

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

**DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA PRESENTE EN EL
TRACTO RESPIRATORIO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.**

Memoria presentada por **Elena Campano Cuevas** para optar al grado de
Doctor.

Sevilla, Septiembre de 2016.

**DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA PRESENTE EN EL
TRACTO RESPIRATORIO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.**

Memoria presentada por **Elena Campano Cuevas** para optar al grado de
Doctor

Directores

Enrique Calderón Sandubete

Profesor Asociado
Departamento de Medicina

Carmen de la Horra Padilla

Doctora en Farmacia
CIBER Epidemiología y Salud Pública

**Departamento de Medicina
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la elaboración de este trabajo:

A los Doctores Enrique Calderón y Javier Medrano, por depositar su confianza en mí y brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

Agradezco a mi amiga y Directora de Tesis, la Dra. Carmen de la Horra, la lectura exhaustiva de este trabajo, las correcciones y sugerencias que me sirvieron y aportaron mucho. Gracias por tu paciencia, por todo lo que me has enseñado, por tu disponibilidad dentro y fuera del trabajo, por el esfuerzo que tanto tú como tu familia realizasteis para que yo pudiera hacer esta tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Vicente Friaiza y Rubén Morilla, por el inmejorable ambiente de trabajo que creamos juntos y por todo lo que me enseñaron y aportaron dentro y fuera del laboratorio.

A mi familia, mis padres, mi hermano y Yey por su constante preocupación y apoyo incondicional. Yo no tenía tanta fe en mí, así que supongo que he vivido un poco de la vuestra durante estos años.

A mis amigas Lucía, Macarena, Tamara, Yeye y Coco por celebrar conmigo cada paso y saber darme su visión de las cosas que, aunque diferente a la mía, me complementa sin duda. Gracias por las charlas en la cocina, las cañas improvisadas y las cenas de los viernes.

Y gracias a los que se fueron demasiado pronto pero siguen estando en mis pensamientos...

**DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA
PRESENTE EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE
SUJETOS CON ENFERMEDAD PULMONAR
OBSTRUCTIVA CRÓNICA.**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	12
1. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.	13
1.1. Definición, diagnóstico e importancia.	13
1.2. Fisiopatología	15
1.2.1. Desequilibrio proteasa-antiproteasa.	16
1.2.2. Estrés Oxidativo.	16
1.2.3. Apoptosis y reparación ineficaz.	18
1.2.4. Inflamación y Procesos Infecciosos.	19
1.2.5. Exacerbaciones.	24
1.3. Tratamiento de la EPOC.	25
2. Microbiota del tracto respiratorio de sujetos con EPOC.	27
2.1 Bacterias y EPOC.	27
2.2 Hongos y EPOC.	29
2.3 Relación colonización-respuesta inmune.	30
2.4 Alteraciones en el parénquima pulmonar inducidas por hongos.	32
2.5. Técnicas de identificación de microorganismos.	35
2.5.1. Técnicas de tinción.	35
2.5.2. Cultivos convencionales.	35
2.5.3. Técnicas de Inmunoensayo.	36
2.5.4. Técnicas analíticas.	37
2.5.5. Técnicas Moleculares.	37
JUSTIFICACIÓN	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
MATERIAL Y MÉTODOS	43
1. Diseño.	44
2. Población en estudio.	44
2.1. Criterios de inclusión.	44
2.2. Criterios de exclusión.	44
2.3. Parámetros evaluados.	45
2.4. Variables en estudio.	45
3. Métodos.	46
3.1. Obtención y procesamiento inicial de las muestras.	46
3.2. Protocolo de extracción de ADN.	46
3.2.1 Digestión de las muestras.	46
3.2.2 Extracción de ADN partir de muestras de LOF.	47
3.2.3 Extracción de ADN partir de muestras de esputo.	47
3.3. Técnicas de amplificación del ADN.	47
3.4. Identificación molecular de especies fúngicas.	50
3.4.1. Técnica de amplificación de la región ITS.	50
3.4.2. Técnica de Clonación.	51
3.4.3. Técnica de Secuenciación.	56

3.4.4. Identificación de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .	62
3.6. Medidas de Control.	65
3.7. Criterios de interpretación de los resultados y definición de colonización.	66
3.8. Cuantificación de citoquinas y quitotriosidasa.	66
3.9. Cuantificación de MCP-1.	67
3.10. Cuantificación de β -glucanos.	67
3.10.1. Protocolo del ensayo Fungitell.	68
3.10.2. Interpretación de los resultados.	69
3.11. Recogida y análisis de los datos.	69
3.12. Aspectos éticos.	70
RESULTADOS	71
1. Características de la población estudiada.	72
2. Variables clínico-biológicas de la población.	73
3. Descripción de la microbiota fúngica en el tracto respiratorio.	74
3.1 Prevalencia de colonización por hongos en el total de la muestra.	74
3.2 Colonización por hongos y grados de la EPOC.	80
3.3. Estudio de la respuesta inflamatoria sistémica.	84
3.3.1. Comparación entre sujetos colonizados y no colonizados en el total de la población estudiada.	84
3.3.2. Comparación entre pacientes colonizados y no colonizados en cada grupo EPOC.	90
4. Cuantificación de los niveles séricos de β -glucano en el total de la población estudiada.	99
5. Estudio de la relación entre los niveles séricos de β -glucanos y la respuesta inflamatoria sistémica.	101
DISCUSIÓN	103
1. Limitaciones.	104
2. Descripción del microbioma identificado en la población estudiada.	107
2.1. Género <i>Candida</i> .	110
2.2. <i>Pneumocystis jirovecii</i> .	113
2.3. Otros hongos patógenos.	117
2.4. Hongos ambientales.	119
3. Relación entre la colonización por hongos y la respuesta inflamatoria sistémica del huésped.	120
4. Relación entre la colonización por hongos y la concentración sistémica de β -glucanos.	128
5. Estudio de la correlación entre la concentración sérica de β -glucanos y la respuesta inflamatoria sistémica.	131

CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFÍA	136
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	157
ANEXOS	160

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

1.1. Definición, diagnóstico e importancia.

La organización *The Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (GOLD) define a la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) como “un estado clínico caracterizado por la limitación del flujo aéreo que no es reversible”. La EPOC es una entidad prevenible y tratable, generalmente progresiva y asociada a una respuesta inflamatoria exagerada de las vías aéreas y del parénquima pulmonar frente a partículas o gases nocivos. Las exacerbaciones y comorbilidades que presenta cada paciente influyen en la gravedad de la enfermedad (Vestbo *et al.*, 2013).

Los síntomas de la EPOC incluyen: disnea, que suele ser progresiva y persistente, tos crónica, que puede ser intermitente e improductiva, y expectoración crónica. Los episodios de agudización de estos síntomas pueden ser habituales. Hay que contemplar la posible existencia de EPOC en un individuo con más de 40 años de edad que presente cualquiera de estos síntomas y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo de la enfermedad, como el humo del tabaco, el humo de leña, el polvo o los vapores y gases tóxicos o que tenga antecedentes familiares de EPOC (Iniciativa Global para la EPOC, 2011).

El diagnóstico clínico de la enfermedad requiere ineludiblemente de la espirometría. Ésta es una prueba funcional sencilla que permite estudiar el funcionamiento pulmonar analizando, en circunstancias controladas, la magnitud absoluta de los volúmenes pulmonares y la rapidez con la que el paciente es capaz de movilizarlos. Los parámetros espirométricos empleados para el diagnóstico de la EPOC son:

La Capacidad Vital Forzada (CVF), que es el máximo volumen de aire, expresado en litros, que puede espirar un individuo después de una inspiración máxima.

El Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (VEF_1), que se define como el volumen espirado en el primer segundo de una espiración máxima tras una inspiración profunda.

Para aislar el efecto del tamaño pulmonar, se calcula el VEF_1 como porcentaje de la CVF. Los individuos normales espiran durante el primer segundo entre un 70 y 80% de la CVF. Por lo tanto, una relación VEF_1/CVF menor de 0,7 indica obstrucción de las vías aéreas y, por tanto, identifica la presencia de EPOC (Vestbo *et al.*, 2013). La espirometría debería realizarse en todas las personas expuestas al cigarrillo y/o polución ambiental o laboral que presenten síntomas, particularmente disnea, para diagnosticar la obstrucción de la vía aérea (Qaseem *et al.*, 2007).

En función a las pruebas funcionales, la EPOC se clasifica en cuatro estadios según la gravedad de la limitación al flujo aéreo (Iniciativa Global para la EPOC, 2011):

Tabla 1. Clasificación de la EPOC según la Iniciativa Global para la EPOC.

Clasificación Espirométrica de la severidad de la EPOC basada en el VEF_1 post-broncodilatador	
Estadio 1: Leve	$VEF_1/VFC < 0,70$ $VEF_1 \geq 80\%$ del valor predicho
Estadio 2: Moderada	$VEF_1/VFC < 0,70$ $50\% \leq VEF_1 < 80\%$ del valor predicho
Estadio 3: Grave	$VEF_1/VFC < 0,70$ $30\% \leq VEF_1 < 50\%$ del valor predicho
Estadio 4: Muy Grave	$VEF_1 < 30\%$ del valor predicho o $VEF_1 < 50\%$ del valor predicho + FRC

La EPOC es una de las principales causas de enfermedad, muerte y uso de recursos sanitarios en todo el mundo. Esta afección causa 2,7 millones de muertes al año y se cree que esta cifra seguirá aumentando progresivamente. Hoy día, es la cuarta causa de muerte en adultos y se estima que alcanzará el tercer puesto en 2020 (Vestbo *et al.*, 2013; López *et al.*, 2006). Según la Guía Española de la EPOC, dicha enfermedad es la quinta causa de muerte entre los varones, con una tasa anual de 61 muertos por 100.000 habitantes españoles, y la séptima para las mujeres, con una tasa anual de 20 muertes por 100.000 habitantes en el año 2005, estimándose que entre un 9,1% y un 10,2% de la población adulta de más de 40 años padece EPOC en España. Según la Encuesta de Morbilidad Hospitalaria de 2005 las altas por EPOC supusieron el 6,5% del total. El coste total asociado a esta enfermedad equivale al 0,2% del Producto Interior Bruto (Miravittles *et al.*, 2014).

El hecho de que la prevalencia de la EPOC siga en aumento ha producido una enorme carga económica para los individuos y la sociedad en términos de tiempo perdido de trabajo, reducción de la calidad de vida y admisiones más frecuentes en el hospital (Chapman *et al.*, 2006).

El principal factor de riesgo para la EPOC es la exposición al tabaco, que está presente hasta en el 90% de los casos. En este sentido, en el Centro y el Este de Europa, donde existe una alta tasa de fumadores, la prevalencia de la EPOC es la más elevada según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (Chapman *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006).

1.2. Fisiopatología.

Aunque existe una considerable atención puesta en la prevención y el tratamiento de la enfermedad, su complejidad hace que su historia natural y patogenia no estén totalmente aclaradas.

Entre los factores de riesgo que se han asociado con el desarrollo y la progresión de esta enfermedad destacan: la inhalación de partículas orgánicas e inorgánicas, las anomalías en el desarrollo del pulmón, los factores genéticos, el envejecimiento acelerado, la hiperreactividad bronquial, el nivel socioeconómico y, sobre todo, el humo del tabaco. Toda persona que fuma desarrolla un cierto grado de inflamación en su sistema respiratorio y la respuesta inflamatoria parece estar alterada en aquellos que desarrollarán EPOC (25-50% de los que fuman) (Vestbo *et al.*, 2013; Løkke *et al.*, 2006; Lundback *et al.*, 2003).

Esta respuesta inflamatoria crónica puede inducir la destrucción del parénquima pulmonar produciendo la aparición de enfisema. Además se alteran la reparación normal del tejido y los mecanismos de defensa, originando pequeñas fibrosis de las vías respiratorias. El daño en el tejido pulmonar conduce a una progresiva limitación del flujo aéreo (Vestbo *et al.*, 2013).

Sin embargo, la hipótesis de que un solo evento es el responsable del desarrollo de la EPOC es una simplificación excesiva. Probablemente los daños pulmonares que se dan en la enfermedad sean consecuencia de la combinación de varios mecanismos: un desequilibrio en el balance proteasa-antiproteasa, ciertos mecanismos inmunológicos, el

estrés oxidativo, la inflamación sistémica y/o la apoptosis y reparación ineficaz, entre otros aún sin conocer.

1.2.1. Desequilibrio proteasa-antiproteasa.

Esta hipótesis defiende que la destrucción del tejido pulmonar y el enfisema se deben a un desequilibrio entre la cantidad de proteasas y sus inhibidores.

Por un lado, se ha relacionado el enfisema con una deficiencia de α 1-antitripsina (α 1AT), inhibidor primario de la elastasa de los neutrófilos. La elastasa degrada la elastina, produciendo así una pérdida de la elasticidad del parénquima pulmonar. Un déficit de antiproteasa, por ejemplo como consecuencia de una mutación genética, permite que la elastasa actúe relativamente sin oposición, cambiando así la balanza a favor de elastolisis. De esta forma, la α 1AT mutada promueve la inflamación (Lomas *et al.*, 1993; Shapiro *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha propuesto que el humo del tabaco podría ser responsable del desequilibrio y del consecuente desarrollo de enfisema en sujetos que no presentan dicho déficit genético. En este sentido, existe cierta controversia entre estudios que demuestran una reducción en la funcionalidad de las antiproteasas en fumadores, si se compara con la de no-fumadores (Gadek *et al.*, 1979) y otros que afirman que esta deficiencia funcional no es debida a la inactivación por oxidantes en el humo del cigarrillo, puesto que la α 1-antiproteasa del pulmón de sujetos fumadores es, al menos, tan eficiente en su actividad como inhibidora de elastasa que la de no-fumadores. Se cree, pues, que la exposición crónica al humo del tabaco produce una acumulación de células inflamatorias en las vías aéreas, especialmente macrófagos y neutrófilos, capaces de liberar proteasas y desbordar la capacidad neutralizadora de las antiproteasas, causando el desarrollo de enfisema (Stone *et al.*, 1983).

1.2.2. Estrés Oxidativo.

En el organismo existe un equilibrio entre la toxicidad de los oxidantes y la función protectora que ejercen los antioxidantes de los sistemas de defensa tanto intra como extracelulares. La variación del equilibrio oxidante/antioxidante a favor de los oxidantes se conoce como estrés oxidativo (Sies, 1991). El humo del tabaco tiene altas

concentraciones de radicales libres y otros oxidantes (Church *et al.*, 1985; Pryor *et al.*, 1983). Además, en el pulmón también pueden aparecer especies reactivas del oxígeno como consecuencia de procesos celulares normales como la respiración celular (Phaniendra *et al.*, 2015) o como parte de la respuesta defensiva frente a agentes infecciosos (Kratzer *et al.*, 2012). Se ha observado un aumento considerable del estrés oxidativo en fumadores y en pacientes con EPOC (MacNee, 2001).

El estrés oxidativo causado por aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, bien sean de origen endógeno o exógeno, parece estar implicado en varios procesos patogénicos asociados a la EPOC.

Además de las proteínas y el ADN, un sitio importante de ataque de los radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, produciendo en ellas la peroxidación de lípidos y la consecuente rotura de la bicapa constitutiva de las mismas (Phaniendra *et al.*, 2015). En este sentido, en fumadores sanos se ha observado un incremento sérico significativo de F2-isoprostano, marcador de la peroxidación lipídica, en comparación con sujetos no fumadores (Morrow *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha demostrado un aumento de la peroxidación lipídica en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC en comparación con sujetos que no tienen desarrollada la enfermedad (Rahman *et al.*, 2002). En ese estudio, el nivel de peroxidación de los lípidos en el epitelio alveolar y endotelio de las vías aéreas se correlacionaba inversamente con el VEF₁.

En este sentido, otro estudio *in vitro* confirma que el tabaco, fundamentalmente en su fase volátil donde hay mayor cantidad de oxidantes, induce apoptosis de líneas celulares alveolares tipo II, incluso a baja concentración de oxidantes, y necrosis a altas concentraciones. En este ensayo se midió un aumento de la actividad oxidativa intracelular de los alveolos expuestos al humo. Aún así, los efectos citotóxicos se vieron atenuados cuando las células fueron expuestas a los antioxidantes correspondientes. Puesto que el fluido de revestimiento alveolar tiene actividad antioxidante, éste podría prevenir el efecto citotóxico del tabaco en individuos sanos pero no en aquellos que presenten una enfermedad respiratoria inflamatoria ni en los fumadores crónicos debido a que en ellos esta actividad está disminuida (Hoshino *et al.*, 2001).

Además, de forma indirecta el humo del tabaco provocaría también un incremento en la cantidad de especies oxidantes en los pulmones: los fumadores presentan un aumento del número de neutrófilos y macrófagos en el espacio alveolar y una mayor liberación de radicales del oxígeno por parte de estas células, si se compara con no fumadores (Martín *et al.*, 1985; Kilburn *et al.*, 1975). Por otro lado, las frecuentes exacerbaciones que experimentan los pacientes con EPOC, en gran parte secundarias a infecciones, pueden contribuir al reclutamiento y la activación de células fagocíticas al pulmón y aumentar la carga oxidante (Cosío, 2007).

En contraposición, el fluido del revestimiento del tracto respiratorio cuenta con antioxidantes que, en teoría, nivelan la balanza neutralizando la acción oxidativa que tiene lugar en el pulmón de manera fisiológica. Algunas de las principales macromoléculas antioxidantes son superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa (Cantin *et al.*, 1987; Cantin *et al.*, 1990). Sin embargo, parece que el aumento en la actividad de células inflamatorias en las vías aéreas inferiores sumado a la carga oxidante que procede de la contaminación ambiental y, sobretodo, del humo del tabaco, sobrepasa en la capacidad antioxidante del pulmón, produciendo así una elevación del estrés oxidativo en estos sujetos.

1.2.3. Apoptosis y reparación ineficaz.

La apoptosis es un mecanismo bien regulado de muerte celular. Esta muerte celular programada permite la eliminación de células dañadas. Hay datos que demuestran un aumento de la apoptosis del epitelio alveolar y células endoteliales en los pulmones de pacientes con EPOC en comparación con fumadores y sujetos sanos. Dado que esto no es contrarrestado por un aumento de la proliferación de estas células estructurales, el resultado neto es la destrucción del tejido pulmonar y el desarrollo de enfisema (Cosío, 2007).

El epitelio alveolar a menudo resulta dañado por una variedad de toxinas inhaladas y/o por el humo del tabaco, y en respuesta a esta lesión se inicia una reparación del tejido por parte de las células del epitelio alveolar (Rennard, 1999). Este aumento en la proliferación de las células de la pared alveolar podría frenar y/o alterar su correcta diferenciación hacia su fenotipo funcional y, por consiguiente, daría lugar a un tejido con estructura y función anómala (Yokohori *et al.*, 2004).

Por otro lado, la continúa lesión y regeneración epitelial que tiene lugar en las enfermedades pulmonares crónicas promueve ciclos celulares repetidos en las células del epitelio que pueden acortar la longitud de los telómeros, con lo que potencialmente inducirían la senescencia replicativa (Tsuji *et al.*, 2004).

1.2.4. Inflamación y Procesos Infecciosos.

El origen de la inflamación asociada a la EPOC aún es desconocido pero el hábito tabáquico se ha considerado como el punto de partida en la patogénesis de la enfermedad. En la mucosa bronquial de los pacientes con EPOC predominan los linfocitos T, principalmente CD8+, y los macrófagos; y se cree que la presencia de estos linfocitos T podría diferenciar entre los fumadores que desarrollan EPOC y los que no la desarrollan (Saetta *et al.*, 1998). Sin embargo, el hecho de dejar de fumar no revierte el proceso inflamatorio iniciado, lo que sugiere que existen otros factores que mantienen o incluso incrementan esta respuesta inflamatoria de forma crónica.

En los sujetos con EPOC, el árbol traqueobronquial suele estar colonizado por microorganismos considerados como posibles patógenos respiratorios, predominantemente *H. influenzae* no tipificable, *S. pneumoniae* y *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* (Murphy *et al.*, 2004; Laurenzi *et al.* 1961; Haas *et al.*, 1977). Estos microorganismos podrían actuar como estímulo para desencadenar una respuesta inflamatoria en el sujeto colonizado y, en el caso de pacientes EPOC, contribuir a la progresión de la enfermedad (Sethi *et al.*, 2006). El fenómeno inflamatorio asociado a la entrada de sustancias tóxicas en las vías aéreas provocaría, entonces, una respuesta defensiva en el huésped que engloba desde la activación de la respuesta inmune hasta la estimulación de la afluencia de células al pulmón, así como la inducción de la diferenciación y la supervivencia de las células inflamatorias o la proliferación y/o activación de las células estructurales, contribuyendo de esta manera al remodelado que tiene lugar en la EPOC. Estudios histológicos muestran que el foco de la inflamación se localiza en el parénquima pulmonar y los bronquiolos. Éstos están obstruidos por la presencia de fibrosis e infiltración por macrófagos y linfocitos, predominando los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) (Barnes, 2000). Por tanto, la

inflamación es un componente clave para la progresión de la EPOC e involucra a diferentes tipos de células y una gran variedad de mediadores proinflamatorios.

Por tanto, la infección bacteriana podría condicionar la etiología, la patogénesis y el curso clínico de la EPOC de varias formas: (a) la infección del tracto respiratorio inferior durante la infancia podría predisponer al sujeto a sufrir la enfermedad en la edad adulta; (b) las bacterias causan exacerbaciones agudas que pueden contribuir significativamente a la morbilidad y la mortalidad de la EPOC, ya que estas infecciones recurrentes podrían acelerar el daño pulmonar asociado a la EPOC; y (c) la colonización/infección crónica de los tejidos respiratorios podría inducir una respuesta inflamatoria crónica produciendo un daño pulmonar progresivo (la hipótesis del círculo vicioso) (Murphy *et al.*, 1992).

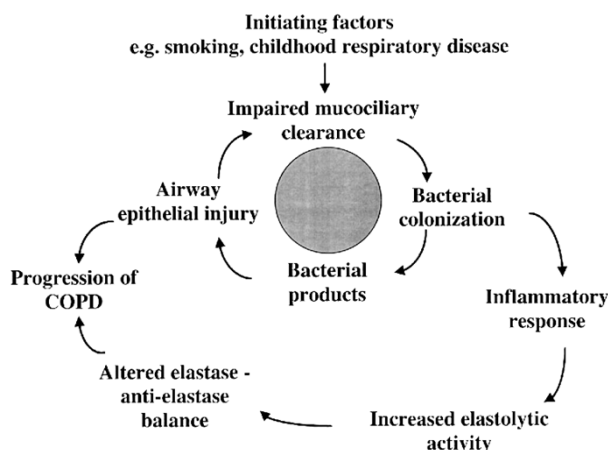


Figura 1. Hipótesis del círculo vicioso (Sethi, 2000).

La hipótesis del círculo vicioso pretende explicar cómo la colonización bacteriana crónica de las vías respiratorias inferiores puede perpetuar la inflamación y contribuir a la progresión de esta enfermedad. Como apoyo sustancial a esta hipótesis se cuenta con la evidencia de que los patógenos bacterianos logran establecerse y persistir en el tracto respiratorio inferior gracias al deficiente aclaramiento mucociliar provocado por el consumo de tabaco. A su vez, la evidencia experimental *in vitro* demuestra que estos patógenos y sus productos pueden perpetuar dicho fallo en el aclaramiento induciendo la secreción de moco, alterando la actividad mucociliar y provocando daños en el epitelio pulmonar (Sethi, 2000). Todo ello originaría un efecto perjudicial en el pulmón, afectando a su capacidad para eliminar infecciones y estimulando una respuesta

inflamatoria crónica que acelera la disfunción pulmonar con o sin la presencia del tabaco.

Por otro lado, se ha observado en biopsias de pulmón de pacientes con EPOC en los diferentes estadios de la GOLD que la progresión de la enfermedad está íntimamente relacionada con un mayor volumen de tejido en las paredes bronquiales y con una acumulación de exudados inflamatorios en la luz de las vías aéreas pequeñas. Conforme avanza la enfermedad, existe una mayor afluencia de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T CD8+ y CD4+, células B y mayor cantidad de folículos linfoides en las vías respiratorias, lo que confirma la participación de la inmunidad innata y adaptativa en la patogenia de la EPOC (Hogg *et al.*, 2004).

Respuesta Inmune Innata.

El sistema inmune innato es el primero en responder a la presencia de agentes patógenos y/o nocivos, y lo hace de una forma genérica e inespecífica.

Esta respuesta primaria se realiza gracias a los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) que están presentes en gran variedad de microorganismos (Becker *et al.*, 2015). Además, el daño que ocasiona el humo del tabaco en el epitelio pulmonar desestabilizando la matriz extracelular produce la liberación de productos de ruptura que parece que también pueden actuar como ligando de algunos de estos receptores (Akira *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que los RRP se expresan en células del sistema inmune innato, es decir, en neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (Becker *et al.*, 2015). Los niveles de estas células se ven aumentados en el pulmón de sujetos con EPOC (Hogg *et al.*, 2004). Tras el reconocimiento de los PMAP por parte de los RRP, dichas células de la inmunidad innata desencadenarían una respuesta promoviendo la producción de mediadores inflamatorios como interleuquinas (IL), interferones (IFN) y

el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Kawai *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2015). El patrón de citoquinas parece responder, en cada caso, al tipo de microorganismo en cuestión (Sahaza *et al.*, 2015).

En este sentido se han publicado estudios que relacionan la presencia de microorganismos (bacterias y hongos) con la respuesta inmunitaria en el ser humano. En un trabajo con cultivos de células humanas de epitelio bronquial se observó un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias, entre ellas IL-6, IL-8 y TNF- α , causada por la presencia de endotoxinas de *H. influenzae* (Khair *et al.*, 1994). Más recientemente se ha demostrado también, aunque esta vez *in vivo*, un aumento de los niveles séricos de IL-6, IL-8 y TNF- α , que se relaciona con la presencia del hongo *Pneumocystis jirovecii* en el pulmón de pacientes con EPOC (Calderón *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado un aumento de los niveles plasmáticos de la enzima quitotriosidasa en enfermedades como el Gaucher (Hollak *et al.*, 1994), caracterizada por una activación crónica de macrófagos. En este sentido, se ha detectado una elevación en la actividad de esta enzima en fumadores habituales (Seibold *et al.*, 2008) y aún más en aquellos que padecen EPOC (Létuvé *et al.*, 2010). Esta enzima ha sido considerada como parte de la inmunidad innata en el ser humano: una vez secretada por los macrófagos, cataliza la hidrólisis de quitina y, por tanto, actúa en la defensa del huésped frente a patógenos que contienen este carbohidrato en su pared celular, como los hongos (Renkema *et al.*, 1995; van Eijk *et al.*, 2005). Sin embargo, y en contraposición a su efecto protector frente a estos microorganismos, se ha propuesto que esta enzima podría jugar un papel en la patogénesis de la EPOC modificando los procesos de remodelación tisular. De hecho, los niveles de quitotriosidasa en LBA se correlacionan con la obstrucción al flujo aéreo y con el enfisema (Cho *et al.*, 2015).

Además de los macrófagos, los neutrófilos también se encuentran aumentados en los pacientes con EPOC (Keatings *et al.*, 1996) y pueden actuar frente al patógeno por mecanismos oxidativos, mediante la producción de enzimas oxidantes como NADPH oxidasa (igual que monocitos y macrófagos) y mieloperoxidasa o también mediante un mecanismo no oxidante con la liberación de enzimas antimicrobianas como lisozimas, lactoferrinas, elastasas, defensinas, gelatinasa y catepsina G (Becker *et al.*, 2015).

La consecuencia global sería, por tanto, una respuesta inflamatoria que, por un lado, descargaría una cantidad excesiva de citoquinas y quimiocinas y, por otro, liberaría proteasas que destruiría el tejido pulmonar.

Finalmente, las células de la defensa innata, una vez son activadas por el patógeno, migran a los nódulos linfáticos para activar a los linfocitos T, constituyendo la interfase entre la respuesta innata y la adaptativa (Duez *et al.*, 2006). Tal y como se observa en la figura 2, la inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a patógenos. Las células dendríticas y los macrófagos reconocen a los patógenos mediante los RRP (principalmente los receptores Toll-like), los fagocitan y promueven la expresión de citoquinas y la presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad. Este fenómeno produce la activación y diferenciación de las células T a linfocitos Th1 o Th2, regulando así la respuesta inmune adaptativa (Arancibia *et al.*, 2007).

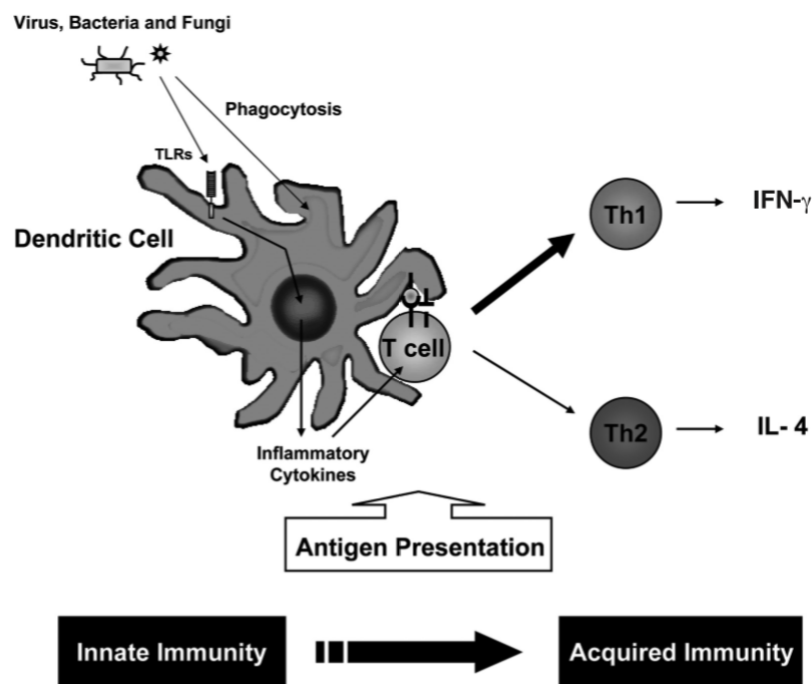


Figura 2. Ilustración donde se resume la interfase entre la respuesta innata y la adaptativa (Arancibia *et al.*, 2007).

Respuesta Inmune Adaptativa

La inmunidad adquirida o adaptativa comienza con la identificación de péptidos específicos de patógenos presentados por las células presentadoras de antígenos. Entre

las células que procesan y presentan el antígeno unido a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, figuran los monocitos-macrófagos, las células dendríticas y las células B. Posteriormente, se desencadena una respuesta inmunitaria celular, mediada por linfocitos T, y una respuesta humoral, mediada por linfocitos B (Xu *et al.*, 2004).

La presentación de antígenos en los nódulos linfáticos promueve la maduración y diferenciación de los linfocitos T a Linfocitos T CD8+ citotóxicos. Por otro lado, los RRP inducen la liberación de IL que, a su vez, promueven la diferenciación de las células T a linfocitos *T helper* (CD4+). Los linfocitos *T helper*-1 (promovidos por la IL-12) producen IL-2, IFN- γ y TNF- α , y controlan reacciones de inmunidad celular útiles frente a infecciones por microorganismos de crecimiento intracelular. Los linfocitos *T helper*-2 (promovidos por la IL-4) producen IL-4, IL-5 e IL-6, y colaboran en las reacciones de inmunidad humoral, fundamentales para neutralizar toxinas e infecciones por gérmenes de crecimiento extracelular (Arancibia *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2004; Redecke *et al.*, 2004). Estos linfocitos migran al lugar de la lesión y atacan a las células dañadas (en el caso de la EPOC a las células de barrera del epitelio pulmonar, que son las que están expresando estos antígenos en su superficie). Dicho ataque se realiza por la liberación, por parte de los linfocitos T CD8+, de perforinas y granzimas que causan la muerte celular y la apoptosis que induce el enfisema (Barnes *et al.*, 2004).

1. 2. 5. Exacerbaciones.

El curso clínico de la EPOC puede presentar episodios recurrentes caracterizados por un aumento agudo-subagudo de inflamación tanto sistémica como localizada en las vías respiratorias, que conlleva un incremento de los síntomas respiratorios. Estos episodios se conocen como exacerbaciones, tienen un impacto negativo en la calidad de vida del paciente y contribuyen a la disminución acelerada de la función pulmonar que caracteriza a la EPOC (Donaldson *et al.*, 2002; Perera *et al.*, 2007).

Las exacerbaciones pueden ser producidas por microorganismos, principalmente bacterias (Sethi *et al.*, 2008a). Sin embargo, también han sido asociadas con la detección de virus (Rohde *et al.*, 2003). Además, en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo, donde se incluyeron pacientes no inmunodeprimidos con EPOC se

observaron niveles de linfocitos totales y CD4+ en sangre periférica más elevados en los pacientes colonizados por *P. jirovecii*, en comparación con los no colonizados, lo cual podría estar en relación con la progresión de la enfermedad y las exacerbaciones de la misma (Varela *et al.*, 2003).

1.3. Tratamiento de la EPOC.

La EPOC es una entidad irreversible, los fármacos que se usan en su tratamiento tienen como fin prevenir y controlar los síntomas a la vez que reducen la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones y mejoran la calidad de vida de los pacientes y la tolerancia al ejercicio.

- Abandono del hábito tabáquico

El cese del hábito tabaquero es fundamental para disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad. Parece que cuando se deja de fumar, los pacientes con EPOC leve-moderada tienen un declive del VEF₁ menor que los pacientes que no abandonan el hábito (Scanlon *et al.*, 2000). Aunque se ha observado que los sujetos con EPOC que dejan de fumar no experimentan una reducción en el grado de inflamación pulmonar, los autores achacan esta inflamación persistente a la reparación del tejido dañado (Willemse *et al.*, 2005). Por tanto, y al demostrarse una mejora transitoria en VEF₁ de pacientes EPOC que dejan de fumar, se ha propuesto el uso concomitante de otras terapias durante el abandono del tabaco para así amplificar estos efectos a nivel de la función pulmonar (Dhariwal *et al.*, 2014).

- Fomento del ejercicio físico.

La rehabilitación pulmonar se realiza en pacientes con EPOC para reducir los síntomas, mejorar la función pulmonar y estabilizar o revertir las manifestaciones sistémicas de la enfermedad (Nici *et al.*, 2006). El entrenamiento muscular inspiratorio consigue mejorar la fuerza y resistencia muscular, disminuir la disnea y, en definitiva, mejorar la calidad de vida de los pacientes (Gosselink *et al.*, 2011). Parece que los sujetos EPOC más activos físicamente tienen menor riesgo de hospitalización (Seidel *et*

al., 2012), resaltando así la importancia del nivel de actividad física para aquellos que sufren esta patología.

- Farmacoterapia.

Según la guía española de la EPOC, actualizada en enero de 2014, la base del tratamiento farmacológico de esta enfermedad son los broncodilatadores (Miravittles *et al.*, 2014). Éstos se resumen, según su tipo de acción, en tres grupos:

- Fármacos agonistas de receptores beta-2-adrenérgicos, tanto los de corta duración (SABA) como los de larga duración (LABA). La forma de administración más frecuente es por inhalación.
- Fármacos anticolinérgicos, de corta y larga duración, que también suelen prescribirse como inhaladores.
- Fármacos conocidos como Metilxantinas, de administración oral y larga duración.

Las guías sobre el tratamiento de la EPOC recomiendan una terapia que empiece con fármacos del tipo SABA para el estadio 1 de la enfermedad y se añadan fármacos del tipo LABA en el estadio 2. Para las fases más avanzadas de la enfermedad se recomienda añadir corticoesteroides inhalados.

Por otro lado, en el tratamiento farmacológico de la agudización suelen utilizarse corticoides sistémicos y antibióticos (Muñoz *et al.*, 2001). Sin embargo, la efectividad de estos últimos no está clara en todas las situaciones, probablemente porque las manifestaciones clínicas no permiten identificar la causa de la agudización: ya sean de origen viral o bacteriano, se asocian con los mismos síntomas clínicos y similar respuesta inflamatoria. Además, en el 25% de los episodios de exacerbación no se demuestra una etiología infecciosa.

Se sabe que el tracto respiratorio de estos sujetos también puede estar colonizado por hongos y, al igual que se especula sobre diferentes factores como hemos detallado, sería lógico pensar que quizás haya casos en los que sea un hongo el agente causal de la

exacerbación. Además, sabiendo que las mismas bacterias que producen la exacerbación ya están presentes en el paciente estable, sería interesante desarrollar técnicas de diagnóstico poco invasivas pero efectivas para la determinación de la etiología de esta exacerbación, ya sea de origen bacteriano o fúngico. Esta información podría servir de guía a la hora de elegir un tratamiento más efectivo puesto que la GesEPOC no recomienda utilizar antibióticos de forma indiscriminada, sino emplearlos solo en pacientes ambulatorios cuando aparezca un cambio en el color del esputo (Miravittlesa *et al.*, 2014) o en pacientes hospitalizados (Soler *et al.*, 2012), y los antifúngicos no suelen ser el tratamiento de elección ante una exacerbación.

2. Microbiota del tracto respiratorio de sujetos con EPOC.

El total de microorganismos que habita en un nicho ecológico particular, por ejemplo en el tracto gastrointestinal, en la piel o en las vías aéreas del hombre, se conoce con el término de microbiota (Coudeyras *et al.*, 2010). Entre estos microorganismos se encuentran bacterias, virus y hongos, siendo las bacterias las más estudiadas.

2.1 Bacterias y EPOC.

En los últimos años, el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la identificación de toda la microbiota bacteriana existente en un nicho determinado con independencia de que dichas bacterias puedan ser o no cultivables. En este sentido con la utilización del gen 16S rRNA, común a todas las bacterias, se ha podido demostrar que los pulmones del ser humano no son estériles, sino que hay bacterias que residen en las vías respiratorias inferiores (Hilty *et al.*, 2010). Sin embargo, existe cierta controversia sobre la similitud entre la comunidad bacteriana del pulmón de sujetos sanos y la de sujetos con diferentes afecciones pulmonares.

Por un lado, hay estudios que afirman que no hay diferencias significativas en el número total de bacterias ni en la composición bacteriana del pulmón de sujetos no fumadores, sujetos fumadores y pacientes con EPOC leve, aunque sí se sugiere una disminución en la diversidad bacteriana que habita en el pulmón de los pacientes con EPOC más grave. El estudio realizado por Erb-Downward y su equipo fue el primero en aportar datos que aseguran que las diferentes partes del pulmón de un mismo sujeto

EPOC presentan comunidades bacterianas distintas, lo cual concordaría con la observación clínica de que algunas formas de la enfermedad como el enfisema comience más comúnmente en determinadas zonas del pulmón. Este estudio sugiere que la disbacteriosis que presenta el pulmón de estos pacientes podría ser responsable del estímulo inflamatorio constante que se observa en la EPOC y que, aunque estos organismos no son causantes de la enfermedad, podrían alterar el ambiente pulmonar favoreciendo la progresión de la misma (Erb-Downward *et al.*, 2011).

Por otro lado, existen estudios que sí han demostrado diferencias significativas en la composición de la comunidad bacteriana entre pulmones de EPOC y pulmones de individuos sanos usados como control (Hilty *et al.*, 2010; Sze *et al.*, 2012). En datos obtenidos de biopsias de pulmón de pacientes con EPOC grave, se observa gran diversidad bacteriana tanto en los pacientes como en sujetos fumadores y no fumadores. Además se comprobó que el pulmón de pacientes con EPOC muy grave tenían una comunidad bacteriana diferente a los controles y a pacientes con Fibrosis Quística (FQ), aportando la primera evidencia de que el pulmón de los pacientes con EPOC podría considerarse como un nicho ecológico diferente al del pulmón sano (Sze *et al.*, 2012).

Se sabe que las bacterias causan hasta el 50% de las exacerbaciones de la EPOC (Sethi *et al.*, 2008a) y en estudios realizados con broncoscopia se ha encontrado que la prevalencia de colonización de las vías respiratorias bajas por microorganismos potencialmente patógenos es aproximadamente de un 29% en EPOC estable y de un 54% en agudización (Rosell *et al.*, 2005), siendo *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* las especies bacterianas predominantes.

Según Soler, las bacterias que colonizan el tracto respiratorio pueden clasificarse como microorganismos potencialmente patógenos (MPPs), que incluye a especies como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. parainfluenzae*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*; y microorganismos no potencialmente patógenos (MNPPs), como son: *Streptococcus viridans*, *Neisseria spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* La presencia de MPPs en las vías respiratorias tanto de sujetos EPOC como de controles fumadores que no presentan la enfermedad se ha asociado a un aumento en el porcentaje de neutrófilos y en los niveles de TNF- α en muestras de LBA, hecho que evidencia que la colonización

bronquial con los MPPs (y no sólo la infección) podría favorecer la inflamación local en estos sujetos (Soler *et al.*, 1999).

En este sentido, también se ha descrito que en pacientes con EPOC en estadio II y III en situación estable que presentan MPPs en esputo tienen una respuesta inflamatoria exagerada en las vías respiratorias, peor estado de salud y mayores niveles de fibrinógeno en plasma en comparación con aquellos pacientes en los que sólo se identificaron MNPPs (Banerjee *et al.*, 2004). Aunque no se observó relación entre la cantidad de MPPs en esputo y la función pulmonar en los pacientes, es posible que los MPPs causen un peor estado de salud mediante la inducción de una respuesta inflamatoria exagerada ya que se midieron valores de IL-8, LTB₄, TNF- α y quimiotaxis de neutrófilos significativamente más altos en el esputo de los pacientes con MPPs que en los que tenían MNPPs.

La presencia bacteriana en el pulmón de los pacientes con EPOC plantea la hipótesis de que estos microorganismos pudieran influir en la progresión de la enfermedad al producir alteraciones en el sistema inmunológico del huésped y/o pudieran inducir cambios mecánicos en el pulmón, favoreciendo la colonización por parte de otros microorganismos como los hongos.

2.2 Hongos y EPOC.

En contraposición a las bacterias, que son bien conocidas por los clínicos y microbiólogos que participan en el seguimiento de los pacientes con EPOC, la prevalencia de colonización por hongos en este contexto y su importancia clínica es, sin duda, subestimada. Esto podría deberse a la falta de estandarización del examen micológico de muestras clínicas y/o al pobre conocimiento que aún se tiene sobre algunos de estos hongos.

La población general está continuamente expuesta a los hongos del ambiente. Algunos de estos microorganismos más frecuentes pertenecen a los géneros: *Cryptococcus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Pneumocystis* (Colom *et al.*, 2005; Colom *et al.*, 2012; Docampo *et al.*, 2011; O’Gorman *et al.*, 2008; Sautour *et al.*, 2009; Medrano *et al.*, 2005). Las esporas de estos hongos pueden ser inhaladas por el hombre y dar lugar a una colonización del tracto respiratorio del

huésped. Se ha observado que la población sana podría ser portadora de algunos de estos microorganismos (Sellart-Altisent *et al.*, 2007; Rivero *et al.*, 2008).

El primer estudio sobre en la prevalencia de las especies fúngicas en la población española, usando técnicas de identificación molecular y resistencia a medicamentos antifúngicos, se realizó entre 2010 y 2011 y se llevó a cabo en 29 hospitales del país. Se estudiaron muestras tisulares, sanguíneas y respiratorias y se observó una prevalencia de hongos filamentosos del 0,002%. Sin embargo, resulta interesante resaltar que de las 325 cepas que fueron aisladas, el 95 % provenían de muestras respiratorias y, entre ellas, el 40 % resultaron ser hongos con relevancia clínica, es decir, que habían producido infección o eran capaces de producirla. El género de hongo más frecuentemente identificado fue *Aspergillus*, seguido de *Scedosporium*, orden Mucorales, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium* (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013). En otro estudio de 2009 en un hospital de Francia en el que se midió la contaminación fúngica del aire, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* resultaron ser los géneros más frecuentes (Sautour *et al.*, 2009).

Según estos datos, los pacientes con EPOC en su día a día y en sus visitas al hospital podrían sufrir una colonización fúngica del tracto respiratorio. Esta colonización estaría facilitada por el uso repetido y prolongado de antibióticos y corticosteroides, y podría conducir a infecciones respiratorias y a un deterioro progresivo de la función pulmonar a través de la secreción de enzimas proteolíticas y fosfolipasas o, indirectamente, a través de su contribución a la reacción inflamatoria y a la liberación de la elastasa de leucocitos.

Por otro lado, también sería posible que daños previos en tejidos epiteliales bronco-pulmonares inducidos por proteasas bacterianas o por la elastasa de leucocitos favorezcan la colonización respiratoria por hongos y, en este sentido, sería interesante conocer si existe alguna relación entre la presencia de ciertas bacterias en el pulmón de paciente EPOC y determinados géneros de hongos.

2.3 Relación colonización-respuesta inmune.

Es frecuente que durante las exacerbaciones haya un aumento de la respuesta inflamatoria, sistémica y/o local, del huésped (Perera *et al.*, 2007) y puesto que, como

hemos citado anteriormente, la mayoría de ellas se producen por una infección, es posible que la colonización de las vías respiratorias de sujetos EPOC en situación estable influencie dicha respuesta inmune y altere el curso natural de la enfermedad. En la bibliografía podemos encontrar varios estudios que corroboran una alteración del perfil de citoquinas en respuesta a la colonización bacteriana.

En un trabajo con cultivo de células humanas de epitelio bronquial en contacto con endotoxinas de *H. influenzae* se observó un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, y TNF- α (Khair *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha demostrado que la inyección de endotoxinas de *E. coli* en sujetos voluntarios provoca un aumento en los niveles sanguíneos de IL-8 (van Deventer *et al.*, 1993). Otra evidencia de que los productos bacterianos alteran la respuesta inflamatoria del huésped es que la inhalación de lipopolisacáridos de *E. coli* por sujetos sanos no fumadores triplicó el número de linfocitos en LBA de estos sujetos 3 horas después de la inducción y elevó de forma exponencial la respuesta neutrofílica, medida en la misma muestra (Sandström *et al.*, 1992).

Los niveles de citoquinas y quimiocinas en esputo, tales como TNF, IL-8, IL-6 y el leucotrieno B4, así como los niveles de productos de neutrófilos, tales como la mieloperoxidasa y la elastasa de neutrófilos, se incrementan en pacientes con EPOC con colonización de las vías respiratorias, en comparación con los pacientes cuyas vías respiratorias no están colonizadas (Bhowmik *et al.*, 2000; Bresser *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2004).

Igualmente, se ha demostrado un aumento en los niveles de IL-8, leucotrieno B4, TNF- α y de elastasa de neutrófilos en pacientes estables colonizados por MPPs, en comparación con pacientes colonizados por MNPPs, sugiriendo que la colonización de las vías respiratorias por estos microorganismos puede alterar la respuesta inmune del huésped *in situ* (Banerjee *et al.*, 2004). Además, se conoce que una mayor carga bacteriana provoca un aumento significativo en los niveles de TNF- α y en el número de neutrófilos, medidos en LBA (Soler *et al.*, 1999). Estas observaciones sugieren que puede haber una relación entre la colonización bacteriana de las vías respiratorias y la respuesta inflamatoria sistémica.

Asimismo, se ha determinado que las células dendríticas humanas también pueden ser estimuladas para producir ciertas citoquinas en función de la bacteria con la que entren en contacto. Así, bacterias de las familias *Haemophilus* spp. y *Moraxella* spp., consideradas como patógenos potenciales asociados a asma y EPOC, inducen una expresión de las citoquinas IL-23, IL-12p70 e IL-10 mucho más intensa que las bacterias consideradas como comensales. También se ha descrito en el mismo trabajo que la co-exposición a *Prevotella* spp., identificado como organismo comensal, reducía la respuesta de IL-12p70 inducida en las células dendríticas en respuesta a *H. influenzae* (Larsen *et al.*, 2012).

Por otro lado, aunque la presencia de los hongos en el pulmón de los EPOC ha sido menos estudiada que la de las bacterias, sí existen algunos trabajos que relacionan una alteración en la respuesta inmune del huésped con la colonización fúngica.

En el caso de *Pneumocystis*, un hongo atípico que se localiza en el pulmón, se conoce que tan sólo la colonización ya puede inducir elevación de interleuquinas proinflamatorias en el lavado broncoalveolar de modelos animales inmunodeprimidos (Shipley *et al.*, 2010). Además, en un estudio piloto realizado en 51 pacientes con EPOC se observó un aumento significativo de los valores de IL-8, IL-6 y TNF- α a nivel sistémico en los sujetos colonizados por *P. jirovecii* (Calderón *et al.*, 2007) y, recientemente, se ha observado un aumento en la expresión de genes que codifican la respuesta Th1 en muestras pulmonares de pacientes colonizados por este microorganismo (Fitzpatrick *et al.*, 2014).

De la misma manera, la presencia de otras especies fúngicas pueden provocar alteraciones inmunológicas en el hombre. En este sentido, se ha demostrado que *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* promueven la liberación de IL-8 y IL-12p70 en células dendríticas infectadas *in vitro* (Fidan *et al.*, 2014). Este estudio precede al de Maher de 2015, en el que se corrobora que *C. albicans* es capaz de inducir, *in vitro*, la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-22 e IL-23 en células dendríticas (Maher *et al.*, 2015).

Recientemente se ha demostrado que *Histoplasma capsulatum* provoca un aumento en la producción de citoquinas en el pulmón de ratones inoculados intranasalmente. Se determinó el perfil de citoquinas de las respuestas innata, innata-

adaptativa y adaptativa del huésped durante los 28 días siguientes a la infección, y se observó una elevación de IL-1- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, IL-22, TNF- α e IFN- γ . Además en el artículo se mostró que los niveles de citoquinas variaban según qué cepa infectara al huésped, la brasileña o la norteamericana (Sahaza *et al.*, 2015).

2.4 Alteraciones en el parénquima pulmonar inducidas por hongos.

Los β -glucanos, componente estructural principal de la pared celular de la mayoría de los hongos, participan en la respuesta inflamatoria del huésped mediante su unión a receptores específicos de reconocimiento de patógenos (Hohl *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2003a). Esta respuesta inflamatoria en pacientes con EPOC, aunque es necesaria para el aclaramiento de la infección, podría ocasionar una excesiva morbilidad al aumentar el daño pulmonar.

Los β -glucanos son una clase de polímeros de glucosa unidos por enlace β -(1,3) y (1,6) que forman parte de la pared celular de muchos hongos que se encuentran en el ambiente. Son estructuras muy conservadas que no se encuentran en células de mamífero y, por tanto, se consideran un patrón molecular asociado a patógenos (Willment *et al.*, 2001). De hecho, los niveles de (1/3)- β -D-glucanos medidos en suero se han propuesto como marcadores de la presencia de infecciones fúngicas invasivas en el hombre (De Pauw *et al.*, 2008).

Existen diferentes RRP presentes en las células del sistema inmune innato capaces de reconocer moléculas características de microorganismos (Becker *et al.*, 2015).

- Los receptores de lectina tipo C, presentes en macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y eosinófilos (Willment *et al.*, 2005) juegan un papel fundamental en la mediación de la inmunidad frente a géneros fúngicos como *Candida* y *Aspergillus*. En concreto, los receptores Dectin-1 reconocen los β -glucanos de estos hongos.
- Los receptores *Toll-like* (TLR), presentes en células dendríticas y macrófagos (Cohen *et al.*, 2013; Tsuji *et al.*, 2000). Su localización puede variar, de manera que de los 10 que se han identificado en humanos, los

TLR1; 2; 4; 5; 6; y 10 se expresan en la superficie celular y migran a los fagosomas (vesícula rodeada de membrana en un fagocito que se forma por la invaginación de la membrana celular y del material fagocitado) tras activarse por la interacción con su ligando. Los TLR3; 7; 8; y 9 se expresan en compartimientos intracelulares, principalmente en el endosoma y el retículo endoplasmático (Duez *et al.*, 2006; Arancibia *et al.*, 2007). Cada TLR reconoce un grupo de moléculas características, entre ellas los β -glucanos de hongos (Netea *et al.*, 2006).

La unión del β -glucano con su receptor puede desencadenar varias respuestas: por un lado, parece inducir la fagocitosis del hongo por parte de los macrófagos; por otro lado, podría desencadenar una señalización intracelular que culminaría con la secreción de citoquinas y mediadores de la inflamación (Brown *et al.*, 2003a; Steele *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2005; Bellanger *et al.*, 2011; Chamilos *et al.*, 2010). Además se ha propuesto que los β -glucanos podrían tener actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos (Sato *et al.*, 2006).

En este sentido, se ha observado experimentalmente que los β -glucanos son un elemento de reconocimiento clave para la fagocitosis de especies fúngicas como *Pneumocystis carinii* y *C. albicans* (Steele *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2005) y parece que inducen la maduración de células dendríticas *in vitro*, elevando la producción de IL-8 y IL-12p70 (Fidan *et al.*, 2014).

Estudios sobre los β -glucanos de la pared celular de *Pneumocystis* evidencian que estos polisacáridos tienen la capacidad de inducir la activación de múltiples vías inflamatorias en el huésped y se ha propuesto que los β -glucanos de la pared celular contribuyen a la exagerada respuesta inflamatoria provocada por los macrófagos alveolares, favoreciendo el fallo respiratorio en pacientes con neumonía grave por *Pneumocystis* (Lebron *et al.*, 2003; Vassallo *et al.*, 1999a; Vassallo *et al.*, 1999b; Limper *et al.*, 1989). Además se ha demostrado que los β -glucanos de *Pneumocystis* pueden activar las células dendríticas y modular las respuestas de las células T (Carmona *et al.*, 2006), crucial para el aclaramiento de *Pneumocystis* y que los β -glucanos preparan a las células dendríticas de manera que polaricen a las células T para que se diferencien a Th17, que promueve una mayor resistencia inmune antifúngica del huésped (Zelante *et al.*, 2007).

Además los β -glucanos activan al complemento, estimulando así la fagocitosis y/o desgranulación citotóxica (Ross *et al.*, 1999).

Por lo tanto, estos polímeros podrían tener efectos moduladores en el sistema inmunológico mediante varios mecanismos: activación de los macrófagos, fagocitosis del patógeno y liberación de citoquinas proinflamatorias. Con objeto de medir la inflamación sistémica, tanto en pacientes EPOC como en sujetos con otras afecciones crónicas, se recurre a la medida de “marcadores inflamatorios” plasmáticos, por ejemplo: IL-6, IL-8, TNF- α . Sería interesante estudiar si existe un cambio significativo en los niveles de otros mediadores inflamatorios y si este posible aumento podría deberse a la colonización por algún hongo en particular.

2.5. Técnicas de identificación de microorganismos.

2.5.1. Técnicas de tinción.

El método más rápido para la detección de microorganismos en una muestra clínica es el examen microscópico de la misma. Este examen puede aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo y en otras, un diagnóstico de sospecha previo a la confirmación definitiva por cultivo. Por lo tanto, es un procedimiento que debería ser realizado en todos los laboratorios ya que puede realizarse mediante técnicas sencillas, aunque a veces puede requerir tinciones complejas, permitiendo dirigir los medios adecuados para el cultivo de la muestra (Schwarz, 1982).

La tinción de Gram, típicamente utilizada para diferenciar bacterias Gram-positivas de las Gram-negativas, también se usa en levaduras como *Candida*. Otros hongos pueden ser visualizados y diferenciados mediante otras técnicas de tinción como el colorante hematoxilina-eosina, la tinción de Gridley y la Metenammina de Plata de Grocott, entre otros (Huppert *et al.*, 1978; Schwarz, 1982).

2.5.2. Cultivos convencionales.

La identificación de microorganismos en la rutina médica suele basarse en el cultivo convencional seguido de una identificación fenotípica.

Las muestras de esputo pueden ser cultivadas en varios tipos de medios: sangre-agar, chocolate-agar, medio de eosina-azul de metileno, agar Sabouraud dextrosa y MacConkey agar, entre otros (Bakare *et al.*, 2003; Ajao *et al.*, 2011; Pravin Charles *et al.*, 2015). Basándose en el fenotipo del microorganismo y el medio en el que crece, se puede identificar al hongo o la bacteria presente en la muestra sembrada mediante microscopia (Bakare *et al.*, 2003). Además, se pueden aplicar técnicas de tinción para facilitar la identificación del microorganismo al microscopio.

Los agares cromogénicos, como el CHROMagar, también pueden ayudar en la identificación de microorganismos y son ampliamente utilizados en los laboratorios clínicos. Las placas de CHROMagar contienen un sustrato que es hidrolizado por un microorganismo específico, produciéndose así una reacción que da lugar a una coloración específica permitiendo incluso la diferenciación de especies pertenecientes al mismo género (Odds *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 2002).

Sin embargo, estas técnicas resultan muy limitadas cuando se trata de microorganismos que necesitan condiciones particulares de crecimiento, por ejemplo anaerobiosis, y nula en el caso de microorganismos no cultivables.

2.5.3. Técnicas de Inmunoensayo.

Se han desarrollado técnicas para la detección de microorganismos basándose en la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), como el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Puesto que esta interacción Ag-Ac es específica, al detectarla a partir de la muestra del huésped se puede determinar el agente causal de la infección. Para detectar un antígeno con la técnica ELISA, la muestra a analizar se fija al pocillo de una placa de poliestireno. El anticuerpo específico del microorganismo que estamos testando está unido a una enzima y a continuación se añade al pocillo. Si el antígeno específico de este anticuerpo está presente en la muestra se producirá la unión Ag-Ac. Los anticuerpos que no se unan serán eliminados por técnicas de lavados con los buffer adecuados. A continuación se añadirá el sustrato enzimático al pocillo. Las enzimas que han quedado en el pocillo porque están ancladas al Ac reaccionarán con el sustrato dando lugar a una señal visible indicando entonces la presencia del microorganismo en la muestra (Engvall *et al.*, 1971).

A modo de ejemplo, en la identificación de hongos se ha desarrollado un ELISA indirecto que detecta el anticuerpo IgG contra *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* en muestras de suero (Przyklenk *et al.*, 1987).

Esta técnica tiene el inconveniente de que permite evaluar un número reducido de microorganismos al mismo tiempo, por lo que resulta poco práctica en estudios de la microbiota global de un paciente.

2.5.4. Técnicas analíticas.

Entre las técnicas de microanálisis utilizadas en la última década para la identificación microbiana se encuentra la espectrometría de masas de proteínas. Este método permite la identificación de una molécula mediante la medición de su masa en relación a su carga y también la identificación de los fragmentos generados a partir de ella. Tras la desorción/ionización láser de una molécula (por ejemplo péptidos y proteínas que forman parte de hongos y bacterias) en una matriz determinada, el espectrómetro puede calcular el tiempo de migración de cada fragmento de esta molécula a través de un trayecto predeterminado y emitir un espectro de masas que será característico de cada microorganismo para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración. La identificación se realiza a través de la comparación del espectro que resulta de una bacteria u hongo con todos los espectros de masas contenidos en una base de datos comercial. Este método presenta limitaciones en relación al manejo de microorganismos previo a la realización del espectro de masas, a la ausencia de ciertas especies en las bases de datos y a la dificultad en la identificación de mezclas de microorganismos. Aún así, el uso de esta tecnología en los laboratorios clínicos ha sido uno de los cambios más importantes en el campo de la identificación microbiológica después de los métodos moleculares (García *et al.*, 2012).

2.5.5. Técnicas Moleculares.

Finalmente, en los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares para la identificación de microorganismos.

En el caso de las bacterias, la identificación basada en técnicas moleculares suele utilizar la secuencia del ARN ribosomal 16S rRNA, marcador molecular presente en la gran mayoría de bacterias (Sibley *et al.*, 2011; Guss *et al.*, 2011).

En el caso de los hongos, estas técnicas se basan en la amplificación de genes ribosomales, que están presentes en la mayoría de los organismos en un alto número de copias, ayudando así a la detección y aumentando la sensibilidad de la reacción de PCR. Para el desarrollo de estas técnicas se han estudiado diferentes regiones del ADN fúngico como posibles dianas de amplificación (Schoch *et al.*, 2012). El ADN ribosomal de los hongos (rDNA) está organizado en unidades que se repiten cientos de veces a lo largo del genoma. Cada una de estas unidades consta de tres genes, el gen que codifica para la subunidad mayor (25S), el gen que codifica para la subunidad menor (18S) y el gen que codifica para la subunidad 5.8S, separados por secuencias no codificantes conocidas como regiones espaciadoras internas transcritas (ITS; del inglés Internal Transcribed Spacer) (Atkins *et al.*, 2004). En la Figura 3 se puede observar un esquema de esta zona.

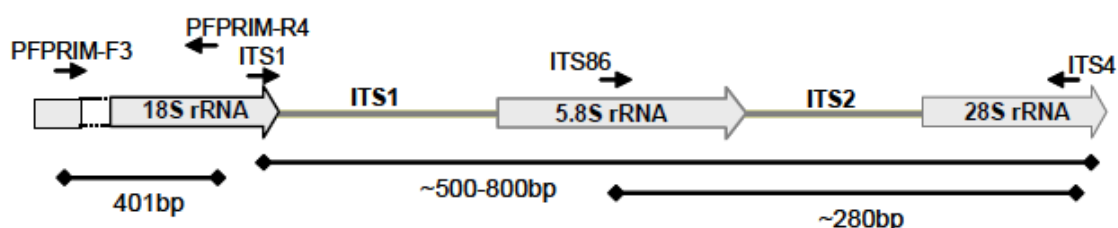


Figura 3. Representación de las regiones ITS.

El problema recae en la dificultad de diferenciar especies del mismo género y para solventarlo se ha propuesto el estudio de la región ITS entre los genes 18S y 5.8S rRNA (región ITS1) y/o entre los genes 5.8S y 28S rRNA (región ITS2) (Leaw *et al.*, 2006, Nilsson *et al.*, 2009), ya que esta región tiene áreas muy conservadas filogenéticamente y áreas de gran variabilidad interespecífica (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Las regiones ITS han sido las más secuenciadas en los últimos años para la identificación del ADN fúngico y en estudios de filogenia y taxonomía, a partir de todo tipo de muestras, desde ambientales hasta clínicas (Schoch *et al.*, 2012; Romanelli *et al.*, 2014; De Beeck *et al.*, 2014; Nilsson *et al.*, 2009). Esta región tiene la más elevada probabilidad de éxito en la identificación de especies fúngicas, aun siendo muy cercanas filogenéticamente (Schoch *et al.*, 2012).

Algunos de los métodos utilizados como técnica molecular de identificación son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) (Rogers *et al.*, 2003), los microarrays (Cox *et al.*, 2010), la clonación y secuenciación (Harris *et al.*, 2007) y el uso de la nueva generación de sistemas de secuenciación masiva (Erb-Downward *et al.*, 2011; Guss *et al.*, 2011).

En este sentido, se puede recurrir a la PCR para amplificar marcadores moleculares pertenecientes a microorganismos (Erlich *et al.*, 1991). Para ello se han usado tanto cebadores específicos para una especie concreta como cebadores universales capaces de detectar diferentes géneros (Logotheti *et al.*, 2009; Liesack *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1993). Al usar cebadores universales, las técnicas de PCR generan productos de diferente longitud proporcionando un perfil de la microbiota (Suzuki *et al.*, 1998). Estos fragmentos amplificados pueden después ser secuenciados para facilitar la identificación de los diferentes géneros y especies presentes en la muestra de partida.

El desarrollo de la PCR Multiplex, en la que se combinan parejas de cebadores específicos para detectar múltiples microorganismos en la misma reacción, ha permitido la identificación en paralelo de diferentes especies de *Aspergillus* (Logotheti *et al.*, 2009). Sin embargo, esta técnica puede resultar insuficiente debido a la desigual amplificación de ciertos *loci* y la dificultad para reproducir algunos resultados (Henegariu *et al.*, 1997).

Hay muchos microorganismos que tienen la misma longitud de fragmento amplificado al usar determinados cebadores universales aunque las secuencias de dichos fragmentos no sean iguales. Por ello, en la mayoría de los casos se recomienda la secuenciación de dichos amplicones para diferenciar los microorganismos. El método de secuenciación más común es la secuenciación Sanger, desarrollada en los años 70. Con este método, el ADN se divide en 4 reacciones, cada una de ellas con los 4 deoxinucleótidos estándar (dNTPs), 1 dideoxinucleótido (ddNTP) y una polimerasa. La cadena de ADN complementaria se va creando a partir de los dNTPs y cuando se añade un ddNTP, la reacción de extensión finaliza. Por tanto, se producen fragmentos de diferente longitud que pueden separarse por tamaño y visualizarse usando radioactividad para determinar la secuencia de ADN (Sanger *et al.*, 1977). Además, esta técnica se puede modificar para que todas las reacciones se den en el mismo tubo. Para ello, los cuatro tipos diferentes de ddNTP se marcan con fluorescencia de manera que

los fragmentos se separan por tamaño y la secuencia se determina por fluorescencia. Una vez generada la secuencia, ésta se compara con secuencias almacenadas en las bases de datos disponibles, como el GenBank (Benson *et al.*, 2008) para identificar al microorganismo.

Más recientemente se ha desarrollado la técnica de pirosecuenciación, con la que se obtienen también datos cuantitativos. Esta técnica se basa en un proceso conocido como secuenciación ‘by synthesis’, una técnica que permite la monitorización de la síntesis de ADN en tiempo real. La pirosecuenciación se fundamenta en el principio de que el pirofosfato (PPi) se libera cuando la ADN polimerasa añade un nucleótido nuevo a la cadena complementaria que está creando. Este PPi se transforma en adenosina trifosfato (ATP), que se utiliza como un sustrato en una reacción química que resulta en la emisión de luz visible. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad de síntesis. Los dNTPs se añaden secuencialmente y la luz es sólo emitida si el dNTP añadido a la reacción es el siguiente en ser incorporado a la cadena creciente (Ahmadian *et al.*, 2006). La pirosecuenciación puede producir gran cantidad de lecturas de secuencias en una pequeña cantidad de tiempo. De esta forma, este método es más eficiente que el método de Sanger para secuenciar una gran biblioteca de clones. Es importante destacar que la pirosecuenciación ha superado a los métodos tradicionales de detección en el ámbito clínico mediante la identificación del 91% de los aislamientos al menos a nivel de género. El 9% restante no pudo ser identificado porque las secuencias leídas eran demasiado cortas, lo cual es un claro inconveniente de la técnica (Luna *et al.*, 2007).

Sin embargo, en un estudio comparativo entre pirosecuenciación y método Sanger en muestras de esputo de pacientes con Fibrosis Quística se observó que ambas técnicas eran capaces de identificar prácticamente las mismas bacterias, aunque la pirosecuenciación mostrase una estimación más fiable sobre la abundancia de cada especie (Armougom *et al.*, 2009).

JUSTIFICACIÓN

La microbiota no bacteriana que coloniza el pulmón no ha sido todavía bien caracterizada y es un área que demanda investigación. La EPOC representa un problema socio-sanitario de primera magnitud por su alta morbi-mortalidad. Es una enfermedad prevenible y tratable desencadenada por el humo del tabaco en la que hay un proceso inflamatorio complejo y multidimensional que se inicia en el pulmón pero que se acompaña de manifestaciones sistémicas (Cosío, 2007). Los agentes infecciosos colonizadores del árbol respiratorio pueden amplificar la respuesta inflamatoria desencadenada por el tabaco. La capacidad demostrada de un hongo como *Pneumocystis jirovecii* para inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias permite plantear la posibilidad de que la colonización por otros hongos en estos pacientes puede desencadenar o favorecer la progresión de este proceso (Calderón *et al.*, 2007). La demostración de este hecho tendría una gran importancia clínica pues disponemos de fármacos efectivos para el tratamiento de estas infecciones que podrían mejorar el pronóstico de los pacientes con EPOC que las presenten.

En definitiva, podemos intuir que la colonización fúngica en el pulmón de sujetos con EPOC podría modificar la respuesta inmune del huésped y sería, por tanto, interesante describir la flora fúngica presente en el tracto respiratorio de los pacientes con enfermedad pulmonar crónica, observar si existe una relación con los diferentes estadios de la enfermedad y analizar su posible relación con la respuesta inflamatoria sistémica.

En este sentido, una parte de este estudio también se propone evaluar la relación entre la presencia de hongos en el tracto respiratorio de los sujetos con EPOC y el nivel de β -glucanos en suero, al igual que comprobar si existe una correlación entre la respuesta inflamatoria del paciente y la concentración sistémica de β -glucanos.

HIPÓTESIS

La colonización por hongos podría ser un fenómeno frecuente en pacientes con EPOC. Esta colonización podría producir cambios a nivel alveolar y desencadenar una respuesta inmunitaria que daría lugar a una reacción inflamatoria local y sistémica que podría favorecer la progresión de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Describir los hongos presentes en el tracto respiratorio de pacientes con EPOC y comprobar si existe una relación con el estadio de la enfermedad y con la respuesta inflamatoria del paciente colonizado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar la micobiota presente en el tracto respiratorio de sujetos con EPOC mediante técnicas de metagenómica y la presencia concreta de *Pneumocystis jirovecii* mediante PCR específica.

Describir esta micobiota en relación con los diferentes estadios de la enfermedad y la respuesta inflamatoria sistémica.

Evaluar la relación entre la presencia de hongos en el tracto respiratorio de los sujetos con EPOC y el nivel de β -glucanos en suero.

Comprobar si existe correlación entre la respuesta inflamatoria del paciente y el nivel de β -glucanos en suero.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Diseño.

Para cubrir los objetivos se realizó un estudio descriptivo transversal.

2. Población en estudio.

Se incluyeron sujetos atendidos en la Unidad Médico-Quirúrgica del Hospital Universitario Virgen del Rocío desde noviembre de 2009 hasta julio de 2012. Estos individuos cumplían todos los criterios de inclusión establecidos para este estudio y ninguno de los criterios de exclusión.

2.1. Criterios de inclusión.

- Hombres o mujeres con edad ≥ 18 años con diagnóstico previo de EPOC.
- Confirmación espirométrica del diagnóstico de EPOC según los criterios de la GOLD: FEV₁ post-broncodilatador inferior al 80% del valor de referencia en asociación con FEV₁/FVC inferior al 70%.
- Posibilidad de obtener muestras de lavado orofaríngeo (LOF), esputo y suero.
- Consentimiento informado del paciente.

2.2. Criterios de exclusión.

- Diagnóstico concomitante de otra enfermedad pulmonar diferente a la EPOC.
- Diagnóstico confirmado o sospecha de neoplasia.
- Inmunodepresión de cualquier origen (enfermedad autoinmune, trasplante, uso crónico de esteroides sistémicos o de otros fármacos inmunomoduladores).
- Infección por el VIH.
- Episodio de exacerbación o neumonía en los tres meses previos.
- Utilización de antibióticos en los tres meses previos.
- Imposibilidad de otorgar el consentimiento informado o negativa del paciente.

Como control se incluyó un grupo de sujetos fumadores que no tenían criterios espirométricos de EPOC que cumplieran el resto de criterios de inclusión y no tenían criterios de exclusión.

2.3. Parámetros evaluados

En todos los casos se realizó una evaluación clínico-biológica que incluía los siguientes parámetros:

- Datos demográficos: nombre, sexo, fecha de nacimiento, número de historia clínica.
- Datos de codificación: código asignado y fecha de inclusión en el estudio.
- Datos biológicos: valor FEV₁ (%) obtenido en las pruebas funcionales respiratorias.
- Datos clínicos: antecedentes patológicos, hábitos tóxicos incluyendo historia tabáquica y gravedad de la enfermedad:
 - a) estadio 1 o EPOC leve, con FEV₁ mayor al 80%.
 - b) estadio 2 o EPOC moderada, con FEV₁ entre el 80 y el 50%.
 - c) estadio 3 o EPOC grave, con FEV₁ entre el 50 y el 30%.
 - d) estadio 4 o EPOC muy grave, con FEV₁ inferior al 30%.
- Pruebas de imagen: radiografía de tórax.

El manejo terapéutico de los sujetos se realizó, en cada caso, a criterio del clínico responsable del paciente según la *lex artis ad hoc*.

2.4 Variables en estudio.

En el presente estudio, se evaluaron las siguientes variables:

- 1) Hongos identificados.
- 2) Respuesta inflamatoria sistémica: citoquinas séricas, MCP-1 y quitotriosidasa.
- 3) Detección de β -glucanos en suero.

3. Métodos.

3.1 Obtención y procesamiento inicial de las muestras.

Muestras de lavado orofaríngeo (LOF): se obtuvieron mediante la realización de gargarismos con 10 ml de suero fisiológico estéril al 0,9% durante un minuto. Transcurrido este tiempo, cada sujeto depositó el suero en un tubo falcon de 50 ml (BD Falcon™) debidamente identificado y las muestras se mantuvieron en frío hasta su recepción en el laboratorio. Cada muestra de LOF fue dividida equitativamente en dos tubos falcon de 15 ml y ambos tubos se centrifugaron a 800g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con suero fisiológico hasta un volumen de 500 µl. Todas estas muestras fueron conservadas a -20° C hasta su posterior procesamiento.

Muestras de esputo: se mantuvieron en frío hasta su llegada al laboratorio. Cada muestra se disgregó usando jeringas de 20G para, posteriormente, ser separadas en alícuotas de 500 µl y conservadas a -20° C hasta su posterior procesamiento.

Muestras séricas: las muestras de sangre total fueron centrifugadas a 1000 g durante cinco minutos para separar el suero. Este suero fue igualmente separado en alícuotas de 500 µl que se guardaron a -20° C hasta su procesamiento.

3.2 Protocolo de extracción de ADN.

3.2.1 Digestión de las muestras.

Las alícuotas de las muestras respiratorias requieren un paso de digestión previo a la extracción del ADN para que el material intracelular quede accesible. Este proceso de digestión se desarrolló aplicando un protocolo puesto punto en nuestro laboratorio.

La digestión de cada alícuota de 500 µl de LOF se realizó añadiendo 5 µl de EDTA (2mM, pH8), que actúa como agente quelante de iones bivalentes manteniendo la estabilidad de la hebra de ADN porque inhibe la acción de las nucleasas, 10 µl de SDS al 10%, que por su acción como detergente iónico disuelve los lípidos de las membranas celulares y libera al ADN de proteínas básicas como las histonas y, en último lugar, 25 µl de Proteinasa K (14mg/ml), que digiere las proteínas celulares. A

continuación, las muestras se incubaron en un baño termostatzado (GRANT GSL Acua 12 plus) con agitación a 56°C, temperatura a la que la eficiencia de proteinasa K es máxima y durante, al menos, dos horas para favorecer el proceso de digestión.

La digestión de las muestras respiratorias se realizó igualmente añadiendo a cada alícuota una solución tampón que contenía 5 µl de EDTA (2mM) y 15 µl de SDS (10%), junto con 45 µl de Proteinasa K (14mg/ml). Cada muestra con dicho buffer añadido se introdujo en el baño termostatzado a 56°C y se mantuvo en agitación durante, al menos, 6 horas.

3.2.2 Extracción de ADN a partir de muestras de LOF.

La extracción del ADN genómico de las células se realizó mediante cromatografía de adsorción en columnas con el equipo comercial NucleoSpin Tissue (Macherey & Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ADN con este protocolo se basa en la adicción de sales caotrópicas a las muestras para favorecer la adsorción de las moléculas de ADN en la membrana de sílica de la columna. Se purifica el ADN retenido mediante soluciones que arrastran sales, proteínas y otros productos restantes de la digestión celular. Finalmente se eluye el ADN rehidratando la membrana de la columna. Como resultado final se obtuvieron eppendorf con un volumen de 60 µl de agua destilada que contenían el ADN eluido y que fueron almacenados a -20° C hasta el momento del análisis.

3.2.3 Extracción de ADN a partir de muestras de esputo.

La extracción de ADN se realizó también con el kit comercial NucleoSpin Tissue. El ADN extraído se eluyó con 55 µl de agua ultrapura y se conservó a -20° C hasta su examen.

3.3 Técnicas de amplificación del ADN.

La amplificación de las secuencias génicas para la identificación de las especies bacterianas y fúngicas presentes en las muestras en estudio se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por Kary Mullis en 1986 (Mullis *et al.*, 1986). Esta técnica se desarrolla, normalmente, en tres pasos:

La primera fase se conoce como **desnaturalización** y se realiza a una temperatura de 94°C. Con ella se consigue la separación de la doble cadena de ADN que actúa como molde.

La segunda fase es la fase de **hibridación**, en la que existe un descenso en la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al ADN molde. La temperatura de hibridación es específica de cada fragmento y de los cebadores empleados.

Por último, en la fase de **extensión**, la enzima Taq polimerasa incorpora los desoxinucleótidos disponibles en el medio de manera complementaria a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura de esta fase de elongación suele ser de 72°C.

Una vez realizadas las PCR, los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

La agarosa es un polímero lineal constituido por unidades alternantes de D- y L-galactosa unidas por enlaces glicosídicos α -(1->3) y β -(1->4). Al solidificar forma un entramado tridimensional con poros de un diámetro entre 50 nm y más de 200 nm. En estos geles, las moléculas lineales de ADN migran hacia el polo positivo con una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, dentro de ciertos límites.

Para preparar el gel se añadieron los gramos de agarosa (Agarosa D1 Low EEO de pronadisa) necesarios para conseguir la concentración deseada (1,5 gramos en el caso de geles al 1,5% y 2 gramos para geles al 2%) a 100 ml de tampón TBE 0,5X preparado a partir de una solución del TBE 5X (54g de Tris base, 27,5g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5M a pH = 8). La mezcla se calentó en un microondas para favorecer la homogenización y, una vez disuelta la agarosa en su totalidad, se dejó enfriar parcialmente y se añadió 4,5 μ l de bromuro de etidio.

El bromuro de etidio (3,8 diamino-6-etil-5-fenilfenatridium bromuro) se utiliza para visualizar el ADN. Este compuesto, que es un mutágeno muy potente, se intercala entre las bases del ADN. Absorbe radiaciones a 302 y 366 nm (emitidas por las fuentes

comerciales de luz ultravioleta), reemitiendo parte de la energía absorbida a 590 nm, longitud de onda que corresponde a la región rojo-naranja del espectro visible.

La mezcla se pasa al molde del gel, se inserta el peine para formar los pocillos donde se coloca el producto de PCR y se deja enfriar durante, al menos, 30 minutos. Una vez solidificado, se retira el peine y el gel se sumerge en la cubeta de electroforesis conteniendo el buffer TBE 0,5X.

Se utilizaron 8 µl del producto de la amplificación para su visualización en el gel. Para ello, se mezclaron con 2 µl buffer de carga 6X compuesto al 0,25% de azul de bromofenol (25 mg), 0,25% xylene cyanol FF (25mg) y sacarosa al 40% peso/volumen (4g) y se colocaron en su pocillo correspondiente en el gel. Además, a uno de los pocillos se añade un marcador de peso molecular (Hyperladder IV de Bioline) que se usa como referencia para conocer el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados por PCR.

El azul de bromofenol (3, 3, 5, 5-Tetrabromofenol Sulfonftaleína) es de menor peso molecular que las moléculas de ADN por lo que migra más rápido. De forma contraria, el xylene-cyanol migra más lentamente. Al ser visibles por su coloración son utilizados como indicadores del avance electroforético y permiten detener la migración de las moléculas de ADN en el gel en el momento adecuado.

El efecto mutagénico del bromuro de etidio y el efecto irritante leve del azul de bromofenol obligan al uso de guantes durante la ejecución del procedimiento y la manipulación de los materiales que han estado en contacto con ellos.

Tras cubrir la cubeta de electroforesis, se aplicaron 100V de voltaje con la fuente de alimentación que está conectada a la cubeta. Cuando el frente del gel alcanzó los 2/3 del total se consideró acabada la electroforesis. Los geles se visualizaron bajo la luz ultravioleta de un transiluminador (Biodoc-It Imaging System 2UV Tansiluminator) y se identificaron las bandas de interés en función del tamaño, que se determina por su posición relativa respecto a las bandas del marcador de peso molecular de tamaño conocido.

3.4. Identificación molecular de especies fúngicas.

3.4.1. Técnica de amplificación de la región ITS.

La identificación molecular de las especies fúngicas presentes en el tracto respiratorio de los individuos incluidos en el estudio se realizó mediante la amplificación por Nested-PCR de las regiones ITS usando pares de cebadores universales para hongos.

Para ello se realizaron dos rondas consecutivas. Una primera ronda se realizó con los cebadores externos ITS-1 e ITS-4, descritos por T.J. White (White *et al.*, 1990). Estos cebadores flanquean una región de entre 500 y 800 pb conservada del genoma de gran variedad de hongos:

ITS-1: 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'.

ITS-4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'.

La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25 μ l, que incluía: 3 μ l del ADN extraído de cada alícuota, 2,5 μ l de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline), 0,2 μ l de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ μ l de Bioline), 0,5 μ l de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1 μ M de cada dNTP), 0,5 μ l de cada cebador (concentración de 20 μ M cada uno) y 1,25 μ l de MgCl₂ 50mM. La tabla 2 muestra el programa que se siguió.

Tabla 2. Condiciones de la primera ronda de Nested-PCR utilizada para detectar la presencia de la región ITS de los hongos.

ETAPA	Nº DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Activación	1	95	5 minutos
Desnaturalización	35	94	30 segundos
Hibridación		55	45 segundos
Extensión		72	30 segundos
Terminación	1	72	7 minutos

A continuación, a partir de los productos de PCR de esta primera ronda se realizó una segunda ronda con la pareja de cebadores ITS-3 e ITS-4 (White *et al.*, 1990), que amplificaban una región de unos 200-500 pb:

ITS-3: 5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC -3'.

ITS-4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'.

La mezcla de PCR para esta segunda ronda se preparó para un volumen final de 40 μ l, que incluían: 4 μ l de ADN, 4 μ l de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline), 0.3 μ l de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ μ l de Bioline), 1 μ l de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1 μ M de cada dNTP), 1 μ l de cada cebador a una concentración de 20 μ M cada uno y 2 μ l de MgCl₂ 50mM. El programa era similar pero, en este caso, para 40 ciclos y se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la segunda ronda de Nested-PCR utilizada para detectar la presencia de la región ITS de los hongos.

ETAPA	Nº DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Activación	1	95	5 minutos
Desnaturalización	40	94	45 segundos
Hibridación		55	45 segundos
Extensión		72	45 segundos
Terminación	1	72	7 minutos

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron con el Transiluminador.

A continuación se procedió a la preparación de los fragmentos amplificados para su secuenciación. Para ello, las muestras se dividieron en tres grupos:

Las muestras en las que amplificaron varios fragmentos que no se separaban totalmente durante la electroforesis en gel por tener tamaño parecido fueron clonadas antes de ser purificadas y secuenciadas.

Las muestras en las que aparecieron varios fragmentos que diferían en peso molecular lo suficiente como para separarse en el gel más de 50 pb fueron añadidas en su totalidad a un gel de agarosa. A partir del gel, estas bandas se cortaron con la ayuda de un bisturí y se purificaron antes de ser secuenciadas.

Las muestras en las que solo amplificó un fragmento se consideraron colonizadas por una sola especie fúngica y se purificaron directamente.

3.4.2 Técnica de Clonación.

Los fragmentos que se amplificaron con los cebadores universales ITS y que tenían diferente tamaño pero peso molecular parecido dentro de una misma muestra no se separaban lo suficiente como para poder ser recortados a partir del gel de agarosa y

así poder ser secuenciados después. En estos casos, estos productos de PCR fueron clonados para su posterior purificación y secuenciación. El protocolo de clonación se basó en 3 pasos:

1º) Reacción de Ligación.

Esta reacción se realiza para insertar un fragmento de ADN de doble cadena en un vector de clonación, que son moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN que llevan insertados.

Existen varios tipos de vectores, entre ellos los plásmidos, que son moléculas de ADN circular de doble cadena y extracromosómico que tienen capacidad de reproducirse de manera independiente del ADN cromosomal de la bacteria en la que son introducidos. En resumen, un vector plasmídico ha de poseer unas características determinadas: la presencia en su ADN de una secuencia que le confiera la capacidad de duplicarse de manera autónoma respecto del cromosoma bacteriano principal; la presencia de un gen que lo haga resistente a un antibiótico para poder seleccionar los clones de células bacterianas que contengan los plásmidos; y, por último, la presencia de secuencias de reconocimiento que permitan la inserción del fragmento de ADN exógeno.

La unión del fragmento de ADN que se desea clonar con el vector de clonación se realiza por medio de unas enzimas denominadas ADN-ligasas. Estas enzimas requieren como sustrato dos extremos de ADN; un extremo 5' (portador de un grupo fosfato) y un extremo 3' (grupo hidroxilo de la desoxirribosa). La ligasa puede unir tanto extremos romos como extremos cohesivos. Los vectores que transportan un fragmento insertado se denominan vectores recombinantes.

En este trabajo, la reacción de ligación de los productos amplificados se llevó a cabo con el vector de clonación pGEM®-T Easy Vector (PROMEGA). Como se muestra en la siguiente imagen, este vector tiene 3015 pb. Entre ellas, posee un gen que le confiere a la bacteria resistencia frente a la ampicilina.

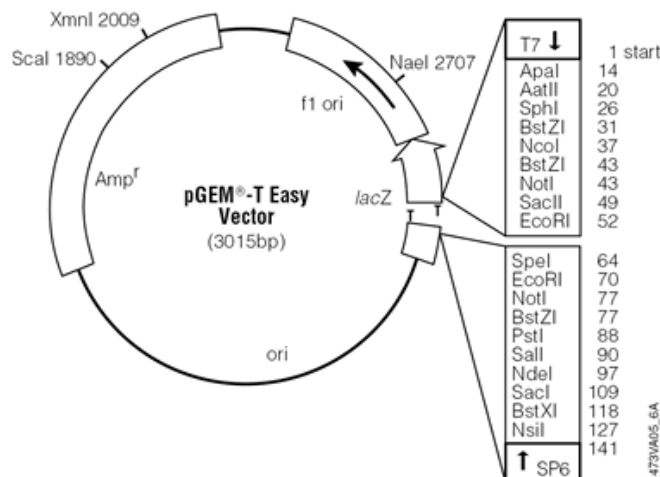


Figura 4. pGEM®-T Easy Vector (Promega®).

Para calcular la cantidad óptima de inserto que debíamos añadir a 1 μ l de pGEM®-T Easy Vector (50ng/ μ l) se cuantificó la concentración de ADN de cada muestra amplificada y se usó la siguiente ecuación:

$$\frac{(ng \text{ de vector} * kb \text{ de inserto})}{kb \text{ de vector}} * \text{ratio molar del inserto:vector}$$

En la ecuación, ng: nanogramos; kb: kilobases.

La cantidad de ADN calculado en cada caso se colocó en un eppendorf de 0,2 ml al que también se añadieron: 5 μ l de 2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase, 1 μ l de pGEM®-T Easy Vector (50 ng/ μ l), 1 μ l de T4 DNA Ligase (3 U Weiss/ μ l) y agua estéril libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 10 μ l.

Además, se incluyó un eppendorf que contenía 2 μ l de ADN (inserto) suministrado también por PROMEGA y que actúa como control positivo de la reacción de ligación.

La mezcla se incubó a 16 °C en el termociclador (Biometra T1 Thermocycler) durante, al menos, 12 horas para favorecer la reacción de ligación.

2º) Transformación.

Tras la reacción de ligación, obtenemos en cada caso una molécula que consta del inserto de ADN unido al vector recombinante. El siguiente paso en el proceso de

clonación sería la introducción de este material genético en células bacterianas hospedadora mediante un proceso llamado Transformación.

Para ello se usaron cepas JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega®). Antes de empezar, se prepararon los materiales y reactivos necesarios para realizar la transformación, tal y como se detalla a continuación:

Medio LB (Luria Bertani): Se prepararon 500 ml de medio LB para favorecer el crecimiento de las bacterias recombinantes. Para ello, se pesaron 5 g. de Bacto-tryptone, 2,5 g. de Extracto de levadura y 2,5 g. de NaCl y se diluyeron en 500 ml de agua destilada. El pH de la mezcla se ajustó a 7.0 con NaOH y se autoclavó para asegurar que el medio era totalmente estéril.

Medio LBA (LB-agar): Se preparó del mismo modo que el medio LB y, antes de autoclavarlo, se le añadieron 7,5 g. de agar bacteriológico. Tras el proceso de esterilización en autoclave y una vez que la temperatura del medio alcanzó los 50°C aproximadamente, se añadió ampicilina hasta una concentración final de 100µg/ml y se prepararon placas de petri añadiendo unos 36 ml de medio LBA a cada una. Estas placas se dejaron enfriar en campana para que el agar se solidificase y a continuación se guardaron a 4°C.

Medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite Repression): Primero se prepararon 100 ml de medio SOB (Super Optimal Broth) mezclando 2 g. de Bacto®-tryptone, 0,5g de Extracto de levadura, 1 ml de NaCl (1M), 0.25 ml de KCl (1M) y 1ml de MgCl₂ (2M); y disolviéndolo en 100 ml de agua destilada. A continuación el SOB fue autoclavado y, al alcanzar de nuevo la temperatura ambiente, se pasó a medio SOC añadiéndole 1 ml de glucosa (2M) previamente esterilizada con filtro de jeringa. La solución se mantuvo a 4°C hasta el momento de ser utilizada.

IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido): Se preparó una solución stock de IPTG para una concentración final de 0,1M, añadiendo 1,2g de IPTG a 50 ml de agua destilada. La mezcla se esterilizó con filtro de jeringa y se guardaron alícuotas a -20°C.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido): Se prepararon alícuotas de 2 ml disolviendo 100 mg de X-Gal en 2 ml de N,N'-dimetil-formamida. Se cubrieron con papel de aluminio para protegerlas de la luz y se guardaron a -20°C.

Una vez preparados los materiales, se procedió a realizar la transformación. Se centrifugaron los tubos que contenían las reacciones de ligación para asegurar que todo el contenido se desplazaba al fondo del eppendorf. De cada muestra de ligación se tomaron 5 µl y se añadieron a tubos eppendorf de 1,5 ml estériles que teníamos depositados en hielo. Los tubos que contenían a las células competentes JM109, conservadas a – 80°C, se depositaron en hielo durante unos 5 minutos para después añadir 50 µl de células a cada tubo que contenía los 5 µl de reacción de ligación y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizó un choque de calor sobre las células manteniéndolas en un baño a 42°C durante 45-50 segundos para, después, traspasar los tubos inmediatamente al hielo, donde se mantuvieron durante 2 minutos.

Tras este proceso se considera que los vectores con el inserto ligado han sido introducidos en las células. Para favorecer el crecimiento de las células, se añadieron 950 µl de medio SOC a temperatura ambiente a cada tubo y se incubaron a 37°C con agitación moderada (150 rpm aproximadamente) durante una hora y media.

El tiempo de espera se empleó en preparar las placas de petri con el medio LBA solidificado para posteriormente ser cultivadas. Para ello, se usó la campana para favorecer la esterilidad y cada placa de petri se suplementó con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (0,5 mM) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) (80µg/ml), y se extendieron sobre la superficie del agar con la ayuda de un asa de siembra. Las placas se taparon y se mantuvieron a 37 °C durante al menos 30 minutos para favorecer la absorción de IPTG y X-Gal.

3º) Crecimiento de colonias.

El crecimiento de colonias a partir de las células transformadas se realizó sembrando 100µl de cada cultivo de transformación en el medio LBA sólido con ampicilina, IPTG y X-Gal; e incubando cada placa a 37° C durante 16-24 horas.

En condiciones de crecimiento adecuadas, la célula bacteriana hospedadora se divide y genera millones de células, cada una de las cuales contiene varios ejemplares del plásmido recombinante, de manera que en este proceso se consigue obtener muchas moléculas del plásmido y de su inserto. Además, dado que el vector recombinante que

utilizamos es portador de resistencia ampicilina, el uso de este antibiótico en el medio LBA permite el crecimiento únicamente de células bacterianas que contienen dicho vector en su interior.

La molécula de IPTG es absorbida por la bacteria y, vez dentro de la célula, induce la transcripción del gen que codifica la β -galactosidasa, enzima que cataliza la hidrólisis de β -galactósidos a monosacáridos. Las colonias bacterianas que han sido transformadas se pueden identificar usando el X-Gal, ya que este compuesto puede ser metabolizado por la β -galactosidasa en 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol, un compuesto de color azul. Las células transformantes en las que se ha introducido el vector no recombinante con el operón lac intacto, una vez inducidas por IPTG, expresarán activamente β -galactosidasa, que hidroliza X-gal y colorea de azul sus colonias. Por el contrario, las colonias de células transformantes que han captado un plásmido con el operón lac recombinante, en cuyo interior ha sido insertado el fragmento de ADN de interés, sufren con la inserción la inactivación del gen lacZ (uno de los genes que codifica la β -galactosidasa) y por tanto, no pueden expresar β -galactosidasa ni degradar X-gal, permaneciendo sus colonias de color blanco.

De esta forma, se pudieron seleccionar 5 colonias blancas (con el inserto debidamente acoplado al plásmido) de cada muestra y se hicieron crecer en medio LB líquido con ampicilina de nuevo a 37°C, esta vez con agitación, durante 24 horas.

3.4.5 Técnica de Secuenciación.

Los productos de PCR suelen contener restos de cebadores, dNTPs, enzima y demás componentes que han sido utilizados durante el proceso de PCR y que interfieren directamente en la secuenciación disminuyendo la calidad de las secuencias que se obtengan. Por este motivo, es necesario llevar a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación de los productos de PCR.

A continuación, se realiza una reacción de secuenciación a partir de los productos purificados. Este proceso consiste en una PCR en la que, a partir de un molde de ADN, se obtienen fragmentos de amplificación cuyo tamaño difiere en una sola base. Se consigue añadiendo a la mezcla de reacción nucleótidos marcados con moléculas fluorescentes que, al incorporarse al final de la cadena (en el extremo 3') produce la

terminación del fragmento. Al usar nucleótidos terminales que lleven cuatro tipos distintos de marcaje (uno diferente para cada nucleótido), las cuatro reacciones de terminación específica (ddATP, ddCTP, ddGTP, y ddTTP) se pueden llevar a cabo en el mismo tubo (Prober *et al.*, 1987), de manera que se puede determinar cuál es el nucleótido terminal de los fragmentos de ADN amplificados en base en su señal y así resolver la secuencia del fragmento de ADN con sólo un carril. Este método asegura que todas las cadenas sintetizadas a partir del molde lleven incorporada una sola marca y la seña que cada fragmento emite depende del nucleótido terminal incorporado.

Tras la reacción de secuenciación, se realiza la precipitación de la reacción de secuencia. En este paso se eliminan los reactivos sobrantes de la reacción y otras moléculas que puedan interferir en la lectura del secuenciador.

1º) Purificación.

Muestras con un solo fragmento amplificado.

Una vez realizada la PCR, aquellas muestras en las que se amplificó un solo fragmento cuando se utilizaron los cebadores ITS fueron directamente purificadas utilizando un proceso de purificación basado en la cromatografía de exclusión molecular para obtener el fragmento de ADN amplificado susceptible de ser secuenciado. Para ello, el producto de PCR se hizo pasar a través de una columna que contiene un lecho de un material poroso, en nuestro caso de sephacryl (Sephacryl S-400 HR de GE Healthcare). El diámetro del poro es el factor que selecciona el tamaño de la molécula a purificar.

Los primeros pasos a seguir son preparar el Sephacryl, montar las columnas de cromatografía y purificar el ADN, siguiendo los protocolos descritos a continuación.

A. Preparación del Sephacryl:

- Preparar 50 mL de Sephacryl y buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 7,5 y 1 mM EDTA) mezclados al 50%. Mezclar bien y centrifugar cinco minutos a 700g.
- Retirar el sobrenadante y añadir buffer TE hasta 50 ml. Volver a centrifugar 5 minutos a 700g. Repetir este paso.

- Retirar el sobrenadante y añadir 20 ml de buffer TE.

B. Purificación de ADN por cromatografía de exclusión molecular:

- Limpiar la columna: Montar una columna (MicroSpin™ S-400 HR Columns de Amersham Bioscience) por muestra. Introducir la columna en un eppendorf de 1,5 ml sin tapón. Lavar la columna rellenando con 650 µl de agua destilada y centrifugar un minuto a 900g. Repetir dos lavados más tirando el eluido y secando la base de la columna sobre papel entre cada lavado.

- Preparar el lecho poroso: Rellenar completamente la columna con Sephacryl 400 y centrifugar durante 2 minutos a 900g. Tirar el eluido y secar la gota final de la base de la columna. Repetir este paso dos veces más.

- Purificar el ADN: Colocar la columna en un nuevo eppendorf limpio y rotulado convenientemente. Depositar lentamente con la pipeta 30µl de ADN sobre el centro del lecho. Centrifugar a 900g durante 2,5 minutos y quedarnos con el eluido. Se desecha el lecho y se lavan las columnas en agua destilada.

Test de purificación: Preparar un gel de agarosa al 2% y cargar 5µl de ADN mezclado con un de tampón de carga para comprobar que no hemos perdido ADN durante la purificación.

Muestras con varios fragmentos cuyos tamaños diferían en al menos 100 pb.

Aquellas muestras en las que se amplificaron varios fragmentos cuyos tamaños diferían en al menos 100 pb, se procedió a cortar las diferentes bandas directamente del gel de agarosa y se purificó cada banda por separado siguiendo un protocolo del kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up.

La muestra se mezcla con tampón de unión NTI y se calienta para disolver la agarosa. En presencia de sal caotrópica, el ADN se une a la membrana de sílice de la columna suministrada por el Kit y las contaminaciones se eliminan mediante sencillos pasos de lavado con tampón de lavado NT3 y etanol. Por último, el ADN puro se eluye con agua estéril. El protocolo se detalla a continuación.

Una vez recortado el fragmento de ADN con la ayuda de luz UV del transiluminador y un bisturí, se determinó el peso de la rodaja de gel y se transfirió a un eppendorf de 1,5 ml limpio. Por cada 100 mg de gel de agarosa se añadieron 200 μ l de Buffer NTI y se incubaron a 50°C durante 5-10 minutos, agitando cada tubo brevemente cada 2-3 minutos, hasta que el gel estaba totalmente disuelto.

Se colocó una columna por cada muestra sobre un tubo colector de 2 ml y se llenó la columna con la muestra. Se centrifugó a 11.000xg durante 30 segundos, se desechó la solución que atravesó la columna y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El ADN queda de esta forma anclado a la membrana de sílice. A continuación se lavó cada columna con 700 μ l de tampón NT3, centrifugando de nuevo a 11.000xg durante 30 segundos. Tras descartar el eluido, se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 11.000xg para eliminar restos del Buffer NT3, ya que el etanol residual de Buffer NT3 podría inhibir reacciones enzimáticas posteriores.

Para finalizar, cada columna se coloca sobre un nuevo eppendorf debidamente etiquetado y el ADN se eluye añadiendo 30 μ l de agua estéril a cada membrana y dejando incubar 1 minuto a temperatura ambiente antes de centrifugar durante 1 minuto a 11.000xg.

Muestras con varios fragmentos cuyos tamaños diferían en menos de 100 pb.

Por último, en las muestras que habían sido clonadas se procedió a la purificación de los plásmidos con el inserto a partir de las colonias crecidas con el Kit comercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Con este método, las bacterias sedimentadas por centrifugación se resuspenden en el tampón A1 y el ADN plasmídico se libera de las células huésped por lisis de éstas usando el Tampón A2 (solución alcalina con SDS). El Buffer A3 neutraliza el lisado resultante y crea las condiciones apropiadas para la unión del ADN del plásmido a la membrana de sílice.

Los pasos del protocolo que se siguió se describen a continuación.

Los cultivos de células en LB líquido se centrifugaron un minuto a máxima velocidad para después descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 250 μ l buffer A1. Se añadieron entonces 250 μ l de buffer de lisis A2 y se mezcló suavemente

invirtiendo cada tubo 6-8 veces. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante un máximo de 5 minutos, hasta que el lisado tenía apariencia clara.

Se añadieron entonces 300 μ l de Buffer A3, se mezcló por inversión del tubo 6-8 veces y se centrifugó durante otros 5 minutos a 11.000 xg y temperatura ambiente.

Mientras tanto, se colocó una columna por cada muestra sobre un tubo colector de 2 ml. Cuando terminó la centrifugación, se utilizó una pipeta para recoger el sobrenadante con cuidado de no arrastrar los restos de la lisis celular que eran visibles porque adquirieron un tono blanquecino y quedaron adheridos a la pared del tubo por la acción centrífuga. Este sobrenadante fue añadido a cada columna correspondiente y se centrifugó 1 minuto a 11.000 xg.

Una vez teníamos el vector recombinante unido a la membrana de sílice, ésta se lavó con 500 μ l de tampón AW y, posteriormente con 600 μ l de Buffer A4. Tras cada lavado las columnas se centrifugaron 1 minuto a 11.000 xg. Para asegurar que no quedaban restos de etanol, se realizó una centrifugación adicional a 11.000 xg durante 2 minutos.

Finalmente, cada columna se colocó sobre un nuevo eppendorf debidamente etiquetado y el ADN se eluyó añadiendo 50 μ l de agua estéril a cada membrana y dejando incubar 1 minuto a temperatura ambiente antes de centrifugar durante 1 minuto a 11.000 xg.

2º) Reacción de secuenciación.

La secuenciación automática del ADN se realizó mediante electroforesis capilar usando BigDye Terminator v3.1 de Applied Biosystems. Un factor determinante en el éxito de las reacciones de secuenciación es la correcta cuantificación del ADN, ya que si la cantidad de ADN presente en la muestra es inferior a la necesaria se obtendrían casi datos con baja señal, ruido de fondo, errores y ambigüedades. Por ello, la concentración de ADN de los productos purificados se midió en ng/ μ l con la ayuda de un Nanodrop mediante espectrofotometría a 260 nm. En cada caso, al medir la absorbancia de la muestra se comprobó que la ratio A260/A280 oscilaba entre 1,8 y 2, indicando en estos casos que no existe contaminación del ADN con proteínas que puedan afectar negativamente a los resultados de la secuenciación.

La concentración óptima de ADN se calculó dividiendo el número de pares de bases del fragmento que queríamos secuenciar, más el número de pares de bases del vector en el caso de las muestras clonadas, entre 50. Antes de proceder a la reacción de secuenciación, cada muestra se diluyó en agua estéril para alcanzar la concentración de ADN que se requería en cada caso.

- Para la reacción de secuenciación de los productos de PCR purificados directamente y los extraídos a partir del gel de agarosa, se preparó una reacción que contenía: 2 μ l de Terminator ready reaction mix (Big Dye), 2 μ l de cebador ITS-3 ó ITS-4 a una concentración de 3 μ M, 1 μ l de agua inyectable y 5 μ l de ADN purificado.

- Para la reacción de secuenciación de los productos de PCR clonados y purificados, se preparó una reacción que contenía: 2 μ l de Terminator ready reaction mix (Big Dye), 2 μ l del cebador universal M13 forward (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') (3 μ M), 1 μ l de agua inyectable, 1 μ l de DMSO (5%) y 4 μ l de ADN purificado.

El programa de secuenciación se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la PCR de secuenciación.

ETAPA	Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Activación	1	94	3 minutos
Desnaturalización	30	96	10 segundos
Hibridación		50	5 segundos
Extensión		60	4 minutos
Enfriamiento	1	4	Indefinidamente

3º) Protocolo de precipitación.

Con el fin de eliminar los reactivos sobrantes de la reacción y otras moléculas que puedan interferir en la lectura del secuenciador, se realizó la precipitación de cada muestra de 10 μ l obtenida en la reacción de secuenciación. Para ello se usaron tubos eppendorf estériles de 1,5 ml, colocando en cada uno los 10 μ l junto con 2,5 μ l de EDTA (125mM) y 30 μ l de etanol absoluto. Tras la incubación de esta mezcla durante 12 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se procedió a la centrifugación a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C para obtener un pellet que posteriormente se lavó con 125 μ l de etanol al 70%, también a máxima velocidad pero esta vez durante

10 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a 37 °C durante 30 minutos para eliminar los restos de alcohol.

4º) Preparación de la muestra para secuenciación.

Una vez precipitadas y secas, las muestras se resuspendieron en 11 µl de formamida y se traspararon a una placa y se llevaron a la Unidad de Genómica del IBIS donde las muestras fueron inyectadas en el (poner que secuenciador es) y secuenciadas por capilaridad.

5º) Procesamiento de las secuencias obtenidas.

Las secuencias obtenidas de cada muestra se compararon con secuencias previamente incluidas en la base de datos de PubMed para identificar a qué hongo pertenecían en cada caso. Para buscar la concordancia entre las secuencias que habíamos obtenido de nuestras muestras y las secuencias descritas en la base de datos, se recurrió a la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se utilizó el programa Nucleotide Blast que nos permitía buscar una base de datos de nucleótidos utilizando nuestra secuencia de nucleótidos como patrón de búsqueda. Tras introducir nuestra secuencia en formato FASTA, filtramos la búsqueda evitando aquellas secuencias que pertenecieran a humanos y/o ratón y seleccionamos la opción de búsqueda Megablast, con la cual conseguíamos rastrear aquellas secuencias que eran altamente similares a la nuestra.

3.4.4. Identificación de *Pneumocystis jirovecii*.

La identificación molecular de *P. jirovecii* se realizó utilizando dos protocolos modificados de la PCR habitual.

Por un lado, se empleó la técnica conocida como Nested-PCR, que consiste en dos reacciones de PCR consecutivas, con dos pares de cebadores distintos. En la primera reacción de amplificación se utilizaron cebadores específicos (externos) de la secuencia por analizar:

PAZ102-E: 5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3'.

PAZ102-H: 5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3'.

Estos cebadores fueron descritos por A.E. Wakefield y amplifican un fragmento de 346 pb incluido en el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial (mtLSU rRNA) de *P.jirovecii* (Wakefield *et al.*, 1990).

Según el protocolo de Nested-PCR publicado por A. Wakefield y modificado en nuestro laboratorio para la identificación de la colonización por *P. jirovecii*, la mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25 µl, que incluía: 3µl del ADN extraído de cada alícuota, 2,5 µl de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline), 0,25 µl de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ µl de Bioline), 0,5 µl de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1µM de cada dNTP), 0,5 µl de cada cebador (concentración de 20 µM cada uno) y 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM. La tabla 4 muestra el programa de PCR.

Tabla 4. Condiciones de la primera ronda de Nested-PCR utilizada para detectar la presencia del gen mtLSU rRNA de *P. jirovecii*.

ETAPA	Nº DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Activación	1	94	5 minutos
Desnaturalización	35	92	30 segundos
Hibridación		55	30 segundos
Elongación		72	2 minutos
Extensión	1	72	5 minutos

El producto de esta reacción sirvió como molde para una segunda reacción de PCR, en la cual se pretendió amplificar un fragmento de la secuencia amplificada en la primera ronda de PCR. Para ello, el segundo juego de cebadores (internos) se aparean a una secuencia limitada por el primer juego de cebadores (externos).

En este caso, se usaron cebadores internos también descritos por A. Wakefield (Wakefield *et al.*, 1990) y que flanquean una región de 256 pb:

pAZ102-X: 5'-GTGAAATACAAATCGGACTAGG-3'.

pAZ102-Y: 5'-TCACTTAATATTAATTGGGGAGC-3'.

La mezcla de PCR para esta segunda ronda se preparó para un volumen final de 50 µl, que incluía: 5µl de ADN, 5 µl de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline), 0,5 µl de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ µl de Bioline), 1 µl de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1µM de cada dNTP), 1,2 µl de cada cebador a una concentración de 20 µM cada uno y

1.5 µl de MgCl₂ 50mM. El programa era similar pero, en este caso, se aumentó el número de ciclos hasta 40, tal y como se detalla a continuación.

Tabla 5. Condiciones de la segunda ronda de Nested-PCR utilizada para detectar la presencia del gen mtLSU rRNA de *P. jirovecii*.

ETAPA	Nº DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Activación	1	94	5 minutos
Desnaturalización	40	92	30 segundos
Hibridación		55	30 segundos
Elongación		72	2 minutos
Extensión	1	72	5 minutos

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio, tal y como se explicó anteriormente, y las bandas se visualizaron con el transiluminador.

Por otro lado, la identificación de *P. jirovecii* a partir del ADN extraído de las muestras de LOF y esputo también se realizó utilizando la técnica de PCR a Tiempo Real. Este método es una modificación de la PCR convencional y se basa en la monitorización del proceso usando fluoróforos específicos del ADN bicatenario o sondas fluorescentes específicas de la secuencia, que generan una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto de la PCR, con lo que se consigue la visualización en directo del perfil completo de amplificación de la diana.

En nuestro estudio, esta técnica se realizó con el equipo LightCycler 1.5 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), que ofrece la posibilidad de analizar la curva de fusión del producto, haciendo posible la caracterización del fragmento amplificado por su temperatura de fusión (T_m).

Se usó SYBR-Green (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Molecular Biochemicals) como fluoróforo, que se une con gran afinidad al ADN bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1.000 veces. La PCR-TR se realizó en un volumen final de 20 µl, con los cebadores pAZ102-X y pAZ102-Y, anteriormente detallados, a una concentración de 250 nM cada uno, MgCl₂ 1mM y 2 µl de ADN de la muestra.

El programa de PCR que se utilizó se describe en la tabla 6. Como se observa en la tabla, durante el proceso de amplificación se añadió una etapa final a 76°C durante 1

segundo para medir la señal de fluorescencia únicamente de la sonda unida específicamente al ADN bicatenario.

Para que una muestra fuese considerada positiva, ésta debía cumplir tres criterios: que el análisis cualitativo realizado por el software del LightCycler mostrase las muestras como positivas; que la amplificación fuese detectada antes del ciclo 35; y que la T_m del fragmento amplificado tuviera un valor entre 78 y 81° C.

Tabla 6. Condiciones de la PCR a Tiempo Real utilizada para detectar la presencia del gen mtLSU rRNA de *P. jirovecii*.

ETAPA	Nº CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Activación	1	95	8 minutos
Desnaturalización	40	95	5 segundos
Hibridación		55	15 segundos
Extensión		72	10 segundos
		76	1 segundo
Annealing	1	95	30 segundos
		65	30 segundos
		95	0 segundos
Enfriamiento	1	40	30 segundos

3.6. Medidas de Control.

Las muestras se procesaron a ciegas y bajo código. Dentro del control interno del sistema, se utilizaron controles positivos y negativos.

Para evitar falsos-positivos, se usaron pipetas con filtro en cada paso. La extracción del ADN, la preparación de las mezclas de reacción, la adición del ADN a las mezclas de reacción de la PCR, la amplificación por PCR y la detección se realizaron en diferentes áreas del laboratorio.

Para detectar cualquier contaminación cruzada que hubiera podido tener lugar se usaron siempre controles negativos de agua estéril.

En todas las muestras que resultaron negativas por la técnica de PCR se estudió la presencia del gen de la beta-globina para descartar procesos de inhibición de la PCR o mala calidad de la muestra.

En cada uno de los procesos de digestión de las muestras se utilizó suero fisiológico como control negativo de la posible contaminación que pudiera tener lugar en las muestras durante su manejo.

3.7. Criterios de interpretación de los resultados y definición de colonización.

En la identificación de *P. jirovecii*, se consideró que una muestra era positiva o negativa si presentaba el mismo resultado en las dos alícuotas estudiadas para cada caso. Por otro lado, en la identificación del resto de las especies fúngicas, se consideró que una muestra era positiva al observarse la amplificación de la región ITS en las dos alícuotas.

Por tanto, para los fines de este estudio se definió la colonización de una muestra como la identificación del ADN del microorganismo sin que existan signos ni síntomas clínicos o radiológicos de neumonía o de infección respiratoria en el paciente.

3.8. Cuantificación de citoquinas y quitotriosidasa.

Se cuantificaron las concentraciones sistémicas de las citoquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α con dos arrays de ELISA (Custom Human 5-Plex Array y Human Cytokine Array 1, ambos proporcionados por Aushon Biosystems) que detectaban la presencia de cinco o nueve proteínas a la vez, respectivamente. Cada pocillo de la placa contenía anticuerpos específicos para capturar a su citoquina correspondiente, de manera que una vez incubada la placa con los estándares y las muestras, las proteínas que no nos interesaban no se unieron y se eliminaron con el lavado. Después se añadieron anticuerpos marcados con biotina que se unen específicamente a un segundo epítipo de las proteínas diana. Tras incubar y lavar la placa para eliminar el exceso de anticuerpos, se añadió la Estreptavidina-HRP que es una enzima que reacciona con gran variedad de sustratos para producir una señal luminiscente que es detectada en un espectrofotómetro utilizando 450 nm como longitud de onda principal. La cantidad de señal producida es proporcional a la concentración de cada proteína en los estándares y en las muestras.

La cuantificación de los niveles séricos de quitotriosidasa se realizó en el Laboratorio Central del Hospital Universitario Virgen del Rocío utilizando equipos automatizados comerciales y siguiendo un protocolo previamente publicado (Hollack *et al.*, 1994). Para ello, primeramente se prepararon dos soluciones tampón:

1. Tampón Citrato/Fosfato a pH 5,2: se preparó mezclando 50 ml de solución de citrato (solución de ácido cítrico 100 mM) con 52,5 ml de solución de fosfato (solución de PO_4HK_2 200 mM). Una vez preparado, el tampón se conservó a 4°C.

2. Tampón Glicina 0,3 M a pH 10,6: se preparó disolviendo 5,62 g de glicina en 200 ml de agua destilada y se llevó a pH 10,6 con una solución de NaOH 5N. Una vez preparado, también se conservó a 4°C.

Además se preparó una solución de 4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (4-MUF-QT) 0,025 mM, un sustrato fluorogénico que en principio no es fluorescente pero que produce un compuesto fluorescente cuando la enzima quitotriosidasa actúa sobre él.

Por otro lado, se preparó una Curva de Calibración utilizando el Tampón Citrato/Fosfato para hacer las diluciones del estándar.

La actividad quitotriosidasa se midió incubando 10 μl de cada muestra de suero con 100 μl de sustrato 4-MUF-QT durante 15 minutos a 37°C. A continuación, la reacción se paró añadiendo a cada muestra 2 ml del Tampón de Glicina y se leyó la fluorescencia a 365/445 nm. Los resultados se obtuvieron por interpolación a partir de la Curva de Calibración y se expresaron en nmoles/ml/hora.

3.9. Cuantificación de MCP-1.

La proteína humana MCP-1 se cuantificó en el suero de cada paciente mediante un ensayo inmunoenzimático (Human MCP-1 ELISA Kit) proporcionado por Thermo Scientific. Por recomendación del fabricante, los sueros no se diluyeron para este análisis y los valores obtenidos se compararon con aquellos esperados para adultos sanos (228-475 pg/ml).

3.10. Cuantificación de β -glucanos.

Se midió la concentración sistémica de β -glucanos en el suero de cada paciente usando el Kit Assay for (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan in Serum, proporcionado por Fungitell® (Associates of Cape Cod, Inc., EE.UU.). Aunque este ensayo está indicado para el diagnóstico presuntivo de la infección por hongos, no detecta ciertas especies de hongos

como el género *Cryptococcus*, que produce niveles muy bajos de este polisacárido; ni hongos de la familia Zygomycetes, que no producen (1→3)-β-D-glucano. Sin embargo, este ensayo colorimétrico sí puede detectar β-glucanos producidos por otros hongos patógenos oportunistas, entre ellos: *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pneumocystis jirovecii*.

El ensayo se basa en que el factor G de un lisado de amebocitos de *Limulus* es sensible a este componente de la pared fúngica. El Fungitell Reagent está modificado para eliminar el factor C, de manera que el β-glucano actuaría sólo sobre el Factor G, una serina proteasa. Una vez activada esta enzima, se produce una cascada enzimática que termina creando un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 405 nm. El ensayo cinético Fungitell se basa, pues, en la determinación de la tasa de aumento de densidad óptica producido por una muestra. Esta tasa se interpreta frente a una curva estándar para producir estimaciones de la concentración de (1-3)-β-D-glucano en la muestra.

3.10.1. Protocolo del ensayo Fungitell.

Primero se procedió a la preparación de la curva estándar de glucano: se disolvió el estándar suministrado por el kit con el volumen de RGW indicada en el vial, para hacer una solución de 100 pg/ml. A partir de esta solución, se hicieron diluciones usando tubos libres de glucanos, de manera que al final teníamos diferentes concentraciones: 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml y 6,25 pg/ml.

A continuación, se preparó el reactivo alcalino de pre-tratamiento del suero, que convierte glucanos de triple hélice en glucanos de cadena simple que son más reactivos en el ensayo. Se combinaron entonces volúmenes iguales de KOH (0,25 M) y KCl (1,2 M) en tubos libres de glucanos.

Las muestras de suero ya descongeladas se homogeneizaron usando un vórtex para después transferir 5 µl de cada una al pocillo de la placa designado en cada caso. Cada muestra se testó por duplicado. Inmediatamente se añadieron 20 µl de reactivo de pre-tratamiento del suero, se agitó la placa durante 10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos y se incubó durante 10 minutos a 37 ° C en el lector de placas de incubación.

Este tiempo de espera se empleó en la reconstitución de un vial de reactivo Fungitell mediante la adición de 2,8 ml de RGW y después añadiendo 2,8 ml de tampón de reconstitución Pyrosol. Se realizó en tubo libre de glucanos que se cerró con Parafilm y se agitó suavemente para disolver completamente.

Al finalizar la incubación del suero, se retiró la placa del incubador, se añadieron 25 μ l de cada estándar por duplicado a su pocillo correspondiente y se utilizó RGW como control negativo.

A continuación, se añadieron 100 μ l de reactivo Fungitell a cada pocillo, se agitó la placa y se introdujo la placa en el lector de microplacas (previamente equilibrado a 37 °C), donde se leyó a 405 nm menos 490 nm, durante 40 minutos a 37 °C. Se calculó la tasa media de cambio de densidad óptica (unidades mili-absorbancia por minuto) para todos los puntos entre 0 y 40 minutos.

3.10.2. Interpretación de los resultados.

Los resultados se expresaron en pg/ml. Se consideraron resultados negativos para infección invasiva aquellos valores de β -glucanos inferiores a 60 pg/mL y positivos aquellos valores que eran iguales o superiores a 80 pg/ml. Los resultados cuyos valores se encontraban en el intervalo de 60 a 79 pg/mL sugieren una posible infección fúngica invasiva pero se consideraron indeterminados.

3.11. Recogida y análisis de datos.

Los datos epidemiológicos, clínico-biológicos, inmunológicos y microbiológicos se recogieron en un formato estandarizado, utilizando para ello un cuaderno de recogida de datos (Anexo I). Todos los datos fueron traspasados a soporte magnético, mediante procedimientos operativos que contemplan: doble introducción de información, contraste automático de datos, detección de valores atípicos y rutinas de depuración lógica para la detección de inconsistencias.

Toda la información se introdujo en una base de datos construida expresamente para este proyecto, garantizando mediante la encriptación bajo código el cumplimiento de la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999).

Se realizó una estadística descriptiva de las variables del estudio. La comparación de variables cualitativas se realizó aplicando el test exacto de Fisher o el test Chi-cuadrado de Pearson, según el tamaño de la muestra. Las variables cuantitativas se compararon mediante la Prueba de Mann-Whitney, excepto en el estudio de la relación de β -glucanos con la respuesta inflamatoria en el que se empleó el análisis Rho de Spearman. Para las variables cualitativas se utilizaron frecuencias absolutas, mientras que las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar ($Md \pm DE$). Se comprobó la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk ($n < 50$) y Kolmogorff-Smirnof ($n > 50$).

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 14.0. El nivel de significación estadística se estableció para un valor de $p < 0,05$.

3.12. Aspectos éticos.

En el presente estudio se aplicaron los principios éticos recogidos en la última revisión de la Declaración de Helsinki, así como los recogidos en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos. Se cumplieron todos los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. El presente estudio contó con la aprobación oficial del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

La participación en el proyecto fue voluntaria y la solicitud de participación fue realizada como una propuesta de investigación en salud, independiente del proceso asistencial convencional del sistema sanitario.

A cada participante se le informó por escrito de la naturaleza de la investigación y del uso de la información obtenida, así como de su derecho al acceso, modificación o eliminación de los registros en cualquier momento.

Se garantizó la confidencialidad de los datos así como su utilización solo para los fines especificados del estudio. Además se solicitó un consentimiento informado por escrito (Anexo II) a los participantes.

RESULTADOS

1. Características de la población estudiada.

En el estudio se incluyeron un total de 76 sujetos que, voluntariamente, firmaron el consentimiento informado para participar en el mismo. De todos ellos se obtuvieron simultáneamente muestras de esputo espontáneo y de lavado orofaríngeo (LOF). En el mismo momento se extrajo sangre total para la obtención de muestras séricas.

Los datos espirométricos obtenidos de las pruebas funcionales respiratorias a las que fueron sometidos estos individuos previamente a la inclusión en el estudio permitieron establecer el estadio de la EPOC que presentaba cada uno de ellos según criterios de la GOLD, así, se dividieron en tres categorías.

Se incluyeron como grupo control (n=9) sujetos con historia tabáquica actual o reciente pero sin diagnóstico de EPOC que presentaban un $VEF_1/VFC > 0,7$. Los individuos con diagnóstico de EPOC ($VEF_1/VFC < 0,7$) se dividieron en dos grupos en función de la gravedad de la enfermedad que presentaban en el momento de la inclusión.

Se consideraron como pacientes con EPOC leve/moderada los pacientes con un $VEF_1 \geq 80\%$ y que, por tanto, se encuentran en estadio 1 según los criterios de la GOLD (n=17); junto con los pacientes con un VEF_1 entre el 79 y el 50 %, correspondiente al estadio 2 (n=17).

Se consideraron como pacientes con EPOC grave/muy grave aquellos pacientes (n=18) que presentaban una limitación grave del flujo aéreo correspondiente al estadio 3 (VEF_1 del 49 al 30%) y los sujetos en estadio 4 de la clasificación de la GOLD, con una limitación al flujo aéreo muy grave y con un VEF_1 menor al 30% (n=15).

Estos datos se ilustran en la Figura 5 y se resumen en la Tabla 7.

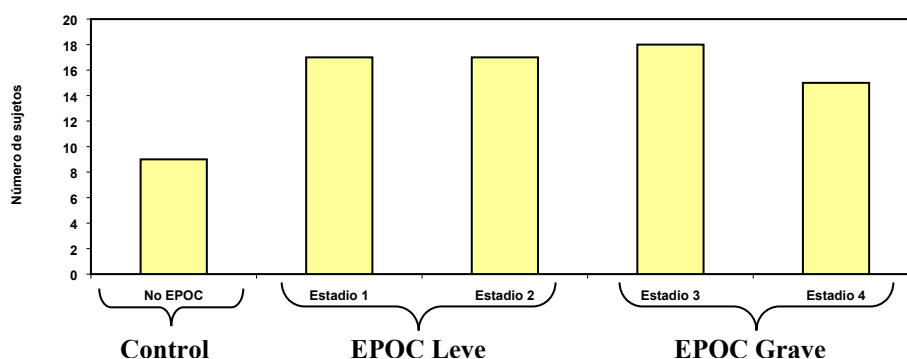


Figura 5. Descripción del número de sujetos por grupo de estudio

Tabla 7. Número de pacientes incluidos en el estudio, analizados según la clasificación de la GOLD.

GRUPOS	NÚMERO DE INDIVIDUOS N (estadio GOLD)	% DE LA MUESTRA
Controles	n= 9 (Estadio 0)	11,8
EPOC Leve	n=17 (Estadio 1) n=17 (Estadio 2)	44,8
EPOC Grave	n=18 (Estadio 3) n=15 (Estadio 4)	43,4
Total	n= 76	100

2. Características clínico-biológicas de la población.

En la Tabla 8 se muestran los datos demográficos y clínico-epidemiológicos recogidos de cada sujeto, tales como: edad, sexo, hábito tabáquico y función pulmonar.

En los 76 sujetos incluidos en el estudio, la edad media era de $68,01 \pm 11,07$ (edad media \pm DE). El 90,8% de ellos eran hombres y el 9,2 % mujeres.

Respecto al hábito tabáquico, todos los sujetos habían estado expuestos al humo del cigarrillo en algún momento de su vida. En concreto, 27 de estos individuos (35,5 %) eran fumadores activos en el momento de la toma de las muestras, mientras que los otros 49 (64,5 %) eran exfumadores.

Siguiendo los criterios del estudio, en el momento de la toma de muestra los sujetos presentaban situación clínica estable, ninguno de ellos sufría exacerbación de la EPOC, ni ninguna otra condición que pudiera contribuir a la activación de la respuesta inmune. Tampoco habían seguido tratamiento con antibióticos en al menos los tres meses previos.

Tabla 8. Características clínico-epidemiológicas de los sujetos incluidos en el estudio.

CARACTERÍSTICAS	CONTROL	EPOC LEVE	EPOC GRAVE
Edad (edad media \pm DE)	58,11 \pm 15,19	67,88 \pm 9,66	70,85 \pm 9,88
Sexo (% hombres)	55,56	94,12	96,97
Fumador activo (%)	77,78	35,29	21,21
% de VEF₁ (media \pm DE)	95,00 \pm 13,12	74,30 \pm 19,17	36,40 \pm 7,48

La comparación entre el grupo control y los dos grupos de pacientes con EPOC considerados conjuntamente se realizó con dos análisis distintos en función de las características de las variables en cuestión. De este modo, en las variables edad y VEF₁ se aplicó la Prueba de Mann-Whitney; mientras que en las variables sexo y hábito tabáquico se utilizó el Estadístico Exacto de Fisher. Estos datos se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Comparación de las variables edad y función pulmonar entre el grupo control y los pacientes con EPOC.

CARACTERÍSTICAS	CONTROL	EPOC	Prueba de Mann-Whitney (<i>p</i>)
Edad (edad media ± SD)	58,11 ± 15,19	69,34 ± 1,20	0,012
% de FEV ₁ (media ± SD)	95,00 ± 13,12	55,94 ± 3,00	0,016

Tabla 10. Comparación de las variables sexo y hábito tabáquico entre el grupo control y los pacientes con EPOC.

CARACTERÍSTICAS	CONTROL	EPOC	Estadístico exacto de Fisher (<i>p</i>)
Sexo (% hombres)	55,56	95,52	0,003
Fumador activo (%)	77,78	28,35	0,002

3. Descripción de la microbiota fúngica en el tracto respiratorio.

3.1 Prevalencia de colonización por hongos en el total de la muestra.

El análisis de las secuencias mediante alineamiento BLAST y posterior comparación con las secuencias descritas en la base de datos de PUBMED permitió la identificación de los géneros y especies fúngicas presentes en cada muestra. En total se identificaron 25 géneros de hongos distintos. Estos datos que se desglosan en la Tabla 11.

Solo en tres sujetos (3,9 %) no hubo evidencias moleculares de la presencia de hongos cuando se usaron la región espaciadora ITS y/o el gen mt LSU rRNA específico de *P. jirovecii* como dianas de amplificación. De esta forma, la prevalencia de colonización por hongos en nuestra muestra fue del 96,1%. Cada una de las muestras que resultó positiva al aplicar estas técnicas moleculares contenía entre una y cuatro especies de hongos diferentes. Sin embargo, este número podría verse incrementado ya que en tres muestras no se consiguió asociar la secuencia del fragmento amplificado por PCR con ninguna secuencia descrita en la base de datos de PubMed.

Con objeto de conocer la diversidad y frecuencia de especies y géneros fúngicos que están presentes en el tracto respiratorio de la población EPOC en estudio y si esta es diferente a la de nuestro grupo control, se analizaron estadísticamente las prevalencias de colonización por cada hongo comparando las identificaciones moleculares halladas en los nueve sujetos que no padecían la enfermedad con las encontradas en los pacientes. Para ello se aplicó el test exacto de Fisher, que permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña, como es el caso de nuestro grupo control. Los resultados de este test se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Comparación de la colonización por hongos entre el grupo control y los pacientes con EPOC.

HONGO	GRUPO CONTROL Núm. Colonizados (%)	GRUPO EPOC. Núm. Colonizados (%)	Estadístico exacto de Fisher (p)
Género <i>Alternaria</i>	0 (0)	4 (6,0)	1,000
- <i>A. alternata</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>A. pluriseptata</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>A. tenuissima</i>	0 (0)	1 (1,5)	
<i>Antrodia sinuosa</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Aspergillus restrictus</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
Género <i>Candida</i>	4 (44,4)	36 (53,7)	0,728
- <i>C. albicans</i>	4 (44,4)	27 (40,3)	
- <i>C. galbrata</i>	0 (0)	5 (7,5)	
- <i>C. galli</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>C. intermedia</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>C. orthopsilosis</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>C. pararugosa</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>C. sake</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>C. tropicalis</i>	0 (0)	5 (7,5)	
Género <i>Cladosporium</i>	3 (33,3)	21 (31,3)	1,000
- <i>C. cladosporioides</i>	1 (11,1)	3 (4,5)	
- <i>C. herbarum</i>	0 (0)	1 (1,5)	
Género <i>Cryptococcus</i>	0 (0)	2 (3,0)	1,000
- <i>C. neoformans</i>	0 (0)	1 (1,5)	
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0)	2 (3,0)	1,000
<i>Dioszegia hungarica</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Galactomyces geotrichum</i>	0 (0)	2 (3,0)	1,000
<i>Malassezia globosa</i>	1 (11,1)	0 (0)	0,118
Género <i>Penicillium</i>	0 (0)	2 (3,0)	1,000
- <i>P. brevicompactum</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>P. minioluteum</i>	0 (0)	1 (1,5)	
Género <i>Peniophora</i>	1 (11,1)	2 (3,0)	0,319
- <i>P. lycii</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>P. rosea</i>	0 (0)	1 (1,5)	
<i>Phialocephala trigonospora</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Phlebiopsis peniophoroides</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Pichia fermentans</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	6 (66,7)	27 (40,3)	0,165
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
Género <i>Rhodotorula</i>	0 (0)	3 (4,5)	1,000
- <i>R. mucilaginosa</i>	0 (0)	2 (3,0)	
- <i>R. slooffiae</i>	0 (0)	1 (1,5)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 (0)	2 (3,0)	1,000
Género <i>Sporobolomyces</i>	1 (11,1)	5 (7,5)	0,544
- <i>S. coprosmae</i>	0 (0)	1 (1,5)	
- <i>S. roseus</i>	1 (11,1)	5 (7,5)	
Género <i>Torulaspora</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Trametes versicolor</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
<i>Wallemia sebi</i>	0 (0)	2 (3,0)	1,000
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0 (0)	1 (1,5)	1,000
HNI	1 (11,1)	2 (3,0)	0,319

En la descripción de la micobiota presente en el tracto respiratorio de sujetos con EPOC se incluyeron los 67 pacientes que tenían diagnóstico clínico de padecer la enfermedad y los 9 sujetos control. En el grupo de los pacientes se identificaron 24 géneros en total, mientras que en el grupo control sólo se identificaron 6 géneros diferentes. En el presente estudio la prevalencia de colonización por hongos en el tracto respiratorio de pacientes con EPOC fue del 96,9%, mientras que en el grupo control fue del 100%.

El género *Candida* resultó ser el hongo más frecuente en los pacientes, con una prevalencia de colonización del 53,7 %. Dentro de este género, la especie más frecuente fue *C.albicans*, presente en 27 de las 67 muestras pertenecientes a sujetos con EPOC (prevalencia del 40,3%). Además se identificaron otras especies de *Candida* aunque con menor frecuencia. Así, de los 36 casos en los que se identificó este género, cinco presentaban colonización por *C. tropicalis* y otros cinco por *C. galbrata*. Además se identificaron las especies *C. intermedia*, *C. pararugosa*, *C. galli*, *C. sake* y *C. orthopsilosis* (en una sola muestra cada especie). En cuatro casos coexistían dos o más especies diferentes de *Candida*. Sin embargo, en el grupo control la prevalencia de colonización por este género era del 44,4% y, aunque esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa, si cabe reseñar que la única especie del género *Candida* que se identificó en sujetos sin EPOC fue *C. albicans*.

Se consideró que un paciente estaba colonizado por *P. jirovecii* cuando el fragmento de 256 pb del gen mt LSU rRNA se amplificaba por PCR anidada y PCR a Tiempo Real en al menos dos alícuotas de las muestras obtenidas de cada sujeto. De acuerdo con este criterio, 27 de los 67 pacientes incluidos en el estudio resultaron estar colonizados por este hongo atípico, lo que representa una prevalencia del 40,3%. En el grupo control se apreció una prevalencia de colonización por *P. jirovecii* más elevada, del 66,7%, sin que esta diferencia se pudiese considerar significativa a nivel estadístico ($p = 0,165$).

Por otro lado, la región ITS del género *Cladosporium* se amplificó en 21 muestras de pacientes, indicando una prevalencia de colonización por este hongo del 32,3% en la población con EPOC estudiada. De todos los casos en los que se identificó este género solo se pudo determinar la especie en cuatro ocasiones: tres casos en los que se trataba de *Cladosporium cladosporioides* y un caso en el que se identificó

Cladosporium herbarum. La prevalencia de colonización por este género en el grupo control fue prácticamente similar (33,3%), siendo un caso de *Cladosporium cladosporioides* el único en el que se pudo concretar la especie.

Además, se detectó la presencia de otros hongos que, aunque eran mucho menos frecuentes, también formaban parte de la microbiota fúngica de los sujetos incluidos en el estudio. Entre ellos se identificó el género *Sporobolomyces*, con una prevalencia de colonización del 7,5% en el grupo de pacientes con EPOC y 11,1% en el grupo control; en concreto, las especies: *S. roseus* y *S. coprosmae*. La primera se identificó en ambos grupos, mientras que la segunda sólo en el grupo de pacientes.

El género *Peniophora* se identificó con una baja frecuencia en ambos grupos. Las especies *P. rosea* y *P. lycii* se pudieron concretar en el caso de dos pacientes pero en el grupo control sólo se llegó al nivel de género.

Malassezia globosa se secuenció sólo en uno de los casos control, mientras que los géneros *Alternaria*, *Cryptococcus*, *Penicillium* y *Rhodotorula* sólo se identificaron en el grupo de los sujetos que padecían EPOC.

Dentro del género *Alternaria*, que resultó tener una prevalencia de colonización del 6% para los pacientes con EPOC, se identificaron las especies *A. pluriseptata*, *A. alternata* y *A. tenuissima*.

La presencia de los géneros *Penicillium* y *Cryptococcus* se identificó en dos pacientes cada uno. En el caso de *Penicillium*, se pudieron apreciar dos especies, *P. minioluteum* y *P. brevicompactum*. Sin embargo, en el caso de *Cryptococcus* únicamente se pudo concretar la especie *C. neoformans* en una de las muestras, mientras que en la otra sólo se llegó a identificar el género.

Las especies *Rhodotorula slooffiae* y *Rhodotorula mucilaginosa* se identificaron en uno y dos casos respectivamente, mostrando que el género *Rhodotorula* coloniza el tracto respiratorio de pacientes con EPOC en un 4,5% de los casos.

Del mismo modo, las especies *Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces geotrichum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Wallemia sebi* aparecían en dos pacientes cada una de ellas y no se apreciaron en el grupo control.

Además, se identificaron hongos que solo aparecían en una muestra de paciente cada uno. Éste fue el caso del género *Torulaspota*, en el que no se pudo concretar la especie; y las especies *Antrodia sinuosa*, *Aspergillus restrictus*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Dioszegia hungarica*, *Phialocephala trigonospora*, *Phlebiopsis peniophoroides*, *Pichia fermentans*, *Rhodospordium babjevae*, *Trametes versicolor* y *Zygosaccharomyces rouxii*.

Por último, en uno de los casos del grupo control y en dos de los pacientes se consiguió amplificar la región ITS pero la secuencia que se obtuvo no correspondía a ninguna especie fúngica que en la actualidad estuviese descrita en la base de datos de PubMed. En estos casos, se consideraron como hongos no identificables (HNI).

3.2 Colonización por hongos y grados de la EPOC.

En la Figura 6 se muestra la diversidad y la frecuencia de colonización de las especies y géneros fúngicos identificados en cada grupo de pacientes con EPOC.

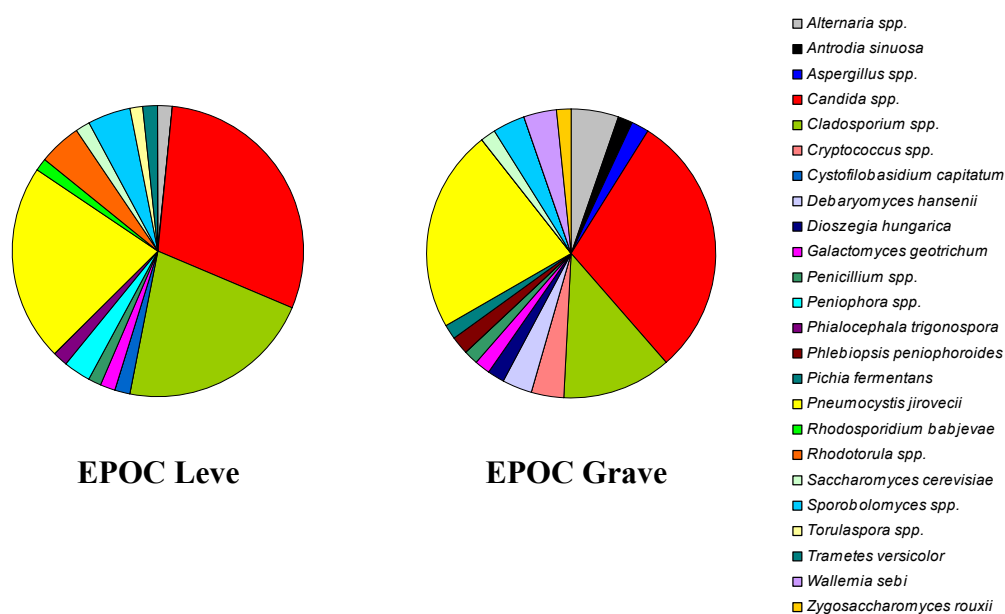


Figura 6. Descripción de géneros y especies fúngicas en los dos grupos de EPOC.

La frecuencia con la que cada hongo aparece en uno u otro grupo fueron analizadas con el test Chi-cuadrado de Pearson para valorar si había alguna relación entre la colonización por hongos y la gravedad de la EPOC. En este análisis se excluyeron a los sujetos control por no presentar la enfermedad. Se concluyó que no existían diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de la colonización

por los distintos hongos entre los dos grupos EPOC considerados. Estos datos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Colonización por hongos y gravedad de la EPOC

HONGO	EPOC LEVE (n=34). Núm. Colonizados (%)	EPOC GRAVE (n=33). Núm. Colonizados (%)	Chi-cuadrado de Pearson (p)
Género <i>Alternaria</i>	1 (2,9)	3 (9,1)	0,288
- <i>A. alternata</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>A. pluriseptata</i>	0 (0)	1 (3,0)	
- <i>A. tenuissima</i>	1 (2,9)	0 (0)	
<i>Antrodia sinuosa</i>	0 (0)	1 (3,0)	0,306
<i>Aspergillus restrictus</i>	0 (0)	1 (3,0)	0,306
Género <i>Candida</i>	19 (55,9)	17 (51,5)	0,720
- <i>C. albicans</i>	14 (41,2)	13 (39,4)	
- <i>C. galbrata</i>	3 (8,8)	2 (6,1)	
- <i>C. galli</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>C. intermedia</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>C. orthopsilosis</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>C. pararugosa</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>C. sake</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>C. tropicalis</i>	2 (5,9)	3 (9,1)	
Género <i>Cladosporium</i>	14 (41,2)	7 (21,2)	0,078
- <i>C. cladosporioides</i>	1 (2,9)	2 (6,1)	
- <i>C. herbarum</i>	0 (0)	1 (3,0)	
Género <i>Cryptococcus</i>	0 (0)	2 (6,1)	0,145
- <i>C. neoformans</i>	0 (0)	1 (3,0)	
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	1 (2,9)	0 (0)	0,321
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 (0)	2 (6,1)	0,145
<i>Dioszegia hungarica</i>	0 (0)	1 (3,0)	0,306
<i>Galactomyces geotrichum</i>	1 (2,9)	1 (3,0)	0,983
Género <i>Penicillium</i>	1 (2,9)	1 (3,0)	0,983
- <i>P. brevicompactum</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>P. minioluteum</i>	0 (0)	1 (3,0)	
Género <i>Peniophora</i>	2 (5,9)	0 (0)	0,157
- <i>P. lycii</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>P. rosea</i>	1 (2,9)	0 (0)	
<i>Phialocephala trigonospora</i>	1 (2,9)	0 (0)	0,321
<i>Phlebiopsis peniophoroides</i>	0 (0)	1 (3,0)	0,306
<i>Pichia fermentans</i>	0 (0)	1 (3,0)	0,306
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	14 (41,2)	13 (39,4)	0,882
<i>Rhodospordium babjevae</i>	1 (2,9)	0 (0)	0,321
Género <i>Rhodotorula</i>	3 (8,8)	0 (0)	0,081
- <i>R. mucilaginosa</i>	2 (5,9)	0 (0)	
- <i>R. slooffiae</i>	1 (2,9)	0 (0)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 (2,9)	1 (3,0)	0,983
Género <i>Sporobolomyces</i>	3 (8,8)	2 (6,1)	0,667
- <i>S. coprosmae</i>	1 (2,9)	0 (0)	
- <i>S. roseus</i>	3 (8,8)	2 (6,1)	
Género <i>Torulaspota</i>	1 (2,9)	0 (0)	0,321
<i>Trametes versicolor</i>	1 (2,9)	0 (0)	0,321
<i>Wallemia sebi</i>	0 (0)	2 (6,1)	0,145
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0 (0)	1 (3,0)	0,306
HNI	1 (2,9)	1 (3,0)	0,983

Se observa una elevada prevalencia del género *Candida* tanto en pacientes con EPOC leve (55,9%) como en EPOC grave (51,5%), siendo *C. albicans* la especie más frecuente. *C. galbrata* y *C. tropicalis* también fueron identificadas con una frecuencia similar en los diferentes estadios de la enfermedad (entre dos y tres casos cada una). Sin embargo, parece que en los pacientes con EPOC leve hay más variabilidad de especies, identificándose: *C. sake*, *C. orthopsilosis*, *C. pararugosa*, *C. intermedia* y *C. galli*. Estas especies sólo se amplificaron una vez cada una y sólo en los estadios más leves de la enfermedad.

En cuanto a la frecuencia de *P. jirovecii*, fue prácticamente similar en pacientes con EPOC leve y con EPOC grave, con prevalencias de colonización del 41,2 y 39,4%, respectivamente.

El género *Cladosporium* se identificó en los estadios más leves de la enfermedad, con una prevalencia de colonización del 41,2% frente al 21,2% observado en pacientes con EPOC grave. La especie *C. herbarum* sólo se identificó en un caso de EPOC grave, mientras que *C. cladosporioides* se identificó en los dos grupos. Aun así, en la mayoría de los casos no se pudo determinar la especie.

El género *Sporobolomyces* colonizaba el tracto respiratorio de tres pacientes con EPOC leve y dos con EPOC grave. En el primer grupo se identificaron las especies *S. roseus* y *S. coprosmae*, mientras que el segundo grupo sólo *S. roseus*. De igual forma, el género *Alternaria* se encontró en ambos grupos, sin embargo en la EPOC grave sólo se pudo determinar hasta nivel de especie un caso de *A. pluriseptata*, mientras que en EPOC leve se identificaron las especies *A. alternata* y *A. tenuissima*.

Las especies *Galactomyces geotrichum* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron cada una identificadas en un paciente de cada grupo. El género *Penicillium* también se secuenció en los dos grupos, con la diferencia de que la especie *P. brevicompactum* sólo se identificó en un paciente con EPOC leve y la especie *P. minioluteum* en un paciente con EPOC grave.

Finalmente, los géneros *Rhodotorula*, *Torulaspora* y *Peniophora* y las especies *Cystofilobasidium capitatum*, *Phialocephala trigonospora*, *Rhodosporidium babjevae* y *Trametes versicolor* se identificaron en las muestras que pertenecían a pacientes con

EPOC leve; mientras que el género *Cryptococcus* y las especies *Antrodia sinuosa*, *Aspergillus restrictus*, *Debaryomyces hansenii*, *Dioszegia hungarica*, *Phlebiopsis peniophoroides*, *Pichia fermentans*, *Wallemia sebi* y *Zygosaccharomyces rouxii* solo colonizaban pacientes con EPOC grave.

De las 67 muestras de esputo recogidas de los pacientes incluidos en el estudio, dos resultaron positivas para la colonización por hongos tras amplificar la región ITS por PCR y posterior secuenciación del fragmento amplificado, pero la identificación del microorganismo no se pudo llevar a cabo porque la secuencia se correspondía con secuencias fúngicas registradas en PubMed pero no aparecía ninguna taxonomía concreta. Una de estas muestras era de un paciente con estadio I de la GOLD y la otra pertenecía a un paciente con estadio III.

3.3. Estudio de la respuesta inflamatoria sistémica.

3.3.1. Comparación entre sujetos colonizados y no colonizados en el total de la población estudiada.

Se determinó la respuesta inflamatoria sistémica en el total de la población estudiada con el fin de comprobar si existía una relación entre la colonización por hongos en el tracto respiratorio de los sujetos en estudio y los niveles séricos de varias citoquinas. Las determinaciones se realizaron de manera individual y por duplicado en cada una de las muestras, tal como se indica en el apartado de Material y Método.

Para ello se usaron lotes de ELISA convencional para medir los niveles de MCP-1 (pg/ml) y un Array comercial de multicitoquinas (AUSHOM) basados en quimioluminiscencia con los que se midieron las concentraciones séricas en pg/ml de las citoquinas proinflamatorias: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12p70, TNF- α e IFN- γ ; la citoquina antiinflamatoria IL-10; y la citoquina IL-6, que tiene actividad proinflamatoria y antiinflamatoria.

Además, se midió la actividad sérica de la enzima quitotriosidasa, componente de la inmunidad innata utilizada en la defensa contra hongos. Esta proteína está considerada como un biomarcador de la estimulación de macrófagos, siendo principalmente producida en situaciones de activación crónica de éstos. Al igual que con las citoquinas, previamente descritas, se estudió estadísticamente la alteración de

los niveles de actividad de quitotriosidasa en función de situación de colonización y no colonización por los tres géneros fúngicos más frecuentes hallados en las muestras de esputo.

Se compararon los valores medios calculados para cada citoquina entre sujetos colonizados y no colonizados por los hongos cuya prevalencia era mayor al 30 % en alguno de los grupos, en concreto, los géneros *Candida*, *Pneumocystis* y *Cladosporium*. A continuación se aplicó la Prueba de Mann-Whitney a los datos medidos para estudiar si la presencia de estos hongos en el pulmón de estos individuos producía un cambio estadísticamente significativo en los niveles séricos de estas citoquinas y de la actividad de la quitotriosidasa y, por tanto, una alteración de la respuesta inflamatoria sistémica del huésped. Estos datos se muestran en las Tablas 14, 15 y 16.

Tabla 14. Comparación de los niveles séricos de citoquinas y de actividad de quitotriosidasa entre sujetos colonizados y no colonizados por el género *Candida*.

FUNCIÓN EN EL SISTEMA INMUNE	BIOMARCADOR	CONCENTRACIÓN (pg/ml para citoquinas y nmoles/ml/hora para quitotriosidasa)		PRUEBA DE MANN-WHITNEY (P)
		SUJETOS NO COLONIZADOS (N=29)	SUJETOS COLONIZADOS (N=31)	
Factor quimiotáctico	MCP-1	757,00 ± 77,22	952,48 ± 94,69	0,189
	IL-8	21,17 ± 8,50	15,67 ± 2,51	0,796
Proinflamatoria, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-6	24,79 ± 9,81	14,89 ± 2,50	0,579
	INF- γ	13,83 ± 4,78	4,46 ± 0,96	0,840
Proinflamatoria y respuesta inmune innata	IL-1 α	2,74 ± 1,20	3,24 ± 1,31	0,143
	IL-1 β	2,64 ± 1,09	1,17 ± 0,38	0,603
Inmunosupresora, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-10	3,53 ± 1,20	1,49 ± 0,22	0,127
Respuesta inmune innata y adaptativa	TNF- α	29,27 ± 9,99	21,65 ± 4,10	0,700
Respuesta inmune innata	IL-12p70	9,20 ± 5,05	4,75 ± 1,72	0,773
	Quitotriosidasa	81,59 ± 9,40	120,73 ± 15,53	0,021
Respuesta inmune adaptativa	IL-2	29,93 ± 18,83	7,80 ± 2,96	0,111

Los sujetos colonizados por el género *Candida* mostraron niveles séricos diferentes a los encontrados en sujetos no colonizados, pero en ningún caso estas diferencias resultaron significativas de manera estadística. Tampoco se apreciaron diferencias significativas en los niveles de MCP-1 entre individuos colonizados y no colonizados. Sin embargo, los niveles de actividad de quitotriosidasa, enzima que representa la actividad de los macrófagos, sí se vieron influenciados por la presencia del género *Candida*: los sujetos colonizados y no colonizados presentaban niveles séricos de quitotriosidasa de $120,73 \pm 15,53$ nmoles/ml/hora y $81,59 \pm 9,40$ nmoles/ml/hora respectivamente ($p = 0,021$). En la Figura 7 se representan estos datos.

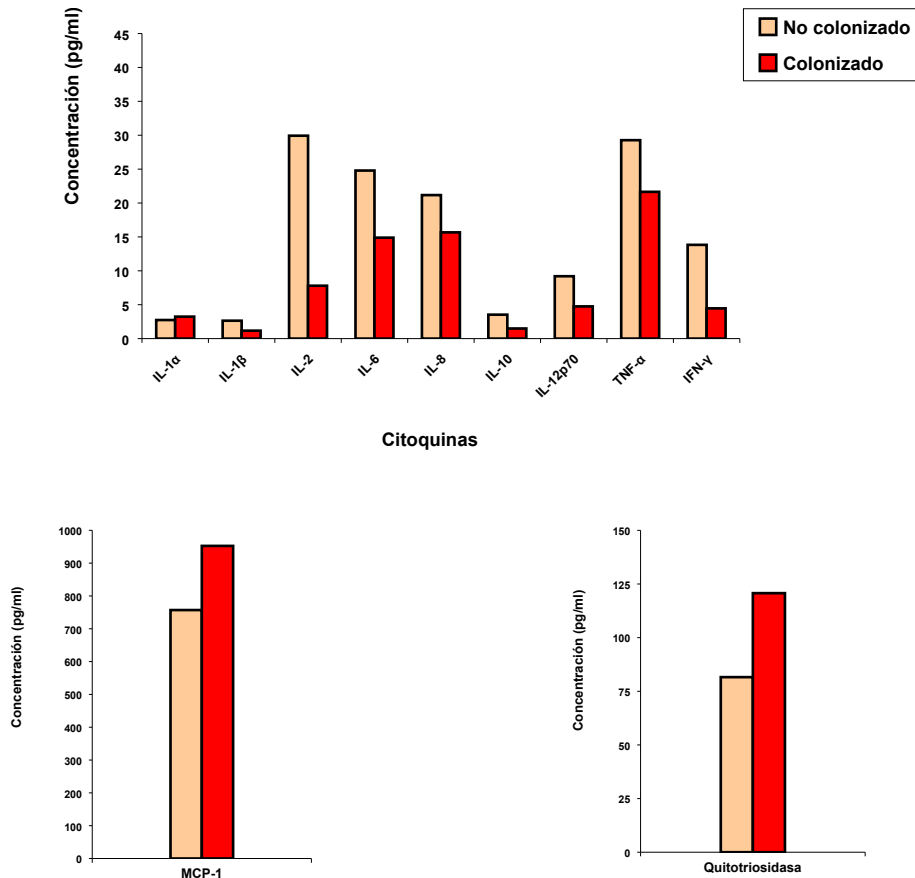


Figura 7. Representación gráfica de los niveles séricos de citoquinas, MCP-1 y actividad de quitotriosidasa en sujetos colonizados y no colonizados por el género *Candida*.

Por otro lado, tal y como se muestra en la Tabla 15, los sujetos colonizados por *P. jirovecii* presentaban niveles séricos de IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α y del factor atrayente de macrófagos MCP-1 significativamente elevados respecto a los sujetos no

colonizados. Sin embargo, no se apreciaron cambios en los niveles del resto de las citoquinas analizadas. Tampoco se observó una influencia estadísticamente significativa de este hongo sobre los niveles de actividad de quitotriosidasa en los pacientes colonizados. La Figura 8 representa gráficamente estos valores.

Tabla 15. Comparación de los niveles séricos de citoquinas y quitotriosidasa entre sujetos colonizados y no colonizados por *P.jirovecii*.

FUNCIÓN EN EL SISTEMA INMUNE	BIOMARCADOR	CONCENTRACIÓN (pg/ml para citoquinas y nmoles/ml/hora para quitotriosidasa)		PRUEBA DE MANN-WHITNEY (P)
		SUJETOS NO COLONIZADOS (N=37)	SUJETOS COLONIZADOS (N=23)	
Factor quimiotáctico	MCP-1	729,40 ± 67,33	1064,87 ± 109,96	0,015
	IL-8	16,15 ± 6,60	21,83 ± 3,52	<0,001
Proinflamatoria, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-6	12,05 ± 1,69	31,93 ± 12,25	0,041
	INF- γ	6,26 ± 1,88	13,38 ± 5,50	0,139
Proinflamatoria y respuesta inmune innata	IL-1 α	1,09 ± 0,32	6,08 ± 2,12	<0,001
	IL-1 β	1,45 ± 0,56	2,58 ± 1,18	0,258
Inmunosupresora, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-10	1,53 ± 0,21	4,00 ± 1,50	0,126
Respuesta inmune innata y adaptativa	TNF- α	14,45 ± 3,07	42,83 ± 12,06	0,040
Respuesta inmune innata	IL-12p70	3,15 ± 0,75	12,93 ± 6,54	0,802
	Quitotriosidasa	113,97 ± 14,41	82,26 ± 7,45	0,164
Respuesta inmune adaptativa	IL-2	6,78 ± 1,89	37,36 ± 23,75	0,209

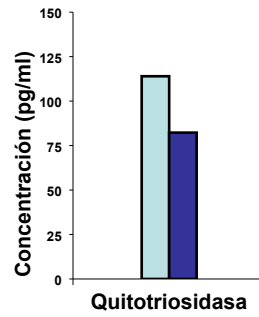
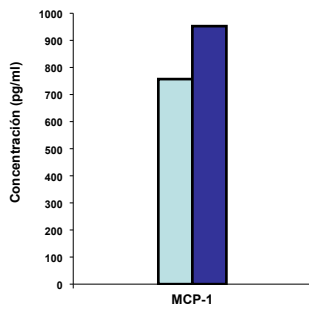
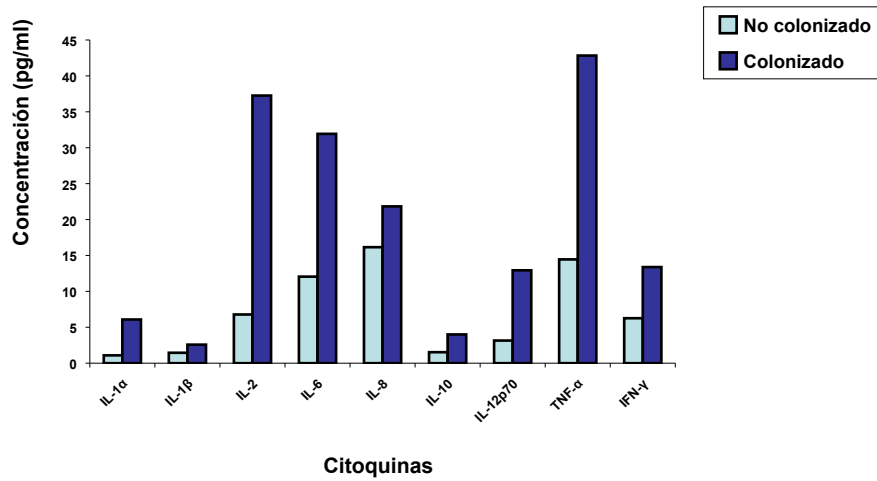


Figura 8. Representación gráfica de los niveles séricos de citoquinas, MCP-1 y actividad de quitotriosidasa en sujetos colonizados y no colonizados por *P. jirovecii*.

Tabla 16. Comparación de los niveles séricos de citoquinas y actividad de quitotriosidasa entre sujetos colonizados y no colonizados por el género *Cladosporium*.

FUNCIÓN EN EL SISTEMA INMUNE	BIOMARCADOR	CONCENTRACIÓN (pg/ml para citoquinas y nmoles/ml/hora para quitotriosidasa)		PRUEBA DE MANN- WHITNEY (P)
		SUJETOS NO COLONIZADOS (N=40)	SUJETOS COLONIZADOS (N=20)	
Factor quimiotáctico	MCP-1	870,75 ± 73,64	832,50 ± 117,80	0,818
	IL-8	15,11 ± 2,53	24,76 ± 11,87	0,900
Proinflamatoria, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-6	21,35 ± 7,13	16,31 ± 3,93	0,471
	INF- γ	10,81 ± 3,52	5,34 ± 1,64	0,893
Proinflamatoria y respuesta inmune innata	IL-1 α	3,89 ± 1,29	1,23 ± 0,46	0,147
	IL-1 β	2,09 ± 0,81	1,48 ± 0,57	0,879
Inmunosupresora, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-10	2,69 ± 0,89	2,04 ± 0,37	0,406
Respuesta inmune innata y adaptativa	TNF- α	29,70 ± 7,37	16,58 ± 5,27	0,242
Respuesta inmune innata	IL-12p70	8,66 ± 3,83	3,37 ± 1,17	0,944
	Quitotriosidasa	99,19 ± 9,73	107,05 ± 21,19	0,875
Respuesta inmune adaptativa	IL-2	23,10 ± 13,81	9,30 ± 2,93	0,335

Tal y como se observa en la Tabla 16, los niveles séricos de citoquinas no parecían verse alterados de manera estadísticamente significativa en los sujetos colonizados por el género *Cladosporium*. De igual modo, tampoco se apreciaron diferencias significativas en los niveles de actividad de la quitotriosidasa entre sujetos colonizados y no colonizados. Estos datos se representan en la Figura 9.

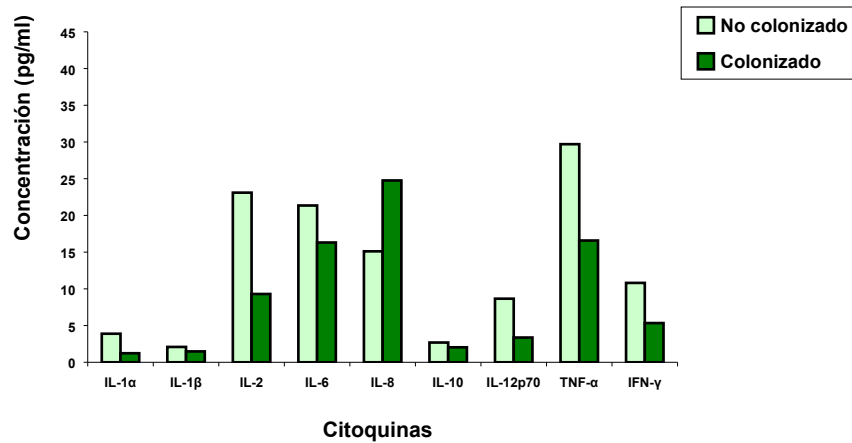


Figura 9. Representación gráfica de los niveles séricos de citoquinas, MCP-1 y actividad de quitotriosidasa en sujetos colonizados y no colonizados por el género *Cladosporium*.

3.3.2. Comparación entre pacientes colonizados y no colonizados en cada grupo EPOC.

Por otro lado, se realizó un análisis estadístico comparativo de los niveles séricos tanto de las citoquinas como de actividad de quitotriosidasa entre pacientes colonizados y no colonizados por *Candida*, *Pneumocystis* y *Cladosporium*. Para ello, se descartaron los casos control por no presentar la enfermedad y se incluyeron en el estudio los 33 pacientes con EPOC leve y los 32 pacientes con EPOC grave. Dentro de cada grupo, se compararon los valores medidos de cada marcador inflamatorio aplicando la Prueba de Mann-Whitney. Estos datos se muestran en las Tablas 17, 18 y 19.

Tabla 17. Comparación de los niveles séricos de citoquinas y actividad quitotriosidasa entre pacientes colonizados y no colonizados por el género *Candida* en los dos grupos de EPOC.

Función	Citoquina	EPOC Leve			EPOC Grave		
		No colonizado (n=14)	Colonizado (n=17)	Prueba de Mann-Whitney (P)	No colonizado (n=15)	Colonizado (n=15)	Prueba de Mann-Whitney (P)
Factor quimiotáctico	MCP-1 (pg/ml)	743,93 ± 116,85	942,00 ± 126,04	0,342	769,20 ± 105,85	979,13 ± 138,94	0,281
	IL-8 (pg/ml)	31,51 ± 17,35	14,13 ± 3,51	0,736	11,52 ± 1,94	19,30 ± 3,82	0,372
Proinflamatoria, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-6 (pg/ml)	31,66 ± 19,71	16,08 ± 4,17	0,843	18,37 ± 5,43	15,71 ± 3,15	0,494
	INF-γ (pg/ml)	8,29 ± 4,81	6,01 ± 1,44	0,231	19,00 ± 8,02	2,48 ± 0,98	0,147
Proinflamatoria y respuesta inmune innata	IL-1α (pg/ml)	2,42 ± 0,98	2,34 ± 0,73	0,485	3,05 ± 2,16	4,07 ± 2,62	0,212
	IL-1β (pg/ml)	1,26 ± 0,87	1,57 ± 0,64	0,558	3,94 ± 1,93	0,71 ± 0,26	0,176
Inmunosupresora, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-10 (pg/ml)	3,24 ± 1,51	1,58 ± 0,28	0,735	3,80 ± 1,90	1,38 ± 0,34	0,119
Respuesta inmune innata y adaptativa	TNF-α (pg/ml)	23,29 ± 11,10	28,23 ± 6,14	0,266	34,85 ± 16,57	12,83 ± 4,31	0,468
Respuesta inmune innata	IL-12p70 (pg/ml)	14,15 ± 9,97	3,70 ± 1,05	0,382	4,57 ± 3,06	5,62 ± 3,24	0,350
	Quitotriosidasa (nmoles/ml/hora)	71,97 ± 9,66	141,76 ± 26,37	0,014	97,57 ± 15,77	93,40 ± 9,60	0,520
Respuesta inmune adaptativa	IL-2 (pg/ml)	14,12 ± 6,19	6,80 ± 2,42	0,330	44,70 ± 36,14	8,42 ± 5,60	0,177

En la Tabla 17 se observa que en ningún caso el nivel de citoquinas séricas se modificaba de forma estadísticamente significativa por la presencia del género *Candida* en el pulmón de los pacientes, independientemente de la gravedad de su enfermedad. La Figura 10 ilustra estos resultados.

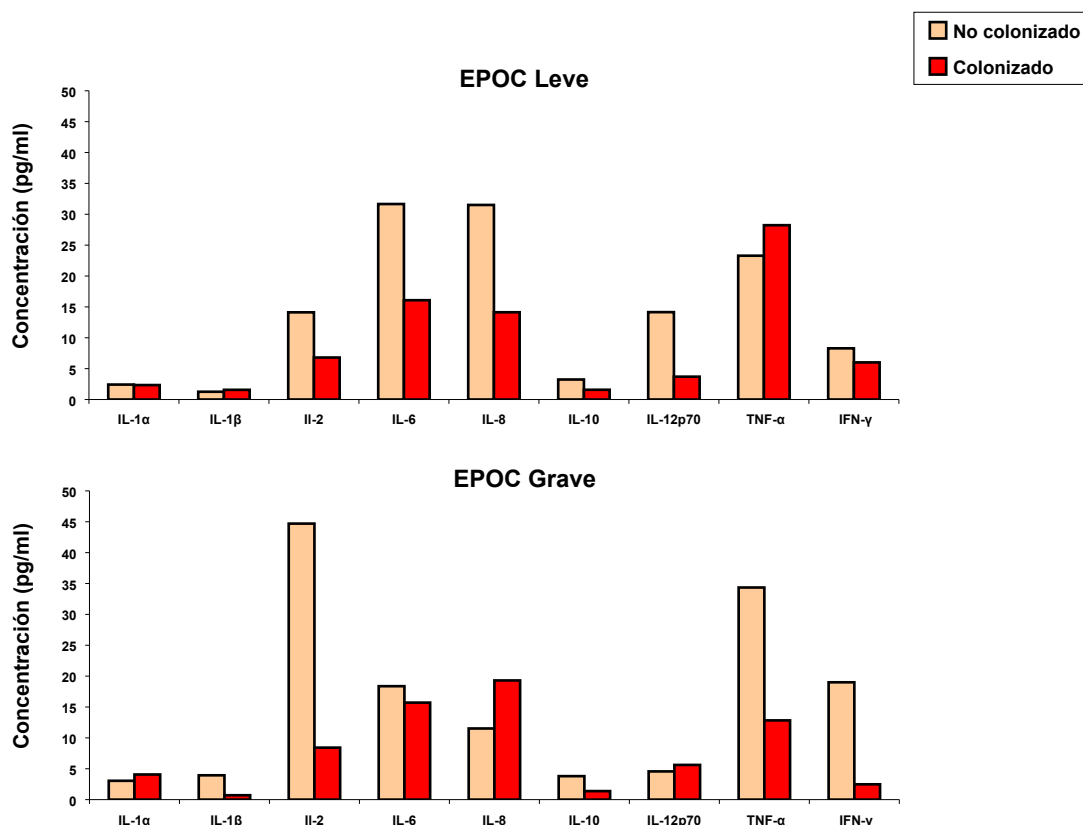


Figura 10. Representación gráfica de los niveles séricos de citoquinas en sujetos colonizados y no colonizados por el género *Candida* en los dos grupos de pacientes EPOC.

De igual modo, tampoco se aprecia una alteración de los niveles de MCP-1 en relación a la colonización por este género en los dos grupos de EPOC. Sin embargo, sí se aprecia una elevación de los niveles de la actividad de la enzima quitotriosidasa en los pacientes con EPOC leve colonizados por este hongo, si se compara con los pacientes que tienen la misma situación clínica pero no presentan dicha colonización ($141,76 \pm 26,37$ nmoles/ml/hora vs $71,97 \pm 9,66$ nmoles/ml/hora; $p=0,014$). Estos datos se ilustran en las Figuras 11 y 12.

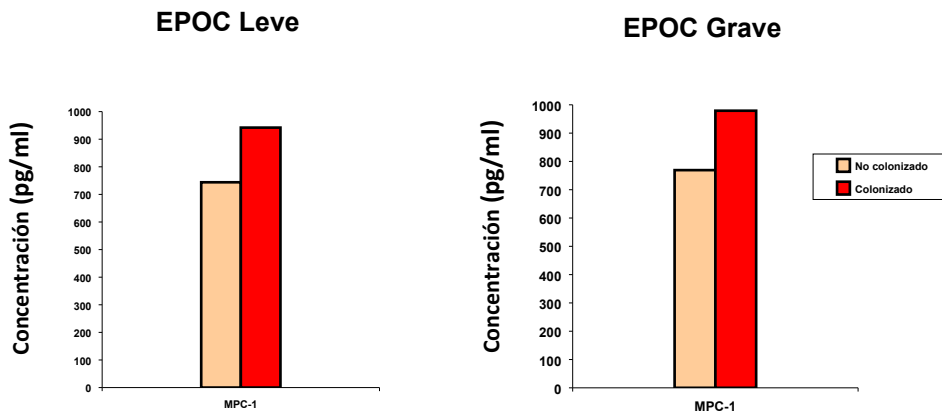


Figura 11. Representación gráfica de los niveles séricos de MCP-1 en pacientes colonizados y no colonizados por el género *Candida* en los dos grupos de pacientes con EPOC.

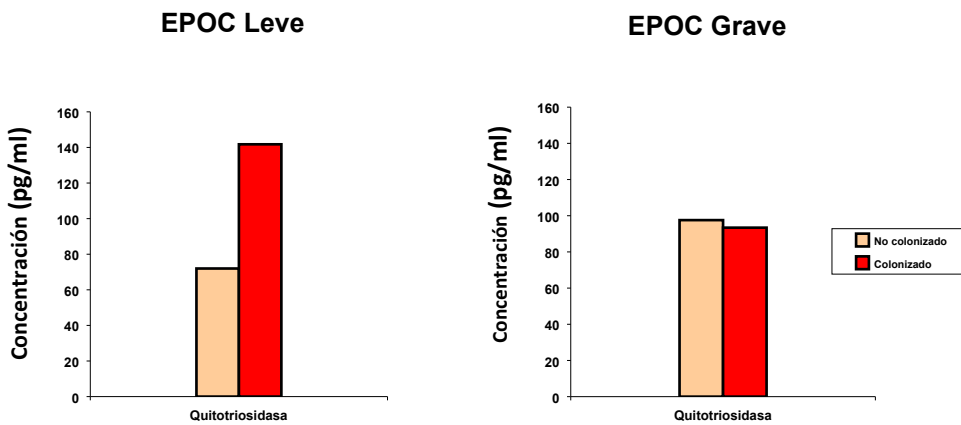


Figura 12. Representación gráfica de los niveles de actividad de quitotriosidasa en pacientes colonizados y no colonizados por el género *Candida* en los dos grupos de pacientes EPOC.

Tabla 18. Comparación de los niveles séricos de citoquinas y quitotriosidasa entre pacientes colonizados y no colonizados por *Pneumocystis jirovecii* en los dos grupos de EPOC.

Función	Citoquina	EPOC Leve			EPOC Grave		
		No colonizado (n=19)	Colonizado (n=12)	Prueba de Mann-Whitney (P)	No colonizado (n=18)	Colonizado (n=12)	Prueba de Mann-Whitney (P)
Factor quimiotáctico	MCP-1 (pg/ml)	637,89 ± 82,56	1192,42 ± 138,02	0,005	826,00 ± 105,11	946,42 ± 156,97	0,498
	IL-8 (pg/ml)	21,27 ± 12,75	23,11 ± 6,08	0,002	10,75 ± 2,20	22,40 ± 3,75	0,005
Proinflamatoria, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-6 (pg/ml)	10,34 ± 1,56	43,35 ± 22,77	0,096	13,86 ± 3,06	21,80 ± 6,16	0,150
	INF-γ (pg/ml)	4,96 ± 1,77	10,34 ± 5,17	0,087	7,63 ± 3,41	15,40 ± 9,44	0,715
Proinflamatoria y respuesta inmune innata	IL-1α (pg/ml)	1,51 ± 0,59	3,75 ± 1,11	0,018	0,64 ± 0,20	7,92 ± 3,94	0,015
	IL-1β (pg/ml)	0,98 ± 0,50	2,14 ± 1,09	0,231	1,95 ± 1,03	2,88 ± 2,03	0,605
Inmunosupresora, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-10 (pg/ml)	1,49 ± 0,27	3,65 ± 1,74	0,138	1,56 ± 0,32	4,13 ± 2,38	0,446
Respuesta inmune innata y adaptativa	TNF-α (pg/ml)	14,65 ± 3,27	43,96 ± 13,16	0,051	14,24 ± 5,39	38,24 ± 19,88	0,397
Respuesta inmune innata	IL-12p70 (pg/ml)	4,29 ± 1,40	14,95 ± 11,58	0,823	1,94 ± 0,27	9,84 ± 5,48	0,735
	Quitotriosidasa (nmoles/ml/hora)	127,99 ± 25,24	82,14 ± 8,79	0,372	99,17 ± 12,94	81,22 ± 11,71	0,330
Respuesta inmune adaptativa	IL-2 (pg/ml)	6,09 ± 2,93	16,45 ± 6,30	0,018	7,50 ± 2,41	55,15 ± 45,44	0,418

En el análisis comparativo de los niveles séricos de citoquinas entre pacientes colonizados y no colonizados por *P. jirovecii* para cada uno de los dos grupos, esquematizado en la Tabla 18, observamos que las concentraciones de las citoquinas IL-1 α e IL-8 se incrementaban a nivel sistémico y de manera estadísticamente significativa en los pacientes colonizados tanto en los casos más leves como en los estadios más graves de la enfermedad. La IL-2 sólo se alteraba de manera significativa, en los estadios más leves de la enfermedad.

En el caso del TNF- α , parece que hay una tendencia a la elevación de los niveles de esta citoquina en sangre en los pacientes con EPOC en estadio 1 y 2 que presentan colonización por dicho microorganismo, pero no llegó a ser una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,051$).

Las concentraciones sistémicas del resto de citoquinas no parecían verse afectadas por la presencia de *P. jirovecii* cuando se comparan sujetos colonizados con no colonizados dentro de un mismo grupo de EPOC.

Estos resultados se ilustran en la Figura 13.

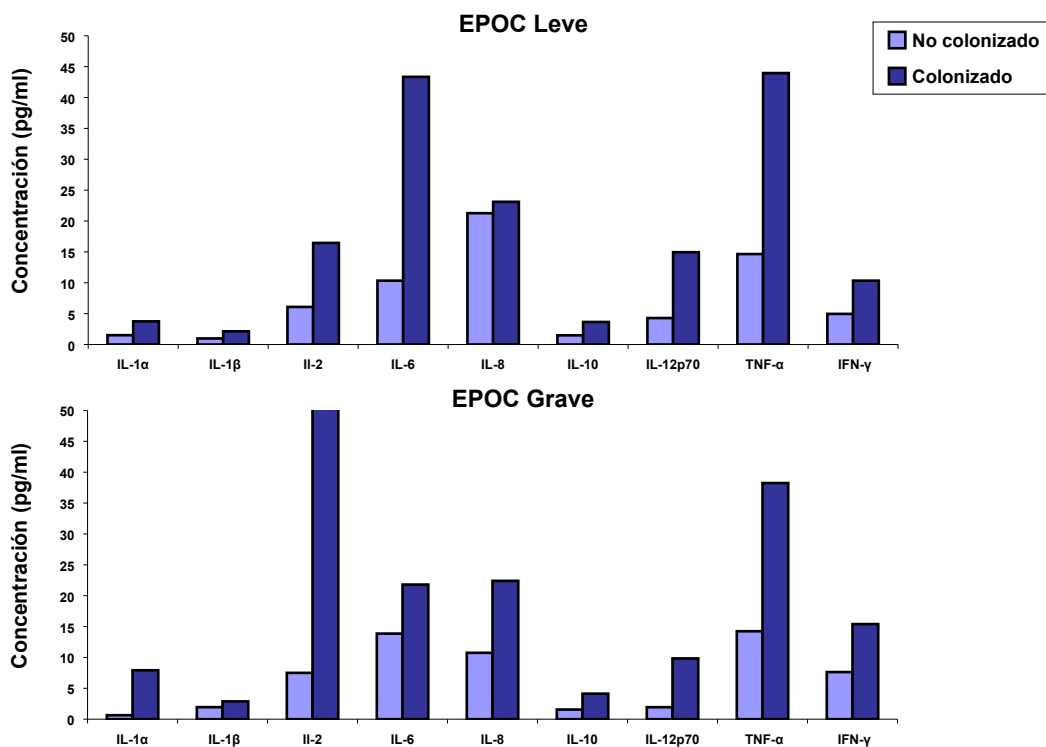


Figura 13. Representación gráfica de los niveles séricos de citoquinas en sujetos colonizados y no colonizados por *Pneumocystis jirovecii* en los dos grupos de pacientes EPOC.

Por otro lado, los niveles séricos de MCP-1 aumentaba de manera significativa por la presencia de *P. jirovecii* en los estadios más leves de la enfermedad.

Finalmente, la colonización por esta especie no parece alterar de manera estadísticamente significativa la actividad sérica de la enzima quitotriosidasa en los pacientes con EPOC.

Estos datos se ilustran en las Figuras 14 y 15.

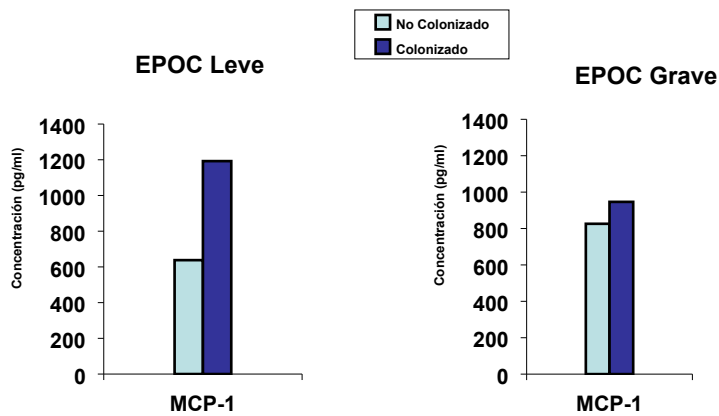


Figura 14. Representación gráfica de los niveles séricos de MCP-1 en pacientes colonizados y no colonizados por *Pneumocystis jirovecii* en los dos grupos de pacientes EPOC.

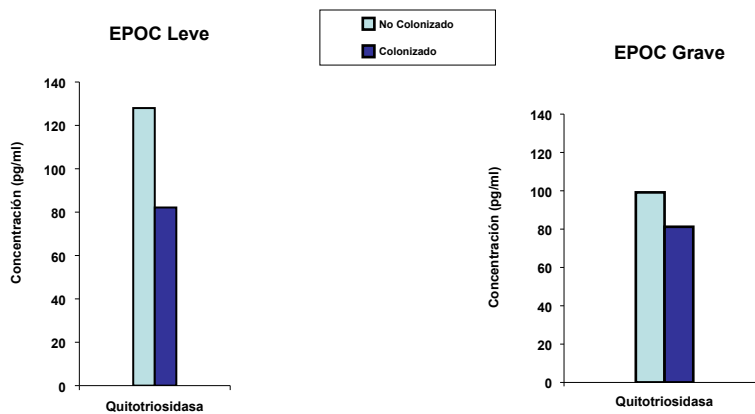


Figura 15. Representación gráfica de los niveles de actividad de quitotriosidasa en pacientes colonizados y no colonizados por *Pneumocystis jirovecii* en los dos grupos de pacientes EPOC.

Tabla 19. Comparación de los niveles séricos de citoquinas y quitotriosidasa entre sujetos colonizados y no colonizados por el género *Cladosporium* en los dos grupos de EPOC.

Función	Citoquina	EPOC Leve			EPOC Grave		
		No colonizado (n=18)	Colonizado (n=13)	Prueba de Mann-Whitney (P)	No colonizado (n=15)	Colonizado (n=15)	Prueba de Mann-Whitney (P)
Factor quimiotáctico	MCP-1 (pg/ml)	876,22 ± 115,43	819,77 ± 138,81	0,924	879,65 ± 94,02	856,14 ± 232,04	0,902
	IL-8 (pg/ml)	15,95 ± 4,91	30,33 ± 18,18	0,749	15,72 ± 2,61	14,40 ± 4,51	0,607
Proinflamatoria, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-6 (pg/ml)	26,56 ± 15,36	18,35 ± 5,44	0,904	18,41 ± 3,73	12,54 ± 5,14	0,111
	INF-γ (pg/ml)	7,64 ± 3,60	6,21 ± 2,30	0,702	12,87 ± 5,47	3,74 ± 1,99	0,486
Proinflamatoria y respuesta inmune innata	IL-1α (pg/ml)	3,12 ± 0,86	1,34 ± 0,68	0,073	4,33 ± 2,16	1,03 ± 0,44	0,941
	IL-1β (pg/ml)	1,15 ± 0,68	1,81 ± 0,82	0,271	2,77 ± 1,29	0,86 ± 0,53	0,396
Inmunosupresora, respuesta inmune innata y adaptativa	IL-10 (pg/ml)	2,59 ± 1,19	1,97 ± 0,38	0,388	2,71 ± 1,25	2,18 ± 0,85	0,980
Respuesta inmune innata y adaptativa	TNF-α (pg/ml)	32,86 ± 8,69	16,48 ± 7,03	0,065	25,99 ± 11,06	16,77 ± 8,25	0,941
Respuesta inmune innata	IL-12p70 (pg/ml)	11,33 ± 7,45	4,38 ± 1,75	0,378	6,20 ± 2,92	1,49 ± 0,25	0,351
	Quitotriosidasa (nmoles/ml/hora)	113,25 ± 19,25	106,07 ± 28,83	0,660	86,85 ± 7,45	108,87 ± 31,22	0,677
Respuesta inmune adaptativa	IL-2 (pg/ml)	8,61 ± 4,44	12,18 ± 4,28	0,130	33,44 ± 23,77	3,96 ± 1,57	0,899

El análisis comparativo entre pacientes colonizados y no colonizados por el género *Cladosporium* en cada grupo de EPOC no mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los marcadores inflamatorios estudiados, tal y como se observa en la Tabla 19.

Estos datos aparecen representados en las Figuras 16, 17 y 18.

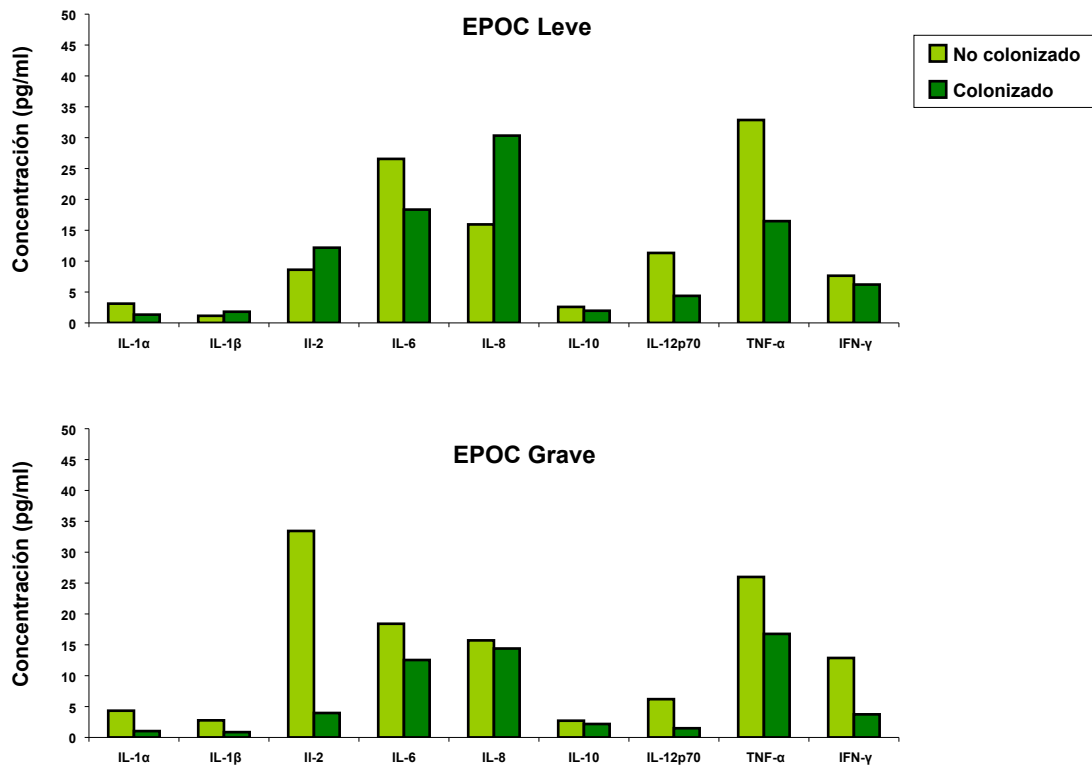


Figura 16. Representación gráfica de los niveles séricos de citoquinas en pacientes colonizados y no colonizados por el género *Cladosporium* en los dos grupos de pacientes EPOC.

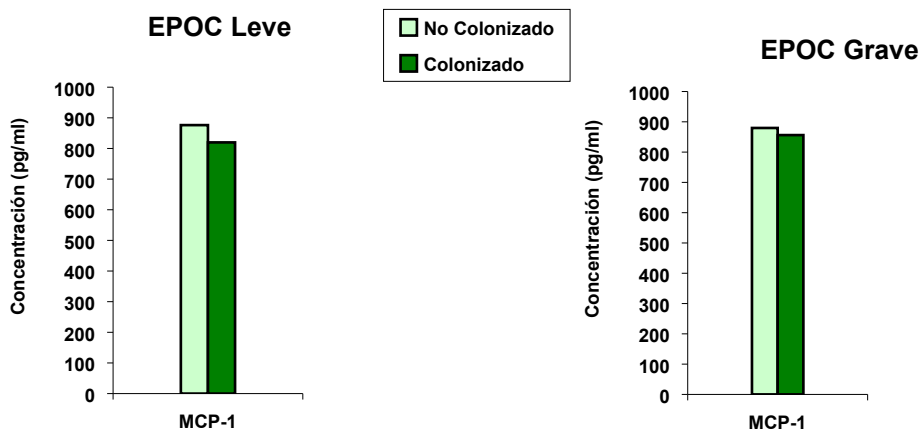


Figura 17. Representación gráfica de los niveles séricos de MCP-1 en pacientes colonizados y no colonizados por el género *Cladosporium* en los dos grupos de pacientes EPOC

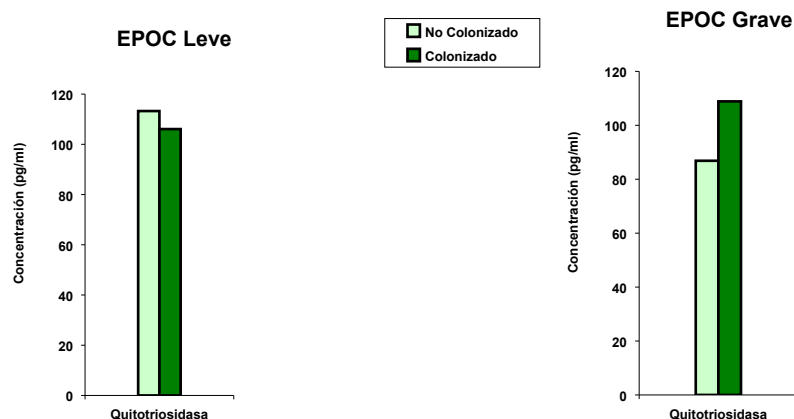


Figura 18. Representación gráfica de los niveles de actividad de quitotriosidasa en sujetos colonizados y no colonizados por el género *Cladosporium* en los dos grupos de pacientes EPOC.

4. Cuantificación de los niveles séricos de β -glucano en el total de la población estudiada.

Con el propósito de detectar y cuantificar los (1,3)- β -D-glucanos presentes en las muestras de suero de los sujetos en estudio, se utilizó el ensayo Fungitell. Este ensayo ha presentado una sensibilidad de entre el 70 y el 100% cuando se ha estudiado en diferentes grupos de pacientes con neumonía por *Pneumocystis* y, además, altos valores predictivos negativos, por lo que se consideró una técnica válida para realizar las mediciones de β -glucano en nuestro estudio (He *et al.*, 2015).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se consideraron resultados negativos aquellos valores de β -glucanos inferiores a 60 pg/ml y positivos aquellos valores que eran iguales o superiores a 80 pg/ml. Hay que tener en consideración que un resultado positivo significa que se ha detectado (1,3)- β -D-Glucano en la muestra, pero no define la presencia de enfermedad y debe ser usado en combinación con otros parámetros clínicos o biológicos para establecer un diagnóstico. Por otro lado, los resultados cuyos valores se encontraban en el intervalo de 60 a 79 pg/ml sugieren una posible infección fúngica pero se consideraron indeterminados.

Las muestras de suero de cada uno de los sujetos se usaron para llevar a cabo dicho ensayo. Cada una de ellas se estudió por duplicado y se repitió el ensayo para aquellas cuyos valores duplicados diferían con un CV mayor a 10 %. El resultado de cada individuo se obtuvo haciendo una media entre el valor obtenido para cada

duplicado de la misma muestra. De ellas, 58 presentaban valores de β -glucanos inferiores a 60 pg/ml, por lo que se consideraron negativas; 17 de ellas tenían valores superiores a 80 pg/ml y, por tanto, se clasificaron como positivas, y sólo una muestra se identificó como indeterminada por presentar un valor de 64,7 pg/ml.

Los valores de β -glucanos obtenidos se relacionaron con la presencia o ausencia de los tres géneros que presentaron mayor prevalencia en el total de la muestra estudiada, es decir, los géneros *Candida*, *Pneumocystis* y *Cladosporium*, utilizando para ello la Prueba de Mann-Whitney. En el análisis también se incluyó la especie *C.albicans* por presentar elevada prevalencia de colonización en la muestra y porque el test Fungitell es especialmente sensible a los β -glucanos producidos por esta especie en concreto.

La concentración media de β -glucanos medida en el suero de sujetos colonizados por *Candida* (n=40) fue de $54,93 \pm 12,23$ pg/ml, muy similar a la detectada en los individuos que no estaban colonizados (n=36) por este género ($50,59 \pm 12,63$ pg/ml). Además se realizó el mismo análisis para comparar los valores séricos de β -glucanos entre sujetos colonizados (n=31) y no colonizados (n=45) por la especie *C. albicans*, y aunque parece que en este caso la concentración de β -glucanos es mayor en los individuos colonizados que en los no colonizados ($62,69 \pm 15,30$ vs $46,11 \pm 10,35$ pg/ml), la diferencia sigue siendo no significativa estadísticamente ($p=0,875$).

El nivel medio de β -glucanos en el suero de los sujetos no colonizados por *P. jirovecii* (n=43) fue algo superior al medido en aquellas muestras que pertenecían a individuos colonizados (n=33) por este hongo ($57,24 \pm 11,56$ vs $47,19 \pm 13,47$ pg/ml), diferencia que tampoco resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,198$).

Por último, se compararon los valores séricos medios de este marcador en pacientes colonizados (n=24) y no colonizados (n=52) por el género *Cladosporium*, que eran $43,22 \pm 11,59$ y $57,33 \pm 11,61$ pg/ml, respectivamente. En este análisis tampoco se encontraron diferencias significativas entre los dos valores.

Todos estos datos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Comparación de los valores medios de β -glucanos medidos en suero de sujetos colonizados y no colonizados por los géneros *Candida*, *Pneumocystis* y *Cladosporium*.

HONGO	CONCENTRACIÓN DE B-GLUCANO EN SUJETOS NO COLONIZADOS (pg/ml)	CONCENTRACIÓN DE B-GLUCANO EN SUJETOS COLONIZADOS (pg/ml)	PRUEBA DE MANN-WHITNEY (p)
<i>Candida spp.</i>	50,59 \pm 12,63	54,93 \pm 12,23	0,966
<i>Candida albicans</i>	46,11 \pm 10,35	62,69 \pm 15,30	0,875
<i>P. jirovecii</i>	57,24 \pm 11,56	47,19 \pm 13,47	0,198
<i>Cladosporium spp.</i>	57,33 \pm 11,61	43,22 \pm 11,59	0,714

5. Estudio de la relación entre los niveles séricos de β -glucanos y la respuesta inflamatoria sistémica.

Las siguientes figuras muestran la correlación entre los niveles séricos de β -glucanos y algunas citoquinas en el total de la muestra. También se analiza la posible relación entre los β -glucanos y la actividad de quitotriosidasa.

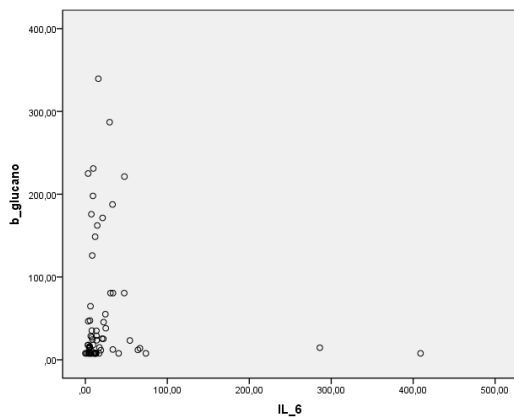


Figura 19. Distribución de los niveles de IL-6 en función de la concentración de β -glucanos.

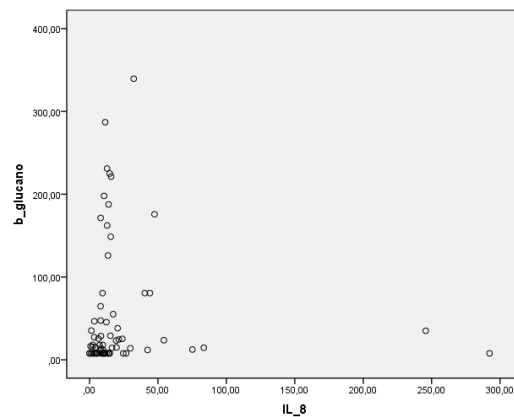


Figura 20. Distribución de los niveles de IL-8 en función de la concentración de β -glucanos.

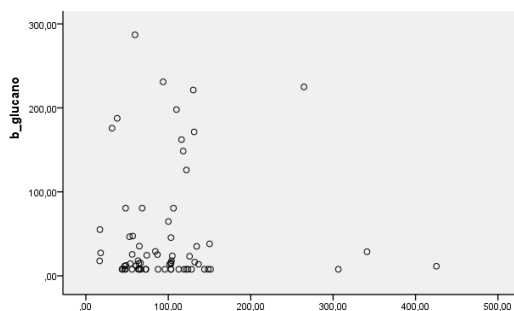


Figura 21. Distribución de la actividad de Quitotriosidasa en función de la concentración de β -glucanos.

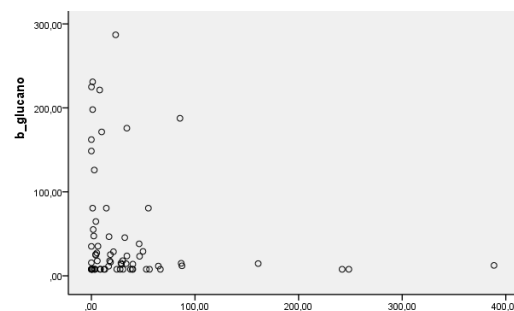


Figura 22. Distribución de los niveles de TNF-a en función de la concentración de β -glucanos.

Al observar esta correlación no lineal, se utilizó el análisis no paramétrico Rho de Spearman para conocer si unos niveles más altos de β -glucanos se asociaban a una elevación en los niveles de las citoquinas y de actividad de la quitotriosidasa medidos en el suero de estos pacientes. En dicho análisis no se apreció una relación estadísticamente significativa entre ninguna de las variables estudiadas excepto con la IL-8 ($p=0,031$). Parece que un aumento en los niveles de β -glucanos en sangre podría producir un incremento en los niveles de esta citoquina. Al observar la correlación entre estas dos variables (β -glucanos e IL-8) vemos que hay dos valores de IL-8 que están muy alejados del resto, ambos por encima de los 200 pg/ml. Puesto que estos dos valores podrían estar alterando la significación encontrada al aplicar el análisis Rho de Spearman, hicimos un segundo análisis dando como perdidos estos dos valores citados (véase Figura 23) y, de nuevo, la relación entre los niveles séricos de β -glucanos y la citoquina IL-8 resultaba significativa ($p=0,017$).

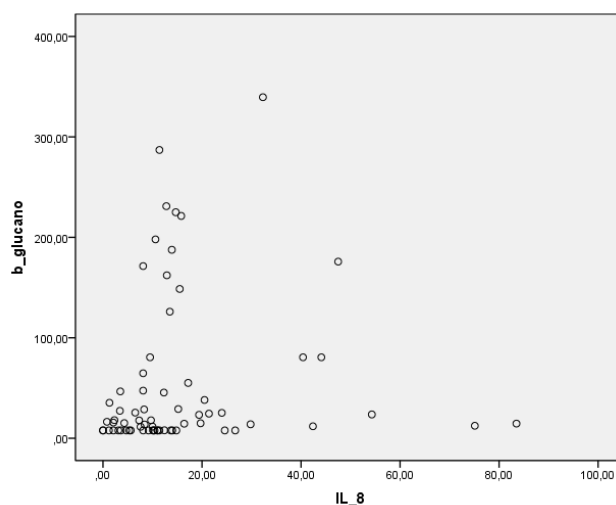


Figura 23. Correlación que existe entre niveles séricos de β -glucanos e IL-8 al considerar como perdidos los dos valores superiores a 200 pg/ml.

DISCUSIÓN

Las técnicas de identificación basadas en el cultivo, aunque ampliamente utilizadas, no permiten la detección de la mayoría de los hongos que forman parte del microbioma del ser humano (Cui *et al.*, 2013). El presente estudio resulta, pues, novedoso puesto que utiliza técnicas moleculares para caracterizar la microbiota fúngica presente en el tracto respiratorio de pacientes con EPOC. El análisis molecular de la presencia de la región espaciadora interna (ITS), conservada en la mayoría de los hongos, junto con el análisis molecular del *loci* mtLSU de *Pneumocystis jirovecii*, aporta información sobre la distribución de hongos en estos pacientes y en relación a los diferentes estadios de la enfermedad, mostrando que no existen diferencias significativas en cuanto a la colonización por diferentes especies fúngicas conforme progresa la enfermedad.

Asimismo, en este trabajo se ha evaluado el posible impacto que esta colonización pudiera tener sobre la respuesta inflamatoria sistémica de estos sujetos, sugiriendo que los géneros *Candida* y *Pneumocystis* son los únicos que alteran dicha respuesta en el huésped.

Por otra parte, el presente trabajo estudia el posible uso de los niveles séricos de β -glucanos como biomarcador de la colonización fúngica del tracto respiratorio, mostrando que no resulta útil para identificar la colonización fúngica en pacientes con EPOC.

Finalmente, en este estudio se analiza la posible relación entre los niveles sistémicos de β -glucanos y marcadores inflamatorios, concluyendo que, posiblemente, el polisacárido fúngico influya en la concentración sérica de la interleuquina 8.

1. Limitaciones.

El desarrollo del presente trabajo cuenta con una serie de limitaciones asociadas al tipo de muestras utilizadas, a las técnicas aplicadas y/o al tamaño muestral.

- Tipo de muestra.

El esputo se considera una muestra sucia y no es totalmente representativa de la microbiota del pulmón. En este sentido, se han publicado estudios que consideran que el LBA es más representativo de la mucosa bronquial que el esputo (Cabrera-Rubio *et al.*,

2014). Sin embargo, nuestro estudio no incluía pacientes intubados, por tanto no tuvimos acceso a muestras como el aspirado bronquial o el LBA. Al ser una muestra poco invasiva, el esputo es frecuentemente utilizado en estudios epidemiológicos que exploran la microbiota del pulmón de sujetos con distintas afecciones respiratorias (García-Núñez *et al.*, 2014; Willger *et al.*, 2014). Por tanto, y sabiendo que lo ideal sería utilizar muestras de LBA, asumimos la limitación y sabemos que los resultados podrían variar si se tuviera acceso a otro tipo de muestras.

En cuanto a la identificación de *P. jirovecii* en el presente trabajo, además del esputo se usaron muestras de LOF, que pueden ser fácilmente obtenidas de forma no invasiva. Si bien el LOF tampoco es una muestra tan representativa del tracto respiratorio como lo es el LBA, en los últimos años varios estudios han demostrado la utilidad del LOF como muestra respiratoria para estudiar el fenómeno de la colonización por *Pneumocystis* (Vargas *et al.* 2000; Medrano *et al.*, 2005; Respaldiza *et al.*, 2006; Wissmann *et al.*, 2011, Samuel *et al.*, 2011). En concreto, la PCR anidada del gen mtLSU rRNA de *Pneumocystis* en muestras de lavado orofaríngeo ha sido utilizado con éxito en estudios previos (Medrano *et al.*, 2005; Respaldiza *et al.*, 2006; Wissmann *et al.*, 2011), habiéndose demostrado que tiene una sensibilidad del 95,6% y una especificidad del 87,5% para el diagnóstico de la colonización por este hongo (Respaldiza *et al.*, 2006).

- Colonización transitoria o crónica.

Por otro lado, el presente trabajo se ha realizado a partir de muestras tomadas en un momento concreto y no se ha llevado a cabo un seguimiento de cada paciente adquiriendo muestras sucesivas para compararlas en el tiempo. Este hecho podría considerarse una limitación porque no es posible concluir con certeza que los hongos identificados estén presentes de forma permanente en el tracto respiratorio de estos pacientes. De hecho, puede que estos microorganismos sean eliminados del tracto respiratorio por el aclaramiento pulmonar a lo largo del tiempo y no constituyan una colonización verdadera.

- Técnica.

La detección de los hongos presentes en el tracto respiratorio de los sujetos incluidos en este trabajo se ha realizado a partir de ADN extraído de las muestras de esputo. Es posible que algunos de los microorganismos identificados por secuenciación y otros métodos moleculares pudieran no ser viables, es decir, la presencia del ADN de estos hongos no asegura que estuvieran vivos en el momento de la toma de la muestra. Sin embargo, la identificación del ADN sí nos permite hacer un estudio descriptivo de la población fúngica en las vías aéreas de estos pacientes, que era uno de los objetivos principales del presente trabajo.

Por otro lado, se nos plantea el inconveniente de que la PCR puede ocasionar falsos positivos, fundamentalmente por problemas de contaminación, lo que podría representar una limitación a la hora de interpretar los resultados de nuestro estudio. Con el fin de evitar la contaminación, se procuró eliminar la posible presencia de ADN procedente de determinaciones anteriores tomando varias medidas: 1) separando espacialmente la zona donde se extraía el ADN de las zonas donde se llevaban a cabo las fases de pre- y post-amplificación; 2) limpiando las superficies de trabajo antes y después de trabajar en ellas con soluciones específicas que destruyen el ADN; 3) usando puntas con filtros y controles negativos (agua estéril) en todos los ensayos. Además, de manera rutinaria se han realizado controles de calidad de los resultados obtenidos.

La PCR es una técnica estandarizada que ha sido ampliamente utilizada tanto en la determinación de infección como colonización. Se sabe que en la colonización por *Pneumocystis* la carga de microorganismo es muy inferior, del orden de 10^4 copias/ μ l menor a la hallada durante la infección (Damiani *et al*, 2013), por tanto es razonable pensar que al tratar con pacientes que no presentan una alta carga parasitaria, la sensibilidad del método no sea del 100% a la hora de detectar cantidades bajas de ADN. Sin embargo, Las técnicas de PCR para amplificación de fragmentos específicos del genoma de microorganismos están validadas, son ampliamente utilizadas para la realización de este tipo de estudios epidemiológicos y tiene la ventaja de que permite la identificación de microorganismos no cultivables (Calderón *et al*, 2010; Cui *et al.*, 2013).

Por otro lado, las técnicas de ELISA empleadas para la detección de interleuquinas inflamatorias, al igual que el ensayo Fungitell utilizado para cuantificar los β -glucanos, se han realizado mediante pruebas comerciales estandarizadas, siendo los límites de detección los especificados por los fabricantes como se muestra en el apartado de material y métodos. Además, la reproductibilidad de estas técnicas se confirmó mediante medidas repetidas de la misma muestra en días sucesivos, con repetición de los ensayos cuando los resultados no fueron coincidentes.

Otra posible limitación a considerar es que el tracto respiratorio de los pacientes con EPOC se encuentra habitualmente colonizado por varios microorganismos diferentes, haciendo difícil separar el papel relativo de cada especie en la respuesta inflamatoria total del huésped. Para obviar en la medida de lo posible este hecho hemos intentado estudiar por separado a los géneros más habituales, analizando la posible relación de cada uno de ellos con la respuesta inflamatoria sistémica del paciente.

- Tamaño muestral.

Finalmente, podría plantearse si el tamaño muestral es idóneo para generalizar los resultados obtenidos a toda la población con EPOC. En nuestro caso, para el análisis global de las observaciones y de las diferencias de prevalencia existentes entre los dos grupos de pacientes en estudio (pacientes con EPOC leve y pacientes con EPOC grave) el número de sujetos incluidos en cada uno de los grupos (34 y 33, respectivamente) podría considerarse suficiente para un estudio descriptivo. De hecho, este tamaño muestral es similar o incluso superior al utilizado en trabajos publicados en los que se describe el microbioma pulmonar en pacientes con enfermedades respiratorias (Cui *et al.*, 2015; Kramer *et al.*, 2015; Willger *et al.*, 2014; Delhaes *et al.*, 2014; Hauser *et al.*, 2014). Aún así, no podemos saber si el tamaño de nuestra muestra podría considerarse suficiente para extraer inferencias respecto al papel de cada microorganismo en la respuesta inflamatoria del huésped.

2. Descripción del microbioma identificado en la población estudiada.

El tracto respiratorio humano representa un importante portal de entrada para numerosos microorganismos, principalmente los que se transmiten en forma de partículas suspendidas en el aire como los hongos (Pashley *et al.*, 2012).

Las características del microorganismo en cuestión, junto con la respuesta inmune del huésped, determinarán si estos organismos serán aclarados o si se adherirán y colonizarán dicho tracto respiratorio. Se considera la colonización como la situación en la que un microorganismo se establece en un nuevo ambiente y no implica que éste ocasione ningún tipo de alteración fisiológica en el huésped. Tanto los microorganismos patógenos como los no patógenos pueden actuar como comensales, ya que la capacidad de éstos para producir enfermedades en el hombre depende de su potencial patogénico, del número de microorganismos, de la integridad del sistema inmune del huésped y, probablemente, también de otros factores que aún no han sido bien definidos (Denning *et al.*, 2014).

A pesar de los recientes esfuerzos para desarrollar métodos de alto rendimiento dirigidos a los genes del ARN ribosomal de los hongos para caracterizar la microbiota fúngica, recientemente resumidas por Cui *et al.* (2013), los datos publicados han explorado principalmente el bacterioma del pulmón. Por tanto, la presencia de hongos en el tracto respiratorio tanto de individuos sanos como de sujetos con afecciones respiratorias se conoce de forma muy limitada (Nguyen *et al.*, 2015). Sólo unos pocos estudios han abordado la diversidad de la comunidad fúngica respiratoria (Charlson *et al.*, 2012; Delhaes *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2013; van Woerden *et al.*, 2013; Willger *et al.*, 2014).

En el total de nuestra población se identificaron 25 géneros de hongos distintos, siendo la prevalencia de colonización por hongos elevada y prácticamente similar en el grupo control y en el grupo de pacientes con EPOC. Esta alta prevalencia concuerda con la encontrada por otros autores en muestras respiratorias de sujetos sanos (Charlson *et al.*, 2012) y en otras enfermedades respiratorias crónicas como la fibrosis quística (Willger *et al.*, 2014).

Hasta la fecha no se ha descrito el micobioma que coloniza las vías respiratorias de los sujetos con EPOC. Sin embargo, la alta prevalencia que se observa en nuestra muestra concuerda con las obtenidas por Delhaes y su equipo en el estudio sobre el micobioma pulmonar en sujetos adultos con Fibrosis Quística (FQ). En dicho estudio, el análisis de ocho muestras de esputo procedentes de cuatro pacientes por pirosecuenciación con el cebador ITS2 y por PCR anidada con cebadores específicos para *P. jirovecii* mostró un 100% de prevalencia de colonización por hongos (Delhaes *et*

al., 2012). Estos datos se corroboraron con un trabajo posterior realizado en 59 pacientes con FQ en los que se detectó la presencia de hongos en todos los pacientes incluidos en el estudio, aplicando las nuevas técnicas de secuenciación en muestras de esputo (Harrison *et al.*, 2013). Además, estos resultados ponen de manifiesto la alta sensibilidad de los métodos de amplificación y secuenciación –ómicos- frente a los cultivos tradicionales que, en este caso, solo evidenciaron la presencia de organismos fúngicos en el 25% de los pacientes. También en pacientes trasplantados de pulmón se identificó una prevalencia de colonización por hongos superior al 90% cuando se utilizaban muestras de LBA y del 100% cuando se usaban muestras de LOF (Charlson *et al.*, 2012).

En relación a los hongos que fueron identificados en los dos grupos en estudio (grupo control y pacientes con EPOC), no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de colonización por estos microorganismos en ambos grupos de sujetos. Sin embargo, se observa que en el grupo control hay menos representación de especies (sólo seis géneros distintos y un hongo sin identificar) que en el grupo de EPOC (24 géneros y dos especies sin identificar). El hecho de que estas diferencias no resulten significativas podría deberse a la diferencia del tamaño muestral (nueve sujetos control vs 67 pacientes) o quizás porque la cantidad de ADN de ciertas especies, aún estando presentes en la muestra de esputo, sea inferior al necesario para poder ser detectado por esta técnica y, de ser así, la frecuencia de colonización en uno u otro grupo podría ser diferente a la expresada en el presente trabajo. En la literatura no existen estudios publicados en los que se compare el microbioma pulmonar de sujetos con EPOC con el de la población sana, pero sí aparecen estudios comparativos con pacientes que sufren otras patologías respiratorias.

En 2013, van Woerden y su equipo publicaron un trabajo en el que, al igual que en nuestro estudio, las vías respiratorias de la población sana parecen estar frecuentemente colonizadas por hongos. El estudio de van Woerden compara el patrón de especies fúngicas aisladas de sujetos sanos y pacientes asmáticos que habitan en una misma zona londinense, concluyendo que existe una clara diferencia entre ambos. Sin embargo, en nuestro trabajo, si comparamos la frecuencia de colonización de las especies identificadas en el grupo control con la tasa de colonización de esas mismas especies en el grupo EPOC, no se observan diferencias significativas. Esto podría

deberse a que van Woerden no compara frecuencias de colonización individuales sino número de lecturas totales obtenidas por pirosecuenciación, de forma que la mayoría de los hongos identificados en su trabajo podrían pertenecer a un mismo individuo o a un número reducido de sujetos cuyas muestras tengan una elevada carga de microorganismos (van Woerden *et al.*, 2013).

2.1 Género *Candida*.

El género *Candida* fue el más frecuente en el grupo de nuestros pacientes y también aparece bien representado en el grupo control. Dentro de este género, la mayoría de los sujetos estaban colonizados por la especie *C.albicans*.

Candida se considera parte de la flora habitual del ser humano, ya que habita como comensal en diferentes superficies mucosas, entre ellas en la cavidad oral tanto de individuos sanos (Ghannoum *et al.*, 2010) como de pacientes con afecciones respiratorias como la EPOC (Przybylowska *et al.*, 2014). En pacientes con FQ se ha propuesto que estos hongos podrían migrar desde la mucosa bucal hacia las vías respiratorias inferiores y colonizarlas (Delhaes *et al.*, 2012); quizás este hecho pudiera darse también en pacientes con EPOC. De hecho, el 12,3% de los pacientes con EPOC presenta colonización del esófago por la especie *C.albicans* (Andersen *et al.*, 1992). Por lo general, en personas con un sistema inmunológico intacto, este género es inocuo, de manera que la neumonía debida a la infección por *Candida* es extremadamente infrecuente. Sin embargo, es una causa conocida de neumonía en pacientes inmunodeprimidos (Chen *et al.*, 2001); y también se ha descrito algún caso de Candidiasis Pulmonar en pacientes sanos (Dosedá *et al.*, 2007).

La presencia del género *Candida* y, en especial, de la especie *C. albicans* en pacientes con EPOC no supone una sorpresa puesto que ya era bien conocido como asiduo en distintas afecciones pulmonares, según hemos revisado en la literatura (Charlson *et al.*, 2012; Delhaes *et al.*, 2012; García-Fontgivell, 2006; Güngör *et al.*, 2013). En este sentido, nuestros datos concuerdan con un trabajo reciente que afirma que el 44,6% de los pacientes con FQ desarrollan una colonización crónica por *C. albicans* (Noni *et al.*, 2015).

En esta línea, el estudio realizado por Chotirmall y su grupo estimó que la colonización por *C. albicans* en FQ tenía una frecuencia del 49,4%, casi un 10% superior a la obtenida en nuestro trabajo (40,3%). Sin embargo, Chotirmall realizó un estudio prospectivo observacional durante 11 años de seguimiento a los pacientes y observó que sólo el 20,22% de ellos presentaban colonización crónica por este hongo y que el 29,21% referían una colonización intermitente (Chotirmall *et al.*, 2010), de manera que, de haberse evaluado la prevalencia en un momento concreto como hemos hecho en el presente trabajo, la tasa de colonización por *Candida* en el estudio de Chotirmall rondaría el 20-30%. Por tanto, podríamos suponer que la prevalencia de colonización por *C.albicans* es superior en nuestra muestra, probablemente debido a la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares de identificación utilizadas en nuestro trabajo frente al cultivo convencional, utilizado en el estudio de Chotirmall; o quizás porque utilizando métodos de cultivo sólo se contabilizan microorganismos viables, mientras que una de las limitaciones de nuestro estudio implica que sólo podemos identificar la presencia del ADN del hongo en cuestión pero no asegurar su viabilidad.

Más recientemente, el trabajo de GÜngör y su equipo identificó la especie *C. albicans* en el 62,5% de los pacientes con FQ. Hay que tener en cuenta que la FQ y la EPOC son enfermedades respiratorias distintas y la colonización por diferentes microorganismos parece ser más frecuente en FQ que en EPOC, lo que explicaría esta diferencia con la frecuencia de colonización encontrada en nuestros pacientes. Además, esta diferencia también podría deberse, en parte, al tipo de muestra utilizada: GÜngör y colaboradores usaron esputos y frotis de garganta para la identificación del hongo, de manera que parte de los microorganismos identificados podrían provenir de la cavidad oral, frecuentemente colonizada por *C. albicans* como hemos citado anteriormente. De hecho, de las 56 muestras que resultaron positivas para *C.albicans*, 16 eran de esputo y 40 eran de frotis (GÜngör *et al.*, 2013).

Finalmente, en el estudio realizado por Philippe Hauser, la frecuencia de colonización por el género *Candida* alcanza el 100% en pacientes con FQ, cuando se usan los cebadores ITS2 en la amplificación por PCR del ADN extraído de muestras de esputo. Esta publicación apoya nuestros resultados en cuanto a la presencia de este género en afecciones respiratorias, mientras que la diferencia que existe con la prevalencia de colonización por este género entre nuestro estudio y el suyo podría

deberse al hecho de que Hauser sólo incluyó a dos pacientes en su análisis (Hauser *et al.*, 2014).

En Tabla 21 se muestra un resumen con los datos más relevantes de estos estudios, incluyendo el tamaño muestral, el tipo de población en estudio, la técnica que se emplea para identificar el ADN del género *Candida* y las muestras sobre las que se aplican estas técnicas, así como el resultado obtenido sobre la colonización por este hongo.

Tabla 21. Resumen de los estudios que informan de la prevalencia de colonización por *Candida* en diferentes afecciones pulmonares.

Estudio	n	Población	Técnica/muestra	% colonización
Ghannoum <i>et al.</i> , 2010	20	Sujetos sanos	PS/EB	75
Charlson <i>et al.</i> , 2012	21	Trasplantados de pulmón	PS/LOF y LBA	>63
Delhaes <i>et al.</i> , 2012	4	FQ	PS/ES	100
Güngör <i>et al.</i> , 2013	48	FQ	Cultivo/ES y FG	>62,5
Przybylowska <i>et al.</i> , 2014	53	EPOC	Cultivo/FD	>46
Noni <i>et al.</i> , 2015	121	FQ	Cultivo/ES	49,4
Chotirmall <i>et al.</i> , 2010	89	FQ	Cultivo/ES	49,4
Hauser <i>et al.</i> , 2014	2	FQ	PCR/ES	100

Abreviaturas: EB, enjuague bucal; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ES, esputo; FD, frotis dental; FG, frotis de garganta; FQ, fibrosis quística; LBA, lavado broncoalveolar; LOF, lavado orofaríngeo; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; PS, pirosecuenciación.

Nuestros datos no mostraron diferencias en la frecuencia de colonización por *Candida* entre sujetos control y pacientes con EPOC y tampoco en relación a la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, llama la atención que la especie *C. albicans* sea la única que aparece en los sujetos control y que en los estadios más graves de la EPOC haya una menor diversidad de especies pertenecientes a este género que en la EPOC más leve. Como hemos citado previamente, en la mayoría de las publicaciones sobre colonización fúngica en pulmón de sujetos con afecciones respiratorias la especie *C. albicans* es la más frecuentemente identificada dentro de su género. El hecho de encontrar gran diversidad de especies de este género en los pacientes con EPOC leve estudiados también se ha observado en pacientes con FQ (Güngör *et al.*, 2013), de nuevo siendo *C. albicans* la especie más frecuente. Con estos datos y nuestros resultados, planteamos que probablemente esta especie esté mejor adaptada al huésped y

que compita con otras especies de *Candida* por los recursos del nicho ecológico, de ahí el hecho de encontrarla en los sujetos control como única especie del género. Cuando se instaura la EPOC en los pacientes, éstos empiezan a sufrir alteraciones fisiopatológicas en el pulmón, quizás favoreciendo la colonización por diferentes especies de *Candida* y, conforme progresa la enfermedad, las alteraciones fisiológicas e inmunológicas del huésped podrían favorecer el crecimiento de *C.albicans*, si realmente es la especie mejor adaptada, dando lugar a dos posibles consecuencias: 1) *C.albicans* aumenta su población y reduce o evita la colonización por otras especies; 2) las demás especies siguen estando presentes pero la elevada carga de ADN de *C.albicans* evita la identificación de otras especies minoritarias.

2.2. *Pneumocystis jirovecii*.

La identificación de *P. jirovecii* se realizó utilizando el locus mtLSU, muy utilizado en estudios epidemiológicos por tratarse de un gen multicopia, lo que facilita su amplificación cuando la cantidad de microorganismos presente en la muestra es muy baja (Wakefield, 1994). De hecho, en la mayoría de las publicaciones sobre colonización fúngica en el pulmón de sujetos con afecciones respiratorias no se aprecia esta especie porque suele tratarse de estudios que usan la amplificación de la región espaciadora interna (ITS) como método de identificación y *P. jirovecii* sólo tiene una copia del locus ITS2 en su genoma (Nahimana *et al.*, 2000). Tampoco se aprecia en estudios basados en el cultivo puesto que, hasta el momento, no se ha desarrollado ningún tipo de cultivo estandarizado que permita el crecimiento de esta especie (Chabé *et al.*, 2011).

Pneumocystis jirovecii tiene un considerable tropismo pulmonar en el ser humano. Se estima que alcanza una elevada prevalencia en sujetos inmunodeprimidos por ser un hongo oportunista pero que también coloniza población general sin causar sintomatología (Calderón *et al.*, 2004a; Medrano *et al.*, 2005). En este sentido, se han publicado diferentes datos sobre la presencia de *P. jirovecii* en población sana de nuestra área, comunicándose un 20% de colonización por Medrano en 2005 usando PCR anidada en muestras de LOF (Medrano *et al.*, 2005) y un 73% de exposición al microorganismo publicado por Respaldiza en 2004 usando Western blot en muestras

séricas de niños (Respaldiza *et al.*, 2004). Estos datos ponen de manifiesto que este hongo está muy extendido en nuestra región.

En un estudio realizado en Chile a partir de biopsias y autopsias de individuos fallecidos de forma accidental y/o violenta, es decir, sin existir una causa médica, se observa una prevalencia de colonización del 64,9% (Ponce *et al.*, 2010). Por tanto, la alta frecuencia de identificación de *Pneumocystis* en nuestro grupo control podría considerarse normal, aunque el número de sujetos era muy pequeño para poder establecer datos de prevalencia.

Es importante tener en cuenta que, aunque esta especie no produzca una patología en individuos sanos, éstos podrían actuar como reservorio del hongo y ser fuente de infección para otros individuos, por ejemplo, para sujetos con EPOC.

Por otro lado, se ha estudiado la prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en diferentes enfermedades respiratorias crónicas. Estos datos pueden variar de un estudio a otro, aún coincidiendo en la enfermedad de base, en función del tipo de muestra y la técnica utilizada para la identificación del hongo. Teniendo esto en cuenta, se han publicado prevalencias de entre el 1,3 hasta el 38,2% en pacientes con FQ (Gal *et al.*, 2010; Respaldiza *et al.*, 2005; Pederiva *et al.*, 2012); una prevalencia del 33,8% en enfermedad pulmonar intersticial (Vidal *et al.*, 2006); y hasta un 100% de prevalencia en sujetos con cáncer de pulmón microcítico (de la Horra *et al.*, 2004).

En el ámbito de la EPOC se ha incrementado el número de estudios epidemiológicos de colonización por este hongo en los últimos 20 años, desde que Calderón y su equipo identificaran esta especie, usando técnicas de tinción, en el 10% de los sujetos con bronquitis crónica (Calderón *et al.*, 1996). Desde este momento y con el uso de la PCR, se han descrito prevalencias de colonización que concuerdan con la encontrada en nuestro estudio para pacientes con EPOC: 40,5% (Probst *et al.*, 2000); 40,5% (Calderón *et al.*, 2004b); y 42.1% (Sivam *et al.*, 2011).

Un trabajo realizado recientemente en el Líbano (Khalife *et al.*, 2015) determina una prevalencia de colonización por *P. jirovecii* del 17,3% en los 23 pacientes que se incluyeron en el estudio. Estos sujetos no presentaban síntomas de infección respiratoria y tampoco habían seguido tratamiento anti-*Pneumocystis* en los

seis meses previos a la inclusión en el estudio. La identificación del ADN de este microorganismo se realizó a partir de muestras de LOF, esputo, LBA y aspirado nasal y traqueal mediante amplificación por PCR anidada del gen mtLSU.

No se puede descartar que esta prevalencia sea inferior a la nuestra debido a que en nuestro estudio pudiera haber falsos positivos que no se detectaron como tal porque no hubo posterior secuenciación del microorganismo, tal y como hicieron *S. Khalife et al.* en su trabajo, sin embargo esto parece poco probable puesto que en nuestro estudio sólo se consideraron positivas aquellas muestras que amplificaron la región de 256 pb en dos alícuotas diferentes o por distintos métodos en la misma alícuota. Es más probable que las diferencias se deban a variaciones geográficas en la prevalencia de *Pneumocystis* debidas a factores climáticos como ocurre con otros hongos (Varela *et al.*, 2004). En este sentido, se obtuvieron frecuencias del 16 % mediante PCR en esputo de pacientes EPOC de Amiens, Francia, (Nevez *et al.*, 2006) donde predomina un clima principalmente lluvioso y del 19,1% mediante PCR en biopsias pulmonares de fumadores con EPOC en San Francisco, EEUU (Morris *et al.*, 2004).

Un estudio previo realizado por nuestro grupo en 2007 concluyó que el 55% de los pacientes con EPOC presentaban colonización de las vías respiratorias por *Pneumocystis* (Calderón *et al.*, 2007). Al aplicar el test estadístico Chi-cuadrado para comparar los datos de este estudio con los obtenidos en el presente trabajo sobre la prevalencia de *P.jirovecii* en pacientes con EPOC se observó que no había diferencias significativas ($p=0,164$).

Por otro lado, se ha demostrado que, independientemente del hábito tabáquico, la prevalencia de colonización por *P. jirovecii* se correlaciona positivamente con el grado de obstrucción al flujo aéreo y, por tanto, con la gravedad de la EPOC (Morris *et al.*, 2004), siendo la prevalencia más elevada en los estadios avanzados de la enfermedad y sugiriendo que el ecosistema de las vías aéreas de pacientes con una obstrucción más grave representa un ambiente propicio para la colonización por este hongo. En nuestro estudio no se observan diferencias de prevalencia de colonización por esta especie entre los estadios más leves y más graves de la enfermedad. Estas diferencias pueden deberse a condiciones diferentes a la EPOC ya que en el estudio de Morris pudo existir un sesgo de selección y diagnóstico. Las muestras de los pacientes en estadio 4 procedían de tejido pulmonar porque todos los pacientes fueron

trasplantados, mientras que las muestras del resto de los pacientes eran de LBA. Otra diferencia es que todos los pacientes del estudio de Morris eran fumadores activos mientras que en nuestro trabajo hay un claro declive en el número de sujetos que fuman conforme progresa la enfermedad y se ha demostrado en modelos animales que la colonización por *Pneumocystis* junto a la exposición al humo del tabaco acelera el desarrollo de enfisema (Christensen *et al.*, 2008).

En definitiva, la prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en los pacientes con EPOC de nuestro entorno pone de manifiesto la importancia de contar en los centros clínicos con técnicas diagnósticas rápidas y fiables que identifiquen este hongo no cultivable, ya que los sujetos colonizados con afección pulmonar podrían estar en riesgo de desarrollar una neumonía por *Pneumocystis* (PcP) o servir como reservorio y fuente de infección para otros sujetos. Además, como explicaremos más adelante, *Pneumocystis* parece estimular la respuesta inflamatoria del huésped, lo que conllevaría un daño pulmonar añadido y probablemente influiría en la progresión de enfermedades pulmonares como la EPOC (Calderón *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2008).

En la Tabla 22 aparecen resumidos los datos más relevantes de estos estudios, como son el tamaño muestral, el tipo de población en estudio, la técnica utilizada para identificar la colonización por *P. jirovecii*, las muestras sobre las que se aplican estas técnicas y la frecuencia de colonización observada.

Tabla 22. Resumen de los estudios que informan de la prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en diferentes afecciones pulmonares.

Estudio	n	Población	Técnica/muestra	% colonización
Gal <i>et al.</i> , 2010	76	FQ	PCR-TR y N-PCR/ES	1,3
Respaldiza <i>et al.</i> , 2005	88	FQ	N-PCR/ES y LOF	21,5
Pederiva <i>et al.</i> , 2012	34	FQ	N-PCR/LBA	38,2
Vidal <i>et al.</i> , 2006	80	EPI	N-PCR/LBA	33,8
de la Horra <i>et al.</i> , 2004	10	CP	N-PCR/BP	100
Calderón <i>et al.</i> , 1996	50	EPOC	Tinción e IF/ES	10
Probst <i>et al.</i> , 2000	37	EPOC	N-PCR/LBA, ES y AB	40,5
Calderón <i>et al.</i> , 2004	37	BC	N-PCR/ES	40,5
Sivam <i>et al.</i> , 2011	19	EPOC	N-PCR/BP	42,1
Khalife <i>et al.</i> , 2015	23	EPOC	N-PCR/ LOF, ES, LBA, AN y AT	17,3
Morris <i>et al.</i> , 2004	30	EPOC (Estadio 4)	N-PCR/BP	36,7
	68	Fumadores EPOC		19,1
Nevez G, 2006	50	EPOC	N-PCR/ES	16
Calderón <i>et al.</i> , 2007	51	EPOC	N-PCR/ES	55

Abreviaturas: AB, aspirado bronquial; AN, aspirado nasal; AT, aspirado traqueal; BC, bronquitis crónica; BP, biopsia de pulmón; CP, cáncer de pulmón; EPI, enfermedad pulmonar intersticial; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ES, esputo; FQ, fibrosis quística; IF, inmunofluorescencia; LBA, lavado broncoalveolar; LOF, lavado orofaríngeo; N-PCR, Nested PCR; PCR-TR, PCR a Tiempo Real.

2.3. Otros hongos patógenos.

En los pacientes de nuestro estudio también se identificaron secuencias de los géneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cryptococcus* y *Malassezia*. A pesar de ser menos frecuentes, su presencia debe tenerse en cuenta ya que estos microorganismos pueden ser patógenos.

Dentro del género *Aspergillus*, en nuestra población en estudio sólo pudo identificarse un caso portador de *Aspergillus restrictus* en un paciente con EPOC grave. La única publicación en la que se relaciona a esta especie con alguna afección respiratoria lo identifica como posible agente causal de asma en adultos (Itabashi *et al.*, 2007). Dentro del género *Aspergillus*, la especie que más frecuentemente ha sido identificada en muestras respiratorias de sujetos con enfermedades pulmonares es *A. fumigatus* (Bakare *et al.*, 2003; Laroumagne *et al.*, 2012). Es de extrañar que no la hayamos identificado en nuestros pacientes. No creemos que la ausencia de esta especie

en nuestro estudio se deba a un déficit de la técnica en cuanto a la región que hemos utilizado como diana de amplificación puesto que esta misma región se ha empleado en estudios previos con éxito (Delhaes *et al.*, 2012).

Chotirmall explica en su revisión que la mutación en el gen CFTR que sufren los pacientes con FQ afecta a las interacciones entre las células epiteliales y los microorganismos, tales como *A. fumigatus*, porque con la función de barrera del epitelio pulmonar alterada y la acumulación de moco el aclaramiento del patógeno no es efectivo, favoreciendo la presencia prolongada del hongo en el pulmón y la germinación del mismo (Chotirmall *et al.*, 2014). Puede que estos factores que predisponen el pulmón de los pacientes con FQ a la colonización por *A. fumigatus* no se den en los pacientes con EPOC y por eso no se haya identificado esta especie en nuestra muestra. Sin embargo, se estima que este género causa Aspergillosis Pulmonar Invasiva en el 22,1% de los pacientes con EPOC y que, en el 83% de los casos, la especie responsable es *A. fumigatus* (Guinea *et al.*, 2009). Es posible que la ausencia de esta especie en nuestra muestra se deba a que los pacientes del presente trabajo se encontraban en situación clínica estable.

En un trabajo en el que se usaron cultivos específicos para la identificación de hongos filamentosos a partir de muestras respiratorias de sujetos con EPOC se observó la presencia del género *Aspergillus* en el 42 % de los pacientes (siendo *A. fumigatus* la especie más común). Esta alta prevalencia se relacionó con el uso de corticoesteroides, puesto que los pacientes con cultivo positivo para *A. fumigatus* usaban mayores dosis. Sin embargo, en este estudio los resultados no fueron reproducibles cuando se utilizó la misma técnica en la identificación de *A. fumigatus* en los meses posteriores (Bafadhel *et al.*, 2014).

El género *Cryptococcus* se identificó en dos pacientes con EPOC grave: en un caso sólo se identificó el género y en el otro caso se concretó la especie *C. neoformans*. Este hongo suele colonizar el pulmón de un huésped inmunocompetente de manera asintomática y sin inducir patología, aunque sí puede ocasionar graves infecciones como meningitis en sujetos inmunodeprimidos. En la literatura aparece algún caso de cryptococcosis pulmonar en sujetos inmunocompetentes (Aberg *et al.*, 1999; Barbosa *et al.*, 2006), pero son situaciones muy infrecuentes. En nuestro trabajo, el hecho de que *Cryptococcus* haya sido identificado sólo en los estadios más graves de la EPOC podría

estar en relación con un mayor deterioro fisiológico y anatómico del pulmón del huésped; o quizás se deba al tamaño muestral, ya que se estima que *Cryptococcus* tiene una baja prevalencia de colonización en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (Delhaes *et al.* 2012).

Por otro lado, en nuestro estudio se identificó el género *Alternaria* en cuatro pacientes. Este género contiene varias especies que causan infecciones oportunistas en el ser humano. Se ha demostrado que los pacientes con EPOC son susceptibles a desarrollar alergias y micosis broncopulmonares causadas por especies de este género (Agarwal *et al.*, 2015). En este sentido, sería interesante aumentar el tamaño muestral de nuestro trabajo para investigar la posible influencia del género *Alternaria* en la progresión de la EPOC.

Finalmente, *Malassezia globosa* se secuenció solo en uno de los casos control. Este hongo reside habitualmente en la piel tanto de humanos como de animales y es responsable de enfermedades cutáneas como la pitiriasis versicolor (Zeinali *et al.*, 2014) y la dermatitis seborreica (Gaitanis *et al.*, 2012). A pesar de que *Malassezia* puede modificar la respuesta inmune a nivel local promoviendo la liberación de citoquinas proinflamatorias en las células epidérmicas, la mayoría de los casos publicados en los que este género fuera responsable de infecciones sistémicas eran sujetos con una acusada inmunodepresión y que recibían nutrición parenteral con suplemento lipídico (que estimula el crecimiento de este hongo) a través de un catéter central (Gaitanis *et al.*, 2012; Shparago *et al.*, 1995). Esta especie no puede cultivarse a menos que se usen medios con características especiales, quizás por ello su presencia en patología pulmonar aún no ha sido bien caracterizada hasta la fecha. Sin embargo, se ha detectado su presencia en algunos estudios donde se describía el microbioma del pulmón de sujetos con FQ (Delhaes *et al.*, 2012; Mounier *et al.*, 2014). En nuestro estudio esta especie no ha sido identificada en los pacientes con EPOC y solo en uno de los controles, no pudiéndose descartar que procediera de una contaminación cutánea.

2.4. Hongos ambientales.

En nuestra población en estudio también se identificaron otros hongos que suelen encontrarse en el medioambiente pero que no han sido descritos como patógenos para el ser humano. Tal es el caso de los géneros: *Cladosporium*, *Debaryomyces*,

Galactomyces, *Penicillium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, etc. Estos hongos se han identificado como champiñones, hongos de humedades de las casas, o asociados a agua, suelo y plantas. También algunos de ellos se usan habitualmente en la industria alimentaria. Las secuencias de estos microorganismos están presentes en baja abundancia en nuestra muestra, lo cual apoya la hipótesis de que son hongos pasajeros de la microbiota del pulmón en la EPOC. La mayoría de ellos también han sido identificados con una baja prevalencia en otras afecciones respiratorias como FQ, asma y en sujetos con trasplante de pulmón (Göngür *et al.*, 2013; Bakare *et al.*, 2003; Charlson *et al.*, 2012; Delhaes *et al.*, 2012; van Woerden *et al.*, 2013).

3. Relación entre la colonización por hongos y la respuesta inflamatoria sistémica del huésped.

Cada vez hay más pruebas que sugieren una relación patogénica de los hongos en las enfermedades respiratorias crónicas (Reponen *et al.*, 2012; Hulin *et al.*, 2013). Se ha establecido que el desarrollo del sistema inmune del huésped depende de su relación simbiótica con el microbioma y, por tanto, que el micobioma podría actuar como un cofactor en la respuesta inflamatoria pulmonar (Marsland *et al.*, 2014).

De hecho, existe una evidencia creciente de que el micobioma del pulmón tiene un impacto importante sobre la evolución clínica de enfermedades respiratorias crónicas como el asma, las bronquiectasias, la FQ o la EPOC (Nguyen *et al.*, 2015). Por tanto, resulta esencial profundizar en el estudio del micobioma respiratorio, con el fin de mejorar el manejo del paciente.

Las alteraciones inflamatorias podrían constituir uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes en el desarrollo y progresión de las enfermedades pulmonares crónicas como la EPOC (Wouters *et al.*, 2005). De hecho, la EPOC se caracteriza por un intenso proceso inflamatorio crónico de las vías aéreas, el parénquima y los vasos pulmonares. Además, se ha observado un aumento de la concentración sistémica de marcadores inflamatorios, entre ellos IL-6 e IL-8, en sujetos con EPOC (Su *et al.*, 2016). No se conoce con exactitud cómo los pacientes con EPOC desarrollan una inflamación sistémica, pero se barajan varias hipótesis. Es posible que el proceso inflamatorio local se extienda hacia la circulación periférica induciendo una reacción inflamatoria generalizada en el paciente, o que sean factores genéticos y/o

constitutivos de los sujetos con EPOC los que predispongan a estos pacientes a sufrir tanto una inflamación local como sistémica, o incluso que la EPOC cause primero una inflamación sistémica que conllevaría al deterioro de las vías aéreas (Gan *et al.*, 2004).

Aunque se cree que el humo del tabaco es el desencadenante de la cascada inflamatoria en la EPOC, se sabe que hay fumadores con distinto grado de inflamación y exfumadores que tienen una inflamación persistente, incluso después de cesar en su hábito. Estos hallazgos sugieren que existen otros factores que incrementan o mantienen el proceso inflamatorio crónico una vez se ha establecido (Barnes *et. al.*, 2000) y, en este sentido, se ha propuesto que la colonización microbiana del tracto respiratorio de sujetos con EPOC sea, en parte, responsable de que se perpetúen la inflamación y la destrucción pulmonar. Esta hipótesis se basa en los datos experimentales que apuntan a la colonización bacteriana en sujetos con EPOC como posible responsable de la elevación de los niveles de IL-8 y TNF- α en esputo y en LBA de estos pacientes y de un mayor grado de obstrucción de las vías respiratorias (Patel *et. al.*, 2002; Patel *et. al.*, 2004). De igual forma, las infecciones víricas también han sido relacionadas con una progresión más acelerada de la enfermedad a través de la inflamación pulmonar (Rhode *et. al.*, 2003).

En este sentido, en el presente estudio se observa un aumento de las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- α a nivel sistémico en los pacientes con EPOC colonizados por *Pneumocystis jirovecii*. Sin embargo, no se aprecian dichas alteraciones en los marcadores de la inflamación medidos en relación a la colonización por otros hongos frecuentes en nuestra muestra como *Candida* y *Cladosporium*. Estos resultados sugieren que la presencia de *P. jirovecii* en el tracto respiratorio de sujetos con EPOC podría condicionar cambios en el sistema inmunitario del huésped caracterizados por una activación de la respuesta inflamatoria. Esta misma hipótesis fue ya sugerida en 2007 a partir de un estudio piloto realizado por nuestro grupo en el que también se evidenció una elevación de IL-6, IL-8 y TNF- α en sangre periférica de pacientes con EPOC colonizados por *Pneumocystis* (Calderón *et. al.*, 2007). Además de promover la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos, se ha propuesto que estos mediadores inflamatorios podrían destruir el parénquima pulmonar, por lo que el principal tratamiento de la EPOC se basa en la supresión de la inflamación para prevenir estas complicaciones (Emami Ardestani *et al.*, 2015).

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina multifuncional que juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria, de manera que participa en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes y también enfermedades caracterizadas por una inflamación crónica. Se ha propuesto que IL-6 podría contribuir a la progresión de la inflamación suprimiendo la función reguladora de la células T, dando lugar a la acumulación de productos de la matriz, anticuerpos y proteasas en el tejido diana que conllevarían a la destrucción tisular (Emami Ardestani *et al.*, 2015).

Por otro lado, la elevación de los niveles plasmáticos de IL-6 se ha relacionado con un menor rendimiento físico, una disminución de FEV1 y FEV1/FVC y un aumento en la mortalidad en pacientes con EPOC (Ferrari *et al.*, 2013; Emami Ardestani *et al.*, 2015).

Se ha detectado un incremento en los niveles plasmáticos de IL-6 producido por el tabaco, incluso se ha propuesto a esta citoquina como indicador predictivo del desarrollo de EPOC en fumadores (Emami Ardestani *et al.*, 2015); y también se ha documentado una elevación de los niveles locales de IL-6 en el tracto respiratorio de pacientes con EPOC colonizados por bacterias (Wang *et al.*, 2015), sugiriendo que los microorganismos podrían incrementar la respuesta inflamatoria que habitualmente tiene lugar en las vías respiratorias de pacientes con esta enfermedad.

Estas evidencias apoyan los datos obtenidos en el presente trabajo, sugiriendo que la colonización por *Pneumocystis* en sujetos con EPOC favorece el desarrollo de una respuesta inflamatoria sistémica más intensa que la experimentada en los pacientes no colonizados y, por tanto, posiblemente esté contribuyendo a una progresión más rápida de la patología y del deterioro pulmonar.

En nuestro estudio también se compararon los valores de la citoquinas entre pacientes colonizados y no colonizados por *Pneumocystis* separando a los pacientes según el estadio de la EPOC y, aunque se observaban niveles mayores de IL6 en los pacientes colonizados tanto con EPOC leve como grave, estos valores no alcanzaban significación estadística, probablemente por un problema de tamaño de la muestra, puesto que al agrupar los pacientes según la gravedad de su enfermedad, disminuimos el número de sujetos y perdemos potencia estadística. Por otro lado, Emami Ardestani y su

grupo afirman que los niveles de IL-6 se ven aumentados proporcionalmente conforme aumenta la gravedad de la enfermedad pulmonar (Emami Ardestani *et al.*, 2015). De ser así, este hecho podría estar condicionando los resultados que hemos obtenido al comparar los niveles de IL-6 entre colonizados y no colonizados en el total de la muestra con EPOC.

En nuestro trabajo también se observó una elevación significativa de los niveles de IL-8, un potente factor quimiotáctico de neutrófilos con acción principalmente proinflamatoria, en los sujetos colonizados por *P. jirovecii*. Esta interleuquina es secretada por células del sistema inmunitario, entre ellas monocitos y neutrófilos, y por células somáticas como las células epiteliales, en respuesta a estímulos como citoquinas proinflamatorias, microorganismos y sus productos y situaciones adversas como la hipoxia. Por su potente acción sobre neutrófilos, la IL-8 se considera fundamental en la inflamación aguda mediada por dichas células. Además se cree que posee acción quimiotáctica sobre otras células como linfocitos, monocitos, células endoteliales y fibroblastos, sugiriendo que actúa en diferentes condiciones patológicas y en procesos que conllevan una inflamación crónica (Mukaida *et al.*, 2003).

Se ha observado un aumento en los niveles locales de IL-8 inducido por la colonización microbiana (Vos *et al.*, 2007). En este sentido, parece que la IL-8 podría promover el reclutamiento de neutrófilos al lugar de la infección al mismo tiempo que favorecer la erradicación de microorganismos como *Mycobacterium fortuitum* (Nibbering *et al.*, 1993) y *Candida albicans* por parte de los neutrófilos (Djeu *et al.*, 1990), sugiriendo que IL-8 juega un papel fundamental en la regulación local de la infección.

En nuestro estudio no se aprecia un cambio significativo de los niveles de IL-8 a nivel sistémico en respuesta al género *Candida*, quizás porque en la colonización la carga de este microorganismo no fue lo suficientemente alta como para desencadenar una respuesta inflamatoria a este nivel. Tampoco se apreció este efecto en relación a la colonización por el género *Cladosporium*. Quizás podría haberse apreciado una influencia de estos hongos sobre la respuesta inflamatoria a nivel local, pero este análisis no formaba parte de los objetivos planteados en el presente estudio. No obstante, para futuros trabajos podría ser interesante medir los valores de IL-8 en muestras respiratorias de pacientes con EPOC colonizados.

Los niveles séricos de IL-8 sí parecían verse incrementados por la presencia de *Pneumocystis* en las vías respiratorias de los pacientes con EPOC estudiados, sugiriendo que este hongo podría alterar la respuesta inflamatoria sistémica del huésped. Puesto que se conoce que en la EPOC existe una acumulación anómala de células del sistema inmune, entre ellas neutrófilos (Martin *et al.*, 1985) en las vías respiratorias de los pacientes, los datos de nuestro estudio sugieren que *P. jirovecii*, al inducir un aumento en la producción de IL-8, podría elevar aún más la cantidad de neutrófilos que acuden a las vías respiratorias facilitando los mecanismos que desencadenan la obstrucción al flujo aéreo y la progresión de la enfermedad. Además, los neutrófilos, junto con los macrófagos, están implicados en el daño tisular en la EPOC por la producción de proteasas que actúan en el parénquima pulmonar degradando el tejido conectivo y dando lugar al enfisema (Sethi *et. al.*, 2012).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es otra de las citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria del hombre. Además juega un papel importante en la patogénesis de la EPOC. El TNF- α se encuentra elevado a nivel del tracto respiratorio de pacientes con esta patología, relacionándose inversamente con FEV1 (Hacievliyagil *et al.*, 2006), y a nivel sistémico, donde se ha relacionado con un acelerado deterioro de la función pulmonar y un mayor riesgo de hospitalización para el paciente (Gan *et. al.*, 2004). Por tanto, parece clara la asociación entre progresión de la EPOC e inflamación.

Los datos obtenidos en nuestro estudio mostraron una elevación de los niveles sistémicos de TNF- α en los pacientes con EPOC colonizados por *Pneumocystis* y parece que esta influencia es más fuerte en los estadios más leves de la enfermedad, en los que este incremento es muy cercano a la significación estadística. Estos datos sugieren, de nuevo, que *P. jirovecii* está ocasionando un aumento de la respuesta inflamatoria a nivel sistémico.

En el presente trabajo también se observa que la presencia de *Pneumocystis* estimula una elevación de los niveles plasmáticos de las interleuquinas 1 α (IL-1 α) y 2 (IL-2), ésta última incrementada sólo en los estadios más leves de la enfermedad. Previamente se conocía la capacidad *in vitro* del antígeno mayor de superficie (MSG) de *Pneumocystis* de producir la liberación de estas citoquinas en células esplénicas (Theus 1993) y se ha observado un aumento local de IL-1 α , pero no de IL-2, en modelos animales que desarrollaron una respuesta inflamatoria exagerada inducida por

la presencia de MSG de *Pneumocystis* (Thullen *et al.*, 2004), pero es la primera vez que se observa un aumento sistémico de estas citoquinas asociado a la presencia de *Pneumocystis* en el tracto respiratorio en humanos. IL-1 α se localiza principalmente en el citosol de la mayoría de las células de individuos sanos y se libera en situación de necrosis para promover una respuesta inflamatoria y la infiltración de neutrófilos hacia el tejido dañado (Rider *et al.*, 2013). También se ha propuesto que la inflamación mediada por IL-1 α contribuye al daño en el tejido pulmonar (Dinarello *et al.*, 2013). Estos datos sugieren nuevamente que *Pneumocystis* está favoreciendo una acusada movilización de neutrófilos hacia el tracto respiratorio de los sujetos que coloniza.

La citoquina quimioatrayante MCP-1 (del inglés monocyte chemoattractant protein-1), segregada por los macrófagos, regula la migración e infiltración de monocitos en respuesta a la presencia de productos fúngicos (Ajuebor *et al.*, 1998). Por otro lado, parece que MCP-1 podría influir sobre la inmunidad adaptativa promoviendo la diferenciación de los linfocitos T a linfocitos tipo Th2 como se ha observado *in vitro* (Karpus *et al.*, 1997) y en ratones deficientes en MCP-1 que son incapaces de generar esta respuesta adaptativa Th2 (Gu *et al.*, 2000). Por tanto, parece que MCP-1 podría tener un papel tanto en la respuesta inmune innata como en la adquirida en el ser humano.

Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado la capacidad del MSG de *Pneumocystis* de inducir la producción de IL-8 y MCP-1 por parte de las células epiteliales alveolares humanas (Coleman *et. al.*, 1984; Benfield *et. al.*, 1999).

Teniendo estas evidencias en cuenta, se podría sugerir que si *Pneumocystis* está provocando un aumento en los niveles de MCP-1 en los pacientes que coloniza, esté incrementando la respuesta inmunológica del huésped favoreciendo, por un lado, la migración de monocitos a las vías respiratorias y la acumulación de macrófagos, hecho que contribuye al aumento de la respuesta inflamatoria que lleva a la obstrucción de estas vías al flujo aéreo; y por otro lado, la activación de una respuesta Th2, con el consiguiente aumento de la respuesta adaptativa en el lugar de la colonización. En este sentido, se ha postulado la posible relación de *Pneumocystis* con la progresión de la enfermedad en un estudio previo realizado en nuestro área (Varela *et. al.*, 2003) en el que se observó un mayor recuento de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica de

pacientes con EPOC colonizados por *Pneumocystis*, en comparación con los controles no colonizados.

Además, el aumento significativo de los niveles de MCP-1 que se observa en nuestro estudio sugiere que el macrófago podría ser el desencadenante de la respuesta inflamatoria del hospedador. Esta interacción de *Pneumocystis* con el macrófago, es importante porque hay una fuerte evidencia de que el deterioro pulmonar y la mortalidad en la PcP están más estrechamente asociados con la inflamación pulmonar que con la carga del microorganismo (Limper et. al., 1989; Wright et. al., 2005). Así pues, la colonización por *Pneumocystis* podría inducir un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica en sujetos con EPOC, posiblemente promoviendo la producción de la proteína MCP-1. Este incremento en la actividad del macrófago podría favorecer la liberación de mediadores inflamatorios como la IL-6, IL-8 y TNF- α , también elevados de manera significativa a nivel sistémico en nuestros sujetos con EPOC colonizados. Además, aunque en nuestro estudio no se realizó el recuento de linfocitos T en estos pacientes, según los datos de las publicaciones anteriormente citadas se podría plantear la hipótesis de que el aumento de los niveles de MCP-1 estimulado por la colonización por *Pneumocystis* podría favorecer también una respuesta adaptativa tipo Th2 en nuestros sujetos con EPOC.

Finalmente, no se aprecia una influencia significativa de la presencia de *Candida*, *Cladosporium* y *Pneumocystis* sobre los niveles de los demás marcadores de la inflamación medidos en este estudio (INF- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70). Parece pues, que cada especie se caracteriza por inducir un patrón de citoquinas diferente en el huésped, igual que se ha demostrado en otros trabajos en los que incluso diferentes cepas de la misma especie de microorganismo conllevan a una elevación de citoquinas distinta en el huésped (Sahaza et al., 2015).

La quitotriosidasa es un enzima que degrada la quitina, un polímero que es componente de la pared celular de los hongos, por lo que se ha propuesto que pueda desempeñar un papel en los mecanismos de defensa innata del huésped frente a infecciones fúngicas. Se expresa en células del sistema inmune del huésped como neutrófilos, macrófagos pulmonares y en células epiteliales del pulmón, entre otros.

Los macrófagos y neutrófilos liberan quitotriosidasa tras la estimulación de los

TLR, aunque también por estimulación de citoquinas como IFN- γ y TNF- α . Sin embargo, no parece que se produzca esta estimulación en los monocitos circulantes, sugiriendo que se necesita que el macrófago tisular sea lo suficientemente maduro para iniciar una respuesta inmune innata mediada por quitotriosidasa. Parece que la expresión de esta enzima se ve alterada en varias enfermedades inflamatorias no infecciosas como la EPOC, pero el mecanismo de actuación de esta enzima en estas enfermedades no está aún determinado. De hecho, se ha sugerido que la acción de esta enzima sobre la inflamación y la obstrucción al flujo aéreo depende de la situación clínica del individuo (Cho *et al.*, 2015). En el caso de fumadores con EPOC, parece que esta enzima es más elevada en LBA y su expresión en los macrófagos está aumentada, en comparación con fumadores sin EPOC. Además en este estudio la elevación de los niveles de esta enzima se correlacionaba con mayor obstrucción de las vías aéreas y con el enfisema (Létuvé *et al.*, 2010).

Por otro lado se ha propuesto que la quitotriosidasa contribuye en la reparación tisular asociada a un daño producido por una respuesta adaptativa Th2, aunque se cree que en un daño menos intenso ocasionado por la exposición a partículas irritantes podría promover una reparación eficaz del tejido dañado. En nuestro estudio, se ha observado un aumento significativo de los niveles sistémicos de quitotriosidasa asociado a la presencia del género *Candida* en el tracto respiratorio de los sujetos en estudio. En este sentido, podríamos sugerir que *Candida* está influyendo en los procesos de remodelación pulmonar y alterando la respuesta inmune del huésped al promover una elevación de los niveles de esta enzima por parte de las células del sistema inmune del huésped. Sin embargo, el efecto específico que esta enzima tiene en la patogénesis de la EPOC aún no se ha establecido (Cho *et al.*, 2015).

En definitiva, la respuesta inflamatoria sistémica se caracteriza por la movilización y activación de células inflamatorias en la circulación y el incremento de mediadores inflamatorios circulantes. Los resultados de nuestro estudio sugieren que *P. jirovecii* favorece una respuesta inflamatoria mediada en parte por neutrófilos y en parte por macrófagos. En este sentido, *Pneumocystis* produciría una mayor migración y activación de neutrófilos promoviendo la elevación de los niveles de IL-6, IL-8 y TNF- α . Por otro lado, fomentaría la inflamación mediada por macrófagos al inducir un incremento en la producción de MCP-1.

La presencia del género *Candida*, sin embargo, parece estar en relación con la actividad sérica de la enzima quitotriosidasa, sugiriendo que fomenta en el huésped el desarrollo de una respuesta inflamatoria mediada principalmente por macrófagos. De esta forma, la colonización de las vías respiratorias por ambos microorganismos podría jugar un papel causal o potenciador de la progresión de enfermedades pulmonares. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios que delimiten el verdadero papel de la colonización en esta patología y que determinen el mecanismo exacto de su efecto en el pulmón. Adicionalmente, sería necesario evaluar si el tratamiento anti-fúngico puede atenuar el proceso inflamatorio en estos pacientes colonizados, lo que permitiría tratar un posible factor de progresión de esta patología.

4. Relación entre la colonización por hongos y la concentración sistémica de β -glucanos.

El diagnóstico de infecciones invasivas causadas por hongos mediante técnicas de cultivo requiere varios días y puede dar falsos negativos hasta en el 50% de los casos de infección sistémica por *Candida* o *Aspergillus* (Pickering *et al.*, 2005). El examen histopatológico de tejido biopsiado requiere un procedimiento muy invasivo para la obtención de la muestra y, por tanto, en ocasiones no es un método viable. Por tanto, se precisa el estudio de biomarcadores que aceleren el diagnóstico de este tipo de infecciones.

La presencia del (1 \rightarrow 3)- β -glucano en sangre de un paciente es indicativo de una infección fúngica, por lo que, en los últimos años, se ha estudiado la utilidad que aportaría la medida de este polisacárido en suero para la práctica clínica. El β -glucano es un polisacárido característico de la pared celular de la mayoría de los hongos, exceptuando a *Cryptococcus neoformans* y la familia Zygomycetes (Pickering *et al.*, 2005). En este sentido, el β -glucano ha podido ser detectado en suero de pacientes con diferentes infecciones fúngicas, incluyendo candidiasis invasiva, aspergilosis invasiva, fusariosis invasiva y neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, pero sin especificidad sobre ninguna de estas especies de hongos (Arvanitis *et al.*, 2014).

En nuestro estudio hemos utilizado el test Fungitell para medir los niveles de β -glucano en el suero de los sujetos que componen nuestra muestra. Este test ha demostrado tener una sensibilidad y especificidad del 92,9 y 100%, respectivamente, en

pacientes con infecciones fúngicas invasivas (Pickering *et al.*, 2005). Además esta técnica se realiza en unas horas, lo cual le aporta una enorme ventaja en la práctica clínica frente al cultivo convencional. En nuestro estudio pretendíamos observar si la presencia de colonización por hongos en el pulmón de los sujetos con EPOC podría relacionarse con los niveles de este componente fúngico en sangre y evaluar su utilidad para identificar la situación de portador.

En el presente trabajo no se han observado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de β -glucano cuando se comparan pacientes colonizados con pacientes no colonizados por los hongos que fueron identificados con mayor frecuencia en las muestras de esputo. El test Fungitell resulta efectivo en situación de infección pero, en nuestro caso, los pacientes no sufrían exacerbación ni tenían síntomas de infección respiratoria en el momento de la toma de muestra, por lo que los casos en los que se ha detectado la presencia de hongos en el tracto respiratorio de estos sujetos indicarían una colonización pero no una infección. Este hecho ha de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos, puesto que durante la colonización la carga de microorganismo, y por tanto de los componentes de su pared, es muy inferior a la cantidad de patógenos presente durante una infección. Ésta podría ser la razón por la cual no se observó una elevación en los niveles de β -glucano en suero en relación a la presencia de hongos en las muestras de esputo de los pacientes con EPOC. Quizás si hubiésemos realizado este test en muestras de esputo hubiéramos podido encontrar diferencias significativas al medir la cantidad de β -glucano a nivel local, pero por el momento no tenemos constancia de ningún test que mida la cantidad de β -glucano en este tipo de muestra (Arvanitis *et al.*, 2014).

En 2003 se publicó el caso de un paciente con EPOC con aspergilosis pulmonar invasiva en el que no se pudo detectar una elevación de los niveles de β -glucano en sangre hasta 15 días tras su ingreso, implicando que, aunque la medición de este polisacárido podría ser un método más válido en el diagnóstico de esta infección que otros test, los ensayos que miden β -glucano en suero no son lo suficientemente efectivos en el diagnóstico clínico precoz de la infección pulmonar por *Aspergillus* (Okada *et al.*, 2003).

Otra posible explicación es que, aunque el β -glucano está presente en la gran mayoría de los hongos, no en todos ellos se encuentra en la misma proporción. De

hecho, los niveles de β -glucano en géneros como *Alternaria* y *Aspergillus* son relativamente bajos (Knutsen *et al.*, 2011). Las técnicas de identificación de hongos que hemos utilizado en el presente trabajo aportan datos cualitativos sobre la colonización del tracto respiratorio del huésped, pero no tenemos información cuantitativa acerca de la carga parasitaria de cada especie.

En la pared celular de *P. jirovecii* parece que los β -glucanos están presentes en cantidad significativa (Steele *et al.*, 2003). En un estudio comparativo entre los niveles de β -glucanos entre sujetos colonizados por *Pneumocystis* y sujetos con PcP, diferenciados en función del número de copias de ADN del hongo por μ l, se observó que 23 de los 29 sujetos colonizados tenían valores séricos de β -glucanos inferiores a 80pg/ml, y por tanto eran considerados negativos para este biomarcador según el fabricante de Fungitell (Damiani *et al.*, 2013). Estos datos concuerdan con nuestros resultados ya que en nuestra muestra 25 de los 30 sujetos colonizados y 34 de los 41 no colonizados presentan valores de β -glucano en plasma inferiores a 80pg/ml.

En conclusión, el test Fungitell no resulta adecuado para diagnosticar la situación de colonización fúngica en sujetos que no sufren una infección invasiva. Además, en caso de que fuera válido, podría indicar la colonización pero no identificar al microorganismo concreto responsable de dicha colonización (Lamoth *et al.*, 2012).

En este sentido, Esteves y su grupo proponen la utilización de este test en combinación con el análisis serológico de otros biomarcadores, como el antígeno Krebs von den Lungen-6, para aumentar la especificidad del test Fungitell en el diagnóstico de la neumonía causada por *P. jirovecii* (Esteves *et al.*, 2015).

Además de los (1,3)- β -D-Glucanos de patógenos fúngicos oportunistas que se pueden detectar mediante el ensayo Fungitell, tales como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae* y *Pneumocystis jirovecii*, se ha observado que hay ciertas infecciones bacterianas que podrían generar resultados positivos en este test y por tanto ocasionar falsos positivos al utilizar este ensayo en el diagnóstico de infecciones fúngicas. De hecho, se ha observado la reactividad de este test a partir de muestras sanguíneas de pacientes con bacteriemia. Uno de los (1,3)- β -D-glucanos bacterianos que parece generar resultados positivos en el Ensayo Fungitell es el producido por *Pseudomonas aeruginosa* (Mennink-Kersten *et al.*, 2008).

5. Estudio de la correlación entre la concentración sérica de β -glucanos y la respuesta inflamatoria sistémica.

Los β -glucanos de la pared celular de los hongos no se encuentran en mamíferos, por lo que pueden ser reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos por el sistema inmune innato del hombre (Brown *et al.*, 2003b). En este sentido, son varios los estudios que afirman que los glucanos poseen actividades inmunoestimuladoras (Harada *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, los trabajos publicados sobre los efectos inmunológicos que desencadenan estos PMAP en el huésped aportan datos a menudo contradictorios. Esto se debe, principalmente, a la utilización de glucanos diferentes derivados de distintas fuentes fúngicas (Brown *et al.*, 2003b), ya que los efectos inmunomoduladores de los glucanos difieren según su grado de ramificación, la longitud del polímero y su estructura terciaria (Okazaki *et al.*, 1995) y todavía no hay consenso acerca de los requisitos estructurales básicos para la actividad biológica de cada uno (Brown *et al.*, 2003b).

La respuesta inmune innata desempeña un papel central en el control de infecciones fúngicas. Cada vez hay más pruebas de que los glucanos están implicados en la iniciación de muchos aspectos de esta respuesta (Brown *et al.*, 2003b; McIntosh *et al.*, 2005; Kernodle *et al.*, 1998).

Por un lado, se ha observado *in vitro* un efecto inductor sobre la quimiotaxis de neutrófilos por parte de los β -glucanos de la pared de hongos como *Saccharomyces cerevisiae* (Wakshull *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1998) y *C. albicans* (Sato *et al.*, 2006), sugiriendo que estos PMAP podrían fomentar la acumulación de neutrófilos durante la inflamación pulmonar inducida por hongos (Vassallo *et al.*, 2000). Por el contrario, otros tipos diferentes de glucanos no afectaron a la migración de neutrófilos (Sato *et al.*, 2006).

Por otro lado, se postula que hay β -glucanos capaces de activar a los macrófagos directamente (Kataoka *et al.*, 2002; Okazaki *et al.*, 1996; Adachi *et al.*, 1994) y promover la liberación de citoquinas (Harada *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002). Carmona y su grupo han demostrado que los β -glucanos de la pared de *Pneumocystis* inducen la producción de TNF- α en los macrófagos (McCann *et al.*, 2005) y que estimulan a las células epiteliales de las vías respiratorias de ratas para secretar la proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2) (Evans *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2003). Posteriormente,

Carmona y sus colaboradores han demostrado que las células epiteliales de las vías respiratorias humanas secretan cantidades significantes de IL-8, el homólogo humano de MIP-2, en respuesta al β -glucano de la pared celular de *Pneumocystis* (Carmona *et al.*, 2010). Sin embargo, los eventos a través de los cuales los β -glucanos de *Pneumocystis* inician la activación de las células epiteliales en las vías respiratorias no están claros (Carmona *et al.*, 2010). En este sentido, otro estudio ha mostrado la capacidad in vitro del β -glucano de la pared celular de *C. albicans* para inducir la expresión y secreción de TNF- α e IL-8 en monocitos humanos (Li *et al.*, 2009). Igualmente, otro trabajo realizado con modelos animales concluye que el β -glucano aislado de la pared celular de *C. albicans* tiene un efecto sobre el sistema inmune del ratón in vivo, induciendo una inflamación neutrofilica y eosinófila en las vías respiratorias del animal que cursa con un incremento local de los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6, macrophage inflammatory protein-1 α y MPC-1, entre otros mediadores de la inflamación (Inoue *et al.*, 2007).

En nuestro estudio se evidenció una asociación entre los niveles séricos de β -glucano y de IL-8 que se mantenían incluso al eliminar del análisis estadístico los valores extremos observados en casos.

Anteriormente hemos detallado que tanto el β -glucano de *Candida* como el de *Pneumocystis*, los hongos predominantes en nuestra muestra, son capaces de inducir un aumento de IL-8 en células del sistema inmunitario del huésped. No podemos asegurar que los niveles de β -glucano en sangre de nuestros pacientes se deban a una u otra especie ya que no encontramos una relación significativa. Sin embargo, creemos que tiene gran interés el hallazgo que parece indicar que los niveles de β -glucanos pueden influir en la respuesta inflamatoria del huésped aumentando la expresión de IL-8 y probablemente fomentando la movilización de neutrófilos.

Wouters y su equipo realizaron un trabajo con cultivos celulares que sugiere una correlación entre la presencia de un β -glucano bacteriano y la producción de las citoquinas IL-1 β , IL6, IL8 y TNF- α por parte de las células sanguíneas de individuos sanos. En este estudio se apreció que la producción de citoquinas era dependiente de la concentración de glucano al que las células fueron expuestas y afirma que la respuesta inflamatoria inducida por el glucano varía de un individuo a otro, principalmente en el caso de las citoquinas IL-1 β e IL-6. En este sentido, se ha sugerido que la liberación

celular de citoquinas en respuesta a estímulos como los glucanos puede ser diferente entre individuos debido a factores genéticos, como mutaciones en los TLR; a una exposición mantenida a sustancias proinflamatorias como polvo orgánico, o a enfermedades subyacentes como aquellas que cursan con una inflamación crónica (Wouters *et al.*, 2002). Teniendo esto en cuenta, estos trabajos no serían del todo comparables con el nuestro ya que probablemente nuestros datos sean los primeros en sugerir la influencia de los β -glucano sobre los niveles de IL-8 a nivel sistémico.

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio confirman la existencia de una elevada prevalencia de colonización por hongos en sujetos con EPOC y, por primera vez, muestran la diversidad de géneros y especies fúngicas presentes en las vías respiratorias de estos pacientes, siendo *Candida albicans* y *Pneumocystis jirovecii* los hongos oportunistas más frecuentes en el tracto respiratorio de los sujetos con EPOC.

2. No se han observado diferencias en la distribución de la microbiota pulmonar en relación con el estadio de la EPOC.

2.1. La colonización por *Pneumocystis jirovecii* del tracto respiratorio de pacientes con EPOC se asocia a un incremento sistémico de los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-1- α , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α y MCP-1, sugiriendo que *Pneumocystis* podría inducir una respuesta inflamatoria, mediada principalmente por macrófagos y neutrófilos, en el huésped.

2.2 El perfil de la respuesta inflamatoria inducida por *Pneumocystis* parece depender en parte del estadio de la EPOC, observándose en la EPOC leve-moderada incrementos de IL-1- α , IL-8, y MCP-1 y en la EPOC grave solo de IL-1- α e IL-8.

2.3. La colonización del tracto respiratorio de estos pacientes por el género *Candida* se asocia a un incremento sistémico de la actividad de la enzima quitotriosidasa en pacientes con EPOC leve-moderado, sugiriendo que este hongo podría inducir una respuesta inflamatoria en el huésped fomentando el aumento de la actividad de los macrófagos en los estadios iniciales de la enfermedad.

3. La presencia de colonización por hongos en el tracto respiratorio de pacientes con EPOC no puede identificarse mediante la cuantificación sérica de β -glucanos.

4. La elevación de los niveles séricos de β -glucanos parece inducir un incremento en la producción sistémica de IL-8 en el huésped, sugiriendo que estos polisacáridos podrían ser reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos por el sistema inmune del huésped y desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberg JA, Mundy LM, Powderly WG. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection. *Chest*. 1999 Mar; 115(3):734-40.
- Adachi Y, Okazaki M, Ohno N, Yadomae T. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1->3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol Pharm Bull*. 1994 Dec; 17:1554–1560.
- Agarwal K, Gaur SN, Chowdhary A. The role of fungal sensitisation in clinical presentation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Mycoses*. 2015 Sep; 58(9):531-5.
- Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin Chim Acta*. 2006; 363:83-94.
- Ajao AO, Robinson G, Lee MS, Ranke TD, Venezia RA, Furuno JP *et al*. Comparison of culture media for detection of *Acinetobacter baumannii* in surveillance cultures of critically-ill patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Nov; 30(11):1425-30.
- Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, Perretti M. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol*. 1998 Jan; 63(1):108-16.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001 Aug; 2(8):675-80.
- Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, *et al*. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chether*. 2013; 57(7):3380-7.
- Andersen LI, Frederiksen HJ, Appleyard M. Prevalence of esophageal *Candida* colonization in a Danish population: special reference to esophageal symptoms, benign esophageal disorders, and pulmonary disease. *J Infect Dis*. 1992 Feb; 165(2):389-92.
- Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: A mini review. *J Appl Genet*. 2004; 45:3-15.
- Arancibia S, Beltran C, Aguirre I, Silva P, Peralta A, Malinarich F, *et al*. Toll-like receptor are key participants in innate immune responses. *Biol Res*. 2007; 40:97–112.
- Armougom F, Bittar F, Stremmer N, Rolain JM, Robert C, Dubus JC, *et al*. Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28:1151-1154.
- Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jul; 27(3):490-526.
- Bafadhel M, McKenna S, Agbetile J, Fairs A, Desai D, Mistry V, *et al*. *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. *Eur Respir J*. 2014 Jan; 43(1):64-71.

- Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 2003; 46:19-23.
- Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD patients. *Eur Respir J* 2004; 23:685-91.
- Barbosa AT, Colares FA, Gusmão Eda S, Barros AA, Cordeiro CG, Andrade MC. Isolated pulmonary cryptococcosis in an immunocompetent patient. *J Bras Pneumol*. 2006 Sep-Oct; 32(5):476-80.
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2000; 343:269–80.
- Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med*. 2004; 1(1):e20.
- Becker KL, Ifrim DC, Quintin J, Netea MG, van de Veerdonk FL. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. *Semin Immunopathol*. 2015 Mar; 37(2):107-16.
- Bellanger AP, Millon L, Rognon B, Roussel S, Botterel F, Bretagne S, *et al*. Variable beta-glucans production by different states of *Eurotium amstelodami* explains differences in inflammatory responses in airway cells. *APMIS* 2011; 119:605–610.
- Benfield TL, Lundgren B, Shelhamer JH, Lundgren JD. *Pneumocystis carinii* major surface glycoprotein induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 release from a human alveolar epithelial cell line. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29:717–22.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan; 36(Database issue):D25-30.
- Bhowmik A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. 2000; 55:114-20.
- Bresser P, Out TA, van Alphen L, Jansen HM, Lutter R. Airway inflammation in non obstructive and obstructive chronic bronchitis with *Haemophilus influenzae* airway infection: comparison with non infected patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:947-52.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J. Exp.Med*. 2003a; 197:1119–1124.
- Brown GD, Gordon S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003b; 19:311–315.
- Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet*. 1996 Apr; 347(9006):977.

- Calderón EJ, Varela JM, Medrano FJ, Nieto V, González-Becerra C, Respaldiza N, *et al.* Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in southern Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2004a Jul; 10(7):673-6.
- Calderón E, de la Horra C, Medrano FJ, López-Suárez A, Montes-Cano MA, Respaldiza N, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004b Jul; 23(7):545-9.
- Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N, Morilla R, Montes-Cano MA, Friaza V, *et al.* Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 15; 45(2):e17-9.
- Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol.* 1987; 63:152–157.
- Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J Clin Invest.* 1990 Sep; 86(3):962-71.
- Carmona EM, Vassallo R, Vuk-Pavlovic Z, Standing JE, Kottom TJ, Limper AH. *Pneumocystis* cell wall beta-glucans induce dendritic cell costimulatory molecule expression and inflammatory activation through a Fas-Fas ligand mechanism. *J Immunol.* 2006; 177:459-467.
- Carmona EM, Lamont JD, Xue A, Wylam M, Limper AH. *Pneumocystis* cell wall beta-glucan stimulates calcium-dependent signaling of IL-8 secretion by human airway epithelial cells. *Respir Res.* 2010 Jul 13; 11:95.
- Chabé M, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, Aliouat el M, Viscogliosi E, Dei-Cas E. *Pneumocystis*: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Res.* 2011 Feb; 11(1):2-17.
- Chamilos G, Ganguly D, Lande R, Gregorio J, Meller S, Goldman WE, *et al.* Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses. *PLoS One.* 2010; 5:e12955.
- Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, Vermeire PA, Buist AS, Thun MJ, *et al.* Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:188-207.
- Charlson ES, Diamond JM, Bittinger K, Fitzgerald AS, Yadav A, Haas AR, *et al.* Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186:536–545.
- Chen KY, Ko SC, Hsueh PR, Luh KT, Yang PC. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. *Chest.* 2001 Jul; 120(1):177-84.
- Chen AI, Dolben EF, Okegbe C, Harty CE, Golub Y, Thao S, Ha DG, *et al.* *Candida albicans* ethanol stimulates *Pseudomonas aeruginosa* WspR-controlled biofilm formation as part

- of a cyclic relationship involving phenazines. *PLoS Pathog.* 2014 Oct; 10(10):e1004480.
- Cho SJ, Weiden MD, Lee CG. Chitotriosidase in the Pathogenesis of Inflammation, Interstitial Lung Diseases and COPD. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015 Jan; 7(1):14-21.
- Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest.* 2010 Nov; 138(5):1186-95.
- Chotirmall SH, McElvaney NG. Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Jul; 52:161-73.
- Christensen PJ, Preston AM, Ling T, Du M, Fields WB, Curtis JL, *et al.* *Pneumocystis murina* infection and cigarette smoke exposure interact to cause increased organism burden, development of airspace enlargement, and pulmonary inflammation in mice. *Infect Immun.* 2008 Aug; 76(8):3481-90.
- Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* 1985 Dec; 64:111-26.
- Cohen HB, Mosser DM. Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 2013; 94(5):913-9.
- Coleman L, Doder P, Golden J, Luce J, Golden , Gold W, *et al.* Correlation between serial pulmonary function test and fiberoptic bronchoscopy in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia and the acquired immune deficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129:491-93.
- Colom MF, Frasés S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, *et al.* First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7):3548–3550.
- Colom MF, Hagen F, Gonzalez A, Mellado A, Morera N, Linares C, *et al.* *Ceratonia siliqua* (carob) trees as natural habitat and source of infection by *Cryptococcus gattii* in the Mediterranean environment. *Med Mycol.* 2012; 50(1):67-73.
- Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:3622-3627.
- Cosío, BG. EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2007; 43(Supl 2):15-23.
- Coudeyras S, Forestier C. Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine. *Can J Microbiol.* 2010 Aug; 56(8):611-50.
- Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA, *et al.* Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2010; 5(6):e11044.

- Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med.* 2013 Jul 30; 5(7):63.
- Cui L, Lucht L, Tipton L, Rogers MB, Fitch A, Kessinger C, *et al.* Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Apr 15; 191(8):932-42.
- Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, Virmaux M, Nevez G, Totet A. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1->3)- β -D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. *J Clin Microbiol.* 2013 Oct; 51(10):3380-8.
- De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert JV. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS One.* 2014; 9(6):e97629.
- Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, *et al.* The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community—implications for therapeutic management. *PLoS ONE.* 2012; 7:e36313.
- Denning DW, Pashley C, Hartl D, Wardlaw A, Godet C, Del Giacco S, *et al.* Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin Transl Allergy.* 2014 Apr 15; 4:14.
- de la Horra C, Varela JM, Fernández-Alonso J, Medrano FJ, Respaldiza N, Montes-Cano MA, *et al.* Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 2004 Mar; 34(3):229-35.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008 Jun 15; 46(12):1813-21.
- Dhariwal J, Tennant RC, Hansell DM, Westwick J, Walker C, Ward SP, *et al.* Smoking cessation in COPD causes a transient improvement in spirometry and decreases micronodules on high-resolution CT imaging. *Chest.* 2014 May; 145(5):1006-15.
- Djeu JY, Matsushima K, Oppenheim JJ, Shiotsuki K, Blanchard DK. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J Immunol.* 1990 Mar 15; 144(6):2205-10.
- Docampo S, Trigo MM, Recio M, Melgar M, García-Sánchez J, Cabezudo B. Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): diversity and origin. *Sci Total Environ.* 2011 Jan 15; 409(4):835-43.
- Donaldson GC, Seemungal TAR, Browmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57:847-52.

- Dosdá R, Carrión F, Pérez V, Mollá MA. Candidiasis pulmonary en un paciente no inmunodeprimido. *Radiología*. 2007; 49(6):452-6.
- Duez C, Gosset P, Tonnel A. Dendritic cells and toll-like receptors in allergy and asthma. *Eur J Dermatol*. 2006; 16:12–16.
- Eiland CW, Knapp S, Florquin S, De Vos AF, Takeda K, Akira S, *et al*. Non-mannose-capped lipo arabino mannan induces lung inflammation via toll-like receptor 2. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170:1367–74.
- Emami Ardestani M, Zaerin O. Role of Serum Interleukin 6, Albumin and C-Reactive Protein in COPD Patients. *Tanaffos*. 2015; 14(2):134-40.
- Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta*. 1971 Dec 28; 251(3):427-34.
- 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 Feb 22; 6(2):e16384.
- Erlich HA, Gelfand D, Sninsky J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 1991; 252:1643-1651.
- Esteves F, Calé SS, Badura R, de Boer MG, Maltez F, Calderón EJ, *et al*. Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Apr; 21(4):379.e1-10.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol*. 1999 Jan; 49 Pt 1:329-37.
- Evans SE, Hahn PY, McCann F, Kottom TJ, Pavlovic ZV, Limper AH. *Pneumocystis* cell wall beta-glucans stimulate alveolar epithelial cell chemokine generation through nuclear factor-kappaB-dependent mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Jun; 32(6):490-7.
- Ferrari R, Tanni SE, Caram LM, Corrêa C, Corrêa CR, Godoy I. Three-year follow-up of Interleukin 6 and C-reactive protein in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2013 Feb; 14:24.
- Fidan I, Kalkanci A, Yesilyurt E, Erdal B. In vitro effects of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* on dendritic cells and the role of beta glucan in this effect. *Adv Clin Exp Med*. 2014 Jan-Feb; 23(1):17-24.
- Fitzpatrick ME, Tedrow JR, Hillenbrand ME, Lucht L, Richards T, Norris KA, *et al*. *Pneumocystis jirovecii* colonization is associated with enhanced Th1 inflammatory gene expression in lungs of humans with chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiol Immunol*. 2014 Mar; 58(3):202-11.

- Gadek J, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science*. 1979; 206:1315–1316.
- Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jan; 25(1):106-41.
- Gal SL, Héry-Arnaud G, Ramel S, Virmaux M, Damiani C, Totet A, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scand J Infect Dis*. 2010 Mar; 42(3):225-7.
- Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004 Jul; 59(7):574-80.
- Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J*. 2005; 24:1277–1286.
- García-Fontgüivell JF, Mayayo Artal E. Prevalence of fungal infections detected from biopsies and autopsies in the past 11 years at the University Hospital Joan XXIII in Tarragona, Spain. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Dec; 23(4):201-8.
- García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S. Bacterial identification based on protein mass spectrometry: A new insight at the microbiology of the 21st century. *Rev Chilena Infectol*. 2012 Jun; 29(3):263-72.
- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010 Jan 8; 6(1):e1000713.
- Gosselink R, De Vos J, Van den Heuvel SP, Segers J, Decramer M, Kwakkel G. Impact of inspiratory muscle training in patients with COPD: what is the evidence? *Eur Respir J*. 2011; 37:416-25.
- Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. 2000 Mar 23; 404(6776):407-11.
- Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, Muñoz P, Pozo F, Peláez T, *et al.* Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jul; 16(7):870-7.
- Güngör O, Tamay Z, Güler N, Erturan Z. Frequency of fungi in respiratory samples from Turkish cystic fibrosis patients. *Mycoses*. 2013 Mar; 56(2):123-9.
- Guss AM, Roeselers G, Newton IL, Young CR, Klepac-Ceraj V, Lory S, *et al.* Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME J*. 2011 Jan; 5(1):20-9.
- Hass H, Morris JF, Samson S, Kilbourn JP, Kim PJ. Bacterial flora of the respiratory tract in chronic bronchitis: comparison of transtracheal, fiberbronchoscopic, and oropharyngeal sampling methods. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 116:41–47.

- Hacievliyagil SS, Gunen H, Mutlu LC, Karabulut AB, Temel I. Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2006 May; 100(5):846-54.
- Hahn PY, Evans SE, Kottom TJ, Standing JE, Pagano RE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 2003; 278(3):2043-2050.
- Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates cytokine induction by 1,3- β -D-glucan SCG in DBA/2 mice in vitro. *J Interferon Cytokine Res.* 2004; 24:478–489.
- Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, *et al.* Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Dec 18; 104(51):20529-33.
- Harrison MJ, Twomey KB, McCarthy Y, O’Connell OJ, Alston M, Febrer M, *et al.* The role of second-generation sequencing in describing the fungal microbiota in the adult cystic fibrosis (CF) airway and its correlation with clinical phenotype. *J Cyst Fibros.* 2013; 12:S16. (Oral presentation).
- Hauser PM, Bernard T, Greub G, Jatou K, Pagni M, Hafen GM. Microbiota present in cystic fibrosis lungs as revealed by whole genome sequencing. *PLoS One.* 2014 Mar 5; 9(3):e90934.
- He S, Hang JP, Zhang L, Wang F, Zhang DC, Gong FH. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015; 48: 351-61.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques.* 1997; 23:504-511.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, *et al.* Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010 Jan 5; 5(1):e8578.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 Jun 24; 350(26):2645-53.
- Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, Morgan LA, Chen PL, Feldmesser M, *et al.* *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta- glucan display. *PLoS Pathog* 2005; 1:e30.
- Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994 Mar; 93(3):1288-92.
- Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Aug; 281(2):L509-16.

- Hulin M, Moularat S, Kirchner S, Robine E, Mandin C, Annesi-Maesano I. Positive associations between respiratory outcomes and fungal index in rural inhabitants of a representative sample of French dwellings. *Int J Hyg Environ Health*. 2013 Mar; 216(2):155-62.
- Huppert M, Oliver DJ, Sun SH. Combined methenamine-silver nitrate and hematoxylin & eosin stain for fungi in tissues. *J Clin Microbiol*. 1978; 8:598-603.
- Iniciativa Global para la EPOC- Guía 2011.
- Inoue K, Takano H, Oda T, Yanagisawa R, Tamura H, Ohno N, *et al*. *Candida* soluble cell wall beta-D-glucan induces lung inflammation in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007 Jul-Sep; 20(3):499-508.
- Itabashi T, Hosoe T, Toyasaki N, Imai T, Adachi M, Kawai K. Allergen activity of xerophilic fungus, *Aspergillus restrictus*. *Alerugi*. 2007 Feb; 56(2):101-8.
- Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol*. 1997 May 1; 158(9):4129-36.
- Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K. Activation of macrophages by linear (1->3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27; 277(39):36825-31.
- Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, *et al*. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 2004; 5(10):1061-8.
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153:530-4.
- Kernodle DS, Gates H, Kaiser AB. Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranosyl-[1-3]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:545-549.
- Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Tarraf H, Davies RJ. Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1994; 7: 2109-2116.
- Khalife S, Aliouat EM, Aliouat-Denis CM, Gantois N, Devos P, Mallat H, *et al*. First data on *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with respiratory diseases in North Lebanon. *New Microbes New Infect*. 2015 Mar 4; 6:11-4.
- Kilburn K, McKenzie W. Leucocyte recruitment to airways by cigarette smoke and particle phase in contrast to cytotoxicity of vapor. *Science*. 1975; 189:634-637.

- Knutsen AP, Bush RK, Demain JG, Denning DW, Dixit A, Fairs A, *et al.* Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Feb; 129(2):280-91; quiz 292-3.
- Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham WR, Höfle MG. Cohort Study of Airway Mycobiome in Adult Cystic Fibrosis Patients: Differences in Community Structure between Fungi and Bacteria Reveal Predominance of Transient Fungal Elements. *J Clin Microbiol.* 2015 Sep; 53(9):2900-7.
- Kratzer E, Tian Y, Sarich N, Wu T, Meliton A, Leff A, *et al.* Oxidative stress contributes to lung injury and barrier dysfunction via microtubule destabilization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Nov; 47(5):688-97.
- Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, *et al.* β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis.* 2012 Mar 1; 54(5):633-43.
- Laroumagne S, Lepage B, Hermant C, Plat G, Phelippeau M, Bigay-Game L, *et al.* Bronchial colonisation in patients with lung cancer: a prospective study. *Eur Respir J.* 2013 Jul; 42(1):220-9.
- 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.
- Laurenzi GA, Potter RT, Kass EH. Bacteriologic flora of the lower respiratory tract. *N Engl J Med.* 1961; 265:1273-1278.
- Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:693-699.
- Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper AH. *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2003; 278:25001-25008.
- Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human natural killer T cells. *J Exp Med.* 2002; 195:637-641.
- Létuvé S, Kozhich A, Humbles A, Brewah Y, Dombret MC, Grandsaigne M, *et al.* Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol.* 2010 Feb; 176(2):638-49.
- Li M, Liu ZH, Chen Q, Zhou WQ, Yu MW, Lü GX, *et al.* Insoluble beta-glucan from the cell wall of *Candida albicans* induces immune responses of human THP-1 monocytes through Dectin-1. *Chin Med J (Engl).* 2009 Mar 5; 122(5):496-501.

- Liang J, Melican D, Cafro L, Palace G, Fiset L, Armstrong R, *et al.* Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *Int. J. Immunopharmacol.* 1998; 20:595–614.
- Liesack W, Stackebrandt E. Unculturable microbes detected by molecular sequence and probes. *Biodiversity and Conserv.* 1992; 1:250-262.
- Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin II WJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140:1204-1209.
- Logotheti M, Kotsovili-Tseleni A, Arsenis G, Legakis NI. Multiplex PCR for the discrimination of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* and *A. terreus*. *J Microbiol Meth.* 2009; 76:209-211.
- Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax.* 2006 Nov; 61(11):935-9.
- Lomas DA, Evans DL, Stone SR, Chang W-SW, Carre RW. Effect of the Z mutation on the physical and inhibitory properties of alpha-1 antitrypsin. *Biochemistry.* 1993; 32:500-508.
- López AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J.* 2006 Feb; 27(2):397-412.
- Luna RA, Fasciano LR, Jones SC, Boyanton BL, Ton TT, Versalovic J. DNA pyrosequencing-based bacterial pathogen identification in a pediatric hospital setting. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:2985-2992.
- Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M, Rönmark E, Jonsson AC, Jönsson E, *et al.* Not 15 but 50% of smokers develop COPD? Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med.* 2003 Feb; 97(2):115-22.
- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2001; 429:195–207.
- Maher CO, Dunne K, Comerford R, O'Dea S, Loy A, Woo J, *et al.* *Candida albicans* stimulates IL-23 release by human dendritic cells and downstream IL-17 secretion by V δ 1 T cells. *J Immunol.* 2015 Jun 15; 194(12):5953-60.
- Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol.* 2014 Dec; 14(12):827-35.
- Martin TR, Raghu G, Maunder RJ, Springmeyer SC. The effects of chronic bronchitis and chronic air flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 132(2):254-260.

- McCann F, Carmona E, Puri V, Pagano RE, Limper AH. Macrophage internalization of fungal beta-glucans is not necessary for initiation of related inflammatory responses. *Infect Immun*. 2005; 73(10):6340-6349.
- McIntosh M, Stone BA, Stanisich VA. Curdlan and other bacterial (1,3)- β -D-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 68:163–173.
- Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, *et al*. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis*. 2005 Feb; 11(2):245-50.
- Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Verweij PE. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 15; 46 (12):1930-1.
- 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 Jan; 50 Suppl 1:1-16.
- Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP, Githaiga A, Elliott WM, Hogg JC, *et al*. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Aug 15; 170(4):408-13.
- Morris A, Sciruba FC, Norris KA. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD*. 2008 Feb; 5(1):43-51.
- Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, *et al*. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* 1995; 332:1198–1203.
- Mounier J, Gouëlle A, Keravec M, Le Gal S, Pacini G, Debaets S, *et al*. Use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) to characterize the bacterial and fungal airway microbiota of cystic fibrosis patients. *J Microbiol*. 2014 Apr; 52(4):307-14.
- Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Apr; 284(4):L566-77.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; 51 Pt 1:263-73.
- Muñoz L, Jurado B, Alcázar B, León A, Márquez FL, Feu N, *et al*. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica en atención primaria. Estudio descriptivo en las comunidades de Extremadura y Andalucía. *NEUMOSUR* 2001; 13, 3:183-191.
- Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:1067– 1083.

- Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:266-72.
- Nahimana A, Francioli P, Blanc DS, Bille J, Wakefield AE, Hauser PM. Determination of the copy number of the nuclear rDNA and beta-tubulin genes of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* using PCR multicompetitors. *J Eukaryot Microbiol.* 2000 Jul-Aug; 47(4):368-72.
- Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, *et al.* Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* 2006 Jun; 116(6):1642-50.
- Nevez G, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A. Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clin Infect Dis.* 2006 Jun 1; 42(11):e99-101.
- Nibbering PH, Pos O, Stevenhagen A, Van Furth R. Interleukin-8 enhances nonoxidative intracellular killing of *Mycobacterium fortuitum* by human granulocytes. *Infect Immun.* 1993 Aug; 61(8):3111-6.
- Nici L, Donner C, 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 Jun 15; 173(12):1390-413.
- Noni M, Katelari A, Kaditis A, Theochari I, Lympari I, Alexandrou-Athanassoulis H, *et al.* *Candida albicans* chronic colonisation in cystic fibrosis may be associated with inhaled antibiotics. *Mycoses.* 2015 Jul; 58(7):416-21.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:1923-1929.
- O’Gorman CM, Fuller HT. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *Atmospheric Environment* 42 (2008) 4355–4368.
- Okada S, Teramoto S, Takizawa H, Ouchi Y, Matsuoka R. Clinical insignificance of (1->3)-beta-D-glucan in early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Microbiol.* 2003 Nov; 52(Pt 11):1031-2.
- Okazaki M, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Structure-activity relationship of (1->3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18:1320–1327.
- Okazaki M, Chiba N, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Signal transduction pathway on beta-glucans-triggered hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages in vitro. *Biol Pharm Bull.* 1996 Jan; 19(1):18-23.
- Pashley CH, Fairs A, Free RC, Wardlaw AJ. DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. *Fungal Biol.* 2012 Feb; 116(2):214-24.

- Patel IS, Seemungal TA, 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.
- Patel IS, Vlahos I, Wilkinson TM, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wilks M, *et al*. Bronchiectasis, exacerbation indices, and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170:400-7.
- Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, Morilla R, de La Horra C, Montes-Cano MA, *et al*. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. 2012 Jul; 50(5):556-60.
- Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TMA, Sapsford RJ, Mullerova H, Donaldson GC, *et al*. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29:527e34.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015 Jan; 30(1):11-26.
- Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec; 43(12):5957-62.
- Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis*. 2010 Feb 1; 50(3):347-53.
- Pravin Charles MV, Kali A, Joseph NM. Performance of chromogenic media for *Candida* in rapid presumptive identification of *Candida* species from clinical materials. *Pharmacognosy Res*. 2015 Jun; 7(Suppl 1):S69-73.
- Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T, Serr A. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 Aug; 19(8):644-5.
- Pryor WA, Prier DG, Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect*. 1983 Jan; 47:345-55.
- Przybyłowska D, Mierzwińska-Nastalska E, Swoboda-Kopeć E, Rubinsztajn R, Chazan R. Potential respiratory pathogens colonisation of the denture plaque of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Gerodontology*. 2016 Sep; 33(3):322-7.
- Przyklenk B, Bauernfeind A, Horl G, Emminger G. Serologic response to *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *Infection*. 1987; 15:308- 310.
- Qaseem A, Snow V, Shekelle P, Sherif K, Wilt TJ, Weinberger S, *et al*. Diagnosis and management of stable chronic obstructive pulmonary disease: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2007 Nov 6; 147(9):633-8.

- Rahman I, vanSchadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, *et al.* 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166:490–495.
- Reddy LV, Kumar A, Kurup VP. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probe.* 1993; 7:121-126.
- Redecke V, Häcker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, *et al.* Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol.* 2004 Mar 1; 172(5):2739-43.
- Renkema GH, Boot RG, Muijsers Ao, Donker-Koopman WE, Aerts JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem.* 1995; 270:2198–2202.
- Rennard SI. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160:s12–s16.
- Reponen T, Lockey J, Bernstein DI, Vesper SJ, Levin L, Khurana Hershey GK, *et al.* Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Sep; 130(3):639-644.e5.
- Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, *et al.* High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Nov; 10(11):1029-31.
- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, *et al.* Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Dec; 11(12):1012-5.
- Rivero L, de la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaldiza N, Friaiza V, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg Infect Dis.* 2008 Jul; 14(7):1116-8.
- Rogers GB, Hart CA, Mason JR, Hughes M, Walshaw MJ, Bruce KD. Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8):3548–58.
- Rohde G, Wiethege 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.
- Romanelli AM, Fu J, Herrera ML, Wickes BL. A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycoses.* 2014 Oct; 57(10):612-22.

- Rosell A, Monsó E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, *et al.* Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med.* 2005 Apr 25; 165(8):891-7.
- Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvicková J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology.* 1999 May; 42(1-3):61-74.
- Roux D, Gaudry S, Dreyfuss D, El-Benna J, de Prost N, Denamur E, *et al.* *Candida albicans* impairs macrophage function and facilitates *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rat. *Crit Care Med.* 2009 Mar; 37(3):1062-7.
- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, *et al.* CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Mar; 157(3 Pt 1):822-6.
- Sahaza JH, Suárez-Alvarez R, Estrada-Bárceñas DA, Pérez-Torres A, Taylor ML. Profile of cytokines in the lungs of BALB/c mice after intra-nasal infection with *Histoplasma capsulatum* mycelial propagules. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015 Aug; 41:1-9.
- Sandström T, Bjermer L, Rylander R. Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes, and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J.* 1992 Sep; 5(8):992-6.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74:5463-5467.
- Sato T, Iwabuchi K, Nagaoka I, Adachi Y, Ohno N, Tamura H, *et al.* Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *J Leukoc Biol.* 2006 Jul; 80(1):204-11.
- Sautour M, Sixt N, Dalle F, L'Ollivier C, Fourquenot V, Calinon C, *et al.* Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci Total Environ.* 2009 Jun 1; 407(12):3766-71.
- Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, Altose MD, Bailey WC, Buist AS. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:381– 390.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Apr 17; 109(16):6241-6.
- Seibold MA, Donnelly S, Solon M, Innes A, Woodruff PG, Boot RG, *et al.* Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Nov; 122(5):944-950.
- Seidel D, Cheung A, Suh ES, Raste Y, Atakhorrami M, Spruit MA. Physical inactivity and risk of hospitalisation for chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012; 16:1015-9.

- Sellart-Altisent M, Torres-Rodríguez JM, Gómez de Ana S, Alvarado-Ramírez E. Nasal fungalmicrobiota in allergic and healthy subjects. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24(2):125-30.
- Sethi S. Bacterial Infection and the Pathogenesis of COPD. *Chest* 2000; 117:286S-291S.
- 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 May 1; 173(9):991-8.
- 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, Mahler DA, Marcus P, Owen CA, Yawn B, Rennard S. Inflammation in COPD: implications for management. *Am J Med.* 2012 Dec; 125(12):1162-70.
- Shapiro SD, Ingenito EP. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 32:367-72.
- Shipley TW, Kling HM, Morris A, Patil S, Kristoff J, Guyach SE, *et al.* Persistent *Pneumocystis* colonization leads to the development of chronic obstructive pulmonary disease in a nonhuman primate model of AIDS. *J Infect Dis.* 2010 Jul 15; 202(2):302-12.
- Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Eshaghurshan CS, Faria MM, Dowd SE, *et al.* Culture enriched molecular profiling of the cystic fibrosis airway microbiome. *PLoS One.* 2011; 6(7):e22702.
- Sies H. (1991). Oxidative stress: introduction. In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, ed. SIES, H., pp. xv-xxii. Academic Press, London.
- Sivam S, Sciruba FC, Lucht LA, Zhang Y, Duncan SR, Norris KA, *et al.* Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in lungs from colonized COPD patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Sep; 71(1):24-8.
- Soler N, Ewig S, Torres A, Filella A, Gonzales 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 N, Esperatti M, Ewig S, Huerta A, Agustí C, Torres A. Sputum purulence guided antibiotic use in hospitalised patient with exacerbations of COPD. *Eur Respir J.* 2012; 40:1344-53.
- Shparago NI, Bruno PP, Bennett J. Systemic *Malassezia furfur* infection in an adult receiving total parenteral nutrition. *J Am Osteopath Assoc.* 1995 Jun; 95(6):375-7.
- Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, *et al.* Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* involves molecular recognition by the dectin-1 b-glucan receptor. *J Exp Med.* 2003; 198:1677-1688.

- Stone PJ, Calore JD, McGowan SE, Bernardo J, Snider GL, Franzblau C. Functional alpha 1-protease inhibitor in the lower respiratory tract of cigarette smokers is not decreased. *Science*. 1983 Sep 16; 221(4616):1187-9.
- Su B, Liu T, Fan H, Chen F, Ding H, Wu Z, *et al*. Inflammatory markers and the risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Apr 22; 11(4):e0150586.
- Suzuki M, Rappe MS, Giovannoni SJ. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64:4522-4529.
- Schwarz J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol*. 1982; 13:519-533.
- Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, *et al*. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(10):1073-1080.
- Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, *et al*. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*. 2000 Dec; 68(12):6883-90.
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Dec; 31(6):643-9.
- van Deventer SH, Hart M, van der Poll T, Hack CE, Aarden LA. Endotoxin and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 release in humans. *J Infect Dis*. 1993; 167:461-464.
- van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EF, *et al*. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*. 2005; 17:1505-1512.
- van Woerden HC, Gregory C, Brown R, Marchesi JR, Hoogendoorn B, Matthews IP. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:69.
- Varela JM, Respaldiza N, Sánchez B, de la Horra C, Montes-Cano M, Rincón M, *et al*. Lymphocyte response in subjects with chronic pulmonary disease colonized by *Pneumocystis jirovecii*. *J Eukaryot Microbiol*. 2003; 50 Suppl:672-3.
- Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, Respaldiza N, de La Horra C, Montes-Cano MA, *et al*. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Aug; 10(8):770-2.
- Vassallo R, Standing J, Limper AH. Beta-glucan from *Pneumocystis carinii* stimulates TNF alpha release from alveolar macrophages. *J Eukaryot Microbiol*. 1999a; 46:145S.
- Vassallo R, Thomas CF, Vuk-Pavlovic Z, Limper AH. Alveolar macrophage interactions with *Pneumocystis carinii*. *J Lab Clin Med*. 1999b; 133:535-540.

- Vassallo R, Standing JE, Limper AH. Isolated *Pneumocystis carinii* cell wall glucan provokes lower respiratory tract inflammatory responses. *J Immunol.* 2000; 164:3755–3763.
- 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 Feb 15; 187(4):347-65.
- Vidal S, de la Horra C, Martín J, Montes-Cano MA, Rodríguez E, Respaldiza N, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Mar; 12(3):231-5.
- Vos R, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, Verleden GM. Transient airway colonization is associated with airway inflammation after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2007 May; 7(5):1278-87.
- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, *et al.* Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet.* 1990 Aug 25; 336(8713):451-3.
- Wakefield AE. Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *J Eukaryot Microbiol.* 1994 Sep-Oct; 41(5):116S.
- Wakshull E, Brunke-Reese D, Lindermuth J, Fisette L, Nathans RS, Crowley JJ, *et al.* PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology.* 1999 Feb; 41(2):89-107.
- Wang H, Gu X, Weng Y, Xu T, Fu Z, Peng W, *et al.* Quantitative analysis of pathogens in the lower respiratory tract of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med.* 2015 Aug 19; 15:94.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA. 1990:315–322.
- Willemsse BW, Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J.* 2005 Nov; 26(5):835-45.
- Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, *et al.* Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome.* 2014 Nov 3; 2:40.
- Willment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human b-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem.* 2001; 276:43818–43823.
- Willment JA, Marshall AS, Reid DM, Williams DL, Wong SY, Gordon S, *et al.* The human b-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol.* 2005; 35:1539–1547.

- Wouters IM, Douwes J, Thorne PS, Heederik D, Doekes G. Inter- and intraindividual variation of endotoxin- and beta(1->3)-glucan-induced cytokine responses in a whole blood assay. *Toxicol Ind Health*. 2002 Feb; 18(1):15-27.
- Wouters EFM. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2:26–33.
- Xu D, Liu H, Komai-Koma M. Direct and indirect role of toll-like receptor in T cell mediated immunity. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1:239–46.
- Yokohori N, Aoshiha K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest*. 2004; 125:626–632.
- Zeinali E, Sadeghi G, Yazdinia F, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Clinical and epidemiological features of the genus *Malassezia* in Iran. *Iran J Microbiol*. 2014 Oct; 6(5):354-60.
- Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, *et al*. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*. 2007; 37:2695-2706.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
α1AT	α 1-Antitripsina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosómico
LBA	Lavado Broncoalveolar
CD4+	Conjunto de linfocitos con diferenciación 4
CD8+	Conjunto de linfocitos con diferenciación 8
CVF	Capacidad Vital Forzada
ddATP	Dideosadeníntrifosfato
ddCTP	Dideoxicitosíntrifosfato
ddGTP	Dideoxiguanosíntrifosfato
ddNTP	Dideoxinucleótidotrifosfato
ddTTP	Dideoximidíntrifosfato
dNTP	Deoxinucleótidotrifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FRC	Capacidad Pulmonar Residual
GOLD	del inglés Initiative Global Obstructive Lung Disease
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
INF-γ	Inmunoforon gamma
ITS	del inglés <i>Internal Transcribed Spacer</i> .
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
LABA	Fármacos agonistas de receptores beta-2-adrenérgicos de larga duración
LBA	Lavado Broncoalveolar
LOF	Lavado Orofaringeo
LTB4	Leucotrieno B4
MCP-1	del inglés <i>Monocyte chemotactic protein-1</i> , proteína quimiotáctica de monocitos
MPPs	Microorganismos potencialmente patógenos
MSG	del inglés <i>Major Surface Glycoprotein</i> , proteína mayor de superficie
mtLSU	Subunidad mayor del ribosoma mitocondrial

PcP	del inglés <i>Pneumocystis Pneumonia</i> , neumonía por <i>Pneumocystis</i>
PCR	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reaccion en cadena de la polimerasa
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos
RFLP	del inglés, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rRNA	ARN ribosómico
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
SABA	Fármacos agonistas de receptores beta-2-adrenérgicos de corta duración
SDS	del inglés <i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato sódico
TBE	Tris, Borato y EDTA (tampón)
Th	Linfocito T helper
TLR	del inglés <i>Toll Like Receptor</i>
TNF-α	del inglés <i>Tumor Necrosis Factor α</i> , factor de necrosis tumoral α
VEF₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ANEXOS

ANEXO I

Cuaderno de recogida de datos.

1. Número de caso ⁽¹⁾: _____.
2. Fecha de toma de muestra (Día/Mes/Año): (___ / ___ / ____).
3. Tipo de muestra ⁽²⁾: _____.

DATOS DEL SUJETO.

4. Iniciales del Sujeto ⁽³⁾ _____.
5. Sexo (H/M) _____.
6. Raza (Blanca, Negra, Oriental, Otra) _____.
7. Fecha de Nacimiento (Día/Mes/Año): (___ / ___ / ____).
8. Ciudad de Residencia: _____.

HISTORIA CLÍNICA DEL SUJETO.

	Sí	No
9. Diabetes.		
10. Enfermedad Hepática (transaminasas >2 veces por encima de los valores normales).		
11. Enfermedad Renal (creatinina sérica > 2 mg/dl)		
12. Neoplasias (si responde Sí, especificar: _____)		
13. Otras enfermedades (si responde Sí, especificar: _____)		
14. Receptor de transfusión.		
15. Infección con VIH.		
16. Fumador (si responde Sí, especificar número de cigarros/día): _____)		
17. Ingesta de alcohol (si responde Sí, especificar cantidad diaria: _____)		

HISTORIAL CLÍNICO RELACIONADO CON LA EPOC.

Sí No

18. Enfermedad Pulmonar

--	--

18.1. Bronquitis Crónica

--	--

18.2. Enfisema

--	--

18.3. Bronquiectasis

--	--

18.4. Asma Obstructivo Crónico

--	--

18.5. Fibrosis Quística

--	--

18.6. Otros (si responde Sí, especificar: _____)

--	--

19. Exacerbación de su enfermedad pulmonar en esta evaluación⁽⁴⁾

--	--

(si responde Sí, especificar: leve, moderada o severa):

20. Evidencia de alguna infección pulmonar en esta evaluación

--	--

(si responde Sí, especificar):

Etiología: _____.

Método de identificación: _____.

21. Uso de corticoesteroides en los 3 meses previos.

--	--

(si responde Sí, especificar):

Corticoesteroides inhalados (CI), corticoesteroides orales (CO) o ambos (CIO): _____.

Número total de días que estuvo en tratamiento durante los últimos tres meses: _____.

22. Uso de otros agentes inmunomoduladores ⁽⁵⁾ en los últimos tres meses

--	--

(si responde Sí, especificar el agente): _____.

23. Uso de drogas con actividad antifúngica en los últimos tres meses ⁽⁶⁾

--	--

(si responde Sí, especificar):

Nombre del principio activo: _____.

Número de días en tratamiento: _____.

Dosis total: _____ gramos.

PRUEBAS Y ANÁLISIS REALIZADOS

	Realizada	No realizada
<p>25. Espirometría realizada en los meses previos:</p> <p>Si realizada:</p> <p>25.1. Fecha de realización (Día / Mes/ Año): _____</p> <p>25.2. FEV₁ (%) : _____</p> <p>25.3 FEV₁/FVC (%): _____</p> <p>25.4 Estadio GOLD: _____</p>		
<p>26. Análisis microbiológico del esputo:</p> <p>Si realizada:</p> <p>25.1. Fecha de realización (Día / Mes/ Año): _____</p> <p>25.2 Tipo de test: _____</p> <p>25.3 Identificación microbiana (Sí/No): _____</p> <p>Si la respuesta es Sí, especificar microorganismo:</p> <p>_____</p>		

PROCESAMIENTO/ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

	Yes	No	Nº muestras	Código ⁽⁷⁾
47. Esputo (SP)				
48. Lavado orofaríngeo (OW)				
49. Suero (SE)				

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES FÚNGICAS

	Positiva	Negativa
42. PCR de Esputo (ITS)		
43. Nested-PCR de Esputo (<i>P.jirovecii</i>)		
44. Nested-PCR de LOF (<i>P.jirovecii</i>)		
45. PCR Tiempo Real de Esputo (<i>P.jirovecii</i>)		
46. PCR Tiempo Real de LOF (<i>P.jirovecii</i>)		

Especificar especies identificadas

CUANTIFICACIÓN DE QUITOTRIOSIDASA (nmoles/ml/hora)

	Suero 1	Suero 2
Quitotriosidasa		

CUANTIFICACIÓN DE B-GLUCANO (pg/ml)

	Suero 1	Suero 2
b-glucano		

CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS (pg/ml)

	Suero 1	Suero 2
IL-1a		
IL-1b		
IL-2		
IL-6		
IL-8		
IL-10		
IL-12p70		
TNF-a		
INF-g		

NOTAS

¹ Usar EPOC- seguido por una numeración correlativa de tres dígitos (un número por cada sujeto incluido en el estudio). Por ejemplo: el cuarto paciente sería el número de caso EPOC-004.

² Espudo (SP), Lavado orofaríngeo (OW), Suero (SE).

³ Nombre y Apellidos

⁴ Exacerbación de la EPOC se define como un empeoramiento sostenido de la condición clínica del paciente que es de inicio agudo y requiere el uso de medicación para volver a la situación estable.

Estadio de la exacerbación de la EPOC:

- Leve: El paciente tiene una mayor necesidad de medicación, que él/ella puede manejar en su propio entorno normal

- Moderado: El paciente tiene una mayor necesidad de medicación y siente la necesidad de buscar ayuda médica adicional

- Severo: El paciente/cuidador reconoce un evidente y/o rápido deterioro de la condición clínica del paciente y se requiere hospitalización.

⁵ Incluye quimioterapia citotóxica.

⁶ Incluye pentamidina, dapsona, atovaquona, primaquine, clindamicina, pyrimethamine y macrólidos.

⁷ Número de caso/código de la muestra seguido de un número correlativo (uno para cada alícuota). Por ejemplo: la primera alícuota de esputo para el paciente 4 sería: Número del caso EPOC-004; Código de la muestra EPOC-004 SP-1.

ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE/DONANTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA PRESENTE EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.

La siguiente información describe el estudio a realizar y las consideraciones más importantes sobre las infecciones que frecuentemente afectan a sujetos con **Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)**.

Importancia:

La colonización persistente por patógenos bacterianos es uno de los factores que más contribuye al daño pulmonar y se han asociado al deterioro de la función pulmonar de estos pacientes. Pero, aunque son las bacterias los principales agentes infecciosos, algunos hongos pueden colonizar el tracto respiratorio de los pacientes con EPOC.

El **objetivo** de este estudio es aportar información sobre los diferentes microorganismos fúngicos que colonizan el tracto respiratorio de sujetos con EPOC e intentar determinar cómo los microorganismos presentes pueden condicionar la evolución de esta enfermedad.

Los **procedimientos** del estudio consisten en el análisis de una muestra de esputo y/o lavado orofaríngeo, donde se determinará la presencia de microorganismos y de la muestra de sangre, donde se medirán los niveles de marcadores inflamatorios. Por tanto, usted no recibirá tratamiento en caso que se detecten microorganismos no patogénicos. Si usted presentara alguna sintomatología o la evolución clínica hiciese sospechar que estos microorganismos le pueden estar causando algún problema de salud usted recibirá tratamiento antibiótico específico frente al mismo, y recibirá todos los cuidados médicos necesarios para el control de su enfermedad.

A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Usted ya se encuentra en seguimiento en esta Unidad del Servicio de Respiratorio y es revisado de forma periódica. Para realizar nuestro estudio sólo necesitamos una muestra de esputo y/o de lavado orofaríngeo y una muestra de sangre y no supondrá para usted ninguna actuación más de las que habitualmente se le realizan en las revisiones clínicas en esta Unidad.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal del laboratorio CIBERESP en el teléfono: 955923095 o en el correo electrónico: cdlhorra-ibis@us.es

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE/Donante

DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA PRESENTE EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.

Yo (Nombre y Apellidos):

.....

He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)

He recibido suficiente información sobre el estudio **DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA PRESENTE EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.**

He podido hacer preguntas sobre el estudio **DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA PRESENTE EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.**

He hablado con el profesional sanitario informador:

.....

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud.

Si

No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado **DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA FÚNGICA PRESENTE EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE SUJETOS CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.**

Firma del paciente/donante

Firma del profesional sanitario informador

Nombre y apellidos:.....
Fecha:

Nombre y apellidos:
Fecha: