serratia* (16.1%), *Streptococcus* spp. (9.1%) and other 13 genus (28.6%).

In cluster 4, both the "stable" $n=(58/58)$ and the rest of the "exacerbated" sputum samples ($n=38/60$) were found. Microbiota of this cluster consisted of *Streptococcus* spp. (32.8%), *Prevotella* (9.1%), *Veillonella* (5.8%) and other 42 genus (52.3%) with an index $H' = 2.73$ and a Chao1 index = 20.53.

In 10 of the 38 exacerbated samples of this Cluster 4 at least one respiratory virus was found. The viruses found in this Cluster 4 were in order of frequency: Rhinovirus (n = 4), Influenza A (n = 3), Metapneumovirus (n = 2) and Coronavirus OC43 (n = 1). In the remaining 28 exacerbated samples, no infectious cause of exacerbations was determined. In asthmatic patients, the presence of non-infectious cause exacerbations was higher, although the differences did not reach statistical significance.

The bacterial agents causing the exacerbations were the same in GOLD grade 1-2 versus 3-4. They were also similar in patients with more or less symptomatology based on mMRC scale and CAT Questionnaire, and in patients with a history of at least two exacerbations the previous year compared to those who suffered one or none exacerbation the previous year.

CONCLUSIONS

Through the Principal Components Analysis, 4 different microbiotas have been identified in sputum from patients with COPD. The bacterial microbiotas 1, 2 and 3 are specific for exacerbated patients and bacterial seems to be the cause of the exacerbation. The role of bacterial microbiota of cluster 4 on exacerbations is less clear because microbiota from exacerbated samples is the same as the microbiota of all stable patients.

The genus *Haemophilus* went from a 6th place in stable samples to a first place in exacerbated sputum samples, being the difference in relative abundances statistically significant. The microbioma with the highest relative abundance of "No Tipable *Haemophilus influenzae* (NTHi)" grouped in Cluster 1, presented the highest dysbiosis displacing the rest of bacterial species.

In 10 out of 38 exacerbated patients with microbiota 4, exacerbation seems to be of viral origin and in the rest (28/38) the exacerbation was probably due to a non-infectious etiology. The viral exacerbation did not modify the microbiota, being similar to the microbiota of exacerbations of non-infectious etiology and that of the stable samples, beyond an increase of the relative abundance of microorganisms consuming lactate.

I Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Importancia.

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una causa importante de morbilidad a nivel mundial. Hemos aprendido mucho acerca de la EPOC desde que la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica publicó su primer informe, (Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD / Estrategia Global para el Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la EPOC), en 2001.

El tratamiento actual de la EPOC se centra tanto en el alivio inmediato y la reducción del impacto de los síntomas, como en disminuir el riesgo de eventos adversos como son las exacerbaciones o agudizaciones. Conseguir este doble objetivo obliga a que los médicos se concentren en las repercusiones de la EPOC en sus pacientes tanto a corto como a largo plazo. Así, una estrategia de manejo de la EPOC que combine la evaluación individualizada de la enfermedad con dichos objetivos terapéuticos podrá satisfacer mejor las necesidades de cada paciente (Global Strategy GOLD 2011).

Las enfermedades respiratorias crónicas se sitúan en el cuarto lugar de las enfermedades de larga duración diagnosticadas en adultos (Encuesta Europea de Salud 2009), por detrás del dolor lumbar, los trastornos psíquicos y la cefalea (Raheison & Girodet, 2009).

En España, la EPOC representa la cuarta causa de mortalidad, con una tasa global de 33 por 100.000 habitantes, que asciende a 176 por 100.000 habitantes en mayores de 75 años, además, es la responsable del 35% de las consultas externas en Neumología y supone unas 39.000 hospitalizaciones al año. Junto con los trastornos cerebrovasculares, es el proceso no quirúrgico cuya atención hospitalaria genera mayor coste.

Globalmente, los gastos derivados de la EPOC equivalen al 0,2% del producto interior bruto (PIB) y una parte significativa de este gasto es ocasionada por la gran cantidad de tratamientos antibióticos que reciben estos pacientes sobre todo en las agudizaciones de dicha enfermedad (Barberá, 2001). Las agudizaciones producen un deterioro acelerado de la función pulmonar y empeoramiento en la calidad de vida de los pacientes, con un aumento de la mortalidad (Seemungal, et al. 2000; Soler-Cataluña, et al. 2005).

Debido a su alta prevalencia, elevada morbimortalidad y significativos costes socioeconómicos, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) constituye un problema de salud pública de enorme y creciente importancia, siendo el proceso respiratorio crónico que origina una mayor alteración de la calidad de vida de los pacientes (Sobradillo-Peña et al. 2000; Miravittles et al. 2009a; Agustí & Vetsbo, 2011; Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013).

El conocimiento de la verdadera flora respiratoria presente en cada tipo de paciente (diferentes tipos de gravedad y situación de agudización o no), permitirá diseñar mejores protocolos de terapia empírica y ajustar mejor los tratamientos de los pacientes a la realidad, aumentando su eficacia y por lo tanto, disminuyendo su alto coste.

I.2. Concepto.

La EPOC se define como una enfermedad respiratoria frecuente, compleja, heterogénea, multicomponente, caracterizada esencialmente por una limitación persistente y crónica al flujo aéreo que no es totalmente reversible pero si prevenible y tratable. La limitación al flujo aéreo es progresiva y se asocia con una anormal respuesta inflamatoria de los pulmones a partículas nocivas o gases, causada principalmente por el humo del tabaco, aunque aproximadamente en un 20-25% de los casos no existe antecedente tabáquico (Calle et al. 2010; Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013).

Otras partículas vehiculizadas en el humo, como la biomasa, parecen tener implicaciones similares, sobre todo en zonas rurales y menos desarrolladas (Salvi & Barnes, 2009; Po et al. 2011).

Otros factores identificados causantes o agravantes de la EPOC son: la contaminación atmosférica, exposición ocupacional, tabaquismo pasivo, tuberculosis pulmonar, factores genéticos y gestacionales, infecciones respiratorias durante la infancia, hiperreactividad bronquial, y factores socioeconómicos (Vestbo et al. 2013; Grupo Semergen DOC, 2013).

El factor de riesgo genético mejor documentado es una severa deficiencia hereditaria de alfa-1 antitripsina, responsable del 1% de los casos de EPOC y del 2-4% de los enfisema, proporcionando un modelo de cómo se cree que otros factores de riesgo genético contribuyen a la EPOC (Global Strategy GOLD 2011).

El humo del tabaco produce cambios inflamatorios pulmonares en todos los fumadores, aunque sólo una parte (25-30%) desarrollará la enfermedad (Lokke et al. 2006; Grupo SEPAR-SEMFYC, 2010). La intensidad y el tiempo de exposición al tabaco influyen en ese desarrollo (Miravittles et al. 2009a).

El deterioro de la función pulmonar esta acelerado en los fumadores activos, pero ralentiza su progresión cuando dejan de fumar, aunque ésta no se recupera, sobre todo antes de los 40 años (Fletcher & Peto, 1977; Kohansal et al. 2009).

Los síntomas que más frecuentemente aparecen asociados a la enfermedad son la disnea, la tos y la expectoración en mayor o menor medida.

La disnea, (dificultad para respirar), es una de las causas más importantes de incapacidad y ansiedad asociadas con la enfermedad. La tos crónica es el primer síntoma que aparece habitualmente, intermitente al inicio, para manifestarse después a lo largo de cada día, siendo a menudo productiva. La producción regular de esputo durante tres meses o más en dos años consecutivos es la definición epidemiológica de bronquitis crónica. Los pacientes que producen grandes cantidades de esputo pueden padecer de bronquiectasias subyacentes. Además, la presencia de un esputo purulento

indica el aumento de la inflamación que identifica el comienzo de una exacerbación o agudización de causa bacteriana. La tos crónica o la producción de esputo pueden aparecer años antes que la limitación del flujo aéreo, y a la inversa, la limitación del flujo aéreo puede aparecer sin tos crónica o producción de esputo (Clinical GesEPOC 2012; Global strategy GOLD 2011).

Su presentación clínica es muy heterogénea y se pueden definir diversas formas clínicas o fenotipos con repercusión clínica, pronóstica y terapéutica (Miravittles, 2012).

La presencia de comorbilidades y agudizaciones son características y contribuyen al aumento de la gravedad y al empeoramiento de la calidad de vida en algunos pacientes (Celli & MacNee, 2004; Peces-Barba et al. 2008; Clinical GesEPOC, 2012).

La EPOC también tiene repercusión sistémica. Está demostrada la concentración más alta de biomarcadores inflamatorios en estos pacientes, sobre todo en los que sufren frecuentes agudizaciones de la enfermedad (Pinto-Plata et al. 2007; Barnes & Celli, 2009; Miravittles et al. 2014). Esta actividad pro-inflamatoria, junto al envejecimiento, sedentarismo y el efecto sistémico del tabaquismo, son consideradas así mismo como favorecedoras de las comorbilidades (Gan et al. 2004; Agustí, 2007; De Miguel et al. 2010).

I.3. Epidemiología.

I.3.1. Prevalencia.

La reciente publicación del estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la Carga Mundial de Enfermedades (Global Burden of Disease Study-GBD-) en 2010, actualiza las estimaciones mundiales anteriores en EPOC y otras enfermedades respiratorias y da algunas nuevas estimaciones sobre el asma, los trastornos relacionados con el sueño, las infecciones de las vías respiratorias inferiores, el cáncer de pulmón y la tuberculosis (Vos et al.

2012). En general, las enfermedades respiratorias crónicas representaron el 6,3% de los YLD (años vividos con enfermedad, o years lived with disease) mundiales, y su mayor contribuyente es la EPOC con 29,4 millones de YLD, seguida por el asma con 13,8 millones de YLD. Además, las enfermedades respiratorias crónicas como grupo, representaron el 4,7% de los DALY (años de vida perdidos ajustados por discapacidad / disability-adjusted lost years) global (Murray et al. 2012).

Las nuevas informaciones de mortalidad y prevalencia de EPOC en el mundo, se presentan en el ranking mundial de causas de muerte, donde las enfermedades respiratorias representan 4 (o 5) puestos dentro de los 10 primeros. La EPOC subió del cuarto puesto en 1990 al tercero en 2010, justo por detrás de la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular, mientras que las traqueobronquitis son ahora ya la cuarta causa de muerte, el cáncer de pulmón la quinta y la tuberculosis la décima. También podríamos incluir una proporción significativa (hasta 1 de cada 3) de las muertes en accidente de tráfico (octava en esta clasificación) asociadas con la apnea del sueño (Lozano et al. 2012).

La actualización del GBD 2010 indica un incremento del número de personas con EPOC desde la anterior cifra en 1990 de 210 millones de personas con EPOC en todo el mundo, a la actual de 328.615.000 con EPOC (168 millones en varones y 160 millones en mujeres) (Vos et al. 2012).

En el estudio EPI-SCAN realizado en España, la prevalencia de la EPOC en la población española de 40-80 años es del 10,2% (15,1% en varones y 5,7% mujeres) y se detectó un 73% de infradiagnóstico (Miravittles et al. 2009a). Con estos datos, se estima que actualmente, entre los 21,4 millones de españoles con una edad entre 40 y 80 años hay 2.185.764 que presentan EPOC. Por sexos, las cifras corresponden a 1.571.868 varones y 628.102 mujeres. Si el 73% de ellos aún no están diagnosticados, puede decirse que más de 1.595.000 españoles aún desconoce que padece EPOC y, por lo tanto, no recibe ningún tratamiento para su EPOC (Ancochea et al. 2013).

A su vez, se identificó también una importante variabilidad geográfica en el infradiagnóstico de la EPOC, aunque con un marcado predominio en mujeres.

A nivel mundial, también se ofrecen resultados entre el 8-10%, en pacientes de más de 40 años (Halbert et al. 2006; Atsou et al. 2011).

En Cantabria, las estimaciones son de que podría afectar en torno a 27.500 pacientes mayores de 40 años (Agüero et al. 2011).

I.3.2. Mortalidad.

La EPOC representa la cuarta causa de mortalidad mundial y la OMS espera que sea la tercera en el año 2030 (WHO, 2008; Lozano et al. 2012).

Este incremento en la mortalidad debe básicamente al aumento del hábito tabáquico en las décadas precedentes, a la reducción de mortalidad por otras enfermedades comunes (enfermedades infecciosas, fallo cardiaco, etc.) y al envejecimiento de la población mundial (Global Strategy GOLD 2011).

La tasa de mortalidad por EPOC por 100.000 habitantes, ajustada por población mundial, en el año 2008 fue de 449,22 en hombres y 238,47 en mujeres. La mortalidad por EPOC en España, comparando las tasas ajustadas por población mundial, muestra una tendencia a la disminución durante la última década, tanto en hombres como en mujeres (Clinical GesEPOC 2012).

En España, también se sitúa en un cuarto lugar y representa el 4,1% del total de defunciones, por detrás del cáncer (27%), las enfermedades del corazón (20,5%) y las cerebrovasculares (7,9%). La tasa de mortalidad bruta por EPOC, en el año 2010 fue de 34 por 100.000 habitantes para ambos sexos (51,3 en hombres y 17,2 en mujeres). Las tasas de mortalidad aumentan de manera significativa, sobre todo en hombres, a partir de los 55 años, llegando a una tasa de 431,1 por 100.000 habitantes en ambos sexos por encima de 75 años. En las mujeres, se observa en los últimos años un ascenso de la mortalidad por causas respiratorias, posiblemente tanto por aumento en la incorporación al hábito tabáquico, como por mejora en la supervivencia de otras causas de mortalidad. (Regidor et al. 2010).

La mortalidad global a los 4-7 años, del diagnóstico de EPOC, con una edad media de 65–70 años, oscila entre el 30–48% (Soriano et al. 2010). La principal causa de muerte del paciente EPOC es la propia evolución de la enfermedad, siendo la respiratoria la causa principal, ya sea por agudización o por neoplasia de pulmón (Solanes & Casan, 2010).

En Cantabria en el año 2010, la EPOC también fue la cuarta causa de muerte y llegando a una tasa bruta de 31,3 por 100.000 habitantes, algo por debajo de la media nacional. (Regidor et al. 2010).

I.3.3. Impacto económico.

Dadas sus características de enfermedad crónica y progresiva, la EPOC supone un coste elevado, tanto en consumo de recursos sanitarios como en pérdida de la calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) de los pacientes. La estimación de los costes de la EPOC en España revisados en el documento Estrategia en EPOC del SNS del Ministerio de Sanidad y Consumo se estima en 750-1000 millones de euros/año, incluidos los costes directos, indirectos e intangibles. El coste medio directo por paciente con EPOC se estima entre 1.712 y 3.238 euros/año.

Estos costes directos se distribuyen en gastos hospitalarios (40-45%), fármacos (35-40%) y visitas y pruebas diagnósticas (15-25%); a estos costes se deben añadir los costes indirectos. Los pacientes que incurren en un mayor coste son los más graves y/o con agudizaciones frecuentes. Globalmente, los gastos derivados de la EPOC equivalen al 0,2% del producto interior bruto (Miravittles et al. 2003; Estrategia EPOC SNS, 2009).

El coste farmacológico de las agudizaciones representa más de un tercio del gasto total del tratamiento farmacológico para la EPOC y las hospitalizaciones que sufren estos pacientes, acaparan la partida de gasto más importante. Los pacientes con EPOC más grave, evidentemente tienen más agudizaciones que conllevan hospitalización y por lo tanto, adecuar el seguimiento y tratamiento

de este colectivo reduciría en gran medida el gasto. (Miravittles et al. 2003; Masa et al. 2004; Blasi et al. 2014). Así mismo, reducir la progresión de la enfermedad hasta fases avanzadas mejoraría la calidad de vida de los pacientes y el gasto sanitario. Recientes comunicaciones resaltan la importancia de la existencia y el control de las comorbilidades como factor de riesgo y coste añadido (Gómez et al. 2014).

Actualmente, las medidas más costo efectivas en el manejo de la EPOC serían un diagnóstico precoz y la abstinencia tabáquica (Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013).

I.4. Diagnóstico.

La espirometría es imprescindible para poder establecer el diagnóstico de la EPOC. Este, se fundamenta en tres etapas básicas: la detección precoz y proactiva mediante la sospecha clínica, la caracterización del fenotipo y la valoración de la gravedad (Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013).

El diagnóstico clínico de sospecha de EPOC ha de considerarse en todas las personas adultas con exposición a factores de riesgo, básicamente el hábito tabáquico (con una exposición de al menos 10 paquetes/año) que presentan tos crónica, con o sin producción de esputo o disnea.

Habitualmente el paciente con EPOC es o ha sido fumador durante un tiempo prolongado y refiere el comienzo de sus síntomas desde los 35 años en adelante.

Para lograr este objetivo, es fundamental una adecuada coordinación entre los diferentes niveles asistenciales. Así, en Cantabria, recientemente se ha puesto en marcha un plan diagnóstico-asistencial de carácter multidisciplinar con la intención de estructurar todo este proceso diagnóstico, basándose en las guías nacionales. (Ruta asistencial de la EPOC Cantabria, 2014).

La sospecha clínica debe confirmarse por medio de una espirometría forzada con prueba broncodilatadora realizada en la fase estable de la enfermedad, imprescindible para establecer el diagnóstico de EPOC.

Los objetivos de la espirometría en la evaluación inicial del paciente son: la confirmación del diagnóstico de sospecha y evaluar la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo (Clinical GesEPOC, 2012).

Se considera que hay obstrucción al flujo aéreo si al dividir el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV₁) entre la capacidad vital forzada (FVC) postbroncodilatación (PB), el resultado es inferior a 0,7 (Vestbo et al. 2013).

La utilización del cociente FEV₁/FVC (PB) comporta un riesgo de infradiagnóstico en edades jóvenes y de un sobrediagnóstico en edades avanzadas, ya que el cociente disminuye con la edad (Decramer, 2012), por lo que el diagnóstico de EPOC en individuos de edad avanzada que no hayan tenido exposición a factores de riesgo y con un FEV₁ (PB) normal puede ser sobreestimado.

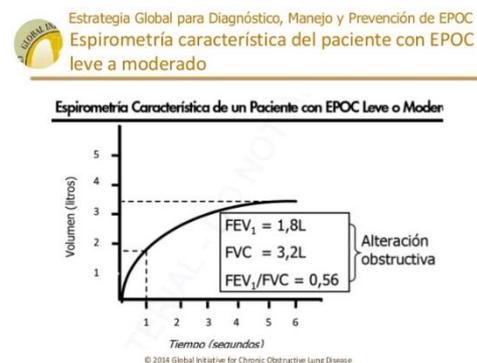
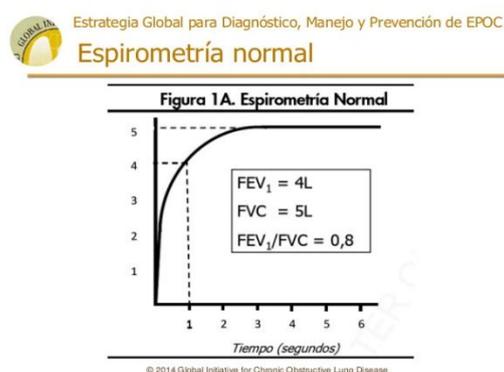


Figura 1. Espirometría en paciente normal (izqda.) o con enfermedad obstructiva (dcha.). Modificado de GOLD report 2013.

La EPOC es una enfermedad muy heterogénea y por lo tanto, no es posible describirla utilizando sólo el volumen espiratorio forzado durante el primer segundo (FEV1).

La denominación de fenotipo se utiliza para referirse a formas clínicas de los pacientes con EPOC. Un grupo de expertos internacionales ha definido el fenotipo clínico de la EPOC: “aquellos atributos de la enfermedad que, solos o combinados, describen las diferencias entre individuos con EPOC en relación con parámetros que tienen significado clínico (síntomas, agudizaciones, respuesta al tratamiento, velocidad de progresión de la enfermedad, o muerte)”.

Por lo tanto, el fenotipo debería ser capaz de clasificar a los pacientes en subgrupos con valor pronóstico que permitan determinar el tratamiento más adecuado para lograr mejores resultados clínicos. (Buist et al. 2007; Han et al. 2010; Clinical GesEPOC, 2012).

La guía GesEPOC propone cuatro fenotipos clínicos: a) Fenotipo no agudizador; b) Fenotipo mixto EPOC-asma; c) Fenotipo agudizador con enfisema y d) Fenotipo agudizador con bronquitis crónica (Clinical GesEPOC, 2012; Miravittles et al. 2014).

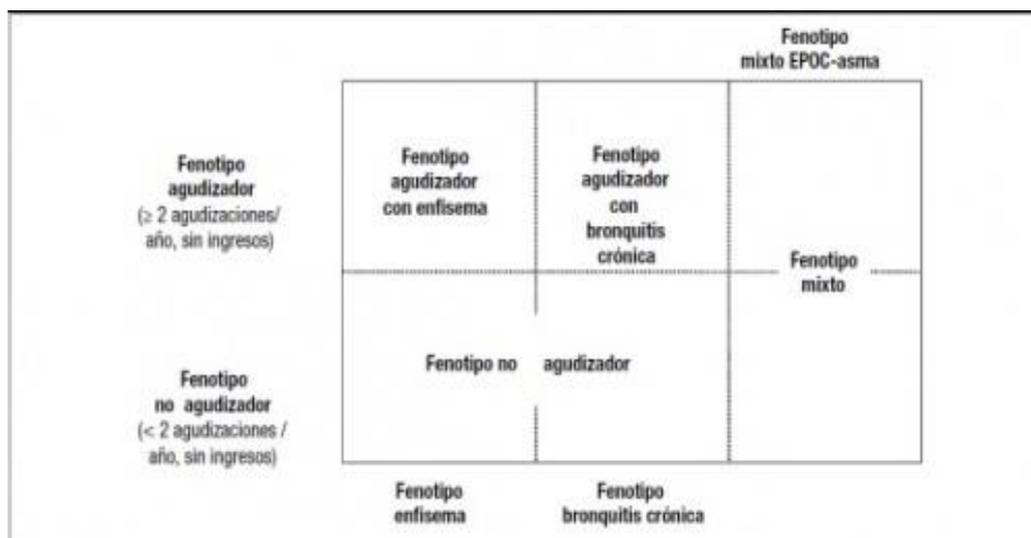


Figura 2. Clasificación en fenotipos del paciente EPOC. Guía GesEPOC 2012.

La gravedad de la obstrucción bronquial se basa en la medida dada por el FEV1 PB, según escala GOLD: I. Leve: $\geq 80\%$; II. Moderada: $50\% \leq \text{FEV1} < 80\%$; III. Grave: $30\% \leq \text{FEV1} < 50\%$; IV. Muy grave: $\text{FEV1} < 30\%$ (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2017 Report).

Table 2.4. Classification of airflow limitation severity in COPD (Based on post-bronchodilator FEV ₁)		
In patients with FEV ₁ /FVC < 0.70:		
GOLD 1:	Mild	FEV ₁ $\geq 80\%$ predicted
GOLD 2:	Moderate	$50\% \leq \text{FEV}_1 < 80\%$ predicted
GOLD 3:	Severe	$30\% \leq \text{FEV}_1 < 50\%$ predicted
GOLD 4:	Very Severe	FEV ₁ < 30% predicted

Figura 3. Clasificación de la gravedad de la obstrucción en función del FEV1 post-broncodilatador en pacientes EPOC. (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2017 Report).

Para determinar la gravedad pronóstica de la EPOC, la guía internacional GOLD propone un nuevo enfoque mediante el refinamiento de la clasificación ABCD que elimina los grados espirométricos de los parámetros de clasificación. Para algunas recomendaciones terapéuticas, los grupos ABCD se establecerán solo con los síntomas y la historia de exacerbaciones. Esta nueva proposición reconoce las limitaciones del FEV1 para influir en las decisiones terapéuticas para pacientes individuales y enfatiza la importancia de los síntomas y el riesgo de las exacerbaciones para guiar la terapia.

La espirometría, junto con los síntomas (a través de diferentes escalas como la mMRC (Bestall et al.1999) y el CAT (Jones et al. 2009)) y con la historia de exacerbaciones, sigue considerándose vital para el diagnóstico, pronóstico y consideraciones de otros tipos de tratamientos.

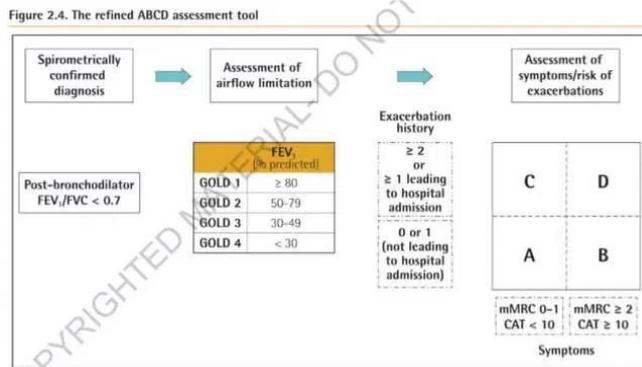


Figura 4. Clasificación GOLD. Modificado de GOLD (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2017 Report).

Escala de disnea modificada del MRC (mMRC)

Grado	Actividad
0	Ausencia de disnea al realizar ejercicio intenso
1	Disnea al andar de prisa en llano, o al andar subiendo una pendiente poco pronunciada
2	La disnea le produce una incapacidad de mantener el paso de otras personas de la misma edad caminando en llano o tener que parar a descansar al andar en llano a su propio paso
3	La disnea hace que tenga que parar a descansar al andar unos 100 m o pocos minutos después de andar en llano
4	La disnea le impide al paciente salir de casa o aparece con actividades como vestirse o desvestirse

Figura 5. Escala de disnea modificada del MRC (mMRC)



Su nombre: Fecha actual:

¿Cómo es la EPOC que padece? Realización del COPD Assessment Test™ (CAT)

Este cuestionario les ayudará a usted y al profesional del cuidado de la salud a medir el impacto que la EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) está teniendo en su bienestar y su vida diaria. Sus respuestas y la puntuación de la prueba pueden ser utilizadas por usted y por el profesional del cuidado de la salud para ayudar a mejorar el manejo de la EPOC y obtener el máximo beneficio del tratamiento.

En cada uno de los siguientes enunciados, ponga una X en la casilla que mejor describa su estado actual. Asegúrese de seleccionar sólo una respuesta para cada pregunta.

Ejemplo: Estoy muy contento 0 1 2 3 4 5 Estoy muy triste

	0	1	2	3	4	5		PUNTAJACIÓN
Nunca toso	<input type="radio"/>	Siempre estoy tosiendo	<input type="text"/>					
No tengo flema (mucosidad) en el pecho	<input type="radio"/>	Tengo el pecho completamente lleno de flema (mucosidad)	<input type="text"/>					
No siento ninguna opresión en el pecho	<input type="radio"/>	Siento mucha opresión en el pecho	<input type="text"/>					
Cuando subo una pendiente o un tramo de escaleras, no me falta el aire	<input type="radio"/>	Cuando subo una pendiente o un tramo de escaleras, me falta mucho el aire	<input type="text"/>					
No me siento limitado para realizar actividades domésticas	<input type="radio"/>	Me siento muy limitado para realizar actividades domésticas	<input type="text"/>					
Me siento seguro al salir de casa a pesar de la enfermedad pulmonar que padezco	<input type="radio"/>	No me siento nada seguro al salir de casa debido a la enfermedad pulmonar que padezco	<input type="text"/>					
Duermo sin problemas	<input type="radio"/>	Tengo problemas para dormir debido a la enfermedad pulmonar que padezco	<input type="text"/>					
Tengo mucha energía	<input type="radio"/>	No tengo ninguna energía	<input type="text"/>					
							PUNTAJACIÓN TOTAL	<input type="text"/>

COPD Assessment Test con el logotipo CAT es una marca comercial del grupo de empresas GlaxoSmithKline.
© 2004 GlaxoSmithKline group of companies. Todos los derechos reservados.
Last Updated: February 26, 2012

Figura 6. Cuestionario de calidad de vida CAT (COPD Assessment test)

La guía GesEPOC propone una clasificación integral de la gravedad en 5 niveles, a través del índice BODE. Este índice integra la información del índice de masa corporal (IMC) (B, de bode mass index), FEV1 (O, de airflow obstruction), disnea (D) y capacidad de ejercicio (E), evaluada mediante la prueba de marcha de 6 minutos (Celli & MacKnee, 2004). Si no se dispone de la prueba de los 6 minutos, se puede utilizar el índice BODEx, donde se tiene en cuenta el número de exacerbaciones graves (Ex) (Soler-Cataluña et al. 2009) como una alternativa, para los niveles I y II (EPOC leve o moderado).

Índice BODE						Índice BODEx					
Marcadores		Puntuación				Marcadores		Puntuación			
		0	1	2	3			0	1	2	3
B	IMC	> 21	≤ 21			B	IMC (kg/m ²)	> 21	≤ 21		
O	FEV ₁ (%)	≥ 65	50-64	36-49	≤ 35	O	FEV ₁ (%)	≥ 65	50-64	36-49	≤ 35
D	Disnea (MRC)	0-1	2	3	4	D	Disnea (mMRC)	0-1	2	3	4
E	6 MM (m)	≥ 350	250-349	150-249	≤ 149	Ex	Exacerbaciones graves	0	1-2	≥ 3	

IMC: índice de masa corporal; MRC: escala modificada de la MRC; 6 MM: distancia recorrida en la prueba de los 6 minutos marcha. Propuesto por Celli et al¹⁴⁵.

IMC: índice de masa corporal; mMRC: escala modificada de la MRC; Ex: exacerbaciones graves (se incluyen únicamente visitas a urgencias hospitalarias o ingresos). Propuesto por Soler-Cataluña et al¹⁵⁰.

Figura 7. Índice BODE

Índice BODEx

I.5. Fisiopatología.

I.5.1. Etiopatogenia.

Los gases y partículas nocivas del ambiente que son inhaladas, fundamentalmente el humo de tabaco, provocan una respuesta inflamatoria en el pulmón. Esta respuesta inflamatoria está alterada en pacientes con EPOC y es la responsable de que los mecanismos de defensa y reparación celular funcionen anormalmente, dando lugar a la fibrosis de las vías aéreas pequeñas y a la destrucción del parénquima pulmonar, produciendo enfisema, cambios patológicos que causan una limitación progresiva del flujo aéreo, principal característica de la enfermedad.

Los principales mecanismos que provocan el engrosamiento y destrucción de la vía aérea no son bien conocidos todavía, pero probablemente, se trate de un proceso multifactorial en el que interactúan estímulos ambientales junto a los determinantes genéticos de los pacientes (Decramer et al. 2012; Brusselle et al. 2011).

Las alteraciones patológicas que podemos encontrar en el pulmón de los pacientes con EPOC son principalmente:

a) Bronquitis crónica: Se caracteriza por un aumento en la producción del moco, una disminución del aclaramiento mucociliar y un aumento de la permeabilidad en la barrera epitelial. La inflamación asociada aparece en el epitelio de las vías aéreas centrales, mayores de 4 mm de diámetro interno y en las glándulas submucosas.

En este proceso participan distintas células inflamatorias, tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa (Decramer et al. 2012; Brusselle et al. 2011; Hogg, 2004).

b) Enfisema: Se define como el agrandamiento permanente de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales, con destrucción de las paredes alveolares, ocasionalmente con fibrosis manifiesta, lo que provoca una reducción del flujo espiratorio máximo.

La relación entre la presencia de enfisema y la exposición al humo de tabaco, medido como paquetes-año, muestra una marcada relación dosis-respuesta.

Existen dos subtipos de enfisema: centroacinar y panacinar.

El enfisema centroacinar es predominante en fumadores, como consecuencia de la dilatación o destrucción de los bronquiolos, vinculado a la obstrucción e inflamación de la pequeña vía aérea. El panacinar se asocia al déficit de alfa-1-antitripsina y a la destrucción de todo el acino.

c) Bronquiectasias: Son dilataciones anormales e irreversibles de los bronquios y bronquiolos que producen tos crónica, producción de esputo e infecciones bacterianas recurrentes. Resultado final de enfermedades diferentes que tienen aspectos comunes, debido a ciclos repetidos de inflamación, infección y remodelado, con alteración en el sistema mucociliar y destrucción de la pared bronquial. Se asocian a infecciones respiratorias recurrentes que pueden ser severas y a una pérdida progresiva de la función pulmonar, pudiendo provocar mortalidad precoz (O'Donnell, 2008; Vendrel et al. 2008).

d) Obstrucción de la vía aérea pequeña: El sitio donde se produce el trastorno ventilatorio obstructivo es principalmente en la vía respiratoria pequeña (< de 2 mm de diámetro). A menudo se asocia con bronquitis crónica, produciéndose una hiperplasia de las células epiteliales con alteración de la reparación tisular y un engrosamiento de la pared que obstruye el flujo aéreo.

Para mantener la homeostasis del tejido pulmonar la apoptosis celular y la destrucción de la matriz extracelular se compensan continuamente. Las células madre residentes en el pulmón son activadas por el daño epitelial, pero el humo de tabaco desregula el proceso de reparación mediado por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), provocando la fibrosis pulmonar (Decramer et al. 2012; Brusselle et al. 2011; Hogg, 2004).

Mecanismos de defensa: Los mecanismos de defensa contra el daño causado por el humo del tabaco y otros irritantes a nivel fisiopatológico los proporcionan la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune (innata y adaptativa).

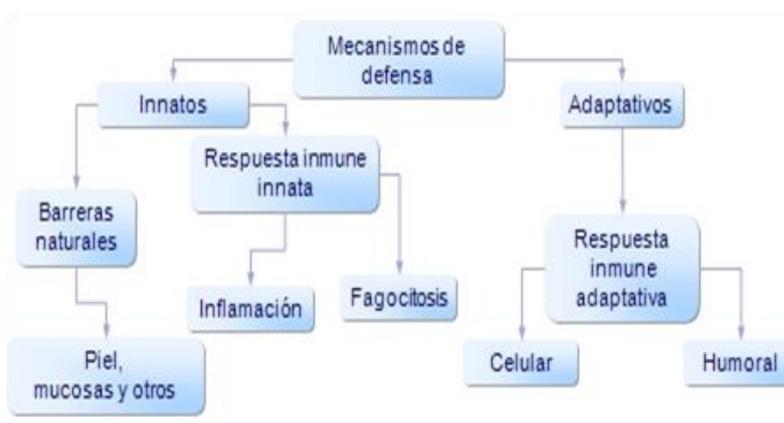


Figura. 8. Mecanismos de defensa de la respuesta inmune.

Entre los mecanismos de defensa innata se incluyen el sistema mucociliar de la vía aérea, que junto con los macrófagos eliminan las partículas extrañas al organismo, y las células epiteliales, que establecen una barrera física entre el espacio aéreo y el tejido pulmonar.

Esta barrera protectora desencadena una respuesta inflamatoria aguda, no específica, liberando moléculas relacionadas con el daño, que son reconocidas por receptores específicos, como los receptores toll-like. Se liberan citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que reclutan macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Además, también se liberan enzimas proteolíticas, como elastasas y metaloproteinasas de matriz (MMPs), y especies reactivas de oxígeno (ROS) que cuando no son contrarrestadas por inhibidores de proteasas y antioxidantes, generan más daño en el tejido, favoreciendo que se perpetúe así la respuesta inflamatoria.

Los componentes de la respuesta inmune adaptativa reaccionan ante los antígenos conocidos que llegan al pulmón, se depositan en la superficie epitelial y pueden ser transportados al interior por mecanismos especializados o a través del tejido dañado. Las células dendríticas, que se encuentran debajo de las células epiteliales formando una red, recogen los antígenos llevándolos hacia el tejido linfático bronquial y ganglios linfáticos, donde los presentan a las células T y B.

Las células T activadas, producen linfocitos T colaboradores CD4+ que estimulan el crecimiento y la diferenciación de más células B que comienzan a producir anticuerpos, permaneciendo algunas como células de memoria. Además, la respuesta inmune adaptativa celular ayuda en la destrucción de los microbios procesados por los macrófagos alveolares en la respuesta innata ya que los linfocitos T colaboradores CD4+ reconocen el complejo antigénico expresado en la superficie de estos macrófagos y secretan interferón gamma (IF- γ) para activar dicha destrucción.

Los linfocitos T citolíticos CD8+ reconocen las células nucleadas infectadas por patógenos intracelulares y las destruyen (Decramer et al. 2012).

Metaloproteinasas de matriz: Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que pertenecen a la familia de las metzincinas.

Su función principal es regular la integridad y composición de la matriz extracelular (MEC). Como enzimas proteolíticas, tienen la capacidad de

degradar los componentes de la MEC, así, las MMPs pueden afectar a la adherencia de las células a la MEC, liberar fragmentos de ésta y atrapar mediadores del microambiente para facilitar que las células reaccionen.

Las MMPs contribuyen a la génesis del trastorno ventilatorio obstructivo en la EPOC al provocar una alteración en el remodelado de la MEC, induciendo colateralmente inflamación (Hu et al. 2007; Shiomi et al. 2003).

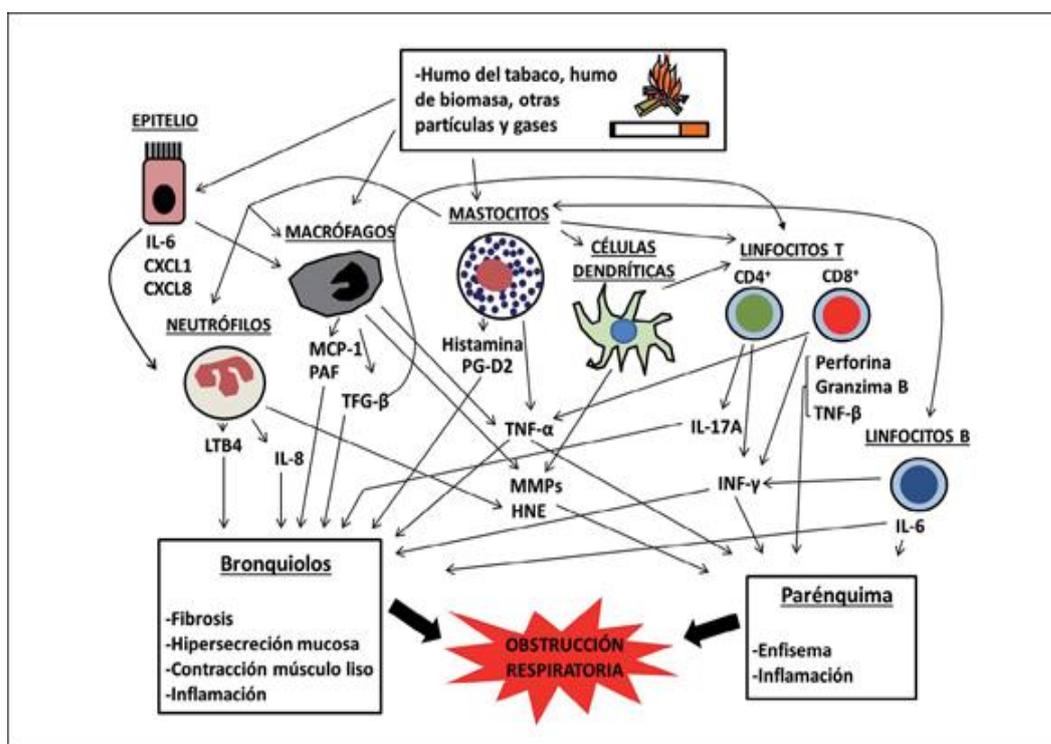


Figura 9. Células inflamatorias y sus principales mediadores químicos en la EPOC. La respuesta inflamatoria característica de la EPOC engloba células de la inmunidad innata y de la adquirida.

(IL-6: interleuquina 6; CXCL 1: ligando quimioquina CXC 1; CXCL 8: ligando quimioquina CXC 8; LTB4: leucotrieno B4; IL-8: interleuquina 8; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; PAF: factor activador de plaquetas; TFG-β: factor de crecimiento transformante; PG-D2: prostaglandina D2; TNF-α: factor de necrosis tumoral α; MMPs: metaloproteasas de matriz; HNE: elastasa de neutrófilos humana; IL-17A: interleuquina 17A; INF-γ: interferón γ; TNF-β: factor de necrosis tumoral β o linfotóxina).

I.5.2. Colonización vs infección bronquial crónica (IBC).

La presencia de microorganismos (bacterias) en las vías respiratorias inferiores de los pacientes con EPOC estable es lo que generalmente se conoce como colonización bronquial, de escasa significación patológica.

La mayoría de estudios que han analizado la colonización de los pacientes con EPOC se han basado en la detección e identificación de las bacterias mediante cultivos microbiológicos de muestras de secreciones respiratorias, como son el esputo espontáneo o inducido, el cepillo bronquial protegido y el BAL.

El papel de estos microorganismos, especialmente bacterias, en la historia natural de la EPOC es un tema controvertido, pero actualmente novedoso.

Son la principal causa de las exacerbaciones de la enfermedad, pero su papel durante las fases de estabilidad no está claro, aunque varios estudios sugieren que contribuyen a la inflamación bronquial crónica y a la progresión de la enfermedad (Marín et al. 2010; Sethi & Murphy, 2008).

Las bacterias aisladas se clasifican en microorganismos potencialmente patógenos (MPPs) y microorganismos no reconocidos como potencialmente patógenos (nMPPs).

Recientemente, se ha sugerido que el término infección bronquial crónica (IBC) sería más adecuado que el de colonización para referirse a la existencia de concentraciones significativas de MPPs en la vía aérea inferior del paciente con EPOC, de tal manera que el término colonización sería más apropiado para definir la presencia de microorganismos no MPPs en el tracto respiratorio de individuos con o sin enfermedad respiratoria crónica (Sethi, 2010; Matkoviz, 2013b).

En los pacientes con EPOC estable y agudizada se ha observado que los microorganismos involucrados son muy similares aunque la carga bacteriana aumenta de forma significativa durante la agudización (infección bronquial aguda). La variabilidad de dichos microorganismos, la exposición al humo del tabaco, factores intrínsecos y extrínsecos van a determinar la naturaleza e

intensidad de la IBC así como la transición de ésta a la agudización (Monsó et al. 1995; Rosell et al. 2005; Garcha et al. 2012; Miravittles, 2002).

También se ha sugerido que la IBC (junto a exposición del humo del tabaco) podría causar la inflamación sistémica persistente en la EPOC y junto al estrés oxidativo, asociarse a la presencia de comorbilidades (enfermedad cardiovascular, arteriosclerosis, osteoporosis, alteraciones musculoesqueléticas, cáncer, caquexia-anorexia, diabetes mellitus, insuficiencia renal, depresión, ansiedad, etc.). (Marín et al. 2012).

Dentro de los MPPs encontramos bacterias que son causa conocida de infección respiratoria, como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y otras menos frecuentemente etiológicas como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae*.

H. influenzae, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* son las más frecuentemente aisladas en pacientes estables como bacterias colonizadoras, junto con *P. aeruginosa* en los pacientes con enfermedad más avanzada, siendo frecuente el aislamiento de más de un patógeno en un mismo paciente.

Dentro de los MPPs existen microorganismos con bajo potencial patogénico como *H. parainfluenzae* y *H. haemolyticus* que producen una inflamación mucho menor y son considerados como no MPPs.

Dentro de los microorganismos no MPPs se incluyen especies como *Candida spp.*, *Corynebacterium spp.* y *Streptococcus viridans* que pertenecen a la flora normal y no suelen estar involucrados en procesos infecciosos (Matkoviz & Miravittles, 2013a).

En las muestras de los pacientes con EPOC se aíslan frecuentemente MPPs y también no MPPs debido al fallo del sistema mucociliar que facilita el crecimiento bacteriano en la vía aérea distal, tanto en la fase de agudización como en la estable (Rosell et al. 2005; Miravittles et al. 2010).

El porcentaje de cultivos positivos en los pacientes con EPOC estable depende en cierto grado del tipo de muestra recogida. Los estudios que han utilizado

muestras de esputo han hallado un 38-74% de los cultivos positivos para MPPs. Los estudios que han usado el cepillo bronquial protegido han encontrado niveles de colonización más bajos (22-83%), con MPPs aislados en un 25-31% de los casos, y resultados similares se han hallado en muestras de BAL, positivas para MPPs en 33-43% de los casos. (Sethi, 2006; Hill, 2000; Matkoviz & Miravittles, 2013a; Patel, 2002; Rosell et al. 2005; Soler, 1999; Monsó et al. 1995; Cabello et al. 1997; Zalacain et al. 1999).

Algunas características clínicas pueden ayudarnos a identificar los pacientes con alto riesgo de IBC (infección bronquial crónica por MPPs). El tabaquismo activo o exfumador, el deterioro grave de la función pulmonar (FEV1 y/o FVC bajas), las comorbilidades, las exacerbaciones frecuentes, la presencia de bronquiectasias, la expectoración purulenta, el aumento de la disnea y el uso de corticoides inhalados en altas dosis se han relacionado con una mayor frecuencia de IBC en la EPOC (Miravittles et al. 2010; Zalacain et al. 1999; Weinreich & Korsgaard, 2008; Monsó et al. 1999).

La infección crónica por MPPs (IBC) contribuye a la progresión de la enfermedad al amplificar la respuesta inflamatoria. La hipótesis del círculo vicioso intenta explicar cómo la infección perpetúa la inflamación y contribuye al progreso de la EPOC.

Son las bacterias quienes liberan moléculas con efectos proinflamatorios potentes, como las endotoxinas, lipoproteínas de la membrana externa, fragmentos de peptidoglicano, ácido lipoteicoico, toxinas y otros (Murphy, 2006; Ha et al. 2007).

En respuesta a estas moléculas, las células epiteliales de las vías respiratorias y los macrófagos producen mediadores inflamatorios (IL-6, IL-10, factor de necrosis tumoral alfa, MPC-1), que llevan al reclutamiento y activación de neutrófilos, nuevos macrófagos y otras células inflamatorias (Clemans et al. 2000; Fuke, 2004).

Los neutrófilos, que predominan en fumadores y pacientes con EPOC, son reclutados de la circulación y activados en respuesta a quimioatrayentes (en particular la IL-8 y el leucotrieno B4) mediante moléculas de adhesión como la e-selectina y la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), expresadas en el

endotelio vascular. Los neutrófilos activados se degranulan liberando mieloperoxidasa y diferentes tipos de proteinasas (elastasa, catepsina G, proteinasa 3 y metaloproteinasa), que en conjunto participan en varios aspectos del daño tisular.

Los pacientes crónicamente infectados presentan concentraciones más altas de citoquinas, neutrófilos y sus productos, comparados con pacientes no infectados con un grado de obstrucción bronquial similar, lo que indicaría un nivel de inflamación mayor inducido por bacterias (Sethi & Murphy, 2008; Marín et al. 2012; Hill, 2000).

Existen también diferencias en el grado de virulencia de las diferentes especies que pueden influir en la gran variabilidad de la duración de la IBC (Martínez-Solano, 2008).

Así pues, una vez que los microorganismos han accedido a las vías respiratorias inferiores debido a: defectos en el sistema mucociliar, aumento en la producción de moco, daño en el epitelio, represión en la producción de IgA y disminución de la capacidad fagocítica celular, característicos de la enfermedad; facilitan la colonización de la vía aérea y provocan un aumento de la respuesta inflamatoria.

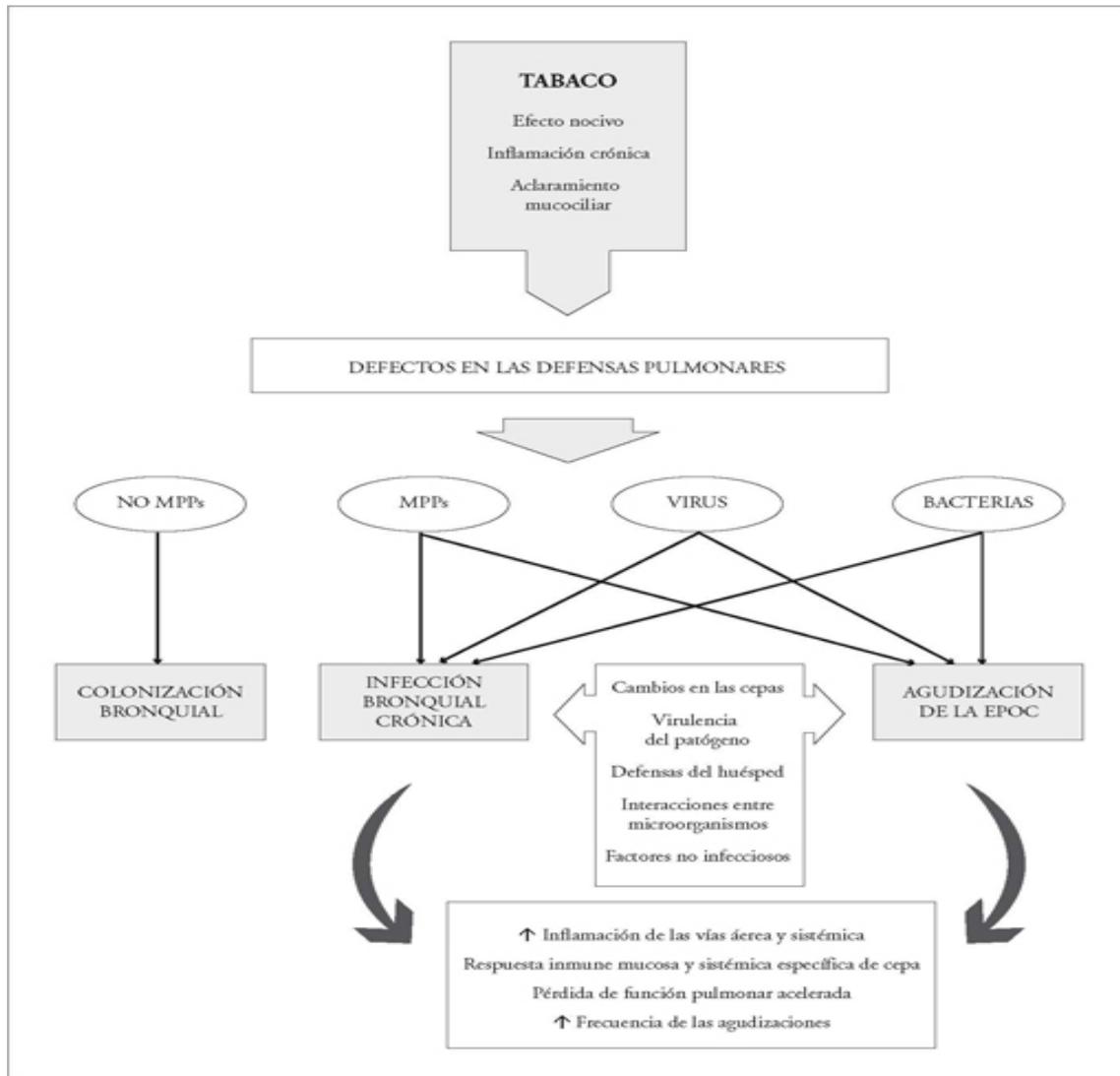


Figura 10. Impacto de la infección en la patogénesis de la EPOC en fase estable y durante las agudizaciones.

Tanto las propias bacterias como el daño epitelial que generan, contribuyen a alterar la respuesta inmune del huésped, de forma que más microorganismos son capaces de persistir en las vías respiratorias inferiores, formándose un ciclo vicioso de inflamación crónica y infección bronquial mantenida en el tiempo.

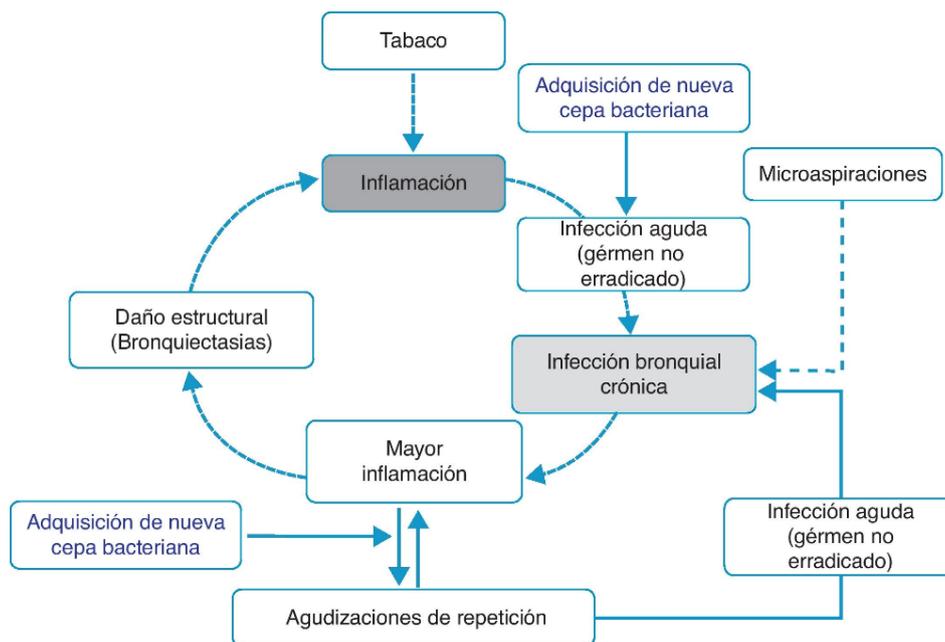


Figura 11. Círculo vicioso de la infección bronquial.

I.5.3. Papel del sistema inmunológico de la mucosa respiratoria.

La mucosa proporciona una barrera física entre el interior y el exterior del cuerpo, por lo tanto, los mecanismos de defensa a ambos lados, deben de ser diferentes. La superficie aproximada de la mucosa de la vía aérea es de unos 100 m² y está continuamente expuesta a antígenos y biotoxinas inhaladas, lo que supone un reto para nuestro sistema inmune.

La presencia de un microorganismo en el parénquima indica infección, sin embargo, la superficie mucosa está colonizada por una microbiota comensal y constantemente expuesta a antígenos ambientales. Así, mientras que el sistema inmune sistémico debe actuar de forma contundente ante la presencia de microorganismos, el sistema inmune de las mucosas debe mantener una microbiota normal mientras reacciona ante la presencia de MPPs.

El principal mecanismo de defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores depende de la inmunoglobulina A secretora (sIgA), debido a su elevada capacidad de unión a antígenos y su resistencia a la proteólisis por la

flora comensal (Pilette, 2004). Es la principal inmunoglobulina en las mucosas y la segunda más importante en circulación. Hay dos subclases, IgA1 e IgA2, con diferente distribución en suero y otras secreciones. En la mucosa respiratoria, la IgA1 representa más del 90% de la IgA total presente (Rao,1999; Brandtzaeg, 1992).

Las IgA se producen localmente en células plasmáticas en forma de dímero o polímero, en contraste con la IgA presente en el suero que es monomérica y se sintetiza en las células plasmáticas de la médula ósea. Es liberada en las secreciones en forma de un complejo con el componente secretor (SC), la porción extracelular del receptor de inmunoglobulina polimérico, que permite el reconocimiento y el transporte selectivo a través de la mucosa epitelial.

Las IgA protegen las superficies mucosas mediante la unión a microorganismos o macromoléculas ambientales, previniendo su contacto con la superficie epitelial y facilitando su eliminación por el movimiento mucociliar, un mecanismo denominado exclusión inmune. También actúan en la lámina propia donde se une a antígenos y los excreta al lumen a través de las células epiteliales por un mecanismo de transcitosis mediada por el receptor de inmunoglobulina polimérico, gracias a este procedimiento, es capaz también de inhibir la producción intracelular de virus y de neutralizar antígenos proinflamatorios que aparecen en los endosomas (Brandtzaeg, 2013; Corthésy, 2013).

No existen muchos estudios sobre los niveles de IgA en los pacientes con EPOC, pero éstos sugieren que la producción de IgA en la mucosa bronquial de pacientes con EPOC está disminuída, sin embargo, la respuesta sistémica mediada por IgA se ha hallado preservada en la EPOC (Pilette, 2004; Qvarfordt, 2001; Von Hertzen et al. 1997).

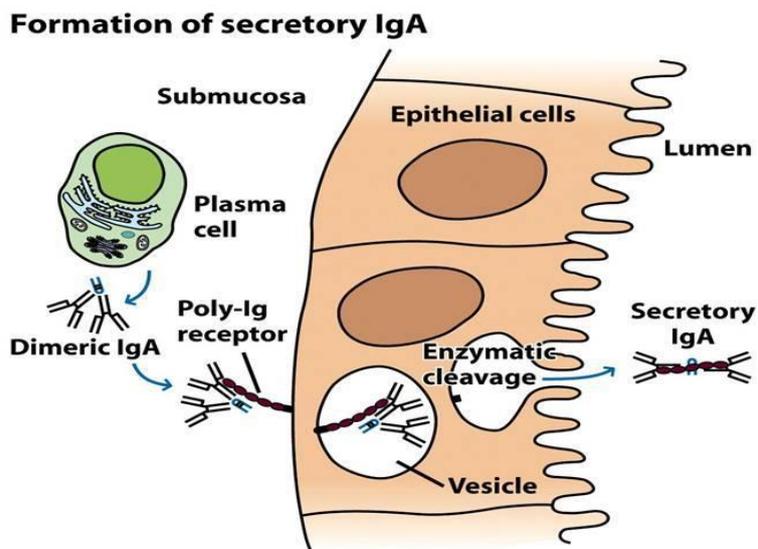


Figura 12. Formación de la Ig A secretora (sIgA) en la mucosa.

I.6. Agudizaciones en la EPOC.

I.6.1. Definición de agudización en la EPOC. Etiología.

La agudización o exacerbación (AEPOC) se define como un episodio agudo de inestabilidad clínica que acontece en el curso natural de la enfermedad y se caracteriza por un empeoramiento mantenido de los síntomas respiratorios que va más allá de sus variaciones diarias. Los principales síntomas referidos son empeoramiento de la disnea, de la tos, e incremento del volumen y/o cambios en el color del esputo o cualquier combinación de éstos, que haga necesario un cambio terapéutico (Celli & Barnes, 2007).

En las exacerbaciones, el nivel de inflamación de la vía aérea se incrementa y se produce un aumento de las células inflamatorias en esputo (neutrófilos, eosinófilos y linfocitos) así como de mediadores inflamatorios con producción de edema de la mucosa respiratoria, broncoespasmo e hipersecreción mucosa, lo que empeora los síntomas respiratorios.

La inflamación neutrofilica, la purulencia del esputo y las exacerbaciones bacterianas son una asociación bien establecida y por lo tanto una base lógica para el uso de la purulencia del esputo como indicador de infección bacteriana y la necesidad de tratamiento antibiótico (Stockley, 2000; Miravittles, 2012b). Las exacerbaciones de la EPOC tienen un impacto significativo en la calidad de vida, la progresión de la enfermedad, la mortalidad, los costes y la utilización de recursos.

Es fundamental distinguir una nueva agudización de un fracaso terapéutico previo, de una recaída o recurrencia para que no sea considerada como una nueva agudización.

Así, el fracaso terapéutico se define como un empeoramiento de síntomas que sucede durante la propia agudización y que requiere un tratamiento adicional. Una recaída es cuando se produce un nuevo empeoramiento de los síntomas entre la finalización del tratamiento de la agudización y las 4 semanas posteriores. Recurrencia se produce cuando los síntomas reaparecen en un plazo inferior a un año desde la agudización precedente, después de un período de relativo buen estado de salud. Para ello, se establece que deben haber transcurrido al menos 4 semanas después de completar el tratamiento de la agudización previa o bien 6 semanas desde que se iniciaron los síntomas (Clinical GesEPOC, 2012).

AGUDIZACIONES

- Nuevos conceptos

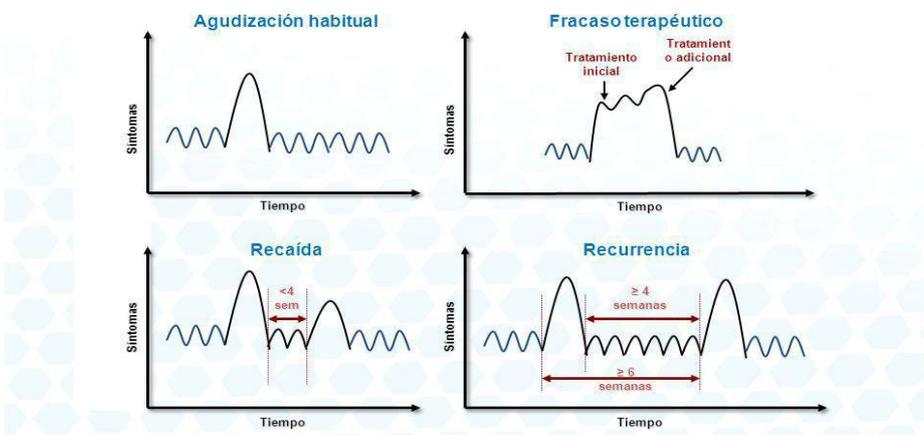


Figura 13. Agudización, fracaso terapéutico, recaída y recurrencia. Guía GesEPOC 2012.

Identificar las causas de la agudización es de gran importancia para un adecuado tratamiento pero, aproximadamente en un tercio de los casos, la etiología no se llega a conocer. Hasta en el 70% de los casos, la causa de la exacerbación es la infección del árbol traqueobronquial (virus 30%, bacterias 50% y co-infección hasta el 25%). La contaminación ambiental puede ser la causante del 5-10% de las exacerbaciones (Seemungal et al. 2001; Grupo SEPAR-SEMFYC, 2010).

Las bacterias MPPs identificadas con mayor frecuencia son *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*, aunque en agudizaciones graves, Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* pueden ser frecuentes (Miravittles, 1999).

La co-infección indica una cierta susceptibilidad a la infección bacteriana tras el proceso viral y conlleva una mayor gravedad, con una estancia hospitalaria significativamente mayor en estos pacientes. Hasta un 19% de los pacientes ingresados pueden requerir una nueva atención hospitalaria o incluso fallecer en el mes siguiente al alta. (Papi et al. 2006).

También es necesario diferenciar la AEPOC, de otras situaciones que se pueden superponer o agravar una disnea o aumento de tos, como insuficiencia cardíaca, tromboembolismo pulmonar, neumotórax, arritmias, fármacos, etc. (Pozo-Rodriguez et al. 2012; Vestbo et al. 2013).

El hecho de tener más agudizaciones, supone un aumento de la inflamación subyacente, un deterioro de la función pulmonar más acelerado, peor calidad de vida y una mayor probabilidad de mortalidad (Miravittles et al. 2004; Kessler et al. 2006; Donaldson et al. 2008; Anzueto, 2010).

La gran variabilidad en la propia definición de AEPOC, supone un problema de validez externa en los diferentes estudios sobre AEPOC. Algunos estudios están basados en la valoración del propio paciente y otros en la del clínico (Pauwels et al. 2004; Hoogendoorn et al. 2010).

Así, se ha propuesto clasificar la gravedad de la AEPOC, en diferentes grados: Leves: serían aquellas que no se notifican al médico. El paciente las puede resolver con modificaciones de su tratamiento de base, en el domicilio (Seemungal et al. 1998). Algún estudio, ha demostrado que más de la mitad de todas las AEPOC no se notifican (Langsetmo et al. 2008; Jones et al. 2011; Leidy et al. 2014).

Moderadas: son aquellas que originan un cambio terapéutico que conlleva la prescripción de antibióticos y/o corticoides sistémicos.

Graves: aquellas que además de lo anterior, conllevan un ingreso hospitalario (Wedzicha & Seemungal, 2007; Hurst et al. 2010).

I.6.2. Fenotipo agudizador y factores predictores del riesgo de agudizaciones futuras.

Los pacientes EPOC presentan 1-4 agudizaciones/año de media, pero la distribución es muy variable, desde pacientes sin agudizaciones hasta otros en los que aparecen de forma repetitiva y estable en el tiempo (Hurst et al. 2010). Esta variabilidad ha hecho sospechar la existencia de un 'Fenotipo Agudizador' (FA) en algunos pacientes EPOC que tendrían una predisposición a padecer

AEPOC y por lo tanto, a un peor pronóstico, menor calidad de vida, mayor mortalidad y aumento de costo sanitario (Peces-Barba et al. 2008; Soler-Cataluña et al. 2011; Clinical GesEPOC 2012; Vestbo et al. 2013).

Por lo tanto, fenotipo agudizador (FA), tendría todo paciente con EPOC que presente 2 o más agudizaciones al año. No está claro, si para esa definición habría que considerar todas las agudizaciones o sólo las moderadas y graves. La implicación pronóstica de las leves aún no está bien clara y son más difíciles de interpretar, por lo que no suelen estar incluidas (Soler-Cataluña et al. 2005; Soler-Cataluña & Rodriguez-Roisin, 2010).

Existe cada vez más interés por encontrar factores predictores relacionados con este FA y con las variaciones clínicas en los pacientes EPOC (Donaldson et al. 2013). Cuanto antes se identifiquen esos riesgos, antes se pueden poner en marcha estrategias de prevención, control, e intensificación terapéutica (Vestbo et al. 2013; Wedzicha et al. 2013).

El factor predictor de FA más fiable conocido hasta la fecha es la historia previa de agudizaciones. La edad es un factor de riesgo existente pero no modificable (Hurst et al. 2010; Donaldson et al. 2013; Müllerova et al. 2014; Miravittles et al. 2014).

Factores que parecen tener una relación demostrada con la frecuencia de agudizaciones, pero con puntualizaciones, son el FEV1, la presencia de comorbilidades y la hipersecreción bronquial. Entre los que la relación es factible estarían, la tenencia y persistencia de marcadores inflamatorios, susceptibilidad a infección viral, colonización bacteriana en la vía aérea, atrapamiento aéreo, predisposición genética y una mala adherencia terapéutica (Patel et al. 2002; Donaldson & Wedzicha, 2006; Wedzicha, 2007; Perera et al. 2007; Hurst et al. 2010; Boixeda et al. 2012; Wedzicha et al. 2013; Makela et al. 2013; Rabe et al. 2013; Thomsen et al. 2013; Yang et al. 2014).

La gravedad del FEV1 influye en la probabilidad de padecer más y más intensas agudizaciones, pero también se ha demostrado que en pacientes con grados de obstrucción moderados (GOLD 2), se puede presentar un patrón de agudización frecuente, por lo que parece que no es el único factor influyente (Hurst et al. 2010).

La comorbilidad cardiovascular está relacionada con las AEPOC graves, aunque no hay certeza sobre si como causa o consecuencia de las mismas (Dewan et al. 2000; Soler-Cataluña & Rodriguez-Roisin, 2010; Alcazar et al. 2012).

I.7. Tratamiento y vacunas en la EPOC.

El objetivo de un plan terapéutico adecuado en EPOC consiste en mejorar los síntomas de base de la enfermedad, disminuir la frecuencia e intensidad de las agudizaciones y mejorar el pronóstico (Postma et al. 2011; Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013).

Los tratamientos inhalados conocidos hasta ahora no han demostrado disminuir el empeoramiento de la función pulmonar propio de estos pacientes, aunque si han mejorado su calidad de vida (Vestbo et al. 2013).

Evitar el tabaquismo y los gases contaminantes, una nutrición adecuada, la actividad física regular, la evaluación y el tratamiento de las comorbilidades y la vacunación antigripal y anti-neumocócica, son las medidas generales más importantes del tratamiento. La rehabilitación respiratoria es fundamental como prevención terciaria (Alfageme et al. 2006; Nice et al. 2006; García-Aymerich et al. 2007; Alcolea et al. 2007; Vestbo et al. 2013; Miravittles et al. 2014).

GesEPOC propone adecuar el tratamiento farmacológico de la EPOC en fase estable al fenotipo de cada paciente y los indicadores de gravedad servirían para regular la intensidad y el grado de supervisión. (Miravittles 2009b; López-Campos, 2010; Clinical GesEPOC, 2012).

La base del tratamiento farmacológico son los broncodilatadores de larga duración (BDLD) (β -adrenérgicos-LABA-, antimuscarínicos-LAMA-). Los fármacos que se deben añadir a los BDLD dependerán del fenotipo del paciente.

En el fenotipo no agudizador (FNA) (enfisema o bronquitis crónica), el uso de los BDLD en combinación es la base del tratamiento.

En el fenotipo mixto (ACO), es la utilización de BDL D combinados con corticoides inhalados (IC).

En el fenotipo agudizador con enfisema se basa en BDL D a los que se pueden añadir los CI y la teofilina según el nivel de gravedad.

En el fenotipo agudizador con bronquitis crónica los BDL D, a los que se pueden añadir CI (se desaconseja la combinación única LAMA+CI), inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (Roflumilast), mucolíticos según la gravedad y en casos especiales antibióticos de forma preventiva (macrólidos y quinolonas a bajas dosis) (Puhan et al. 2009; López-Campos, 2010; Miravittles, 2009b; Miravittles et al. 2008, 2012, 2014).

En las AEPOC, la principal intervención es optimizar la broncodilatación (McCorry et al. 2001). Los antibióticos están indicados en presencia de esputo purulento, aumento de disnea o expectoración (Miravittles et al. 2008, 2014). Una pauta corta de corticoides sistémicos debería prescribirse, en los casos moderados, graves y en los leves que no responden al tratamiento inicial (Walters et al. 2009). La administración de oxígeno en AEPOC graves, debe realizarse siempre de forma controlada (Clinical GesEPOC, 2012).

Las vacunas son una estrategia para reducir el riesgo de agudizaciones relacionadas con el virus de la gripe, la neumonía neumocócica y sus complicaciones (Clinical GesEPOC, 2012).

Existen diversas revisiones sistemáticas y meta-análisis recientes apoyando la seguridad y los beneficios de la vacunación antigripal en población general adulta en cuanto a síntomas gripales y días de trabajo recuperados, que serían moderados (Osterholm et al. 2012; Jefferson et al. 2014).

En relación a subgrupos específicos de riesgo como los pacientes con EPOC, a pesar del consenso generalizado a favor de la vacunación antigripal (Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013), los estudios publicados son más escasos (Hovden, 2007).

Adicionalmente, en países desarrollados los porcentajes de vacunación en pacientes con EPOC son heterogéneos, siendo descritos en su mayoría porcentajes de vacunación subóptimos (Harper et al. 2005; Plans-Rubió, 2007).

Por ello, la mayoría de estudios y revisiones centrados en EPOC (Nichol et al. 1999; Poole et al. 2006; Menon et al. 2008; Vila-Córcoles et al. 2008; Schembri et al. 2009; Seo et al. 2013; Montserrat-Capdevila et al. 2014) concluyen que todavía son necesarios más trabajos para tratar de determinar la efectividad de la vacunación antigripal en diferentes áreas geográficas y en distintos subgrupos de pacientes.

Esta heterogeneidad en los porcentajes de vacunación parece ser mayor en España, donde las cifras de los últimos estudios publicados muestran un rango entre el 52,2% (Montserrat-Capdevila et al. 2014) y el 87,2% (Jiménez-García et al. 2005, 2007).

Con respecto al uso de las vacunas anti-neumocócicas polivalentes (14 y 23 serotipos) en los pacientes con EPOC, diversos estudios no observaron efectos significativos en los resultados (riesgo de neumonía, riesgo de agudización, ingresos hospitalarios y mortalidad) (Alfageme et al. 2006; Walters et al. 2010). Aun así, la mayoría de las Guías siguen recomendando en la actualidad la vacunación anti-neumocócica con una revacunación a los 8 años, dado su bajo coste y gran seguridad. (Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013).

I.8. Metagenómica y microbioma humano.

El estudio de la biodiversidad microbiana en muestras clínicas se ha fundamentado en el cultivo. Las técnicas convencionales de aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las secreciones respiratorias de los pacientes con EPOC son, hasta ahora, la base para el manejo terapéutico durante la exacerbación y la estabilidad de la enfermedad. Para ello, los métodos de cultivo utilizados se han adaptado a aislar aquellos microorganismos más comúnmente involucrados en las infecciones bronquiales observadas en estos pacientes.

Hacia mediados y finales del siglo XX, el cultivo de bacterias y su examen microscópico seguían siendo las principales herramientas de estudio para los

microbiólogos. El estudio de una determinada comunidad microbiana en un ambiente se realizaba mediante evaluación microscópica directa, el uso de pruebas bioquímicas, y las técnicas de cultivo de enriquecimiento. Sin embargo, la diversidad observada a través del microscopio no podía ser explicada mediante lo cultivado en medios de cultivo enriquecido (Staley & Konopka, 1985).

Esta situación no permite evaluar la diversidad microbiana de las secreciones respiratorias, ni detectar microorganismos no considerados como habituales causantes de infección, que podrían participar en la fisiopatología de la enfermedad.

I.8.1. Estudio de metagenomas.

El aislamiento a partir de muestras de secreciones respiratorias requiere del uso de medios selectivos adaptados al cultivo de diferentes microorganismos, principalmente *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, que a menudo no son capaces de aislar microorganismos de crecimiento difícil, y pueden contaminarse por especies ambientales. Por lo tanto, la estimación de la diversidad microbiana por los métodos de cultivo está necesariamente sesgada, y puede no ser representativa de la variabilidad real en muestras de secreciones respiratorias. El número de microorganismos cultivables es mucho menor que el de los no cultivables.

La mayoría de métodos de asignación taxonómica requieren no sólo que la bacteria sea cultivable sino que seamos capaces de aislarla, lo cual restringe enormemente el número de bacterias a estudiar. Somos incapaces de cultivar la mayoría de especies bacterianas y, según las últimas estimaciones, solamente en 8 de los 28 phyla bacterianos conocidos hay especies cultivables en la actualidad (Achtman & Wagner, 2008).

Uno de los argumentos que explican nuestra incapacidad para cultivar la mayoría de las bacterias es que no disponemos de información suficiente para el desarrollo de medios de cultivo, ya que no conocemos todas las

concentraciones y proporciones de oligoelementos y sustratos requeridos, aunque, de hecho, poco a poco se están haciendo avances en esta dirección (Kaeberlein et al. 2002; Stevenson et al. 2004).

Otras especies bacterianas, son capaces de entrar en un estado viable no cultivable o inactivo y, a pesar de tener las condiciones óptimas para crecer, necesitan una señal para activarse. Algunas de estas señales pueden ser moléculas involucradas en quorum sensing y transducción de señales, como el AMP-cíclico y las acil-homoserina-lactonas (Stevenson et al. 2004; Zengler, 2009).

Las especies que colonizan la mucosa bronquial son responsables de infecciones en pacientes con EPOC (Rogers AV. Et al. 2008), aunque la información sobre diversidad microbiana en muestras respiratorias es escasa y principalmente basada en el cultivo. En algunos casos, aproximaciones moleculares basadas en la amplificación del gen 16S ARNr y su clonado se han llevado a cabo en muestras de esputo de individuos con fibrosis quística y EPOC (Bittar et al. 2008; Rogers et al. 2009).

La metagenómica consiste en el estudio del conjunto de genomas que conforman las comunidades microbianas de un determinado entorno a partir de muestras recogidas directamente de dicho ambiente, sin necesidad de que los microorganismos sean cultivados y aislados. Las secuencias obtenidas (que están aproximadamente en proporción a la frecuencia con que aparecen en la población) se comparan con bases de datos de genes donde se encuentra toda la información necesaria para la asignación e identificación de los genes secuenciados, pudiendo de esta manera identificar las comunidades microbianas que habitan por ejemplo, en el ser humano. El desarrollo de técnicas microbiológicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos (New Generation Sequencing) ha permitido la proliferación de estrategias independientes del cultivo para la identificación de microorganismos.

La aplicación de estas nuevas tecnologías al estudio de la diversidad microbiana en muestras de individuos sanos y de pacientes enfermos ayudará a determinar la contribución de determinadas especies al desarrollo de las enfermedades. Por lo tanto, sería deseable el estudio de la diversidad

procariota en muestras de moco de individuos control (sanos) y de pacientes con distintas patologías mediante una aproximación basada en el análisis del metagenoma, que pueda analizar de una manera más certera la implicación de los microorganismos que habitan en nuestro cuerpo y su implicación con las patologías infecciosas con su consecuentemente trascendencia para la salud pública.

La amplificación de genes concretos como la amplificación universal del gen 16S ARNr seguida de secuenciación por pirosecuenciación de una muestra clínica, presenta ventajas considerables para identificar la composición de la microbiota que los métodos dependientes del cultivo microbiológico. En concreto en pacientes con EPOC se ha visto que la microbiota identificada en el esputo es mucho mayor que la identificada a través de métodos microbiológicos basados en el cultivo (Aguirre et al. 2015).

En cuanto a la identificación taxonómica de los microorganismos, la microbiología actualmente dispone de dos aproximaciones; la caracterización fenotípica y la identificación genotípica.

La caracterización fenotípica estudia los rasgos morfológicos, metabólicos, fisiológicos y químicos de la célula. La caracterización genotípica estudia los aspectos comparativos de las células al nivel de su genoma.

Taxonomía

Clasificación científica	
Reino:	<i>Bacteria</i>
Phylum:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Bacilli</i>
Orden:	<i>Lactobacillales</i>
Familia:	<i>Streptococcaceae</i>
Género:	<i>Streptococcus</i>
Especie:	<i>S. mutans</i>
Nombre binomial	
<i>Streptococcus mutans</i> (Clarke 1924)	

Figura 14. Taxonomía y nomenclatura bacteriana

La asignación taxonómica, como la historia evolutiva de los microorganismos, se lleva a cabo en base a los datos genéticos, principalmente del gen 16S ARNr. Los ARNr y los genes que los codifican fueron los primeros marcadores moleculares utilizados para establecer las relaciones filogenéticas en los procariotas (Sogin et al. 1971; Woese et al. 1974).

El ARNr tiene una función universal y constante que ha presentado un elevado grado de conservación desde las primeras etapas de la evolución. La mayoría de los estudios de diversidad bacteriana medioambientales están basados en el análisis de la subunidad pequeña del gen ribosómico 16S ARNr (Woese & Fox, 1977). Este gen codifica para un ARN que forma parte de la subunidad 30S del ribosoma de los procariotas. Está presente en todas las bacterias y está lo suficientemente conservado como para poder alinear de forma precisa las posiciones homólogas de unas especies con otras. Además, los genes ribosómicos son buenos marcadores moleculares por presentar distinta tasa de evolución a lo largo de sus secuencias, de modo que hay alternancia de regiones conservadas y variables como para llevar a cabo análisis filogenéticos (Woese et al. 1990).

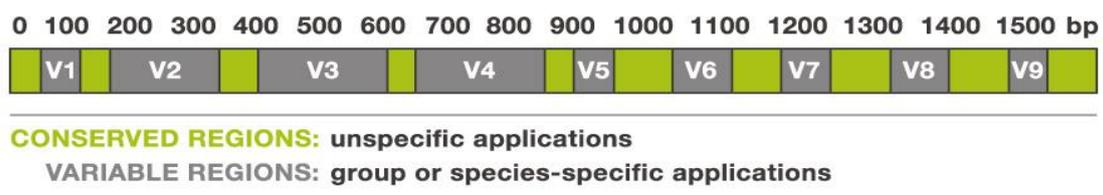


Figura 15. Regiones conservadas e hipervariables (V1-V9) del gen 16S ARNr.

El uso del análisis comparado de la secuencia del gen 16S ARNr ha sido muy importante para el desarrollo de la taxonomía moderna de los procariotas por dos motivos principalmente: la información contenida en este marcador es muy superior a sus alternativas y la calidad de las bases de datos disponibles permite tener buena resolución prácticamente hasta nivel de especie

(Ludwig, 2007). En 1980, Carl Woese y su grupo proporcionaron una visión general de la filogenia bacteriana basándose en secuencias de 16S ARNr, independientes de características morfológicas y bioquímicas que siempre habían sido utilizados para clasificar las bacterias (Woese, 1987). También se utilizó para identificar bacterias en comunidades mixtas sin necesidad de cultivo (Stahl et al. 1984).

Poco después, con el desarrollo de la PCR y la secuenciación, todo se agilizó mediante la clonación y posterior secuenciación clásica (método Sanger) del gen 16S ARNr usando cebadores universales que permiten un análisis más profundo de las comunidades microbianas (Giovannoni et al. 1990).

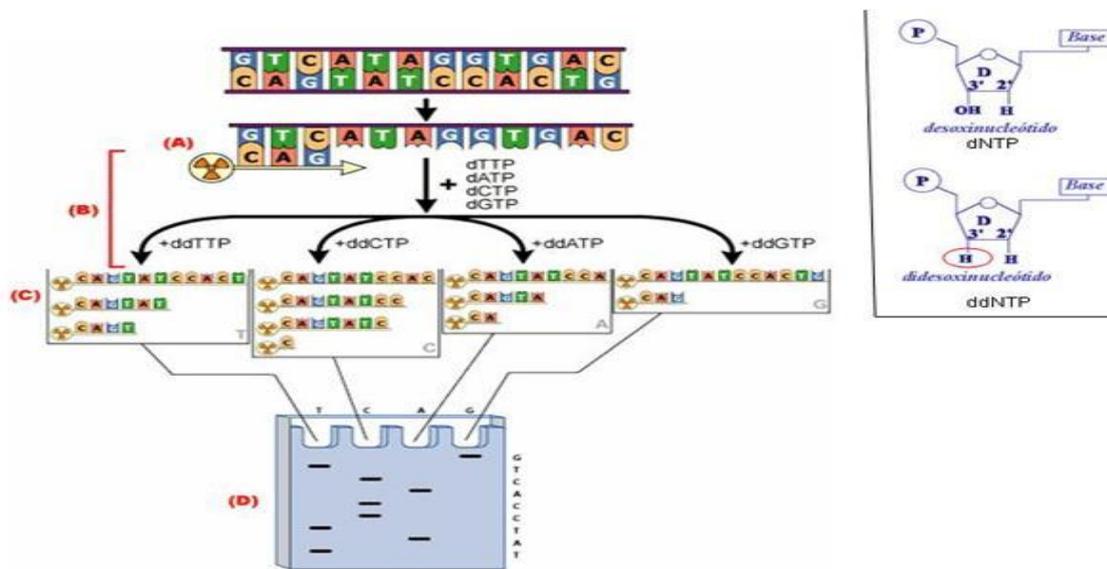


Figura 16. Método de secuenciación de Sanger (1977)

La tecnología clásica de secuenciación (Método de Sanger) fue la dominante durante dos décadas para la comparación de secuencias del gen 16S ARNr si se quería caracterizar la composición de una comunidad bacteriana hasta la entrada de los nuevos métodos de secuenciación masiva.

En los últimos años, la llegada de las ciencias ómicas, que permiten estudiar comunidades completas de microorganismos y con las técnicas de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS),

se ha llegado a la metagenómica, abriendo nuevas posibilidades para el estudio de las relaciones entre microorganismos en el campo de la microbiología (Medini et al. 2008).

El análisis taxonómico de las comunidades microbianas (Determinación de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's)) se basa en la amplificación universal del gen 16S ARNr, su posterior secuenciación por NGS y su asignamiento taxonómico de cada secuencia obtenida. De modo que de cada muestra analizada se obtiene una detallada información de su composición microbiana. Una vez asignada la composición de microorganismos de la muestra se pueden realizar análisis ecológicos entre las distintas muestras o grupos de muestras sometidas al estudio.

Para la comparación entre poblaciones microbianas de muestras o grupos de muestras distintas se emplean indicadores como la diversidad microbiana mediante índices específicos como Shannon-Wiener (H') y Chao1, además de otras comparaciones a nivel de composición taxonómica.

I.8.2. Estudio de comunidades microbianas.

Para el análisis comparativo de poblaciones bacterianas a partir de metadatos obtenidos por secuenciación masiva del gen 16S ARNr se emplean herramientas bioinformáticas que estructuran la estrategia de análisis en tres pasos claves:

1. Filtrado de calidad de las secuencias a analizar: Donde se seleccionan las secuencias que han pasado un umbral predefinido de calidad basado en calidad de lectura y longitud de secuencia.
2. Anotación taxonómica de las secuencias obtenidas: En este paso se obtiene la información taxonómica de cada muestra analizada.
3. Comparación entre las muestras sometidas a estudio: En este paso se comparan las comunidades microbianas obtenidas en cada muestra contra el resto de muestras sometidas a estudio.

Una de las herramientas bioinformáticas más importante para el estudio de comunidades microbianas es el software de libre acceso Qiime (Caporaso et al. 2010).

Aplicando estos avances en el análisis de las comunidades microbianas a las patologías humanas de origen microbiano se va a poder analizar de una manera más profunda sus implicaciones que empleando la metodología clásica basada en el cultivo.

Los principales análisis empleados en el análisis de comunidades microbianas son los análisis de alfa-diversidad y los análisis de beta-diversidad:

Alfa-diversidad: diversidad dentro de una muestra. La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea. Se pueden emplear métodos basados en la cuantificación del número de especies presentes (riqueza específica), o también en función de la estructura de la comunidad, es decir, la distribución proporcional del valor de importancia de cada especie, expresado por ejemplo como abundancia relativa. Los métodos basados en la estructura pueden a su vez clasificarse según se basen en la dominancia (Índice de Simpson, Serie de Hill) o en la equidad de la comunidad, como en el índice de Shannon-Wiener, uno de los más empleados en los estudios de microbioma humano (Pla, 2006). Este índice se representa normalmente como H' y se expresa con un número positivo.

La fórmula del índice de Shannon es la siguiente:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

S – número de especies (la riqueza de especies)

p_i – proporción de individuos de la especie “i”, respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie “i”):

n_i – número de individuos de la especie “i”

N – número total de individuos de todas las especies

De esta forma, el índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia). Adquiere valores entre cero, cuando

hay una sola especie, y el logaritmo de S , cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos.

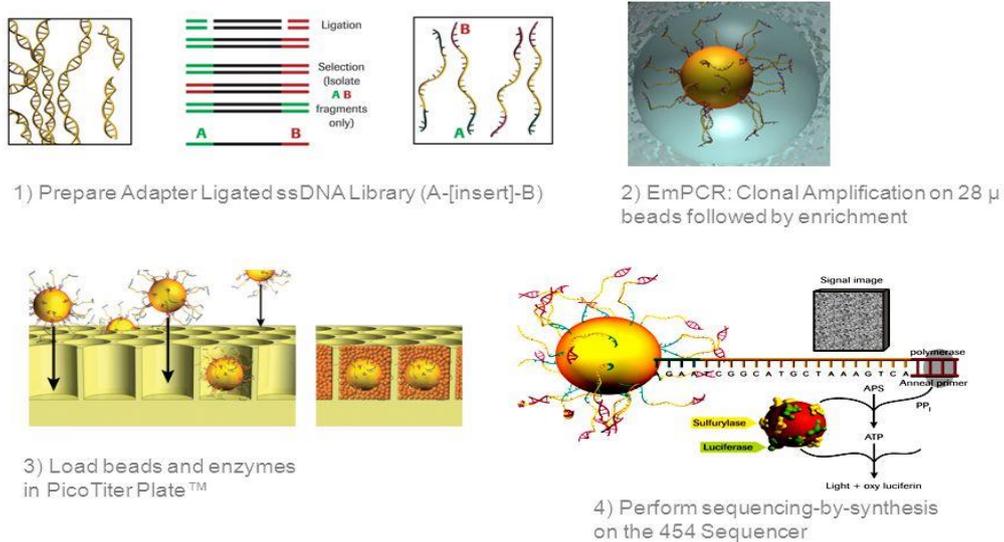
Índice de Shannon, Chao1, Simpson: son parámetros que miden la α -diversidad de una muestra. A partir de estos valores, se pueden crear las curvas de rarefacción, que representan la relación entre el número de secuencias recogidas de una muestra y el número de taxones diferentes presentes, en base a las abundancias detectadas.

Beta-diversidad: Comparación de la diversidad entre diferentes muestras. Representa la similitud o diferencia en la composición de organismos entre muestras. La diversidad beta es el grado de diferencia en la composición de especies entre distintos hábitats, comunidades o individuos, también definida como el cambio biótico a través de gradientes ambientales (Koleff et al. 2003). A diferencia de las diversidades alfa y gamma que pueden ser medidas en función del número de especies, la beta diversidad se basa en proporciones o diferencias. Se mide a través de la abundancia de composición o disimilitud mediante la distancia de Bray-Curtis (Índice de disimilitud de Bray-Curtis). El valor está comprendido entre 0 y 1, donde 0 significa que las muestras tienen la misma composición y 1 que son completamente diferentes. A partir de este índice, se pueden realizar análisis de coordenadas principales (PCoA por sus siglas en inglés), que permiten extraer y visualizar los componentes de variación más informativos de un grupo de datos complejo y multidimensional. Así, se hace una transformación de los datos presentes en una matriz de distancias a unos nuevos ejes octogonales de forma que la primera coordenada explica el mayor porcentaje de variación y así sucesivamente. El Análisis de Componentes Principales (ACP o PCA por sus siglas en inglés) es otra técnica estadística multivariable de síntesis de la información o reducción de la dimensión (número de variables), que permite encontrar los factores subyacentes que mejor explican, tras un conjunto de datos, la variabilidad de éstos.

I.8.3. Tecnologías de secuenciación masiva.

Los nuevos métodos de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación (NGS), como 454 (Roche) o illumina (Illumina), consiguen una secuenciación ultra profunda de cada muestra, pudiendo detectar la mayoría de los microorganismos presentes.

Overview of The 454 Sequencing System



CSB2008 August 2008

UCSC Sequencing Center

Figura 17. Método de secuenciación masiva de nueva generación 454 (Roche).

Illumina/Solexa

1. **Solid-phase amplification** can produce 100-200 million spatially separated clusters, providing free ends to which a universal sequencing primer can be hybridized to initiate the NGS reaction

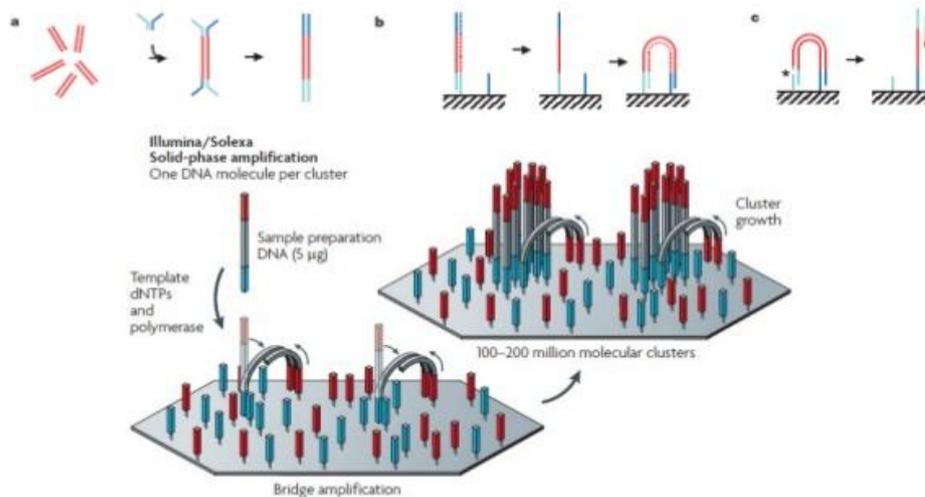


Figura 18. Método de secuenciación masiva de nueva generación Solexa (Illumina).

Desde 2006, la técnicas de secuenciación masiva se ha utilizado para explorar una gran variedad de comunidades bacterianas ambientales, siendo en 2008 cuando se empezó a estudiar en diferentes nichos del cuerpo humano, siendo el primero la microbiota gastrointestinal (Andersson, 2008). Desde entonces, se han estudiado diferentes nichos del cuerpo humano, algunos tan desconocidos y extremos como la mucosa del estómago (Delgado et al. 2012).

Aunque la metagenómica en sus primeros pasos mediante secuenciación Sanger supuso un gran hito, el enorme aumento en el número de secuencias obtenidas con estos métodos de secuenciación masiva permitió abordar mucha más diversidad. A pesar del avance que esto implica, todavía existen retos y limitaciones asociadas con la descripción de las comunidades mediante secuencias del gen 16S ARNr. Una de las limitaciones más grandes del estudio de un determinado ambiente mediante el análisis del gen 16S ARNr,

es que no aporta ninguna información funcional acerca de los microorganismos identificados.

Si se pretende obtener una visión más completa y robusta de las comunidades microbianas, se deben considerar otros abordajes complementarios que proporcionen evidencia acerca de las funciones expresadas y la actividad de las bacterias. Para este fin, se han desarrollado otras técnicas como la metatranscriptómica, que consiste en obtener información de los genes expresados de un determinado ambiente mediante la secuenciación del cDNA total de una muestra (Gosalbes et al. 2011). También, se puede llevar a cabo el estudio metaproteómico de la muestra, generalmente mediante espectrometría de masas, obteniendo información de las proteínas presentes en un ecosistema, si bien esta estrategia, tiene algunos inconvenientes en la extracción, separación e identificación (Wilmes P. & Bond, 2006).

En definitiva, el desarrollo de los métodos de secuenciación masiva nos ha permitido entrar en una era donde podemos alcanzar, con relativo esfuerzo económico, un nivel de resolución genética impensable hasta hace pocos años. Todo este flujo de información ha posibilitado nuevas metas pero también ha supuesto nuevos desafíos y nos abre las puertas al uso de otras tecnologías disponibles que se pueden adaptar a estas nuevas técnicas de secuenciación, ampliando de manera considerable el nivel de preguntas que podemos plantear, así como las respuestas a obtener, siempre y cuando seamos capaces de manejar las enormes necesidades computacionales y estadísticas asociadas a la secuenciación masiva.

I.8.4. Microbioma y microbiota. Diferencias.

Los humanos viven en simbiosis con millones de especies microbianas que habitan en las superficies externas e internas de nuestro cuerpo (Mardis, 2011).

El microbioma es el genoma colectivo y los productos genéticos de los microorganismos residentes en el cuerpo humano (bacterias, arqueas, hongos

y virus), es decir, el ecosistema que engloba todos los microorganismos de un determinado ambiente junto con las interacciones de sus genes con el ambiente. Al grupo de microorganismos formado por bacterias y arqueas se le denomina microbiota.

Se estima que el contenido genómico de las microbiotas que existen en las diferentes partes del cuerpo es 100 veces mayor que el del genoma humano. Estos microorganismos intervienen en una gran selección de funciones bioquímicas y fisiológicas que mantiene la homeóstasis del huésped en estado de salud (Mardis, 2011; Cox et al. 2013; Petrosino et al, 2009).

La microbiota humana puede variar en función de la localización, la edad y factores ambientales como la dieta. Tampoco está claro si se puede definir una microbiota común humana, ya que en diferentes regiones del cuerpo se pueden encontrar diferentes especies con distintas abundancias.

El estudio de las comunidades microbianas es muy complejo en comparación, debido a que hay gran cantidad de lagunas en el conocimiento (62% de las especies que se ha identificado en el intestino humano no se conocían, y un 80% se consideran no-cultivables).

La microbiota representa un componente clave en la medicina personalizada del futuro, en primer lugar porque se ha asociado un gran número de enfermedades con la función de la microbiota, como la obesidad, la diabetes, la depresión, la fibromialgia, el autismo y la alergia (Sekirov & Finlay, 2009).

I.8.5. Microbiota en la EPOC y justificación del estudio.

El árbol bronquial y el parénquima pulmonar son considerados estériles en sujetos sanos, pero microorganismos potencialmente patógenos se han recuperado a partir de secreciones bronquiales en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) durante los períodos de estabilidad clínica y sobretodo durante las exacerbaciones, cuando la carga bacteriana aumenta significativamente (Rosell et al. 2005; Wilkinson et al. 2003).

Ningún estudio llevado a cabo con las nuevas técnicas moleculares de detección microbiológica ha podido demostrar esta esterilidad.

Cuando el esputo se ha usado para la identificación de la colonización bronquial por MPPs en EPOC estable, se han obtenido cultivos positivos entre el 20%-75% de los pacientes y en la mayoría de los casos, se observó un único microorganismo (Sethi et al. 2002; Hill et al. 2000).

Los cultivos positivos para MPPs se han encontrado en un tercio de los pacientes con EPOC en ausencia de síntomas de infección bronquial cuando la muestra se tomó de las vías inferiores, evitando la oro-faringe bajo condiciones de esterilidad. Las bacterias más frecuentemente encontradas fueron *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Mycobacterium catarrhalis* (Rosell et al. 2005), un hallazgo que confirma la presencia de estos microorganismos en la parte inferior del árbol bronquial de los pacientes con EPOC. Dicha colonización bronquial ha sido también demostrada en muestras de lavado broncoalveolar (BAL) obtenidas a partir de pacientes con EPOC, recuperando secreciones periféricas del árbol bronquial (Chin et al. 2005; Sethi et al. 2006; Soler et al. 1999).

La mayoría de los MPPs se han cultivado a partir muestras de pacientes con EPOC estable, con una carga microbiana baja (< 100.000 UFC/ml), sin embargo, no se asocia con una respuesta inflamatoria neutrofílica (Patel et al. 2002; Wilkinson et al. 2006). Con alta carga bacteriana se encuentran casi exclusivamente *H. influenzae* y bacterias comensales (Marín et al. 2010; Marín et al. 2012).

Estos resultados confirman que los microorganismos potencialmente patógenos (MPPs) se pueden encontrar en los árboles bronquiales de algunos pacientes con EPOC. Esta colonización puede estar relacionada con las bacterias oro-faríngeas que migraron al árbol bronquial o a la microbiota que coloniza específicamente el árbol bronquial inferior (VanScoy, 1977).

Mediante las técnicas de cultivo se infradiagnostica a los pacientes con una colonización bronquial por debajo del límite de detección del cultivo de esputo, identificando una décima parte de las muestras de esputo con cultivo negativo (Murphy et al. 2004).

Actualmente se desconoce el efecto que el humo del tabaco de pacientes fumadores tiene en la microbiota pulmonar y si esta puede estar influenciada también por la zona geográfica donde se resida como así ocurre en la microbiota intestinal. Sin embargo, la microbiota de las vías respiratorias superiores sí parece estar afectada por el humo del tabaco (Dickson et al. 2013; Yatsunenکو, 2012).

El uso de métodos moleculares tales como la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen ribosómico 16S (ADNr), seguido por la clonación y secuenciación de Sanger tradicional en muestras de secreción bronquial, ha permitido la identificación de especies bacterianas no detectadas anteriormente por cultivos selectivos utilizados para la identificación de microorganismos potencialmente patógenos y, más recientemente, la aplicación técnicas como la secuenciación masiva ha llevado el estudio de la diversidad microbiana a un nivel de detalle sin precedentes (Charlson et al. 2011; Erb-Downward et al. 2011; Hilty et al. 2010).

En los estudios en los que se ha analizado la microbiota pulmonar de individuos sanos a partir de muestras de BAL, concuerdan con estudios en los que las muestras analizadas provenían de las vías respiratorias superiores (orofaríngeas o nasales), aunque con diferentes abundancias relativas (Erb-Downward et al. 2011; Sze et al. 2012). Los filos bacterianos que se han encontrado con mayor abundancia relativa han sido Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria y los géneros bacterianos más prevalentes fueron *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* y *Pseudomonas*.

Diferentes estudios que han analizado la microbiota pulmonar de los pacientes con EPOC, se han realizado en estos últimos años y la mayoría se realizaron sobre muestras de BAL, con pacientes que no presentaban signos de infección respiratoria y que no habían tomado antibióticos previamente. La principal conclusión es que la microbiota de las vías respiratorias inferiores de los pacientes con EPOC es diferente de la de los individuos sanos. Este hecho podría ser relevante para el desarrollo de la enfermedad como para la aparición de exacerbaciones de características infecciosas.

En otro trabajo realizado por Hilty y colaboradores con muestras de pacientes con EPOC y asma, comparadas con muestras de individuos sanos, encontraron que la microbiota de los pacientes con EPOC era más parecida a la de los asmáticos que a la de los individuos sanos, presentando un aumento en la abundancia de Proteobacteria y una disminución de Bacteroidetes. Los pacientes con EPOC tenían una abundancia mayor de *Haemophilus* spp. que los individuos sanos (Hilty et al. 2010).

En el estudio de Erb-Downward y su grupo, realizado mediante BAL, se comparó la microbiota de pacientes con EPOC grave frente a controles fumadores y no fumadores, observándose una menor diversidad bacteriana en los pacientes con EPOC, donde se identificaron principalmente *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* y *Haemophilus*, aunque la abundancia fue muy similar en los tres grupos. Además, observó que la microbiota se distribuye por el árbol bronquial de una forma desigual y heterogénea, lo que dificulta más la interpretación de los resultados (Erb-Downward et al. 2011).

Por el contrario, en el estudio de Pragman de 2012 sí encontró una mayor diversidad en los pacientes con EPOC que en los controles y ésta se correlacionaba de forma positiva con la gravedad de la enfermedad (Pragman et al. 2012). Sze, en el mismo año, observó la misma diversidad y abundancia microbiana en pacientes EPOC y sujetos sanos, aunque la microbiota era diferente con mayor nivel de Firmicutes en el EPOC, en muestras recogidas de tejido pulmonar (Sze et al. 2012).

En otro trabajo llevado a cabo en 2010 por el grupo de Huang, realizado en pacientes con EPOC después de una agudización se observó una gran diversidad microbiana incluso después de haber sido tratados con antibióticos (Huang et al. 2010).

Estos enfoques demuestran que existe una amplia diversidad de microorganismos en las secreciones respiratorias que no se detectan mediante cultivo (Guss et al. 2011; Galiana et al. 2014) y sugieren que el microbioma bronquial puede ser heterogéneo en la EPOC, con diferencias significativas entre las secciones bronquiales (Erb-Downward et al. 2011). Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo es identificar los microorganismos de las vías

respiratorias pulmonares en pacientes con EPOC agudizado y en fase estable, así como examinar la complejidad de la microbiota en estos pacientes, mediante el uso de la amplificación y secuenciación masiva del gen ribosómico 16S ARNr de las muestras de esputos obtenidas de dichos pacientes con EPOC para el análisis de sus comunidades microbianas.

II Hipótesis

II.HIPÓTESIS

- 1- El ecosistema microbiano en los pacientes con EPOC es complejo, formado por muchas especies diferentes de bacterias, tanto aerobias, como anaerobias o microaerófilas. Este ecosistema no es estático, sino variable en el tiempo en función de las características clínicas de cada paciente.
- 2- Estas variaciones pueden ser tanto cualitativas (en cuanto a las especies existentes), como cuantitativas (en cuanto a la carga microbiana, es decir, el porcentaje que cada especie representa respecto al total de los microorganismos presentes en la mucosa del enfermo).
- 3- La secuenciación masiva es una herramienta que posibilita el estudio de las poblaciones bacterianas presentes en la mucosa respiratoria. El análisis comparativo de la microbiota de la mucosa respiratoria de los mismos pacientes con EPOC entre las categorías clínicas estable o agudizado permitirá avanzar en el conocimiento de la composición de la microbiota de la mucosa respiratoria.

III Objetivos

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general.

Estudiar la microbiota del esputo en pacientes con EPOC agudizado y tras su posterior estabilización a través de secuenciación masiva.

III.2. Objetivos específicos.

- 1- Identificar las distintas especies bacterianas presentes en las vías respiratorias de pacientes con EPOC (pacientes con EPOC leve, moderado, grave y muy grave, además de agudizadores y no agudizadores en el último año).
- 2- Estudiar el cambio de la microbiota entre la fase de captación (en plena agudización), y tras su recuperación y estabilización.
- 3- Identificar los principales microorganismos implicados en el proceso de agudización.
4. Identificar los tipos de microbiotas respiratorias presentes en los procesos clínicos de EPOC agudizado o estable.

IV Material y métodos

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

IV.1. Diseño.

Estudio analítico observacional, en pacientes agrupados en función de la espirometría, del nº de agudizaciones en el último año y de su sintomatología, que acudieron con clínica de agudización de su EPOC. En cada uno de los grupos de pacientes, se realizó un estudio con un diseño pre-post comparando las diferencias en fase de agudización y en fase estable tras la recuperación de la agudización, en cuanto a la flora microbiana.

IV.2. Población de estudio.

Pacientes diagnosticados de EPOC de acuerdo con la normativa internacional ($FEV1/FVC < 70\%$), de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión y de exclusión:

Criterios de inclusión:

- Edad >35 años.
- Diagnóstico de la EPOC: $FEV1/FVC < 70\%$ en la espirometría post-broncodilatación.
- Capacidad para producir esputo espontáneo.

Criterios de exclusión:

- Consumo de antibióticos en el mes previo a la toma de muestra.
- Presencia de asma u otra enfermedad respiratoria crónica que justifique el trastorno respiratorio.
- Bronquiectasias difusas no asociadas a la EPOC.
- Presencia de neoplasia o comorbilidades muy graves que no permitan la realización de las pruebas.

60 pacientes fueron incluidos en el estudio. A cada uno de estos 60 pacientes se le tomó una muestra de esputo espontáneo de calidad, según los criterios microbiológicos establecidos. 118 de los 120 esputos fueron considerados con calidad suficiente para poder ser sometidas a los análisis bioinformáticos. Los dos esputos con calidad insuficiente pertenecieron a la fase de estabilización.

En 5 casos no fue posible la obtención variables clínicas. Para el análisis entre las muestras agudizadas en global, se incluyeron las 118 muestras, y para el análisis en función del deterioro funcional, sintomatología y el riesgo de desarrollar exacerbaciones (fenotipo exacerbador o no en base al nº de exacerbaciones el año previo), solo se incluyeron las muestras procedentes de los 55 pacientes con información clínica.

IV.3. Recogida y análisis de los datos.

La información de los pacientes se recogió por los propios facultativos de los Centros de Salud o de los centros Hospitalarios mediante un formulario específico.

El criterio diagnóstico de confirmación de la EPOC fue definido por un cociente FEV1/FVC <70% hallado en una espirometría tras prueba broncodilatadora en fase estable (Vestbo et al. 2013; Miravittles et al. 2014). Se buscó este dato para cada paciente, anotando asimismo la fecha de la espirometría comprobando que estaba hecha en los últimos 2 años, como dato de buen seguimiento (Soler-Cataluña et al. 2009).

Las muestras respiratorias fueron analizadas mediante técnicas de metagenómica para detectar la presencia del ADN total bacteriano según el protocolo de trabajo descrito a continuación.

IV.4. Protocolo de trabajo.

IV.4.1. Obtención de muestras y procesamiento de muestras:

Las muestras de esputo se obtuvieron mediante expectoración espontánea de buena calidad microbiológica. Las muestras se congelaron en la primera hora tras su obtención a -20°C y se almacenaron hasta su traslado al Biobanco H Alicante en hielo seco.

Una vez recibidas en el Hospital de Alicante, el esputo se homogeneizó con N-acetilcisteína y se dividió en dos partes, una para el estudio de cara a la extracción de los ácidos nucleicos en el Hospital de Alicante y otra para almacén en el Biobanco.

Como control de calidad de la muestra se realizó una tinción de Gram de la muestra y análisis microscópico. Sólo se consideraron para el estudio aquellos esputos que en la escala de Barlet obtuvieron como mínimo un valor de G4 (observación de más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo).

IV.4.2. Extracción de ácidos nucleicos (Hospital de Alicante):

La extracción de ácidos nucleicos totales de cada muestra de esputo se realizó con el extractor automatizado MagnaPure (Roche) con el kit de extracción "Total nucleic acid isolation kit". Previo al proceso de extracción de ácidos nucleicos los esputos fueron pretratados con un igual volumen de N-acetilcisteína para reducir la viscosidad del moco y para el proceso de extracción de ácidos nucleicos se empleó un volumen de 0.5 ml.

IV.4.3. Secuenciación del microbioma bacteriano representado en muestra de esputo de pacientes con EPOC:

El ADN obtenido de la extracción de cada muestra sometida a estudio se secuenció masivamente con el fin de obtener la composición de su microbioma. Para la secuenciación de los microbiomas de esputo, se sintetizó una librería de amplicones del gen 16s rRNA para cada muestra (459 bp) y que comprendían las regiones de hipervariabilidad V3 y V4 empleando unos cebadores universales para dicho gen. El protocolo empleado para este proceso es el descrito por Klindworth et al. publication (Klindworth et al. 2013). Durante la síntesis por PCR de cada una de las librerías de ampliaciones, se introdujeron los adaptadores con los identificadores específicos para cada muestra necesarios para la posterior asignación de las secuencias. La reacción de secuenciación fue del tipo pair-end 2x300 y se llevó a cabo por la empresa Stab Vida (Caparica, Portugal) en un secuenciador masivo Illumina miseq. El proceso de secuenciación masiva empleando la tecnología Illumina miseq se divide en cuatro etapas:

1. Síntesis de la librería de amplicones de interés: Se realiza por PCR y consiste en el enriquecimiento en la muestra de un fragmento del gen 16s rRNA de todos los microorganismos presentes en la muestra de esputo. Al mismo tiempo se inserta en la secuencia un identificador conocido (secuencia de ADN) específica para cada muestra.

2. Generación del clúster de moléculas de ADN a secuenciar: Cada molécula de cadena sencilla de ADN sometida a secuenciación se inmoviliza por un extremo en un soporte sólido donde se amplifica por una “amplificación puente” consiguiendo así sintetizar un cluster de moléculas (50% son moléculas de la hebra + y el otro 50% de la hebra -) totalmente idénticas, necesario previo a la secuenciación.

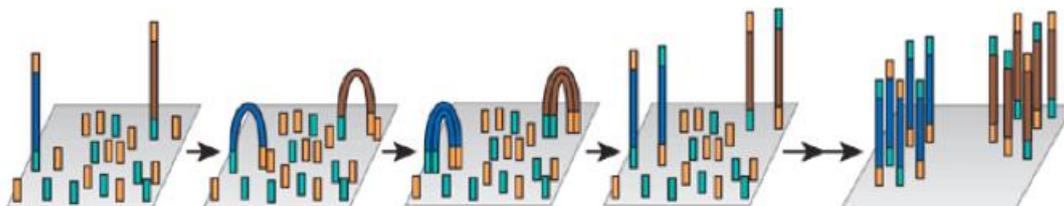


Figura 19. Detalle de la amplificación en puente en la superficie de cristal y creación de las agrupaciones de ADN. Método de secuenciación masiva de nueva generación Solexa (Illumina).

3. Secuenciación por Síntesis: Cada una de las moléculas de cadena sencilla que forman el cluster se secuencian por ciclos repetidos a los que se les va añadiendo un terminador concreto. En cada ciclo se añaden 4 terminadores conocidos y marcados de manera distinta para conocer en todo momento que secuencia se ha añadido al cluster de moléculas que se están secuenciando. Después de cada ciclo, se eliminan los terminadores que no se han incorporado a la molécula y se lee con un lector laser que terminador es el que se ha incorporado.

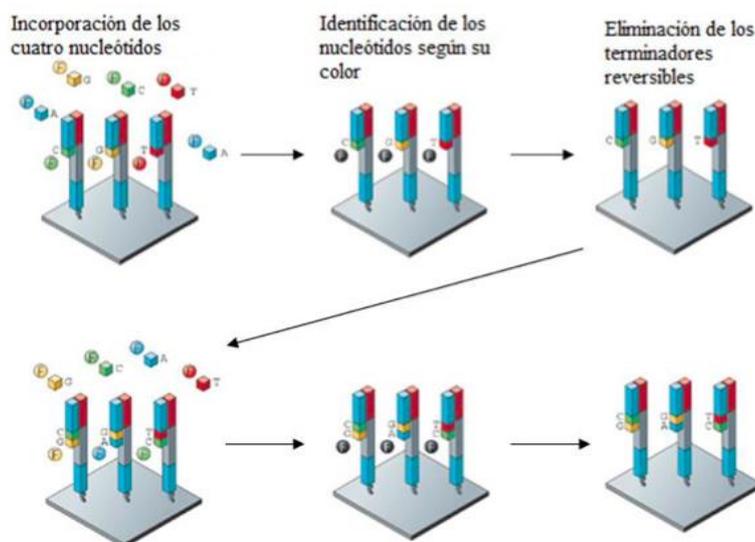


Figura 20. Secuenciación masiva de nueva generación Solexa (Illumina). Se añaden los cuatro nucleótidos con los extremos 3' bloqueados y unidos a un marcador fluorescente, que compiten entre sí para unirse complementariamente a la secuencia.

4. Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas: Previo al análisis de las comunidades microbianas que componen la microbiota del esputo, se hizo un filtrado por tamaño y calidad de las secuencias obtenidas por Illumina miseq empleando el software bioinformático Qiime 1.80. Una vez eliminadas las secuencias de baja calidad y secuencias quiméricas (derivadas de productos aberrantes producidos por PCR) y realizado el proceso de “end-trimming” > 25 de cada secuencia, se procedió al ensamblaje de secuencia para obtener fragmentos de aproximadamente 250-400 bp y la asignación de lecturas a cada muestra.

IV.4.4. Análisis ecológico de las comunidades microbianas identificadas en esputo.

El análisis ecológico de las comunidades que forman la microbiota del esputo de pacientes con EPOC se realizó también con el software Qiime 1.80. Para ello las secuencias asignadas a cada paciente se anotaron a nivel taxonómico desde Filum hasta Género empleando para ello la última versión disponible de la base de datos “Ribosomal Database Project”.

Una vez realizada la asignación taxonómica (OTU, Operational Taxonomic Unit) se realizaron los estudios de alfa y beta diversidad atendiendo a distintas variables donde también se incluyeron los índices de riqueza y de biodiversidad Chao1 y Shannon-Weinner.

IV.4.5. Detección de virus respiratorios.

Debido a que uno de los factores implicados en la agudización de los pacientes con EPOC es la infección por virus respiratorios, se procedió a la identificación de los virus respiratorios más frecuentes (Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, Metapneumovirus, Rhinovirus, Enterovirus y Coronavirus OC43). Para ello se empleó la metodología descrita por Brittain-Long et al, 2008 (Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections).

IV.4.6. Identificación molecular de *Haemophilus* NTHI.

La identificación molecular de cepas bacterianas del tipo *Haemophilus* NTHI se realizó a partir de los ácidos nucleicos totales aislados a partir de esputo, siguiendo el protocolo de trabajo descrito por Parameswaran et al. (2011).

IV.5. Variables.

De acuerdo a las dos últimas revisiones de la guía GOLD (Vestbo et al. 2013) los pacientes EPOC se clasificaron considerando no solo en cuanto a su deterioro funcional, sino también a su sintomatología y al riesgo de desarrollar exacerbaciones.

Los pacientes fueron categorizados en 4 grados en cuanto a su deterioro funcional, en función de la obstrucción bronquial basada en los datos obtenidos en el FEV1 de la última espirometría, de acuerdo a la guía internacional GOLD (Vestbo et al. 2013):

- Grado 1: $\geq 80\%$.
- Grado 2: $\geq 50 - < 80\%$.
- Grado 3: $\geq 30 - < 50\%$.
- Grado 4: $< 30\%$.

El riesgo de desarrollar exacerbaciones (Fenotipo exacerbador) se determinó por los antecedentes de exacerbaciones en el año anterior de evaluación (menos de 2 o ≥ 2 , respectivamente).

El concepto Agudización de la EPOC (AEPOC), se definió como un cambio agudo en la situación clínica basal del paciente, más allá de la variabilidad diaria, que cursa con aumento de la disnea, de la expectoración y expectoración purulenta, o cualquier combinación de estos 3 síntomas, y que precisó un cambio terapéutico. Las AEPOC de carácter leve, son aquellas que no necesitan modificación terapéutica sustancial y normalmente no solicitan consulta médica, por lo tanto no quedan registradas. De esta forma, en el presente estudio únicamente se valoraron las agudizaciones moderadas y graves (a las que denominamos 'agudizaciones totales'). Así pues, tanto el tipo de las agudizaciones registradas como sus definiciones fueron las mismas que las usadas en el estudio ECLIPSE (Hurst et al. 2010). La AEPOC moderada conllevó la prescripción de un antibiótico y/o un corticoide sistémico y la de carácter grave supuso un ingreso hospitalario de más de 24h (Burge et al. 2003; Wedzicha & Seemungal, 2007).

Se definió el concepto de 'Fenotipo Agudizador' (FA), como la característica clínica de aquel paciente que presentara al menos 2 agudizaciones en un año, similar al de 'Agudizador Frecuente', usado en las principales guías nacionales e internacionales (Wedzicha & Seemungal, 2007; Hurst, 2010; Clinical GesEPOC, 2012; Vestbo et al. 2013). Igualmente fue 'Fenotipo No Agudizador' (FNA), sinónimo de 'Agudizador Infrecuente', aquel que tuvo una agudización o ninguna en un año.

Cada agudización debió estar separada al menos, 4 semanas desde la finalización del tratamiento de la agudización previa para diferenciar un nuevo evento de un fracaso terapéutico anterior.

Para establecer la importancia de la sintomatología, se utilizó la escala modificada de disnea del mMRC (poco sintomáticos cuando mMRC < 2 y muy sintomáticos cuando mMRC ≥ 2) o el cuestionario de calidad de vida CAT (poco afectados si CAT < 10 y muy afectados si CAT ≥ 10).

La escala de disnea mMRC (Bestall et al. 1999) es un instrumento que establece la gravedad de la disnea en relación con diversas tareas físicas. Consta de 5 ítems y su valor se establece en un rango de 0 (no disnea o solo con grandes esfuerzos) a 4 (disnea de reposo).

El cuestionario CAT (Jones et al. 2009) es una herramienta para valorar la calidad de vida de los pacientes con EPOC, autoaplicable. Consta de 8 ítems, de los que se obtiene una puntuación de 0 a 40; a mayor puntuación, peor estado de salud y peor calidad de vida.

Recientemente, la Global Initiative for Asthma (GINA) y la GOLD publicaron un documento conjunto acuñando el término “síndrome de superposición asma–EPOC” (SAOC) (o ACOS por las sigas del inglés), que se emplea cuando una persona tiene características clínicas tanto de asma como de EPOC. Esta superposición ha sido asociada a un peor pronóstico en cuanto a morbilidad y mortalidad en los pacientes (Lange et al. 2016; Postma DS & Rabe, 2015). En el presente estudio se recogió el diagnóstico concomitante de asma.

Asimismo, se estudiaron otros aspectos sociodemográficos, clínico-terapéuticos y de comorbilidad:

1. Índice de masa corporal (IMC): peso/altura^2 (kg/metros²). Tomando en consideración la clasificación de la OMS (WHO, 2000):
 - Bajopeso: IMC <18,5.
 - Normopeso: IMC 18,5-24,9.
 - Sobrepeso: IMC 25-29,9.
 - Obesidad: IMC ≥30.

2. Hábito tabáquico: consumo activo y estable de tabaco.
 - Fumador activo: consumo activo durante el último año.
 - Exfumador: consumo finalizado hace más de año.
 - No fumador: nunca consumidor de tabaco.
 - a. Intensidad del hábito tabáquico: en base a la unidad paquete(s)/año registrada.
 - b. N° de años sin fumar en exfumadores.
3. Las siguientes comorbilidades prevalentes fueron consideradas: diabetes mellitus, insuficiencia cardiaca, hipertensión arterial, hiperlipemia, depresión, enfermedad por reflujo gastro esofágico (ERGE). (DeMiguel et al. 2010; Clinical GesEPOC, 2012).
4. Tratamiento inhalador basal de cada paciente; para lo cual debía haberse prescrito de forma habitual para la enfermedad, durante al menos los 6 meses anteriores al reclutamiento del paciente.
 - SABA: broncodilatadores β_2 de acción corta.
 - SAMA: anticolinérgicos de acción corta.
 - LABA: broncodilatadores β_2 de acción larga.
 - LAMA: anticolinérgicos de acción larga.
 - CI: corticoides inhalados.

IV.6. Estrategia de análisis de resultados.

El análisis de datos incorporó un análisis descriptivo inicial de las principales variables independientes de la muestra. Para las variables categóricas y discretas se estimaron proporciones con sus correspondientes intervalos de confianza al 95%, según el método de Wilson, utilizando la prueba ji-cuadrado de Pearson para realizar comparaciones, o alternativamente el test exacto de Fisher cuando más del 20% de las casillas presentaron un número de casos esperados menor o igual a 5. Para las variables continuas se estimaron medias con su desviación estándar o medianas y rangos intercuartílicos en caso de distribuciones asimétricas. Se comprobó previamente la condición de

normalidad mediante la prueba de Saphiro-Wilk. Se utilizaron los test t de Student o ANOVA para analizar la relación entre variables cuantitativas y variables categóricas con 2 niveles, o variables categóricas con más de 2 niveles, respectivamente. Todos estos análisis estadísticos clásicos se hicieron con el paquete SPSS v22.0 de IBM. El error alfa se fijó en 0,05 y todas las p fueron bilaterales.

Teniendo en cuenta los diferentes estados clínicos de los pacientes para cada muestra (EPOC Estable o Agudizado), se protocolizó una primera estrategia de análisis de resultados en microbioma predefinida, para lo cual se realizaron comparaciones entre las variables clínicas (deterioro funcional, sintomatología y riesgo de desarrollar exacerbaciones) y los distintos índices de diversidad bacteriana, usando las pruebas de ANOVA y G-test de independencia. El análisis de alfa diversidad se realizó mediante el cálculo de las curvas de rarefacción y el índice de Shannon (H') usando el software informático R v 2.15.2 (<http://R-project.org>). La Beta diversidad se analizó mediante el análisis de coordenadas principales (PcoA por sus siglas en inglés).

En una segunda estrategia de análisis, se identificaron los clusters a través del Análisis de Componentes Principales (ACP) que tenían un microbioma de similar composición. Una vez definidos estos clusters, se estudió en que medida las variables clínicas (deterioro funcional, sintomatología y riesgo de desarrollar exacerbaciones) u otro tipo de variables podrían asociarse con los diferentes clusters, también en los dos estados clínicos “Agudizado” y “Estable”.

IV.7. Consideraciones éticas.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Ético en Investigación Clínica de Cantabria.

A todos los participantes del estudio, de acuerdo a la declaración de Helsinki, se les ofreció una hoja de información al paciente y un consentimiento informado detallado y específico para las técnicas de obtención de muestras previamente a su inclusión en el estudio. Se informó de que no participación en el proyecto en ningún caso afectaría al acceso a un tratamiento de alta calidad que consistió en el ofertado de forma habitual en el Hospital o Centro de Salud con independencia de la participación o no en el estudio.

Los datos fueron anonimizados y tratados de un modo confidencial con arreglo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Se mantuvo la confidencialidad de la información con arreglo a la Ley 41/2002, de 14 de Noviembre y la Ley de Cantabria 7/2002, 10 de Diciembre, de Ordenación Sanitaria de Cantabria y se aplicó la legislación vigente en materia de investigación biomédica y tratamiento de las muestras biológicas de origen humano (Ley de Investigación Biomédica 14/2007, RD 1716/2011 de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano).

V Resultados

V. RESULTADOS

V.1. Características de los pacientes EPOC (al menos un esputo de calidad analizado).

V.1.1. Edad, hábito tabáquico y peso-IMC de los pacientes a estudio.

En la tabla 1 se presentan las variables edad, hábito tabáquico y peso-IMC de la muestra a estudio, en función del sexo.

La muestra incluyó a 55 pacientes con información clínica, de los cuales 42 (76,4%) fueron hombres. La edad media global fue de 73,33 años [DE=10,27]. Los hombres fueron en promedio 14,83 años mayores, IC95% (9,66-20,01), $p < 0,001$.

El 45,5% de la muestra tuvo \leq a 75 años, y el 54,5% tenían más de 75 años cuando se les tomó la muestra. La mediana fue de 77 años.

Respecto al hábito tabáquico, se encontraron grandes diferencias en función del sexo $p < 0,001$ - Las mujeres fueron en mayor % no fumadoras (15,4%) que los hombres (4,8%) o fumadoras actuales (53,8% frente a un 4,8% de hombres fumadores actuales). El 90,5% de los hombres había abandonado el hábito tabáquico frente a un 30,8% de exfumadoras entre las mujeres.

Respecto al peso-IMC, un 15,4% de las mujeres y un 2,4% de los hombres tuvieron un IMC $< 18,5$ (Bajopeso). Un 38,5% de las mujeres y un 38,1% de los hombres fueron obesos de acuerdo al IMC. El 23,1% de mujeres y el 40,5% de

los hombres tuvieron sobrepeso. Estas diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística ($p=0,263$).

Tabla 1. Edad, hábito tabáquico y peso-IMC de los pacientes, en función del sexo.

	Hombres		Mujeres		Total		<i>Valor p</i>
	N	%columna	N	%columna	N	%columna	
	42	76,4	13	23,6	55	100	
Edad. Media [DE]	76,83	7,90	62,00	8,88	73,33	10,27	<i><0,001</i>
Fumador							
No fumador	2	4,8%	2	15,4%	4	7,3%	<i>0,000</i>
Ex fumador	38	90,5%	4	30,8%	42	76,4%	
Fumador activo	2	4,8%	7	53,8%	9	16,4%	
Peso-IMC. Media [DE]	29,01	4,99	26,88	6,24	28,51	5,33	<i>0,210</i>
Normopeso (18,5-24,9)	8	19,0%	3	23,1%	11	20,0%	<i>0,263</i>
Sobrepeso (25-29,9)	17	40,5%	3	23,1%	20	36,4%	
Obesidad (≥ 30)	16	38,1%	5	38,5%	21	38,2%	
Bajopeso ($<18,5$)	1	2,4%	2	15,4%	3	5,5%	

V.1.2. Variables clínicas.

En la tabla 2 se presentan las características clínicas de los pacientes EPOC, en función del sexo.

La media de agudizaciones en el total de la muestra en los 12 meses anteriores a la toma de muestras fue de 1,75 [DE=1,66]. El 50,9% tuvo al menos 2 agudizaciones el año previo (fenotipo agudizador), en relación al sexo el % con fenotipo agudizador fue ligeramente superior en hombres (54,8%) que en mujeres (38,5%).

El 29,1% de los EPOC, había presentado al menos una agudización grave (hospitalización por AEPOC) el año previo, siendo las agudizaciones graves más prevalentes en hombres que en mujeres.

En cuanto a la gravedad de la EPOC en función de los grados GOLD en base al FEV1, la mayoría de los pacientes (52,7%) presentaron un grado 2 (moderado) de EPOC o un grado 3 (grave) (41,8%). Únicamente dos pacientes (ambas mujeres) presentaron un grado 1 (leve), y únicamente un paciente (hombre) presentó un grado 4 (muy grave).

En cuanto a sintomatología determinada a través del cuestionario mMRC, el 27,3% puntuaron por debajo de 2 (poco sintomáticos) y el 72,7% puntuaron al menos 2 puntos (Muy sintomáticos). Las puntuaciones ≥ 2 puntos fueron más prevalentes en hombres (78,6%) que en mujeres (53,8%), p 0,064.

En cuanto a afectación determinada a través del cuestionario CAT, el 96,4% puntuaron al menos 10 puntos (Muy afectados). El promedio de puntuación en mujeres fue de 23,54 puntos (DE=6,45), ligeramente mayor a los hombres (media=18,31, DE=6,22), puntuando todas ellas al menos 10 puntos.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes EPOC, en función del sexo.

	Hombres		Mujeres		Total		Valor p
	N	%columna	N	%columna	N	%columna	
	42	76,4	13	23,6	55	100	
Agudizaciones totales año previo							
Media [DE]	1,81	1,66	1,54	1,71	1,75	1,66	0,611
Nº Agudizaciones año previo (Fenotipo)							
No Agudizador (< 2)	19	45,2%	8	61,5%	27	49,1%	0,304
Agudizador (≥ 2)	23	54,8%	5	38,5%	28	50,9%	
Agudizaciones graves año previo (hospitalización por AEPOC)							
Media [DE]	0,50	0,80	0,15	0,38	0,42	0,74	0,038
Nº Agudizaciones graves (hospitalización por AEPOC) el año previo							
Ninguna	28	66,7%	11	84,6%	39	70,9%	0,304
Una (1)	8	19,0%	2	15,4%	10	18,2%	
Dos o más (≥2)	6	14,3%	0		6	10,9%	
Ultimo FEV1 (%)							
Media [DE]	52,47	13,55	57,54	16,97	53,67	14,43	0,272
Gravedad GOLD (FEV1)							
Grado 1 (≥80%)	0		2	15,4%	2	3,6%	0,064
Grado 2 (≥50-80%)	22	52,4%	7	53,8%	29	52,7%	
Grado 3 (≥30-49,9%)	19	45,2%	4	30,8%	23	41,8%	
Grado 4 (<30%)	1	2,4%	0		1	1,8%	
mMRC. Media [DE]							
Poco sintomáticos (< 2)	9	21,4%	6	46,2%	15	27,3%	0,064
Muy sintomáticos (≥ 2)	33	78,6%	7	53,8%	40	72,7%	
CAT. Media [DE]							
Poco afectados (< 10)	2	4,8%	0	0,0%	2	3,6%	0,423
Muy afectados (≥ 10)	40	95,2%	13	100,0%	53	96,4%	

V.1.3. Comorbilidades.

En la tabla 3 se presentan las comorbilidades de los pacientes EPOC, en función del sexo.

Las comorbilidades más prevalentes en la muestra fueron la HTA (presente en el 61,8% de los pacientes), y la Hiperlipemia, presente en el 50%.

9 pacientes (16,45%) tuvieron el diagnóstico de asma, pudiendo considerarse ACOS según la definición descrita en la metodología. La prevalencia de este diagnóstico fue superior en mujeres: 6 mujeres (46,2%) frente a 3 hombres (7,1%), $p=0,001$.

La depresión fue más prevalente asimismo en las mujeres de la muestra (la prevalencia en mujeres fue del 61,5% frente al 7,1% en hombres, $p<0,001$). El resto de comorbilidades estudiadas fueron más prevalentes en hombres.

Tabla 3. Comorbilidades de los pacientes EPOC, en función del sexo.

	Hombres		Mujeres		Total		Valor p
	N	%columna	N	%columna	N	%columna	
	42	76,4	13	23,6	55	100	
Asma							
No	39	92,9%	7	53,8%	46	83,6%	0,001
Si	3	7,1%	6	46,2%	9	16,4%	
Insuficiencia cardiaca							
No	27	64,3%	13	100,0%	40	72,7%	0,012
Si	15	35,7%	0	0,0%	15	27,3%	
Hipertensión arterial							
No	14	33,3%	7	53,8%	21	38,2%	0,183
Si	28	66,7%	6	46,2%	34	61,8%	
Diabetes							
No	32	76,2%	11	84,6%	43	78,2%	0,520
Si	10	23,8%	2	15,4%	12	21,8%	
Depresion							
No	39	92,9%	5	38,5%	44	80,0%	<0,001
Si	3	7,1%	8	61,5%	11	20,0%	
ERGE							
No	37	88,1%	12	28,6%	49	116,7%	0,670
Si	5	11,9%	1	2,4%	6	14,3%	
Hiperlipemia							
No	28	66,7%	6	14,3%	34	81,0%	0,183
Si	14	33,3%	7	16,7%	21	50,0%	

V.1.4. Tratamientos

En la tabla 4 se presenta el tipo de tratamiento prescrito de forma habitual para la enfermedad, durante al menos los 6 meses anteriores al reclutamiento del paciente.

Los LAMA y LABA fueron prescritos en el 81,8% y 80% respectivamente de los pacientes, sin diferencias significativas en cuanto a sexo.

Los corticoides inhalados fueron prescritos en el 65,5% de los pacientes. Por último, los broncodilatadores de acción corta fueron asimismo prescritos por el facultativo en el 47,3% de los pacientes.

Tabla 4. Tratamientos de los pacientes EPOC, en función del sexo.

	Hombres		Mujeres		Total		Valor p
	N	%columna	N	%columna	N	%columna	
	42	76,4	13	23,6	55	100	
SAMA&SABA							
No	20	47,6%	9	69,2%	29	52,7%	0,173
Si	22	52,4%	4	30,8%	26	47,3%	
Corticoides inhalados							
No	15	35,7%	4	30,8%	19	34,5%	0,510
Si	27	64,3%	9	69,2%	36	65,5%	
LAMA^c							
No	6	14,3%	4	30,8%	10	18,2%	0,178
Si	36	85,7%	9	69,2%	45	81,8%	
LABA^d							
No	8	19,0%	3	23,1%	11	20,0%	0,751
Si	34	81,0%	10	76,9%	44	80,0%	

^a SAMA: anticolinérgicos de acción corta.

^b SABA: broncodilatadores β_2 , de acción corta.

^c LAMA: anticolinérgicos de acción larga.

^d LABA: broncodilatadores β_2 , de acción larga.

V.2. Análisis bioinformático de la microbiota de la mucosa respiratoria.

V.2.1. Características en cuanto a la calidad de las muestras empleadas para el estudio de microbiota.

Se analizó la microbiota de 120 muestras de esputo pertenecientes a los pacientes incluidos en el estudio (tabla 5). De las cuales, finalmente se obtuvo un

total de 118 muestras de esputo con calidad suficiente para poder ser sometidas a los análisis bioinformáticos pertinentes.

Se obtuvieron un total de 186.914 secuencias post-ensamblaje de las secuencias, pertenecientes al gen 16SrRNA de un tamaño aproximado entre 350 pb y 500 pb que comprendían las regiones de hipervariabilidad genética del gen 16SrRNA V1-V2 (Figura 21). Los datos de las secuencias medias obtenidas por muestra y muestras finales presentes en las muestras categorizadas según los estados clínicos “Estable” o “Agudizado” se muestran en la Tabla 5.

Todos los resultados de alfa y beta diversidad mostrados en este estudio se realizaron a una profundidad de 1.000 iteraciones por muestra

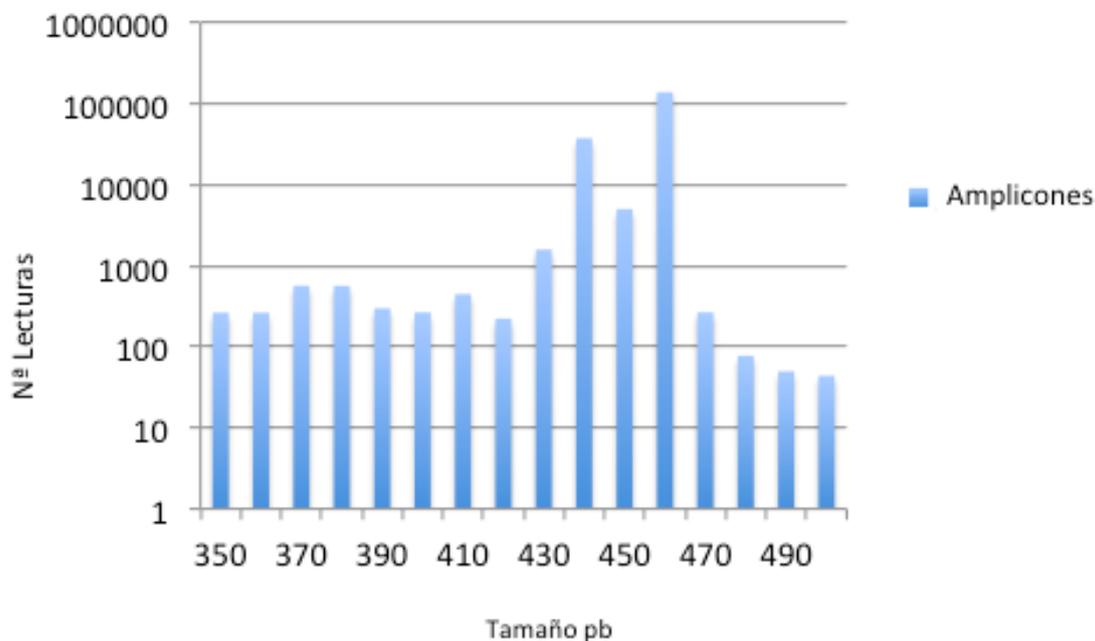


Figura 21. Histograma de frecuencia del tamaño del amplicón empleado para la clasificación taxonómica.

Tabla 5. Datos bioinformáticos de las muestras incluidas en el estudio.

	Muestras		
	Agudizado	Estable	Total
Nº muestras	60	58	118
Lecturas	99.267	87.647	186.914
Nº secuencias medio	1.654	1.511	

Atendiendo a los resultados de rarefacción de cada una de las categorías clínicas “Estable” o “Agudizado”, se observó que la profundidad obtenida por la técnica de secuenciación masiva empleada (Illumina mi-seq) fue lo suficientemente profunda para cada uno de los grupos obteniéndose una secuenciación casi por completo de todas las secuencias presentes en cada categoría. En la Figura 22 se muestran los resultados de rarefacción.

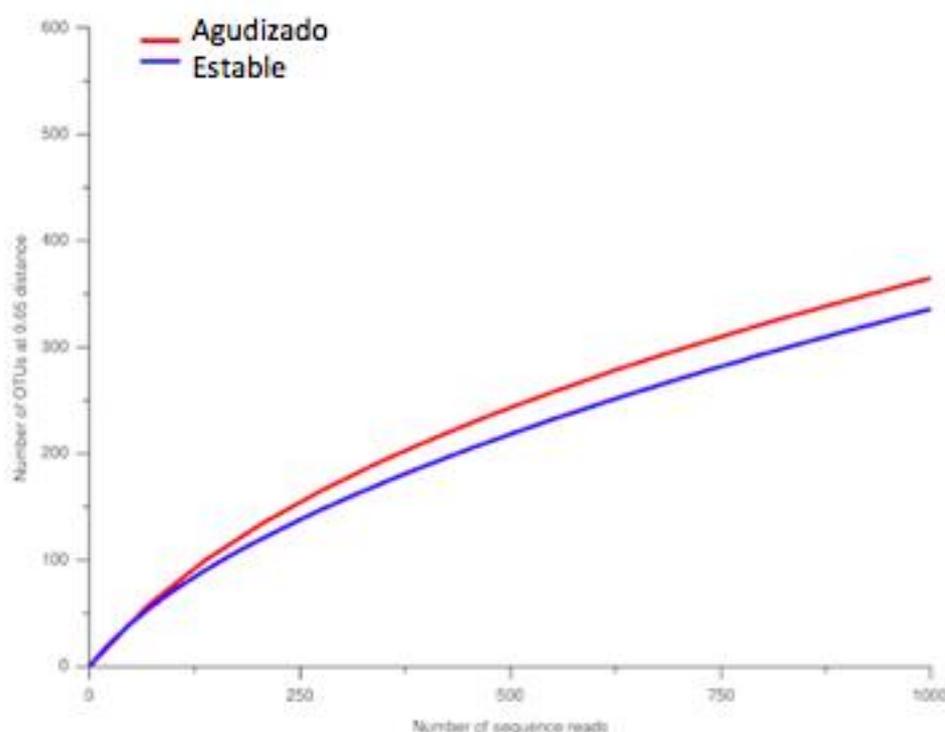


Figura 22 Curvas de rarefacción para las categorías clínicas “Estable” y “Agudizado”.

V.2.2. Análisis de la microbiota según la categorías clínica de “Estable” y “Agudizado”.

Atendiendo a los resultados mostrados por el análisis de componentes principales, en las muestras de la categoría clínica “Estable” se identificó un cluster compacto donde se encuentran todas las muestras de esta categoría, mostrando una composición similar de microbiota.

Por el contrario, en la composición de la microbiota de la mucosa respiratoria para la categoría clínica “Agudizado”, se identificaron hasta la presencia de 4 clústeres distintos, indicando la presencia de varios tipos de microbiota distinta. El Análisis de Componentes Principales y la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano para las categorías “Estable” y “Agudizado”, se muestran en la Figura 23.

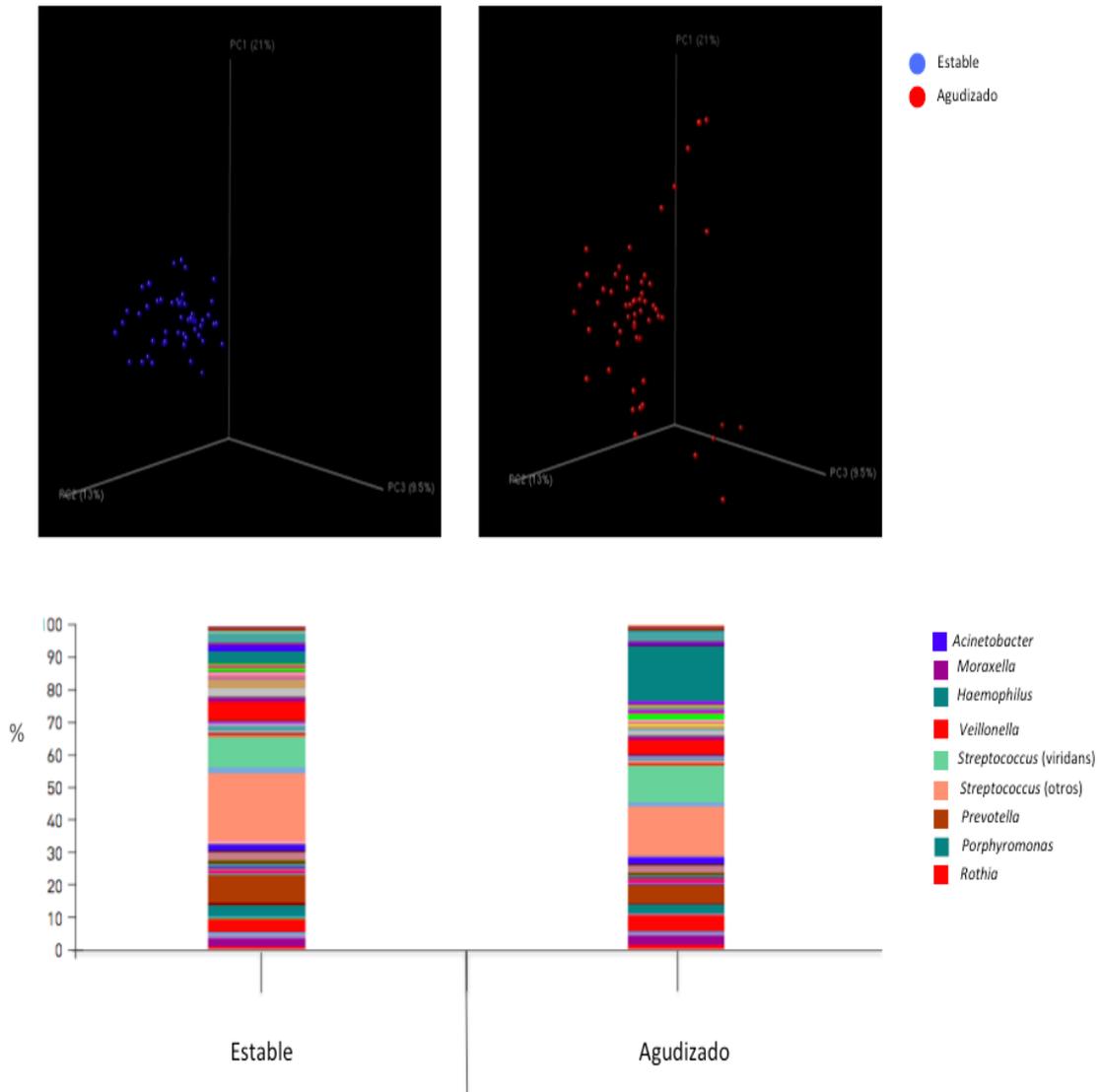


Figura 23. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, para las categorías clínicas “Estable” y “Agudizado”.

Las abundancias relativas (AR) de los géneros bacterianos (OTU) por encima de un valor de 0,01 identificados en cada una las categorías “Estable” o “Agudizado” y los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1) y su comparación entre las categorías se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. OTU's, Abundancia Relativa (AR), índice de Shannon-Wiener (H'), índice de riqueza (Chao1) y su comparación entre las categorías clínicas "Estable" y "Agudizado".

	OTU	AR	H'	Chao1
Estable	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,2082		
	<i>Streptococcus (Viridans)</i>	0,0893		
	<i>Prevotella</i>	0,0862		
	<i>Veillonella</i>	0,0529		
	<i>Rothia</i>	0,0425		
	<i>Haemophilus</i>	0,0375		
	<i>Porphyromonas</i>	0,0348	2,68	35,31
	<i>Pseudomonas</i>	0,0316		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0303		
	<i>Fusobacterium</i>	0,0216		
	<i>Oribacterium</i>	0,0165		
	<i>Acinetobacter</i>	0,0161		
	<i>Atopobium</i>	0,0133		
	<i>Neisseria</i>	0,0124		
Agudizado	<i>Haemophilus</i>	0,1700		
	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,1521		
	<i>Streptococcus (Viridans)</i>	0,1116		
	<i>Prevotella</i>	0,0578		
	<i>Rothia</i>	0,0499		
	<i>Veillonella</i>	0,0430		
	<i>Porphyromonas</i>	0,0291	2,42	28,23
	<i>Pseudomonas</i>	0,0281		
	<i>Neisseria</i>	0,0172		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0153		
	<i>Fusobacterium</i>	0,0133		
	<i>Capnocytophaga</i>	0,0120		
	<i>Atopobium</i>	0,0112		
	<i>p-valor</i>			0,035

La microbiota fue menos diversa en las muestras de los pacientes agudizados (H'= 2,42, Chao1= 28,23) si se compara con los índices de biodiversidad de las muestras de los pacientes en estado estable (H'= 2,68, Chao1= 35,31) donde

la microbiota fue más diversa. Las diferencias en estos índices alcanzaron significación estadística, tanto para la comparación los índices de biodiversidad H' : $p=0,035$ como Chao1: $p=0,013$, además de en la AR del género *Haemophilus*. En la Tabla 7 se muestra la comparación de las ARs de este género para cada una de las categorías y su p-valor de modo específico.

Tabla 7. Diferencias en la AR del género *Haemophilus* entre la categoría “Estable” y “Agudizado”.

OTU	AR Estable	AR Agudizado	<i>p-valor</i>
<i>Haemophilus</i>	0,0375	0,1700	0,014

La composición de la microbiota de las dos categorías clínicas “Estable” y “Agudizado” determinadas en cada muestra que compone cada uno de los grupos estudiados se muestran en las Figuras 24 y 25.

V.2.3. Primera estrategia de análisis. Estrategia de análisis de resultados en microbioma predefinida.

V.2.3.1. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA SEGÚN DETERIORO FUNCIONAL EN BASE AL FEV1 (GRADOS GOLD DE GRAVEDAD).

Según los resultados mostrados por el Análisis de Componentes Principales, al clasificar las muestras de esputo atendiendo a su grado GOLD en base al FEV1, no se identificó ningún tipo de microbiota específica para las categorías Leve-Moderado (Grados GOLD 1-2) o Grave-Muy grave (GOLD 3-4) en la categoría clínica “Agudizado”.

A continuación se muestra el Análisis de Componentes Principales y la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano para las categorías GOLD 1-2 y GOLD 3-4 en categoría clínica “Agudizado”, Figura 26.

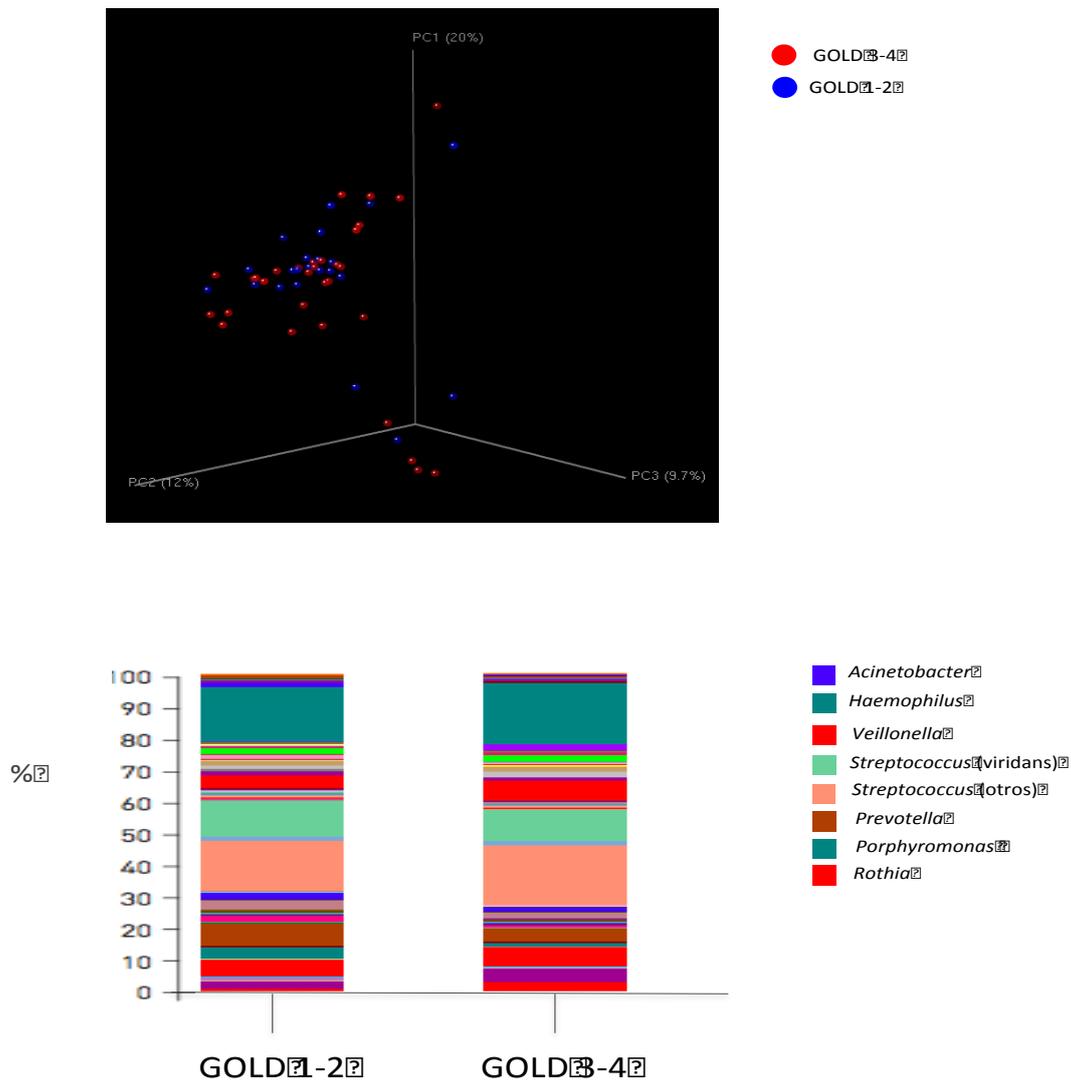


Figura 26. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, para los “grados GOLD 1-2” y “grados GOLD 3-4” en la categoría clínica “Agudizado”.

Las abundancias relativas (AR) de los géneros bacterianos (OTU) por encima de un valor de 0,01 identificados en cada una las categorías “GOLD 1-2” y “GOLD 3-4” en categoría clínica “Agudizado” y los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1) y su comparación entre las categorías se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. OTU's, Abundancia Relativa (AR), índice de Shannon-Wiener (H'), índice de riqueza (Chao1) y su comparación entre las categorías clínicas "GOLD 1-2" y "GOLD 3-4" en categoría clínica "Agudizado".

	OTU	AR	H'	Chao1
GOLD 1-2	<i>Haemophilus</i>	0,1707	2,4	26,63
	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,1591		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,1141		
	<i>Prevotella</i>	0,0712		
	<i>Rothia</i>	0,0523		
	<i>Veillonella</i>	0,0390		
	<i>Porphyromonas</i>	0,0369		
	<i>Neisseria</i>	0,0190		
	<i>Capnocytophaga</i>	0,0177		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0159		
	<i>Acinetobacter</i>	0,0123		
	<i>Atopobium</i>	0,0120		
GOLD 3-4	<i>Haemophilus</i>	0,1946	2,4	26,83
	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,1858		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,0981		
	<i>Veillonella</i>	0,0612		
	<i>Rothia</i>	0,0579		
	<i>Prevotella</i>	0,0421		
	<i>Actinobacillus</i>	0,0208		
	<i>Neisseria</i>	0,0197		
	<i>Fusobacterium</i>	0,0172		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0163		
<i>Porphyromonas</i>	0,0121			
<i>p-valor</i>			1	1

No se han observado diferencias estadísticamente significativas a nivel de composición de géneros e índices de riqueza y biodiversidad para las categorías clínicas "GOLD 1-2" y "GOLD 3-4" en categoría clínica "Agudizado".

Al repetir los análisis en las muestras de la categoría clínica “Estable”, los microbiomas fueron asimismo similares (datos no mostrados en tablas ni en figuras).

V.2.3.2. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ATENDIENDO AL RESTO DE VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS: SEXO, EDAD, IMC, TABAQUISMO, SINTOMATOLOGÍA (mMRC, CAT) Y RIESGO DE DESARROLLAR EXACERBACIONES (FENOTIPO AGUDIZADOR).

Los Análisis de Componentes Principales para cada una del resto de las variables analizadas: Sexo, Edad (mayor versus menor o igual a 75 años), IMC (categorías OMS), Tabaquismo (Fumadores, exfumadores y no fumadores), sintomatología en base a escala modificada de disnea del mMRC (poco sintomáticos, mMRC < 2 versus muy sintomáticos, mMRC ≥ 2) y a cuestionario de calidad de vida CAT (poco afectados, CAT < 10 versus muy afectados, CAT ≥ 10), y riesgo de desarrollar exacerbaciones (Fenotipo Agudizador), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre cada variable y el tipo de microbiota identificado, atendiendo a cada categoría clínica de “Estable” *versus* “Agudizado”. Por ello, los resultados de estas comparaciones se encuentran recogidos en el Anexo I.

V.2.4. Segunda estrategia de análisis. Identificación de los clusters que tuvieron un microbioma de similar composición, a través del Análisis de Componentes Principales.

En una segunda estrategia de análisis, se identificaron los clusters que tuvieron un microbioma de similar composición, a través del Análisis de Componentes Principales. El análisis de la composición de la microbiota de las 118 muestras incluidas en el estudio reveló la presencia de 4 tipos de microbiotas distintas (Clusters 1, 2, 3 y 4). Ver tabla 9.

Tabla 9. Distribución de las muestras en función de su pertenencia a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” y cada uno de los Clusters identificados en el Análisis de Componentes Principales.

Clúster	Estable	Agudizado	Total
C1	-	7	7
C2	-	12	12
C3	-	3	3
C4	58	38	96
Total	58	60	118

En la Figura 27, se muestra en Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, atendiendo a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” y a la pertenencia de cada una de las 4 microbiotas distintas identificadas (Clusters).

Las abundancias relativas (AR) de los géneros bacterianos (OTU) por encima de un valor de 0,01 identificados en cada Clúster (C1-4) y los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1) se muestran en la Tabla 10.

El Clúster 1 lo formaron muestras (n=7) en categoría clínica “Agudizado” y su microbiota estuvo compuesta principalmente por el género *Haemophilus*. En concreto las técnicas moleculares mostraron que la mayoría de estos *Haemophilus* fueron del tipo “No Tipable” (NTHI) (n=5/7 muestras).

El Clúster 2 (n=12) también estuvo formado por muestras de la categoría clínica “Agudizado” y principalmente compuesto por microorganismos del género *Haemophilus* aunque no presentó una disbiosis tan acentuada como los pacientes del Clúster 1, observándose la presencia de otros géneros que también están presentes en las muestras de pacientes estables aunque en menor abundancia relativa (AR).

El Clúster 3 (n=3) estuvo compuesto por muestras de la categoría clínica “Agudizado” y principalmente por microorganismos del género *Pseudomonas* y de la familia *Enterobacteriaceae*.

En cuanto a la composición del Clúster 4 (n=96) se observó que estaba compuesto tanto por muestras de la categoría clínica “Estable” (n=58) como por muestras de la categoría clínica “Agudizado” (n=38), presentando una microbiota mucho más diversa que cualquiera de los tres Clúster anteriores.

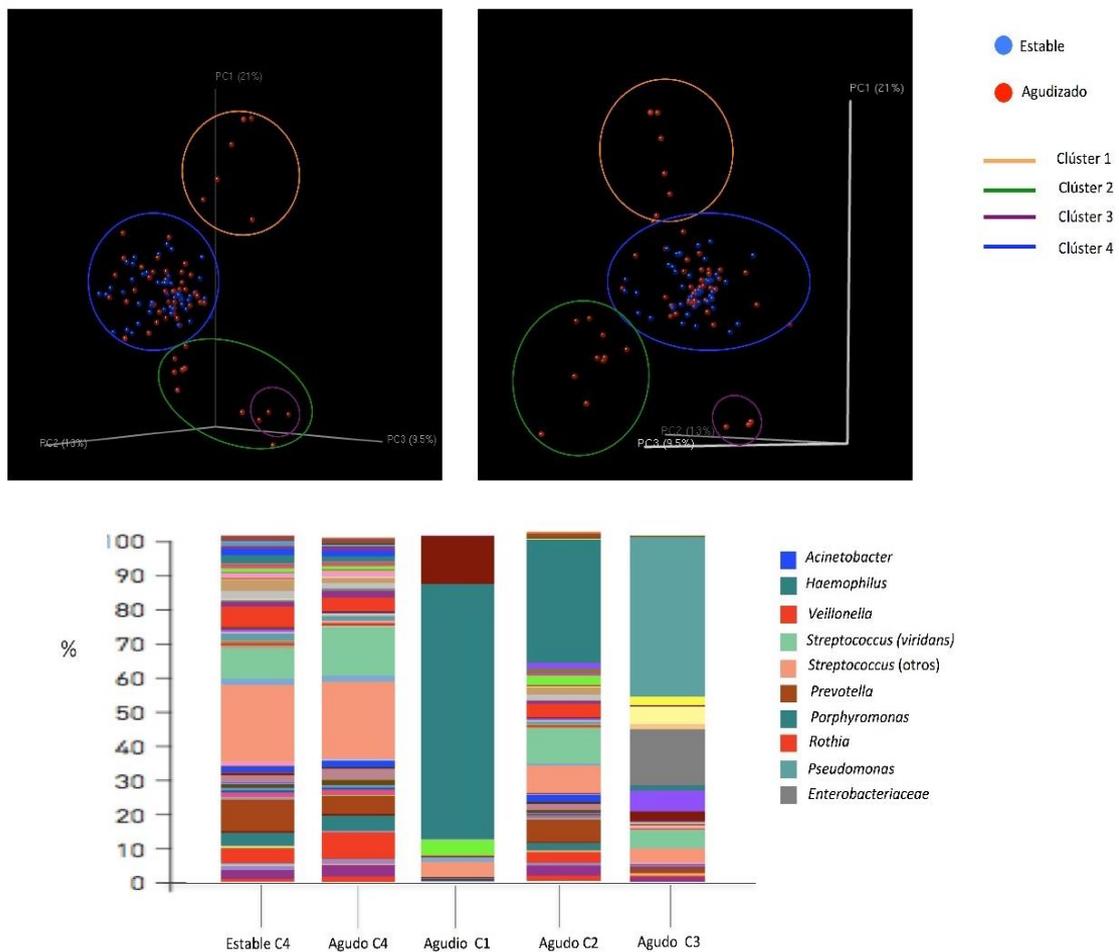


Figura 27. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, atendiendo a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” y a la pertenencia de cada una de las 4 microbiotas distintas identificadas (Clusters).

Tabla 10. OTU's, Abundancia Relativa (AR), índice de Shannon-Wiener (H'), índice de riqueza (Chao1) y su comparación entre los distintos Clusters identificados.

	OTU	AR	H'	Chao1
Clúster 1	<i>Haemophilus</i>	0,7363	1,57	6,61
	<i>Pasteurella</i>	0,1382		
	<i>Neisseria</i>	0,0452		
	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,0444		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,0128		
Clúster 2	<i>Haemophilus</i>	0,3553	2,31	14,67
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,1022		
	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,0793		
	<i>Prevotella</i>	0,066		
	<i>Veillonella</i>	0,0381		
	<i>Rothia</i>	0,0321		
	<i>Neisseria</i>	0,0265		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0216		
	<i>Porphyromonas</i>	0,0203		
<i>Actinobacillus</i>	0,0176			
<i>Fusobacterium</i>	0,0151			
Clúster 3	<i>Pseudomonas</i>	0,4619	2,04	10,61
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,1612		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,0536		
	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,0374		
	<i>Achromobacter</i>	0,0278		
	<i>Gluconacetobacter</i>	0,0144		
<i>Prevotella</i>	0,0113			
Clúster 4	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,2205	2,73	20,53
	<i>Prevotella</i>	0,0907		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,1007		
	<i>Veillonella</i>	0,0576		
	<i>Rothia</i>	0,0421		
	<i>Porphyromonas</i>	0,0376		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0328		
	<i>Haemophilus</i>	0,0247		
	<i>Fusobacterium</i>	0,0236		
	<i>Oribacterium</i>	0,0179		
	<i>Acinetobacter</i>	0,0178		
	<i>Atopobium</i>	0,0136		
	<i>Campylobacter</i>	0,011		
<i>Capnocytophaga</i>	0,0107			
<i>Neisseria</i>	0,0105			

A continuación, en la tabla 11 se muestra una comparación de los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1) entre los distintos Clúster identificados.

Tabla 11. Comparación de los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1) entre los distintos Clúster identificados.

Comparación	H'	p-valor	Chao1	p-valor
C1-C2	1,57 vs 2,31	0,21	6,61 vs 14,67	0,126
C1-C3	1,57 vs 2,04	1	6,61 vs 10,61	1
C1-C4	1,57 vs 2,73	0,037	6,61 vs 20,53	0,021
C2-C3	2,31 vs 2,04	1	14,67 vs 10,61	1
C2-C4	2,31 vs 2,73	1	14,67 vs 20,53	1
C3-C4	2,04 vs 2,73	1	10,61 vs 20,53	1

Se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de los índices de biodiversidad y riqueza, además de en la AR del género *Haemophilus*, para la comparación del Cluster 1 (C1) vs Cluster 4 (C4). En la Tabla XX se muestra la comparación específica de las ARs para este género entre C1 y C4.

Tabla 12. Diferencias en la AR del género *Haemophilus* entre el Cluster 1 (C1) y el Cluster 4 (C4).

OTU	AR C1	AR C4	p-valor
<i>Haemophilus</i>	0,73	0,02	0,014

En la tabla 13 se presenta de forma tabulada el microorganismo considerado con implicación directa en el proceso de agudización con cada una de las muestras de los Clusters 1, 2 y 3. En el Clúster 1 como hemos comentado anteriormente el aumento de la abundancia relativa haría las agudizaciones atribuibles al género *Haemophilus*, en su mayoría del tipo “No Tipable” (NTHI). En el cluster 2 las haría atribuibles al *Haemophilus* tipable en todos los casos. En el cluster 3, la abundancia relativa hace que la agudización sea atribuible a *Pseudomonas* en dos de los pacientes, mientras que en la microbiota del tercer paciente se detectó *Serratia marcenses* de la familia Enterobacteriaceae.

Tabla 13. Descriptivo de los microorganismos considerados con implicación directa en el proceso de agudización con cada una de las muestras de los Clusters 1, 2 y 3.

	C1	C2	C3
<i>Haemophilus</i> (NTHI)	5		
<i>Haemophilus</i>	2	12	
<i>Pseudomonas</i>			2
<i>Serratia marcenses</i>			1
Total	7	12	3

V.2.5. Estudio de la etiología vírica de las agudizaciones en los pacientes con EPOC del Cluster 4.

Se identificó la presencia de virus respiratorios en 11 muestras, todas ellas de la categoría clínica "Agudizado".

El virus más frecuente implicado en el proceso de agudización del paciente con EPOC fue el *Rhinovirus* (n=5), seguido por *Influenza A* (n=3), *Metapneumovirus* (n=2) y *Coronavirus OC43* (n=1).

El Análisis de Componentes Principales mostró que 10 de las muestras agudizadas donde existía la presencia de algún agente viral pertenecieron al Cluster 4 identificado en el Análisis de Componentes Principales. La otra muestra agudizada en la que se aislaron *Rhinovirus* perteneció al Cluster 2, coexistiendo con *Haemophilus*, si bien esta muestra en concreto mostró características especiales estando más alejada que el resto del Cluster 2 y acercándose al Cluster 4. Ver tabla 14. Ver Figura 28.

Tabla 14. Causas de la agudización y Cluster al que pertenece en el total de las muestras en Agudización (60 pacientes).

Id	Clúster	Causa	Patógeno
1	C1	Bacteriana	<i>Haemophilus (NTHI)</i>
2	C1	Bacteriana	<i>Haemophilus (NTHI)</i>
3	C1	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
4	C1	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
5	C1	Bacteriana	<i>Haemophilus (NTHI)</i>
6	C1	Bacteriana	<i>Haemophilus (NTHI)</i>
7	C1	Bacteriana	<i>Haemophilus (NTHI)</i>
8	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
9	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
10	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
11	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
12	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
13	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
14	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
15	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
16	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
17	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
18	C2	Bacteriana	<i>Haemophilus</i>
19	C2	Viral-Bacteriana	<i>Rhinovirus-Haemophilus</i>
20	C3	Bacteriana	<i>Serratia</i>
21	C3	Bacteriana	<i>Pseudomonas</i>
22	C3	Bacteriana	<i>Pseudomonas</i>
23	C4	No infecciosa	-
24	C4	No infecciosa	-
25	C4	Viral	<i>Metapneumovirus</i>
26	C4	No infecciosa	-
27	C4	No infecciosa	-
28	C4	No infecciosa	-
29	C4	No infecciosa	-
30	C4	No infecciosa	-
31	C4	Viral	<i>Rhinovirus</i>
32	C4	No infecciosa	-
33	C4	Viral	<i>Rhinovirus</i>
34	C4	Viral	<i>Influenza A</i>
35	C4	No infecciosa	-
36	C4	No infecciosa	-
37	C4	Viral	<i>Influenza A</i>
38	C4	Viral	<i>Rhinovirus</i>
39	C4	No infecciosa	-
40	C4	No infecciosa	-
41	C4	Viral	<i>Rhinovirus</i>
42	C4	No infecciosa	-
43	C4	No infecciosa	-
44	C4	No infecciosa	-
45	C4	Viral	<i>Influenza A</i>
46	C4	No infecciosa	-
47	C4	Viral	<i>Metapneumovirus</i>
48	C4	No infecciosa	-
49	C4	No infecciosa	-
50	C4	No infecciosa	-
51	C4	No infecciosa	-
52	C4	No infecciosa	-
53	C4	No infecciosa	-
54	C4	No infecciosa	-
55	C4	No infecciosa	-
56	C4	No infecciosa	-
57	C4	No infecciosa	-
58	C4	No infecciosa	-
59	C4	No infecciosa	-
60	C4	Viral	<i>OC43</i>

En la figura 28 se presenta el Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, atendiendo a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” de las muestras del Cluster 4, y a la identificación de virus en las mismas.

La composición de la microbiota de las muestras con virus identificados, fue muy similar a la del resto de muestras con categoría clínica “Estable” o “Agudizado” que pertenecían al mismo Cluster 4, salvo por incrementos en la abundancia relativa (AR) del género *Veillonella* y en menor medida por la categoría *streptococcus* (otros).

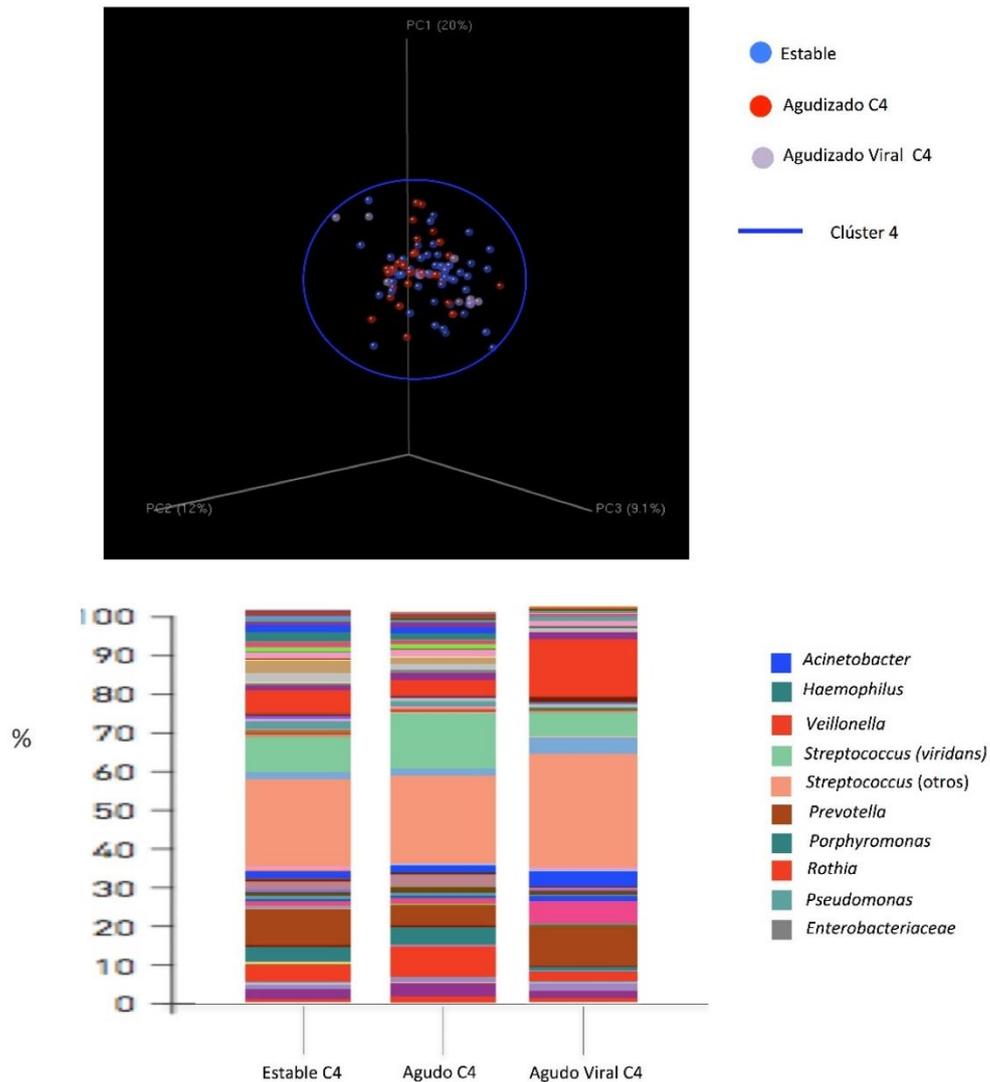


Figura 28. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, atendiendo a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” de las muestras del Cluster 4, y a la identificación de virus en las mismas.

En la tabla 15 se muestran las abundancias relativas (AR) de los géneros bacterianos (OTU) por encima de un valor de 0,01 y los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1), atendiendo a la categoría clínica “Estable” o “Agudizado” de las muestras del Cluster 4, y a la identificación de virus en las mismas.

Tabla 15. Abundancias relativas (AR) de los géneros bacterianos (OTU) por encima de un valor de 0 y los índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1), atendiendo a la categoría clínica "Estable" o "Agudizado" de las muestras del Cluster 4, y a la identificación de virus en las mismas.

	OTU	AR	H'	Chao1
Clúster 4 Agudización Viral	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,2611		
	<i>Veillonella</i>	0,1324		
	<i>Prevotella</i>	0,1023		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,0972	2,54	24,36
	<i>Haemophilus</i>	0,0255		
	<i>Rothia</i>	0,0241		
	<i>Atopobium</i>	0,0166		
Clúster 4 Agudo (No Viral)	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,2247		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,1393		
	<i>Rothia</i>	0,0785		
	<i>Prevotella</i>	0,0513		
	<i>Porphyromonas</i>	0,0453		
	<i>Veillonella</i>	0,0405		
	<i>Haemophilus</i>	0,0165		
	<i>Atopobium</i>	0,0163	2,71	35,2
	<i>Acinetobacter</i>	0,0152		
	<i>Fusobacterium</i>	0,0142		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0135		
	<i>Moraxella</i>	0,0133		
	<i>Capnocytophaga</i>	0,0127		
	<i>Neisseria</i>	0,0119		
<i>Oribacterium</i>	0,0116			
Clúster 4 Estable	<i>Streptococcus (Otros)</i>	0,2205		
	<i>Prevotella</i>	0,0907		
	<i>Streptococcus (viridans)</i>	0,0868		
	<i>Veillonella</i>	0,0575		
	<i>Rothia</i>	0,0421		
	<i>Porphyromonas</i>	0,0375		
	<i>Leptotrichia</i>	0,0328		
	<i>Haemophilus</i>	0,0247	2,73	36,3
	<i>Fusobacterium</i>	0,0235		
	<i>Oribacterium</i>	0,0178		
	<i>Acinetobacter</i>	0,0178		
	<i>Atopobium</i>	0,0135		
	<i>Campylobacter</i>	0,0109		
	<i>Capnocytophaga</i>	0,0107		
<i>Neisseria</i>	0,0105			

En la tabla 16 se muestra la comparación de la AR del género *Veillonella* entre muestras del Cluster 4 (C4) agudizadas por infección vírica, y el resto de muestras del mismo clúster. Se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de AR del género *Veillonella*, entre las muestras del C4 en las que se identificó algún agente viral y el resto de muestras del mismo clúster. Ver tabla 16. Las diferencias en la AR para la categoría *streptococcus* (otros), no llegaron a alcanzar significación estadística (datos no mostrados en tabla).

Tabla 16. Comparación de la AR del género *Veillonella* entre muestras del Cluster 4 (C4) agudizadas por infección vírica, y el resto de muestras del mismo clúster.

OTU	AR resto C4	AR C4 Viral	p-valor
<i>Veillonella</i>	0,04	0,13	0,002

V.2.6. Estudio de factores asociados a las agudizaciones en los pacientes con EPOC del Cluster 4, clasificadas como No Infecciosas.

Debido a que en un número importante de muestras en categoría clínica “Agudizado” (n=28) la composición de la microbiota fue similar a la composición de la microbiota de las muestras en categoría clínica “Estable” (C4) y que tampoco se identificó ningún agente viral al que poder atribuir el estado de agudización, estas se clasificaron como “No Infecciosas”.

Se tuvo en cuenta el diagnóstico concomitante de Asma como posible factor que podría estar asociado a la existencia de agudizaciones no infecciosas.

En la tabla 17, se presentan los % de fila de cada tipo de agudización, en función de la disponibilidad de información clínica sobre el diagnóstico concomitante de Asma y EPOC. El 67% de las agudizaciones en los pacientes asmáticos (N=6) fueron de etiología no infecciosa, mientras que en los EPOC no asmáticos, el % de agudizaciones no infecciosas fue algo menor (del 45,7%) sin llegar a alcanzar las diferencias significación estadística ($p=0,513$).

Tabla 17. Tipo de agudización, en función de la disponibilidad de información clínica sobre el diagnóstico concomitante de Asma y EPOC.

		Clusters1-3	Cluster 4	Cluster 4	
		BACTERIANO	NO INFECCIOSO	VIRICO	Total
No asmaticos	N	16	21	9	46
	% fila	34,8%	45,7%	19,6%	100,0%
Asmaticos	N	2	6	1	9
	% fila	22,2%	66,7%	11,1%	100,0%
	Total	18	27	10	55

En la Figura 29 se muestra en Análisis de Componentes Principales donde aparecen marcadas en blanco las muestras agudizadas del cluster 4 de pacientes asmáticos (N=6), y donde se observa que la composición de su microbiota es similar a la composición del total de muestras de la categoría clínica “Estable” todas ellas pertenecientes al cluster (C4).

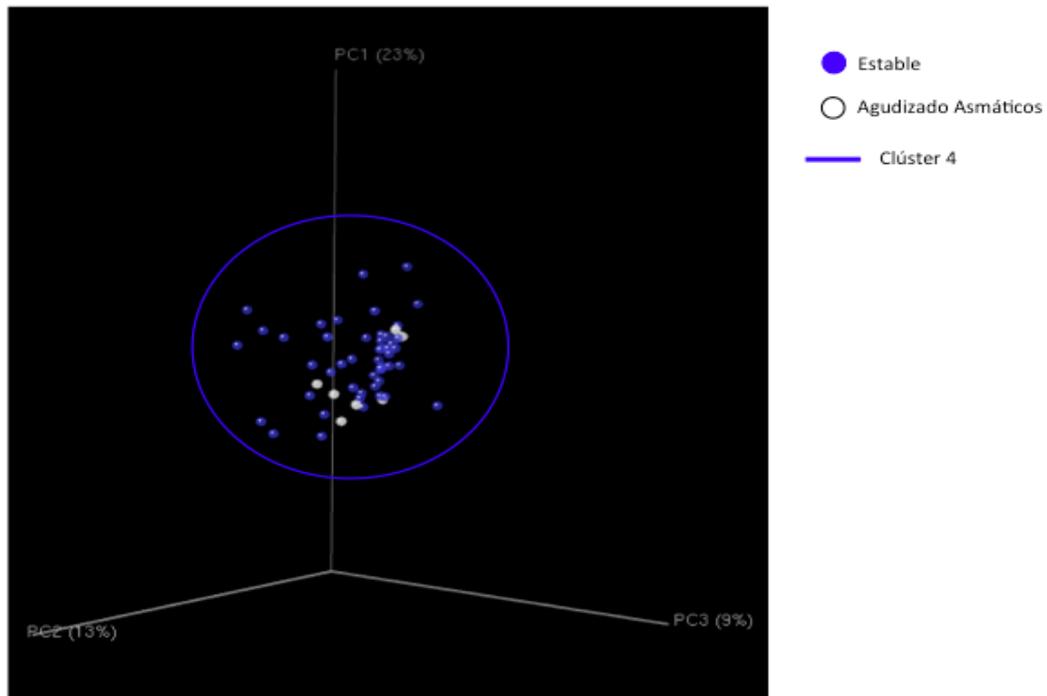


Figura 29. Análisis de Componentes Principales donde aparecen marcadas en blanco las muestras agudizadas del cluster 4 de pacientes asmáticos (N=6), junto con el total de muestras de la categoría clínica “Estable” (N=58), todas ellas pertenecientes también al cluster (C4).

VI Discusión

VI. DISCUSIÓN

VI.1 Discusión.

De acuerdo a las curvas de rarefacción, la técnica de secuenciación masiva empleada (Illumina mi-seq) fue lo suficientemente profunda para cada uno de los grupos obteniéndose una secuenciación casi por completo de todas las secuencias presentes en cada categoría y por tanto permitiendo obtener una idea en profundidad representativa de la diversidad de la microbiota tanto en las muestras de la categorías clínica “Agudizado” como “Estable”.

Coincidiendo con la bibliografía publicada (Aguirre et al. 2015; Galiana et al. 2014), la microbiota fue menos diversa en las muestras de los pacientes agudizados si se compara con los índices de biodiversidad y riqueza de las muestras de los pacientes en estado estable donde la microbiota fue más diversa. Las diferencias en estos índices alcanzaron significación estadística.

Al analizar por separado las muestras atendiendo a la pertenencia de categoría clínica “estable” o “agudizado” en el Análisis de Componentes Principales, todas las muestras pertenecientes a la categoría clínica “estable” formaron una nube de puntos compacta, sugiriendo un clúster de composición similar. Las muestras de la categoría clínica “agudizado” no mostraron una nube de puntos única, sugiriendo más de un tipo de microbioma, esto es, más de un cluster. El género *Haemophilus* con diferencia fue el más prevalente en el paciente agudizado, pasando de una sexta posición en cuanto a abundancia relativa en las muestras de la categoría clínica “Estable” a una primera posición en las muestras de los mismos pacientes en agudización, indicando una relación causal entre el estado de agudización y este género bacteriano. Esto es consistente con la literatura publicada: Barker et al. (2015) estudiaron muestras

de esputo pareado en 55 sujetos con enfermedad estable y exacerbada, observando que la relación más fuerte entre las abundancias relativas bacterianas, la inflamación y los síntomas se observó con *H. influenzae*. Sethi et al. (2002) observaron que el aislamiento de nuevas cepas de patógenos estaba asociado con un mayor riesgo de exacerbaciones (Sethi et al. 2002). Huang et al. (2010, 2014) observaron una mayor diversidad de bacterias, aislando múltiples especies bacterianas orofaríngeas e intestinales, lo que sugiere un papel potencial de estas cepas en las exacerbaciones de EPOC, planteando la hipótesis de la presencia de dos microbiotas bacterianas relacionadas con la EPOC exacerbada, una caracterizada por una prevalencia de Proteobacterias, la otra por una prevalencia de Firmicutes, que podría estar asociada con una mayor diversidad (Huang et al. 2010; 2014). Millares et al. (2014) también encontraron que las exacerbaciones se asociaron con un aumento selectivo en la abundancia relativa de bacterias (bacterias de la cavidad bucal y del tracto gastrointestinal), típicamente asociada con exacerbaciones como *Haemophilus*, *Pseudomonas* y *Moraxella* (Wang et al 2016, Millares et al. 2014, Sethi et al 2008,).

Al analizar todas las muestras conjuntamente en el Análisis de Componentes Principales, este procedimiento estadístico identificó 3 microbiotas distintas: Clusters C1, C2 y C3, en las que solo se encontraron muestras en estado de agudización. El primer Cluster agrupo a 7 pacientes. El segundo Cluster agrupo a 12 pacientes y el tercer Cluster agrupo a 3 pacientes, agrupando por lo tanto los tres Clusters 22 de las 60 muestras agudizadas.

Para clasificar a las exacerbaciones como asociadas a bacterias, se tomaron en cuenta las bacterias contempladas en las definiciones de los estudios previos (Bafadhelet al. 2011; van d V et al. 2004; Stockley et al. 2000) en relación a los patógeno bacterianos positivos en los cultivos de rutina: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

En relación al microorganismo considerado con implicación directa en el proceso de agudización, el Clúster 1 estuvo compuesto principalmente por el género *Haemophilus*, en su mayoría del tipo no tipable (NTHI). Este tipo de *Haemophilus influenzae* tiene una capacidad extraordinaria de colonizar e invadir el tracto resultando en una disbiosis del microbioma respiratorio tal y como se observa en los resultados de este trabajo. Esta disbiosis se ocasiona debido a la capacidad de estas cepas de modificar los antígenos de superficie de membrana para no ser reconocidas por el sistema inmunitario produciendo una colonización e invasión del tracto respiratorio más eficiente que otras cepas de *Haemophilus influenzae* que no pertenecen a la clase NTHI (Foxwell et al, 1998). Además también se ha observado que las cepas NTHI producen un aumento en la producción del moco en pacientes infectados además de que son capaces de secretar proteasas con capacidad de degradar inmunoglobulinas de la clase A (IgA) y producir deterioro en el tejido del tracto respiratorio sugiriendo que el deterioro del tejido respiratorio podría ser mayor en pacientes con este tipo de cepas. También se ha demostrado en estudios recientes que la respuesta inmunitaria innata en tejido respiratorio de pacientes con EPOC y/o fumadores expuestos a este tipo de cepas bacterianas no desencadena en una respuesta como en pacientes sanos por lo que la eliminación por parte del sistema inmune del paciente no se hace pasando a producir una infección crónica (Amantgalim et al, 2017). En el cluster 2 el aumento de la abundancia relativa hace las agudizaciones atribuibles *Haemophilus* sp., distintos a estirpes del tipo NTHI en todos los casos (Sethi et al, 2008, Persson et al, 2017). A diferencia que con las cepas NTHI, aquí se observa una mayor diversidad en el esputo agudizado de los pacientes de este cluster ya que la abundancia relativa del género *Haemophilus* en este cluster no superó el 0,35 aunque fue el género más abundante en el esputo pudiendo atribuir la causa de la agudización a este género (Sethi et al, 2008, Molyneaux et al, 2013). En el cluster 3 por el contrario, la abundancia relativa hace que la agudización sea atribuible a *Pseudomonas* sp. En uno de los pacientes del cluster 3, entre la microbiota se detectó *Serratia* sp. de la familia Enterobacteriaceae, considerado un patógeno con implicación directa en el

proceso de agudización según los métodos clásicos microbiológicos y de relevancia en el manejo clínico y microbiológico clásico con las agudizaciones (Sandner-Miranda et al, 2016, Pragman et al, 2014).

Así pues, en 22 de las 60 muestras (36,7%) la agudización puede considerarse bacteriana. Clásicamente la bibliografía publicada considera que las bacterias pueden jugar un papel etiológico importante hasta en un 50% del total de exacerbaciones (Bafadhel et al. 2011; Sethi & Murphy, 2008), pero estos mismos estudios citan en sus limitaciones que las definiciones para considerar una agudización como de causa bacteriana se basan en la positividad en los cultivos clásicos o en una carga bacteriana alta por PCR, con las limitaciones que esto supone frente a la metagenómica.

En relación al género *Haemophilus spp.*, en el Cluster 2 a pesar de poder atribuirse la etiología a *Haemophilus ssp.* distintos a los NTHI, el cluster 2 no presentó una disbiosis tan acentuada como la de los pacientes del Clúster 1, observándose en el cluster 2 la presencia de otros géneros que también están presentes en las muestras de pacientes estables, aunque en menor abundancia relativa. Coincidiendo con la bibliografía explicada anteriormente, esto sugiere que en este Cluster 2 el género de *Haemophilus* no encapsulado, sería menos agresivo, esto es, con una capacidad menor de desplazar al resto de géneros.

Por otro lado, en nuestro estudio, no se han hallado tantos géneros pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, como los descritos mediante las técnicas microbiológicas convencionales (cultivo de esputo) (Bafadhel et al. 2011; van d V et al. 2004; Stockley et al. 2000). Esto apoya lo descrito en la bibliografía (Aguirre et al. 2015; Pragman et al. 2014) en relación al sesgo que supone el cultivo al favorecer el crecimiento de determinadas bacterias como las de la familia Enterobacteriaceae.

Al estudiar la microbiota de los esputos de la categoría clínica “Agudizado”, no se encontraron grandes diferencias al comparar los pacientes más graves en base al FEV1 (grados GOLD 3-4) con los menos graves. Lo mismo ocurrió al realizar estas comparaciones atendiendo al resto de variables epidemiológicas predefinidas: sexo, edad, IMC, tabaquismo, sintomatología (mMRC, CAT) y riesgo de desarrollar exacerbaciones el año previo (Fenotipo Agudizador). Los agentes causantes de las agudizaciones fueron los mismos en grados GOLD 1-2 y 3-4. Fueron asimismo similares en los pacientes en cuanto a sexo, edad, hábito tabáquico, IMC, en cuanto a sintomatología en base a escala mMRC y cuestionario CAT, y en cuanto a historial de al menos dos agudizaciones el año previo frente a los que sufrieron una o ninguna el año previo. En relación a este extremo, las gráficas pueden sobrerrepresentar visualmente las diferencias, debido al escaso nº de muestras en algunas categorías, pero para ninguna de estas variables se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la microbiota ni en agudización. Tampoco se encontraron al realizar las mismas comparaciones en los esputos de la categoría clínica “Estable”, esto es, tras la recuperación de sus agudizaciones.

En este sentido, una limitación en nuestro estudio, podría ser que el escaso tamaño muestral se asociara a una falta de potencia estadística para detectar pequeñas diferencias en las abundancias relativas e índices de biodiversidad Shannon-Wiener (H') y riqueza de especies (Chao1). Posteriores estudios con mayor tamaño muestral permitirán avanzar en el conocimiento de la influencia del sexo, edad, hábito tabáquico, y del resto de variables clínicas como deterioro funcional, sintomatología y riesgo de desarrollar exacerbaciones. Nuestros resultados, a pesar de las limitaciones descritas, no apoyan que tengan una gran influencia en la microbiota en cualquier caso. La bibliografía consultada al respecto muestra resultados mixtos, que pueden explicarse por las diferentes estrategias de análisis metagenómico. Así, Sze et al. (2012) que analizaron el microbioma en EPOC fumadores vs no fumadores observaron que no había diferencias en la abundancia bacteriana de las muestras aunque tuvieron una composición diferente (Sze et al.2012). Pragman et al. (2012) en

su Análisis de Componentes Principales no demostraron ninguna agrupación entre los sujetos que eran consumidores de tabaco activos ni tampoco para la agrupación de parámetros clínicos como la edad y el sexo (Pragman et al. 2012). Los estudios en el microbioma de la EPOC en pacientes estables revelan menos diversidad en la composición del microbioma a medida que aumenta la gravedad de la EPOC, así el grupo de Galiana et al. (2014) observaron una disminución de la diversidad en el microbioma en el EPOC grave frente al leve/moderado, al igual que el grupo de García Nuñez et al. (2014) que lo observaron en pacientes EPOC muy graves frente a moderados/graves (Galiana et al.2014; García Nuñez et al. 2014). Huang et al. (2014) observaron que no se encontraron relaciones significativas entre la composición de la comunidad microbiana y los parámetros de la función pulmonar, la puntuación de gravedad de los síntomas de exacerbación o los puntos temporales en los que se han recogido muestras (número de días con respecto a la fecha de inicio de la agudización). Estos resultados indican que la variación entre los sujetos en el momento de la recogida de la muestra antes y después de una exacerbación no fue un factor significativo en las diferencias de composición observadas (Huang et al. 2014). En los trabajos de Cameron et al. (2016), sobre la evaluación de la abundancia y su influencia en la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo (FEV1% del valor teórico) se encontró una correlación positiva con el género *Streptococcus* y más específicamente *S. pneumoniae* (a menor diversidad, menor FEV1), al igual que el género *Neisseria* el cual mostró una correlación también positiva con el número de paquetes/años en fumadores. Además, observaron que *Staphylococcus aureus* y *S. maltophilia* pueden estar relacionadas con la disminución del FEV1(%) del valor teórico durante la exacerbación, sin embargo, sus análisis no sugieren ninguna correlación significativa con *P. aeruginosa* (Cameron et al. 2016).

En 11 de las 60 agudizaciones (18,3%) se determinaron virus. En una de las muestras agudizadas se aislaron *Rhinovirus* coexistiendo con *Haemophilus*. Esto es coherente con la literatura publicada que establece que la infección por *Rhinovirus* favorecería una posterior infección bacteriana por *Haemophilus*.

(Huang et al. 2017; Molyneaux et al. 2013). Apoyando esta hipótesis, nuestro Análisis de Componentes Principales para este caso en concreto mostro su pertenencia al Cluster 2 pero con la singularidad de alejarse del Cluster 2 y acercarse hacia el Cluster 4. El resto de virus (N=10) pertenecieron a las muestras del Cluster 4. Al tener todas estas muestras pertenecientes al Cluster 4, una microbiota equivalente a las muestras de la categoría clínica “Estable”, el origen de la agudización puede establecerse como vírico únicamente. Esto es coherente con la bibliografía consultada (Britto et al. 2017; Kim et al. 2016; Biancardi et al. 2016; Wedzicha&Seemungal, 2007; Wedzicha, 2004; Rohde et al. 2003; Seemungal et al. 2001; Wedzicha 2004) que muestran un % de agudizaciones víricas con respecto al total de agudizaciones de hasta el 29% en infección única o mixta (coexistiendo con infección bacteriana o eosinofilia en esputo), y de un 10% en infección únicamente por virus (Bafadhel et al. 2011). El papel de los virus en las agudizaciones que requieren ingreso parece ser relevante, detectándose hasta en el 50% de las agudizaciones graves como agente etiológico único o mixto en coinfección bacteriana-vírica (Papi 2006 et al. Seemungal et al. 2001). Coincidiendo con la literatura, los virus más frecuentemente implicados en el proceso de agudización del paciente con EPOC fueron los Rhinovirus seguidos por Influenza (Kim et al. 2016; Wedzicha, 2004). Algunas series han encontrado virus en pacientes estables (Wedzicha et al. 2004; Seemungal et al. 2001.). Este no ha sido nuestro caso, al menos para los virus analizados en nuestro estudio.

La agudización vírica como muestran los resultados, no modifico la composición de géneros bacterianos de la microbiota, aunque si que se vió un incremento en la abundancia relativa de *Veillonella sp.* en las muestras agudizadas por un agente infeccioso viral si lo comparamos con el resto de muestras agudizadas pertenecientes al Clúster 4. Tal y como se puede deducir de la bibliografía, las infecciones virales producen un cambio drástico del metabolismo celular eucariota. Durante una infección de células eucariotas por el virus Influenza A, el virus replica su material genético y todas sus proteínas a expensas de la maquinaria celular (Sánchez et al, 2015). La síntesis de los

componentes de la partícula viral requiere mucha energía metabólica por parte de la célula eucariota por lo que se modifican las rutas metabólicas clásicas de producción de energía en aerobiosis, cambiando el metabolismo celular hacia la generación de energía en condiciones de anaerobiosis produciéndose grandes cantidades de lactato durante la glicólisis (Janke et al, 2011). Esta producción de condiciones locales de anaerobiosis sumado a la generación de altas cantidades de lactato hace que se produzca una selección a causa de la presión selectiva metabólica y que aumente la cantidad relativa de aquellas bacterias que en este entorno tienen un metabolismo más ventajoso como el género *Veillonella* o *Prevotella* que son anaerobios cuya fuente de carbono es el lactato. Este sería uno de los hallazgos más interesantes de nuestro estudio por su carácter novedoso y que podría explicar los resultados obtenidos por otros investigadores donde se propone utilizar al género *Veillonella* como biomarcador de cáncer de pulmón (Yan et al, 2015). Debido a que el metabolismo local de las células tumorales consume mucha glucosa, esta glucosa incluso en condiciones normales oxigénicas se convierte a consecuencia del metabolismo tumoral en piruvato y posteriormente en lactato en lo que se conoce efecto Warburg. Debido a este efecto Warburg el lactato se acumula a nivel local en el medio extracelular del tumor favoreciendo el crecimiento de microorganismos como *Veillonella* sp (Romero-García et al. 2016).

Según nuestros datos, en 28 de las 60 agudizaciones (46,7%) no se pudo determinar un origen bacteriano, por ser su microbiota similar a las muestras de la categoría clínica “Estable”, tampoco se determinó ninguno de los virus analizados, clasificándose según nuestra definición basada en la literatura en causa “No infecciosa” predominante (Bafadhel et al. 2011; Wedzicha y Seemunga, 2007).

Recientemente, la Global Initiative for Asthma (GINA) y la GOLD publicaron un documento conjunto acuñando el término “síndrome de superposición asma–EPOC” (SAOC) (o ACOS por las sigas del inglés), que se emplea cuando un

paciente tiene características clínicas tanto de asma como de EPOC. Esta superposición ha sido asociada a un peor pronóstico en cuanto a morbimortalidad en los pacientes (Lange et al. 2016; Postma DS & Rabe, 2015).

En paralelo a la definición de este síndrome se ha estudiado el papel de los eosinófilos en esputo inicialmente como predictores de morbimortalidad (George & Brightling, 2016). Dados los inconvenientes de la medición de los eosinófilos en la práctica clínica diaria, posteriormente se estudió el papel de la eosinofilia en sangre (mucho más fáciles de obtener) como indicador indirecto, con resultados prometedores, viéndose la eosinofilia asociada con un mayor riesgo de exacerbaciones de causa no infecciosa, siendo además un factor asociado a peor pronóstico con mayor riesgo por ejemplo de hospitalización (Couillard et al. 2017; Bafadhel et al. 2016; Duman et al. 2015). El % de esputos en agudización con eosinofilia descrito en la literatura rondaría entorno al 28% del total de exacerbaciones (Bafadhel et al. 2011).

Debido a los datos epidemiológicos que apoyan el rol de los eosinófilos y del diagnóstico de ASMA&EPOC (Síndrome ACOS) en la etiología de las agudizaciones no infecciosas se estudiaron los % de este tipo de agudización en función del diagnóstico concomitante de asma. Apoyando nuestra hipótesis, las agudizaciones de causa no infecciosa fueron más frecuentes en los pacientes con asma&EPOC si bien estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Para que las diferencias hubieran alcanzado significación estadística, hubiera hecho falta un mayor número de pacientes. La microbiota de las muestras agudizadas de los pacientes con asma&EPOC fue similar a la microbiota del total de muestras "Estables" (N=58).

Por otro lado, Ko, FW y colaboradores (2016) publicaron un trabajo sobre las causas no infecciosas de AECOPD incluyendo la contaminación del aire, el efecto meteorológico y las comorbilidades de los pacientes, tales como la embolia pulmonar y la insuficiencia cardíaca siempre deben ser considerados.

En Asia, la contaminación del aire exterior es una causa importante de AECOPD. Un aumento de los contaminantes atmosféricos como el dióxido de azufre (SO₂), dióxido de nitrógeno (NO₂), ozono (O₃), PM₁₀ y PM gruesa (2,5-10 µm de diámetro aerodinámico) aumenta el riesgo de AECOPD. Una temperatura ambiente más baja, incluso con una disminución de 1 ° C, puede conducir a AECOPD. El efecto es más marcado cuando hay una caída significativa (5 ° C) a temperatura ambiente. La temporada de invierno y la baja humedad se confirman como desencadenantes de AECOPD (Ko et al, 2016). Un estudio realizado en Nueva Zelanda (2010) ha demostrado que el uso de una terapia de humidificación a largo plazo, con aire completamente saturado y humidificado a 37 ° C y un caudal de 20-25 L / min, puede conducir a un número significativamente menor de días de exacerbación en pacientes EPOC (Rea et al, 2010). También, un reciente estudio coreano (2013) muestra como las causas no infecciosas de AECOPD pueden incluir comorbilidades como la embolia pulmonar (5%), insuficiencia cardiaca congestiva (2%) e interrupción de los fármacos en EPOC (1%) (Choi et al, 2013).

VI.2. Limitaciones.

Anteriormente, ya se ha comentado la falta de potencia para algunos análisis como el caso de la asociación del diagnóstico concomitante asma&EPOC y el mayor % de agudizaciones no infecciosas.

En cuanto a otras limitaciones, el análisis de la microbiota en nuestro estudio se realiza sobre muestras de esputo de calidad. No se pudieron obtener lavados broncoalveolares. Una cuestión importante en las investigaciones hasta el momento es la recogida de muestras. Cabrera-Rubio et al. evaluaron el microbioma de aspirados bronquiales, esputo, lavado bronquial (BAL) y cepillados de la mucosa bronquial. Ellos encontraron que la diversidad microbiana fue menor y la carga fue mayor en las muestras obtenidas de la parte superior (aspirado y esputo) en comparación con el tracto respiratorio

inferior (BAL y la mucosa). No obstante, el estudio de Cabrera-rubio presenta algunas limitaciones como que no se contempló la calidad microbiológica de las muestras de esputo procesadas por lo que sus muestras podrían ser más representativas del tracto respiratorio superior que las muestras con calidad contrastada. Además comparó entre sí muestras del mismo paciente pero de distintas localizaciones del árbol respiratorio, y tal y como se ha visto en la bibliografía, la composición de la microbiota del árbol respiratorio no es igual dependiendo de la localización de la muestra analizada (Erb-Downward et al, 2011). Otra limitación importante es la comparación entre sí de pacientes con o sin cáncer de pulmón en los que según la bibliografía la composición de la microbiota puede ser muy distinta (Yan et al, 2015). En cuanto a los esputos procesados en nuestro trabajo en los se ha identificado finalmente su microbiota, hay que subrayar que todos fueron de calidad microbiológica G3-G4 por lo que podemos considerar que son muestras representativas de la microbiota bacteriana de las vías respiratorias bajas.

El tratamiento de las agudizaciones: uso de antibiótico y corticoide, y el tipo de fármaco y dosis, no fue registrado, lo cual podría suponer una limitación. En los agudos esto no tiene influencia porque las muestras se tomaron antes. En los estables no se incluyó el registro de estas variables porque en base a la bibliografía consultada (Wedzicha&Seemungal, 2007; Hurst et al. 2010), se tomó un tiempo superior a 4 semanas, que garantizara que la flora fuera independiente del tipo de tratamiento y dosis usadas para la agudización. El haberse agrupado todas las muestras estables en un mismo Cluster en el análisis de como principales, apoya este extremo sugiriendo que el uso de uno u otro antibiótico, de corticoides, o las dosis, no influyen en el microbioma, al menos cuando las muestras son tomadas con más de 4 semanas de diferencia. Por otro lado, no parece existir una gran variabilidad en el tratamiento antibiótico ni en las dosis (Ram et al. 2006).

Por ultimo, aunque los resultados en cuanto a microbiota y infección vírica pueden considerarse relativamente completos, no se pudieron determinar

hongos, como por ejemplo infección por *Pneumocystis jirovecii* (antiguamente conocido como *P. carinii*).

VII Conclusiones

VII. CONCLUSIONES

1. La microbiota fue menos diversa en las muestras de los pacientes en agudización. En las muestras de estos pacientes en fase estable tras la recuperación de sus agudizaciones, la microbiota fue más diversa coincidiendo con la bibliografía publicada.
2. En el Análisis de Componentes Principales, todas las muestras pertenecientes a la categoría clínica “estable” formaron una nube de puntos compacta, sugiriendo un clúster de composición similar. Las muestras de la categoría clínica “Agudizado” no mostraron una nube de puntos única, englobándose en 4 tipos de microbioma o Clusters distintos.
4. La abundancia relativa del genero *Haemophilus* pasó de un 6º lugar en estable a un primer lugar en agudizado, siendo la diferencia en las abundancias relativas estadísticamente significativa.
5. En los tres primeros Clusters de agudizaciones, la etiología fue bacteriana. Estos tres primeros Clusters tuvieron características diferenciales en cuanto a disbiosis y etiología bacteriana.
6. El primer Cluster agrupó a 7 pacientes. La agudización en estos pacientes fue por *Haemophilus* del tipo “No Tipable” (NTHi) principalmente, presentando la disbiosis más alta desplazando al resto de especies bacterianas.
7. El segundo Cluster agrupó a 12 pacientes. En todos la etiología fue por *Haemophilus* no encapsulado, y la disbiosis fue menor, desplazando en menor medida al resto de especies.

8. El tercer Cluster agrupó a 3 pacientes. La etiología del tercer Cluster no fue por *Haemophilus sp.* sino por *Pseudomonas sp.* en dos de ellos y *Serratia sp.* en el tercer paciente.

9. El cuarto Cluster de muestras agudizadas agrupó a 38 pacientes. La microbiota del cuarto cluster de pacientes agudizados fue la que más diversidad manifestó, siendo similar a la microbiota en fase estable de todos los 60 pacientes, sugiriendo etiología no bacteriana.

10. En 10 de los 38 pacientes agrupados en el Cluster 4 se determinó el origen vírico de las agudizaciones. La agudización vírica, no modificó la microbiota, siendo similar a la microbiota de las agudizaciones de etiología no infecciosa y a la de las muestras en fase estable, más allá de un aumento de la abundancia relativa de microorganismos consumidores de lactato.

11. Los agentes bacterianos causantes de las agudizaciones fueron los mismos en grados GOLD 1-2 versus 3-4. Fueron asimismo similares en los pacientes con más o menos sintomatología en base a escala mMRC y Cuestionario CAT, y en pacientes con un historial de al menos dos agudizaciones el año previo frente a los que sufrieron una o ninguna el año previo.

12. En pacientes asmáticos la presencia de agudizaciones de causa no infecciosa fue superior, si bien las diferencias no alcanzaron significación estadística.

VIII Bibliografía

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Micro*. 2008;6:431–440.

Agüero R, Gisbert JA, Hierro M, Lopez M, Pellico A, Valle T. Manual de actualización en el abordaje de la EPOC. Servicio Cántabro de Salud 2011.

Aguirre E, Galiana A, Mira A, Guardiola R, Sánchez-Guillén L, Garcia-Pachon E, et al. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *APMIS*. 2015;123:427-32.

Agustí A, Vestbo J. Current controversies and future perspectives in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:507-13.

Agustí A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: what we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4:522-5.

Alcázar B, García-Polo C, Herrejón A, Ruiz LA, De Miguel J, Ros JA, et al. Factores asociados a la hospitalización por exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol*. 2012;48:70–76.

Alcolea S, Villamor J, Álvarez-Sala R. EPOC y estado nutricional. *Arch Bronconeumol*. 2007;43:283-8.

Alfageme I, Vazquez R, Reyes N, Muñoz J, Fernández A, Hernandez M, et al. Clinical efficacy of anti-pneumococcal vaccination inpatients with COPD. *Thorax*. 2006;61:189-95.

- Amatngalim GD, Schrumpf JA, Henic A, Dronkers E, Verhoosel RM, Ordonez SR, et al. Antibacterial Defense of Human Airway Epithelial Cells from Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients Induced by Acute Exposure to Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Modulation by Cigarette Smoke. *J Innate Immun*. 2017 Feb 8. doi: 10.1159/000455193.
- Ancochea J, Miravittles M, García-Río F, Muñoz L, Sánchez G, Sobradillo V, et al. Infradiagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en mujeres: cuantificación del problema, determinantes y propuestas de acción. *Arch Bronconeumol*. 2013;49:223-9.
- Andersson A.F, Lindberg M, Jakobsson H, Ba F. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS One*. 2008;3.
- Anzueto A. Impact of exacerbations on COPD. *Eur Respir Rev*. 2010;19:113-118.
- Atsou K, Chouaid C, Hejblum G. Variability of the chronic obstructive pulmonary disease key epidemiological data in Europe: systematic review. *BMC Med*. 2011;9:7.
- Bafadhel M, Greening NJ, Harvey-Dunstan TC, Williams JE, Morgan MD, Brightling CE, et al. Blood Eosinophils and Outcomes in Severe Hospitalized Exacerbations of COPD. *Chest*. 2016;150:320-8.
- Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Pancholi M, Venge P, et al. Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:48-55.
- Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:662-71.

- Barberà JA, Peces-Barba G, Agustí A, Izquierdo JL, Monsó E, Montemayor T, et al. Guía clínica para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol*. 2001;37:297-316.
- Barker BL, Haldar K, Patel H, Pavord ID, Barer MR, Brightling CE, et al. Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations. *Chest*. 2015;147:46-55.
- Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 2009;33:1165-85.
- Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiota as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio*. 6(2):e00037-15.
- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J*. 2012;6:46-56.
- Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54:581-6.
- Biancardi E, Fennell M, Rawlinson W, Thomas PS. Viruses are frequently present as the infecting agent in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in patients presenting to hospital. *Intern Med J*. 2016;46:1160-1165.
- Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremier N, Sarles J, et al. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2008;3 e2908.

- Blasi F, Cesana G, Conti S, Chiodini V, Aliberti S, Fornari C, et al. The Clinical and Economic Impact of Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Cohort of Hospitalized Patients. *PloS One*. 2014;9(6):e101228.
- Boixeda R, Almagro P, Díez J, Custardoy J, López-García F, San-Román C, et al. Características clínicas y tratamiento de los pacientes ancianos hospitalizados por descompensación de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en los servicios de Medicina Interna españoles. Estudio ECCO. *Med Clin (Barc)*. 2012;138:461-7.
- Brandtzaeg P. Secretory IgA. Designed for Anti Microbial Defense. *Front Immunol*. 2013;4:222.
- Brandtzaeg P. Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis*. 1992;165 Suppl1:S167-176.
- Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol*. 2008;41:53-6.
- Britto CJ, Brady V, Lee S, De la Cruz CS. Respiratory Viral Infections in Chronic Lung Diseases. *Clin Chest Med*. 2017;38:87-96.
- Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378:1015-1026.
- Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD study): a population based prevalence study. *Lancet*. 2007;370:741-50.
- Burge S, Wedzicha JA. COPD exacerbations: definitions and classifications. *Eur Respir J Suppl*. 2003;41:46s-53s.

- Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, Xaubet A, et al. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J.* 1997;10:1137-1144.
- Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, et al. Microbiome Diversity in the Bronchial Tracts of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3562-8.
- Calle M, Rodriguez JL, Alvarez-Sala JL. EPOC en individuos no fumadores. *Arch Bronconeumol.* 2010;46:16-21.
- Cameron SJ, Lewis KE, Huws SA, Lin W, Hegarty MJ, Lewis PD, et al. Metagenomic Sequencing of the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Upper Bronchial Tract Microbiome Reveals Functional Changes Associated with Disease Severity. *PLoS One.* 2016;11):e0149095.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2011;Chapter 10:Unit 10.7.
- Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2007;29:1224-38.
- Celli BR, MacNee W. ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004;23:932-46.
- Chambers DC, Gellatly SL, Hugenholtz P, Hansbro PM. JTD special edition "Hot topics in COPD" - the microbiome in COPD. *J Thorac Dis.* 2014;6:1525-31.
- Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:957-963.

- Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, et al. Haemophilus influenzae from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:85-91.
- Choi KJ, Cha SI, Shin KM, Lee J, Hwangbo Y, Yoo SS, et al. Prevalence and predictors of pulmonary embolism in Korean patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration.* 2013;85:203-9.
- Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, Hobbs MV, StGeme JW 3rd, Marrs CF, et al. Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by non typeable Haemophilus influenzae. *Infect Immun.* 2000;68:4430-40.
- Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) - Spanish Guideline for COPD (GesEPOC). *Arch Bronconeumol.* 2012;48(Supl 1):2-58.
- Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol.* 2013;4:185.
- Couillard S, Larivée P, Courteau J, Vanasse A. Eosinophils in COPD Exacerbations Are Associated With Increased Readmissions. *Chest.* 2017;151:366-73.
- Cox MJ, Cookson WOCM, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet.* 2013;102.
- De Miguel J, Gómez T, Puente L. Comorbilidades de la EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2010;46:20-25.
- De Santis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Green genes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72:5069-72.

- Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2012;379:1341-51.
- Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. Microbiological Survey of the Human Gastric Ecosystem Using Culturing and Pyrosequencing Methods. *Microb. Ecol*. 2013;65:763-72.
- Dewan NA, Rafi S, Kanwar B, Satpathy H, Ryschon K, Tillotson GS, et al. Acute exacerbation of COPD: factors associated with poor outcome. *Chest*. 2000;117:662-71.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;821-30. Vol 12. No 6.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, Walker N, Scales BS, Beck JM, et al. Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct *Pseudomonas* species with distinct clinical associations. *PLoS One*. 2014;9(5):e97214.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(10):L1047-55.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The Role of the Bacterial Microbiome in Lung Disease. *Expert Rev Respir Med*. 2013;7:245-57.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Martínez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:481-504.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, et al. Cell-associated bacteria in the human lung microbiome. *Microbiome*. 2014;2:28.

- Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, et al. Analysis of culture-dependent vs. culture-independent techniques for the identification of bacteria in clinically-obtained bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3605-13.
- Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet.* 2014;384:691-702.
- Donaldson GC, Müllerova H, Locantore N, Hurst JR, Calverley PM, Vestbo J, et al. Factors associated with change in exacerbation frequency in COPD. *Respiratory Research* 2013;14:79.
- Donaldson GC, Seemungal TAR, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2002;57:847-52. [Erratum, *Thorax* 2008;63:753.]
- Donaldson GC, Wedzicha JA. COPD exacerbations (part 1): epidemiology. *Thorax.* 2006;61:164-168.
- Duman D, Aksoy E, Agca MC, Kocak ND, Ozmen I, Akturk UA, et al. The utility of inflammatory markers to predict readmissions and mortality in COPD cases with or without eosinophilia. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015;10:2469-78.
- Dy R, Sethi S. The lung microbiome and exacerbations of COPD. *Curr Opin Pulm Med.* 2016;22:196-202.
- Einarsson GG, Comer DM, McIlreavey L, Parkhill J, Ennis M, Tunney MM, et al. Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax.* 2016.
- Erb-Downward JR, Huffnagle GB, Martinez FJ. The microbiota in respiratory disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:1037-8.

- Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One*. 2011;6:e16384.
- Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*. 1977;1:1645-48.
- Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):294-308.
- Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, Nishimura M. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:405-12.
- Galiana A, Aguirre E, Rodríguez JC, Mira A, Santibañez M, Candela I, et al. Sputum microbiota in moderate versus severe patients with COPD. *Eur Respir J*. 2014;43:1787-90.
- Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2004;59:574-80.
- Garcha DS, Thurston SJ, Patel ARC, Mackay AJ, Goldring JJP, Donaldson GC, et al. Changes in Prevalence and Load of Airway Bacteria Using Quantitative PCR in Stable and Exacerbated COPD. *Thorax*. 2012;67:1075-80.
- García-Aymerich J, Lange P, Benet M, Schnohr P, Antó JM. Regular physical activity modifies smoking-related lung function decline and reduces risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:458-63.

- García-Nuñez M, Millares L, Pomares X, Ferrari R, Pérez-Brocal V, Gallego M, et al. Severity-Related Changes of Bronchial Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol.* 2014;52:4217-23.
- George L, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis.* 2016;7:34-51.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006;312:1355-9.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* 1990;345:60-63.
- Gleeson K, Egli DF, Maxwell SL. Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest.* 1997;111:1266-1272.
- Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2011.
- Gosalbes MJ, Durbán A, Pignatelli M, Abellan JJ, Jiménez-Hernández N, Pérez-Cobas AE, et al. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One.* 2011;6:e17447.
- Grupo de trabajo Semergen DOC (Documentos clínicos Semergen). Área aparato respiratorio. EPOC. Grupo Saned. 2013.
- Grupo de trabajo SEPAR-SEMFYC. Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica sobre Atención Integral al paciente con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Desde la Atención Primaria a la Especializada. Sociedad Española de Medicina de Familia (semFYC) y Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) [Internet]. Semfyc ediciones. 2010.

- Gustave A. Laurenzi MD, Robert T, Potter MD, Edward H. Kass, MD, .et al. Bacteriologic Flora of the Lower Respiratory Tract. *N Engl J Med.* 1961;265:1273-78.
- Ha U, Lim JH, Jono H, Koga T, Srivastava A, Malley R, et al. A novel role for I κ Bkinase (IKK) α and IKK β in ERK-dependent up-regulation of MUC5AC mucin transcription by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2007;178:1736-47.
- Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2006;28:523-32.
- Han MK, Agustí A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes. The future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:598-604.
- Han MK, Huang YJ, Lipuma JJ, Boushey HA, Boucher RC, Cookson WO, et al. Significance of the Microbiome in Obstructive Lung Disease. *Thorax.* 2012;67:456-63.
- Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2005;54:1-40.
- Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *J Clin Virol.* 2000;109:188-195.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010;5:e8578.

- Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004;364:709-721.
- Hoogendoorn M, Feenstra TL, Hoogenveen RT, Al M, Rutten-van Mölken M. Association between lung function and exacerbation frequency in patients with COPD. *International Journal of COPD* 2010;5:435-444.
- Hovden AO, Cox RJ, Haaheim LR. Influenza: the virus and prophylaxis with inactivated influenza vaccine in "at risk" groups, including COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007;2:229-40.
- Hu J, Van den Steen PE, Sang Q-XA, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:480-498.
- Huang YJ, Kim E, Cox MJ, Brodie EL, Brown R, Wiener-Kronish JP, et al. A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *OMICS*. 2010;14:9-59.
- Huang YJ, Lynch SV. The emerging relationship between the airway microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications. *Expert Rev Respir Med*. 2011;5:809-821.
- Huang YJ, Sethi S, Murphy T, Nariya S, Boushey HA, Lynch SV, et al. Airway Microbiome Dynamics in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol*. 2014.
- Huffnagle GB, Dickson RP. The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. *Clin Immunol*. 2015;159:177-82.
- Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2010;363:1128-1138.

- Janke R, Genzel Y, Wetzel M, Reichl U. Effect of influenza virus infection on key metabolic enzyme activities in MDCK cells. *BMC Proc.* 2011;5 Suppl 8:P129.
- Jiménez-García R, Ariñez-Fernandez MC, Garcia-Carballo M, Hernández-Barrera V, De Miguel AG, Carrasco-Garrido P. Influenza vaccination coverage and related factors among Spanish patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Vaccine.* 2005;23:3679-86.
- Jiménez-García R, Ariñez-Fernandez MC, Hernández-Barrera V, Garcia-Carballo MM, De Miguel AG, Carrasco-Garrido P. Compliance with influenza and pneumococcal vaccination among patients with chronic obstructive pulmonary disease consulting their medical practitioners in Catalonia, Spain. *J Infect.* 2007;54:65-74.
- Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen W-H, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J.* 2009;34:648-54.
- Jones PW, Price D, Van der Molen T. Role of clinical questionnaires in optimizing everyday care of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2011;6:289-296.
- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Sci.* 2002;296:1127-1129.
- Kang Y, Deng R, Wang C, Deng T, Peng P, Cheng X, et al. Etiologic Diagnosis of Lower Respiratory Tract Bacterial Infections Using Sputum Samples and Quantitative Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plos One.* 2012;n Vol7.Issue6.e38743.
- Kessler R, Stahl E, Vogelmeier C, Haughney J, Trudeau E, Löfdahl CG, et al. Patients understanding, detection and experience of COPD exacerbations: an observational, interview-based study. *Chest* 2006;130:133-42.

- Kherad O, Kaiser L, Bridevaux P-O, Sarasin F, Thomas Y, Janssens J-P, et al. Upper-Respiratory Viral Infection, Biomarkers, and COPD Exacerbations. *Chest American College of Chest Physicians*. 2010;138:896-904.
- Kim HC, Choi SH, Huh JW, Sung H, Hong SB, Lim CM, et al. Different pattern of viral infections and clinical outcomes in patient with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and chronic obstructive pulmonary disease with pneumonia. *J Med Virol*. 2016;88:2092-2099.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;7:41(1):e1.doi:10.1093/nar/gks808.
- Kohansal R, Martinez-Cambor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:3-10.
- Koleff P, Gaston KJ, Lennon JJ. Measuring beta diversity for presence-absence data. *Journal of Animal Ecology*. 2003;72:367-382.
- Lange P, Halpin DM, O'Donnell DE, MacNee W. Diagnosis, assessment, and phenotyping of COPD: beyond FEV1. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11 Spec Iss:3-12.
- Langsetmo L, Platt RW, Ernst P, Bourbeau J. Underreporting exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in a longitudinal cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:396-401.
- Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Søndergaard JN, Musavian HS, Butt TM, et al. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *Plos One*. 2012;7(2):e31976.

- Lawley B, Tannock GW. Analysis of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences Using the QIIME Software Package. *Methods Mol Biol.* 2017;1537:153-163.
- Leidy N, Murray LT, Jones P, Sethi S. Performance of the Exacerbations of Chronic Pulmonary Disease Tool Patient-reported Outcome Measure in Three Clinical Trials of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11:316-325.
- López-Campos JL. Estrategias de tratamiento en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica: una propuesta de sistematización. *Arch Bronconeumol.* 2010;46:617-20.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380:2095-128.
- Ludwig, W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *Int. J. Food Microbiol.* 2007;120:225-236.
- Makela MJ, Backer V, Hedegaard M, Larsson K. Adherence to inhaled therapies, health outcomes and costs in patients with asthma and COPD. *Respir Med.* 2013;107:1481-90.
- Mammen MJ, Sethi S. COPD and the microbiome. *Respirology.* 2016;21:590-9.
- Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature.* 2011;470:198-203.
- Marín A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, Millares L, García-Núñez M, et al. Effect of bronchial colonization on airway and systemic inflammation in stable COPD. *COPD.* 2012;9:121-30.

- Marin A, Monsó E, Garcia-Nuñez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, et al. Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J*. 2010;35:295-302.
- Martínez-Solano L, Macià MD, Fajardo A, Oliver A, Martínez JL. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1526-33.
- Masa JF, Sobradillo V, Villasante C, Jiménez-Ruiz CA, Fernández-Fau L, Viejo JL, et al. Costes de la EPOC en España. Estimación a partir de un estudio epidemiológico poblacional. *Arch Bronconeumol*. 2004;40:72-9.
- Matkovic Z, Miravittles M. Chronic bronchial infection in COPD. Is there an infective phenotype?. *Respir Med*. 2013a;107:10-22.
- Matkoviz Z, Tudoric N, Miravittles, M. Impact of chronic bronchial infection in the lungs and beyond. *Eur Respir Mon*. 2013b;60:46-57.
- McCorry DC, Brown C, Gelfand SE, Bach PB. Management of acute exacerbations of COPD: a summary and appraisal of published evidence. *Chest*. 2001;119:1190-209.
- McNally, Brown SP. 2015. Building the microbiome in health and disease: niche construction and social conflict in bacteria. *Phil Trans R Soc B*. 2015;370:20140298.
- Medini D, Serruto D, Parkhill J, Relman DA, Donati C, Moxon R, et al. Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Micro*. 2008;6:419-430.
- Menon B, Gurnani M, Aggarwal B. Comparison of outpatient visits and hospitalisations, in patients with chronic obstructive pulmonary disease, before and after influenza vaccination. *Int J Clin Pract*. 2008;62:593-8.
- Millares L, Ferrari R, Gallego M, García-Nuñez M, Pérez-Brocal V, Espasa M, et al. Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by

Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33:1101-11.

Millares L, Pérez-Brocal V, Ferrari R, Gallego M, Pomares X, García-Nuñez M, et al. Functional Metagenomics of the Bronchial Microbiome in COPD. PlosOne. 2015;10(12):e0144448.

Ministerio de Sanidad y Política Social. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud. Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. Sanidad 2009. Ministerio de Sanidad y Política Social.. Disponible en: <http://www.msc.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/docs/EstrategiaEPOCSNS.pdf>

Miravittles M, Calle M, Soler-Cataluña JJ. Clinical phenotypes of COPD. Identification, definition and implications for guidelines. Arch Bronconeumol. 2012a;48:86-98.

Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, Martos JE, Maldonado JA, Gallego M. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Chest 1999;116:40-46.

Miravittles M, Ferrer M, Pont A, Zalacain R, Alvarez-Sala JL, Masa F, et al. Effect of exacerbations on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A 2 year follow up study. Thorax. 2004;59:387-395.

Miravittles M, Kruesmann F, Haverstock D, Perroncel R, Choudhri S, Arvis P. Sputum colour and bacteria in chronic bronchitis exacerbations: a pooled analysis. Eur Respir J. 2012b;39:1354-60.

Miravittles M, Marín A, Monsó E, Vilà S, De La Roza C, Hervás R, et al. Colour of sputums a marker of bacterial colonisation in chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res. 2010;11:58.

- Miravittles M, Monsó E, Mensa J, Aguarón J, Barberán J, Bárcena M, et al. Tratamiento antimicrobiano de la agudización de EPOC: Documento de Consenso 2007. *Arch Bronconeumol*. 2008;44:1008.
- Miravittles M, Murio C, Guerrero T, Gisbert R, On behalf of the DAFNE study group. Costs of chronic bronchitis and COPD. A one year follow-up study. *Chest*. 2003;123:784-91.
- Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. Spanish Guideline for COPD (GesEPOC). Update 2014. *Arch Bronconeumol*. 2014;50(Suppl 1):1-16.
- Miravittles M, Soriano JB, García-Río F, Muñoz L, Duran-Taulería E, Sánchez G, et al. Prevalence of COPD in Spain: Impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax*. 2009a;64:863-8.
- Miravittles M. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are bacteria important?. *Eur Respir J*. 2002;20 Supl 36:1s-11s.
- Miravittles M. Tratamiento individualizado de la EPOC: una propuesta de cambio. *Arch Bronconeumol*. 2009b;45:27-34.
- Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SAG, Homola D, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:1224-1231.
- Monsó E, Rosell A, Bonet G, Manterola J, Cardona PJ, Ruiz J, et al. Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 1999;13:338-342.
- Monsó E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated out patients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:1316-20.

- Montserrat-Capdevila J, Godoy P, Marsal JR, Cruz I, Solanes M. Efectividad de la vacunación antigripal para evitar el ingreso hospitalario por agudización de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:70-5.
- Morgan XC, Huttenhower C. Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol*. 2012;8:e1002808.
- Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:1067-1075.
- Müllerova H, Maselli DJ, Locantore N, Vestbo J, Hurst JR, Wedzicha J, et al. Hospitalized Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Risk Factors and Outcomes in the ECLIPSE Cohort. Unedited version of CHEST. Consultado en Octubre de 2014. Disponible en <http://journal.publications.chestnet.org/>
- Murphy TF. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19:225-30.
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2197-223.
- Nice L, Donner CI, Wouters E, Zuwallack R, Ambrosino N, Bourbeau J, et al. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement on pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1390-413.
- Nichol KL, Baken L, Nelson A. Relation between influenza vaccination and outpatient visits, hospitalization, and mortality in elderly persons with chronic lung disease. *Annals of Internal Medicine*. 1999;130:397-403.

O'Donnell AE. Bronchiectasis. *Chest*. 2008;134:815-823.

Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012;12:36-44.

Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1114-21.

Parameswaran GI, Sethi S, Murphy TF. Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *Chest*. 2011;140:611-7.

Patel IS, Seemungal TAR, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship Between Bacterial Colonisation and the Frequency, Character, and Severity of COPD Exacerbations. *Thorax*. 2002;57:759-764.

Pauwels R, Calverley P, Buist AS, Rennard S, Fukuchi Y, Stahl E, et al. COPD exacerbations: The importance of a standard definition. *Respir Med*. 2004;98:99-107.

Peces-Barba G, Barberà JA, Agustí A, Casanova C, Casas A, Izquierdo JL, et al. Guía clínica de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) y Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *Arch Bronconeumol*. 2008;44:271-81.

Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, Sapsford RJ, Mullerova H, Donaldson GC, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J*. 2007;29:527-534.

Persson LJ, Aanerud M, Hardie JA, Miodini Nilsen R, Bakke PS, Eagan TM, et al. Antimicrobial peptide levels are linked to airway inflammation, bacterial

colonization and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2017;49(3).pii:1601328.

Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem.* 2009;55:856-866.

Pilette C, Durham SR, Vaerman J-P, Sibille Y. Mucosal immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a role for immunoglobulin A?. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1:125-135.

Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax.* 2007;62:595-601.

Pla L. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *INCI.* [Internet]. 2006;31(8):583-590. Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-184420060008000008&lng=es.

Plans-Rubió P. Prevention and control of influenza in persons with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007;2:41-53.

Po JY, FitzGerald JM, Carlsten C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and meta-analysis. *Thorax.* 2011;66:232-9.

Poole PJ, Chacko E, Wood-Baker RW, Cates CJ. Influenza vaccine for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;1:CD002733.

Postma D, Anzueto A, Calverley P, Jenkins C, Make BJ, Sciruba FC, et al. A new perspective on optimal care for patients with COPD. *Prim Care Respir J.* 2011;20:205-9.

- Pozo-Rodríguez F, López-Campos JL, Álvarez-Martínez CJ, Castro-Acosta A, Agüero R, Hueto J, et al; AUDIPOC Study Group. Clinical Audit of COPD patients requiring hospital admissions in Spain: AUDIPOC study. *PLoS One*. 2012;7:e42156
- Pragman AA, Kim HB, Reilly CS, Wendt C, Isaacson RE. The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2012;7:e47305.
- Pruesse, E. Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:7188-96.
- Puhan MA, Bachmann LM, Kleijnen J, Ter Riet G, Kessels AG. Inhaled drugs to reduce exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a network meta-analysis. *BMC Med*. 2009;7:2.
- Qvarfordt I, Riise GC, Andersson BA, Larsson S. IgG subclasses in smokers with chronic bronchitis and recurrent exacerbations. *Thorax*. 2001;56:445-449.
- Rabe KF, Wedzicha JA, Wouters EFM. COPD and Comorbidity. *European Respiratory Society Monograph*. 2013;59.
- Raherison P, Girodet PO. Epidemiology of COPD. *Eur Respir Rev*. 2009;18:114,213-21.
- Ram FS, Rodriguez-Roisin R, Granados-Navarrete A, Garcia-Aymerich J, Barnes NC. Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(2):CD004403.
- Rao VK, Krasan GP, Hendrixson DR, Dawid S, St Geme JW 3rd. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev*. 1999;23:99-129.

- Rea H, McAuley S, Jayaram L, Garrett J, Hockey H, Storey L, et al. The clinical utility of long-term humidification therapy in chronic airway disease. *Respir Med.* 2010;104:525-33.
- Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL, Alfaro M. Patrón de mortalidad en España, 2010. Madrid. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2013.
- Rogers AV, Ädelroth E, Hattotuwa K, Dewar A, Jeffery PK. Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax.* 2008;63:108-114.
- Rogers GB, Carroll MP, Bruce KD. Studying bacterial infections through culture-independent approaches. *J Med Microbiol.* 2009;58:1401-1418.
- Rohde G, Wiethège A, Borg I, Kauth M, Bauer TT, Gillissen A, et al. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax.* 2003;58:37-42
- Rosell A, Monsó E, Soler N, Torres F, Angrill J, Rise G, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med.* 2005;165:891-7.
- Ruta Asistencial EPOC Cantabria. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica EPOC. Gerencia de Atención Primaria Servicio Cántabro de Salud. Ergon; 2014. 67p.
- Salvi SS, Bames PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non smokers. *Lancet.* 2009;374:733-43.
- Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sánchez-García FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol.* 2016;7:52.doi: 10.3389/fimmu.2016.00052.

- Sandner-Miranda L, Vinuesa P, Soberón-Chávez G, Morales-Espinosa R. Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens* SmUNAM836, a Nonpigmented Multidrug-Resistant Strain Isolated from a Mexican Patient with Obstructive Pulmonary Disease. *Genome Announc.* 2016;4(1).pii:e01417-15.
- Schembri S, Morant S, Winter JH, MacDonald TM. Influenza but not pneumococcal vaccination protects against all-cause mortality in patients with COPD. *Thorax.* 2009; 64:567-72.
- Schloss PD. Application of a Database-Independent Approach To Assess the Quality of Operational Taxonomic Unit Picking Methods. *mSystems.* 2016;1(2).
- Seemungal T, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1418-22.
- Seemungal T, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA, et al. Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:1608-13.
- Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1618-23.
- Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung Microbiome for Clinicians. New Discoveries about Bugs in Healthy and Diseased Lungs. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;(11):108-16.
- Sekirov I, Finlay BB. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol.* 2009;587:4159-67.

- Seo YB, Hong KW, Kim IS, Choi WS, Baek JH, Lee J, et al. Effectiveness of the influenza vaccine at preventing hospitalization due to acute lower respiratory infection and exacerbation of chronic cardiopulmonary disease in Korea during 2010-2011. *Vaccine*. 2013;31:1426-30.
- Sethi S, Evans N, Grant B, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *New Eng J Med*. 2002;347:465-71.
- Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:991-998.
- Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2008a;359:2355-65.
- Sethi S, Sethi R, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, et al. Airway bacterial concentrations and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:356-61.
- Sethi S, Wrona C, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, Murphy TF. Inflammatory Profile of New Bacterial Strain Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008b;Vol177:491-97.
- Sethi S. Chronic obstructive pulmonary disease and infection. Disruption of the microbiome?. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11Suppl1:S43-47.
- Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J*. 2010;35:1209-15.
- Shaw JG, Vaughan A, Dent AG, O'Hare PE, Goh F, Bowman RV, et al. Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Thorac Dis*. 2014;6:1532-47.

- Shiomi T, Okada Y, Foronjy R, Schiltz J, Jaenish R, Krane S, et al. Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1. *Exp Lung Res.* 2003;29:1-15.
- Sobradillo-Peña VS, Miravittles M, Gabriel R, Jiménez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, et al. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest.* 2000;118:981-9.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:12115-20.
- Sogin SJ, Sogin ML, Woese CR. Phylogenetic measurement in prokaryotes by primary structural characterization. *J Mol Evol.* 1972;1:173-84.
- Solanes I, Casan P. Causas de muerte y predicción de mortalidad en la EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2010;46:343-6.
- Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1999;14:1015-22.
- Soler-Cataluña JJ, Martínez García MA, Catalán Serra P. The frequent exacerbator. A new phenotype in COPD? *Hot Topics. Respir Med.* 2011;6:7-12.
- Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Román-Sánchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2005;60:925-31.
- Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Sánchez L, Perpiña M, Román P. Severe exacerbations and BODE index: two independent risk factors for death in male COPD patients. *Respir Med.* 2009;103:692-9.

- Soler-Cataluña JJ, Rodríguez-Roisin R. Frequent chronic obstructive pulmonary disease exacerbators: how much real, how much fictitious?. *COPD*. 2010;7:276-84.
- Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR. Analysis of Hydrothermal Vent-Associated Symbionts by Ribosomal RNA Sequences. *Sci*. 1984;224:409-11.
- Staley JT, Konopka A. Measurement of in Situ Activities of Non photosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu Rev Microbiol*. 1985;39:321-46.
- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA. New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004;70:4748-55.
- Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of sputum color tonature and out patient management of acute exacerbations of COPD. *Chest*. 2000;117:1638-45.
- Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink J V, et al. The Lung Tissue Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. American Thoracic Society. 2012;185:1073-80.
- Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, et al. The host response to the lung microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:438-45.
- Thomsen M, Ingebrigtsen TS, Marott JL, Dahl M, Lange P, Vestbo J, et al. Inflammatory biomarkers and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA*. 2013;309:2353-61.

- Van der V, Monninkhof E, Van der Palen J, Zielhuis G, Van HC, Hendrix R. Clinical predictors of bacterial involvement in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis*. 2004;39:980-6.
- Van Scoy RE. Bacterial sputum cultures. A clinician's viewpoint. *Mayo Clin Proc*. 1977;52:3941.
- Vendrell M, De Gracia J, Oliveira C, Martínez MA, Girón R, Máiz L. Diagnosis and treatment of bronchiectasis. Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol*. 2008;44:629640.
- Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, et al. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *MBio*. 2015;20:6(1) e02284-14.
- Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;87:347365.
- Vila-Córcoles A, Ochoa O, De Diego C, Valdivieso A, Herreros I, Bobé F, et al. Effects of annual influenza vaccination on winter mortality in elderly people with chronic pulmonary disease. *Int J Clin Pract*. 2008;62:10-7.
- VonHertzen L, Alakärppä H, Koskinen R, Liippo K, Surcel HM, Leinonen M, et al. Chlamydia pneumonia infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiol Infect*. 1997;118:155-64.
- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2163-96.

- Walters JA, Gibson PG, Wood-Baker R, Hannay M, Walters EH. Systemic corticosteroids for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(1):CD001288.
- Wang J, Shen N, Du Y, Erb-Downward JR, Huffnagle GB, Gyetko MR, et al. Preparation of the metagenomic DNA from bronchoalveolar lavage fluids of patients with chronic obstructive pulmonary diseases. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2014;54:943-9.
- Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, Spivak A, Mayhew D, Miller BE, et al. Lung microbiome dynamics in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *ERJ Express.* 2016;doi:10.1183/13993003.01406-2015.
- Wedzicha JA, Brill SE, Allinson JP, Donaldson GC. Mechanisms and impact of the frequent exacerbator phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Medicine.* 2013;11:181.
- Wedzicha JA. Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1:115-20.
- Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *The Lancet.* 2007;370:786-96.
- Weinreich UM, Korsgaard J. Bacterial colonisation of lower airways in health and chronic lung disease. *Clin Respir J.* 2008;2:116-22.
- WHO 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Disponible en: http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/
- WHO 2008. World health statistics 2008. Consultado en junio de 2013. Disponible en: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf.2010.

- Wilkinson TM, Patel IS, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:1090-5.
- Wilmes P, Bond P. Towards exposure of elusive metabolic mixed-culture processes: the application of metaproteomic analyses to activated sludge. *Water Sci Technol.* 2006;54:217-26.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:4576-9.
- Woese CR, Sogin ML, Sutton LA. Procaryote phylogeny. *J Mol Evol.* 1974;3:293-9
- Woese CR. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 1987;51:221-271.
- Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74:5088-90.
- Wu D, Hou C, Li Y, Zhao Z, Liu J, Lu X, et al. Analysis of the bacterial community in chronic obstructive pulmonary disease sputum samples by denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *BMC Pulm Med.* 2014;14:179.
- Yan X, Yang M, Liu J, Gao R, Hu J, Li J. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):3111-22.
- Yang H, Xiang P, Zhang E, Guo W, Shi Y, Zhang S, et al. Predictors of exacerbation frequency in chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Medical Research.* 2014;19:18.

Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222-7.

Zakharkina T, Heinzl E, Koczulla RA, Greulich T, Rentz K, Pauling JK, et al. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by t-rflp and clone sequencing. *PLoS One*. 2013;8(7):e68302.

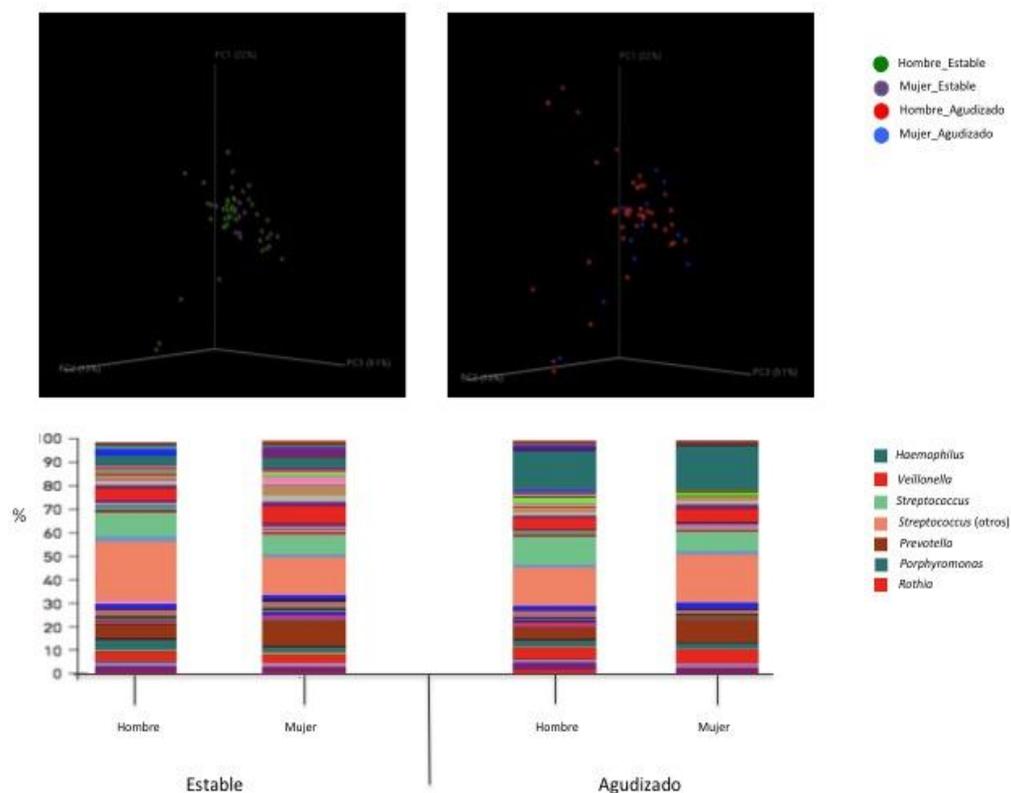
Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barrón J, Achótegui V, Pijoan JI, et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;13:343-48.

Zengler K. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol. Mol Biol Rev*. 2009;73:712-29.

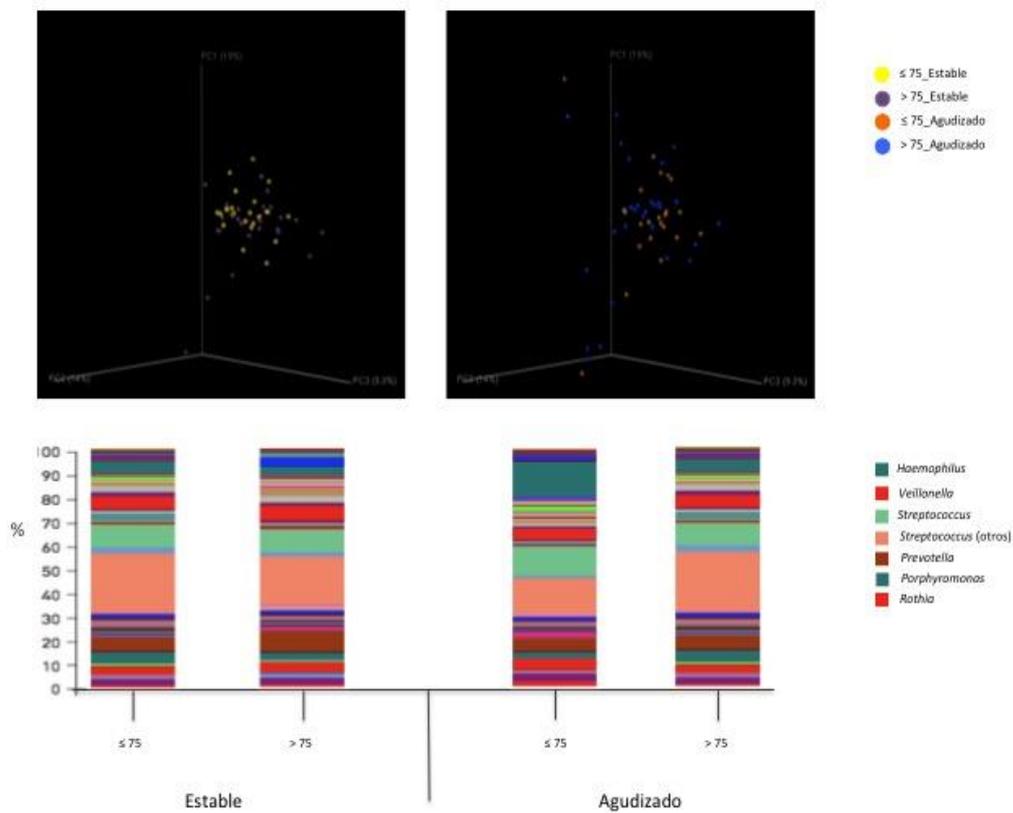
IX Anexos

IX. ANEXOS.

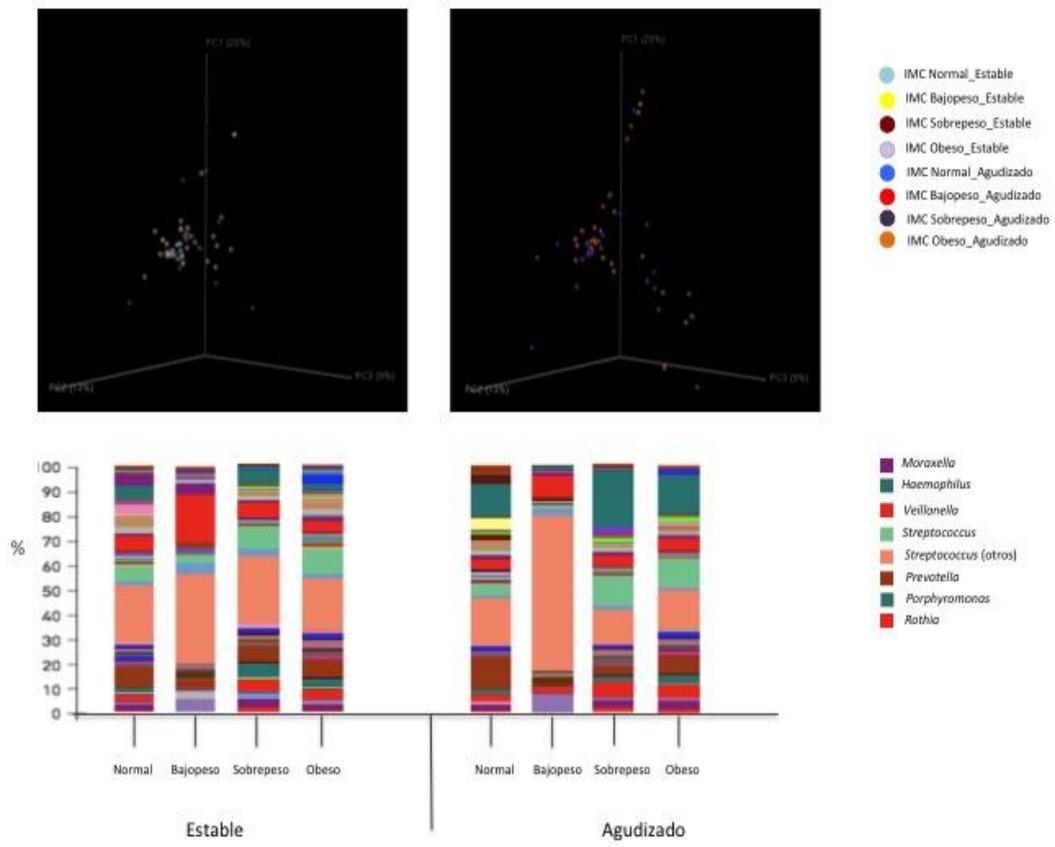
ANEXO I. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA ATENDIENDO AL RESTO DE VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS: SEXO, EDAD, IMC, TABAQUISMO, SINTOMATOLOGÍA (mMRC, CAT) Y RIESGO DE DESARROLLAR EXACERBACIONES (FENOTIPO AGUDIZADOR).



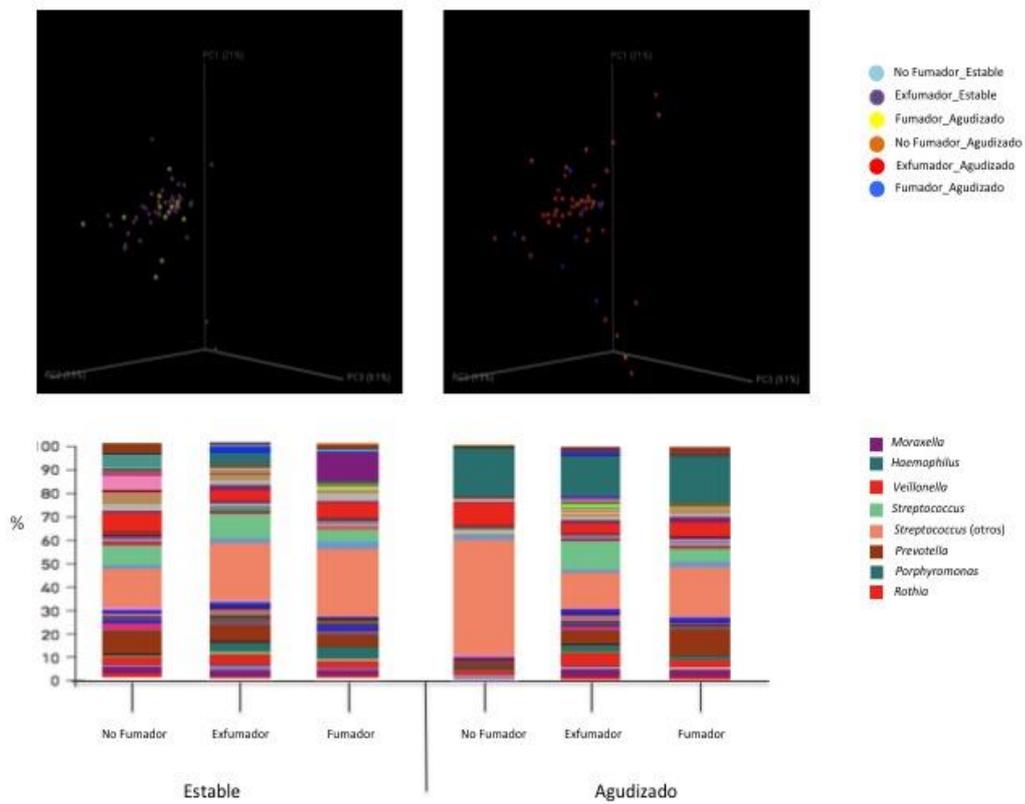
Anexo I a. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, en función del sexo, para las muestras de la categoría clínica “Estable” y “Agudizado” separadamente.



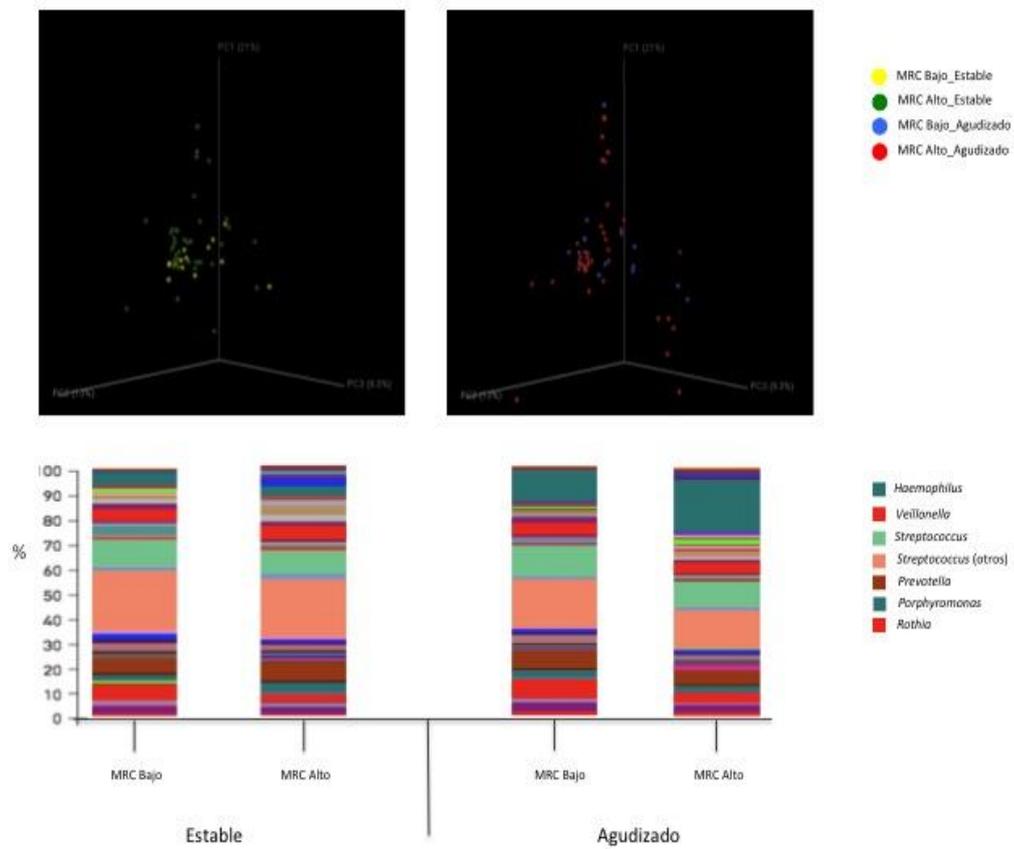
Anexo I b. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, en función de la edad (años), para las muestras de la categoría clínica “Estable” y “Agudizado” separadamente.



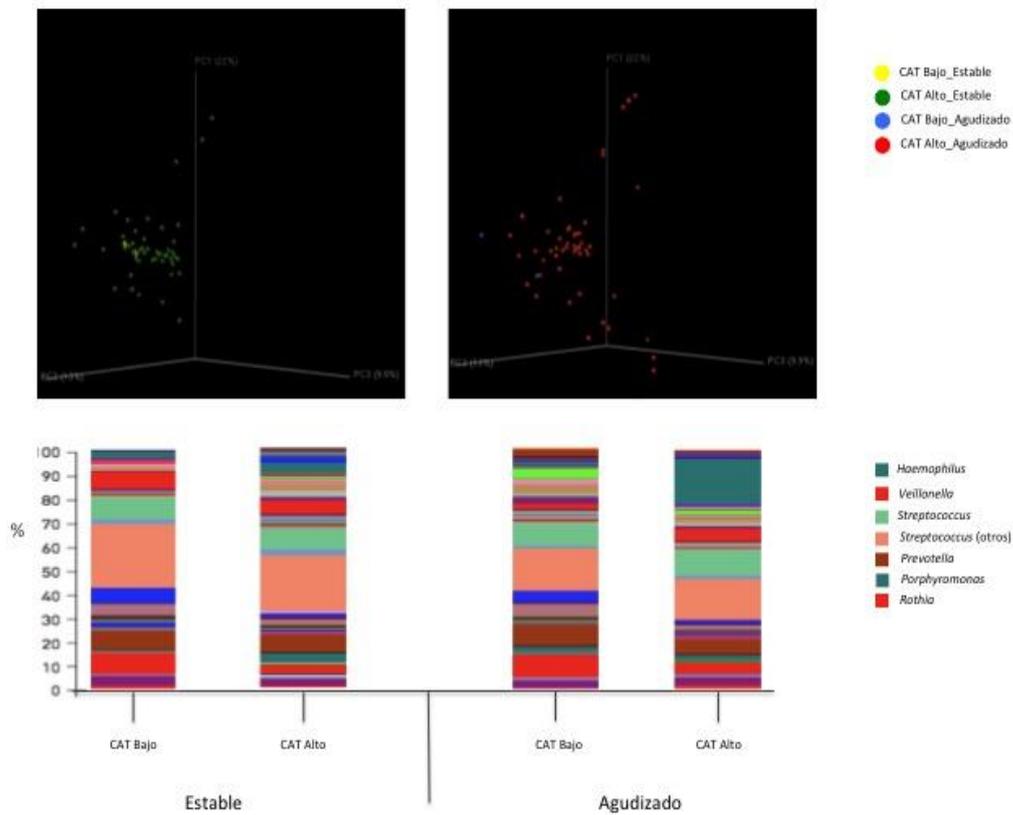
Anexo I c. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, en función del IMC (Categorías OMS), para las muestras de la categoría clínica “Estable” y “Agudizado” separadamente.



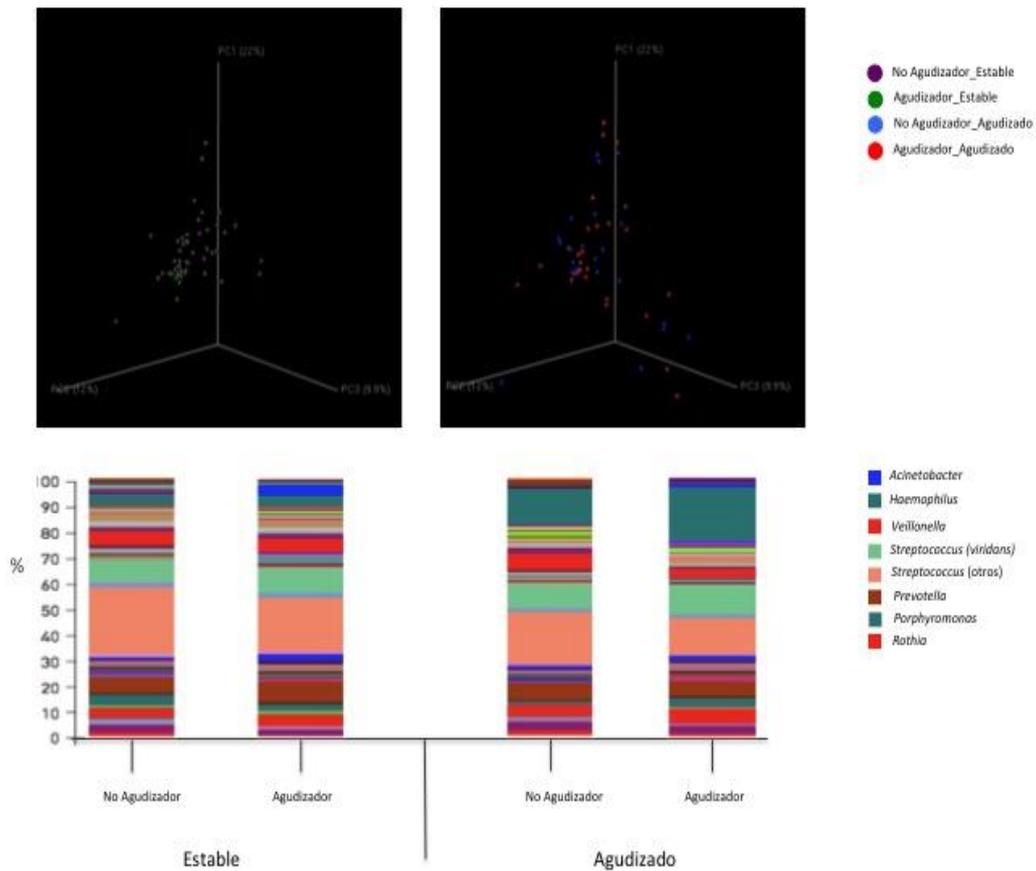
Anexo I d. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, en función del hábito tabáquico, para las muestras de la categoría clínica “Estable” y “Agudizado” separadamente.



Anexo I e. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, en función de la sintomatología determinada según la escala mMRC (poco sintomáticos, bajo, si mMRC < 2 y muy sintomáticos, alto, si mMRC \geq 2), para las muestras de la categoría clínica “Estable” y “Agudizado” separadamente.



Anexo I f. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, en función de la sintomatología determinada según el cuestionario CAT (poco afectados, bajo, si $CAT < 10$ y muy afectados, alto, si $CAT \geq 10$), para las muestras de la categoría clínica “Estable” y “Agudizado” separadamente.



Anexo I g. Análisis de Componentes Principales e histogramas de frecuencia de la composición de la microbiota expresada en abundancia relativa de cada género bacteriano, en función del nº de agudizaciones el año previo (fenotipo agudizador: ≥ 2 agudizaciones el año previo), para las muestras de la categoría clínica “Estable” y “Agudizado” separadamente.