

VALOR PRONÓSTICO DEL ESTUDIO DEL PERFIL DE MIRNAS EN LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

SILVIA VICENTE FERRER

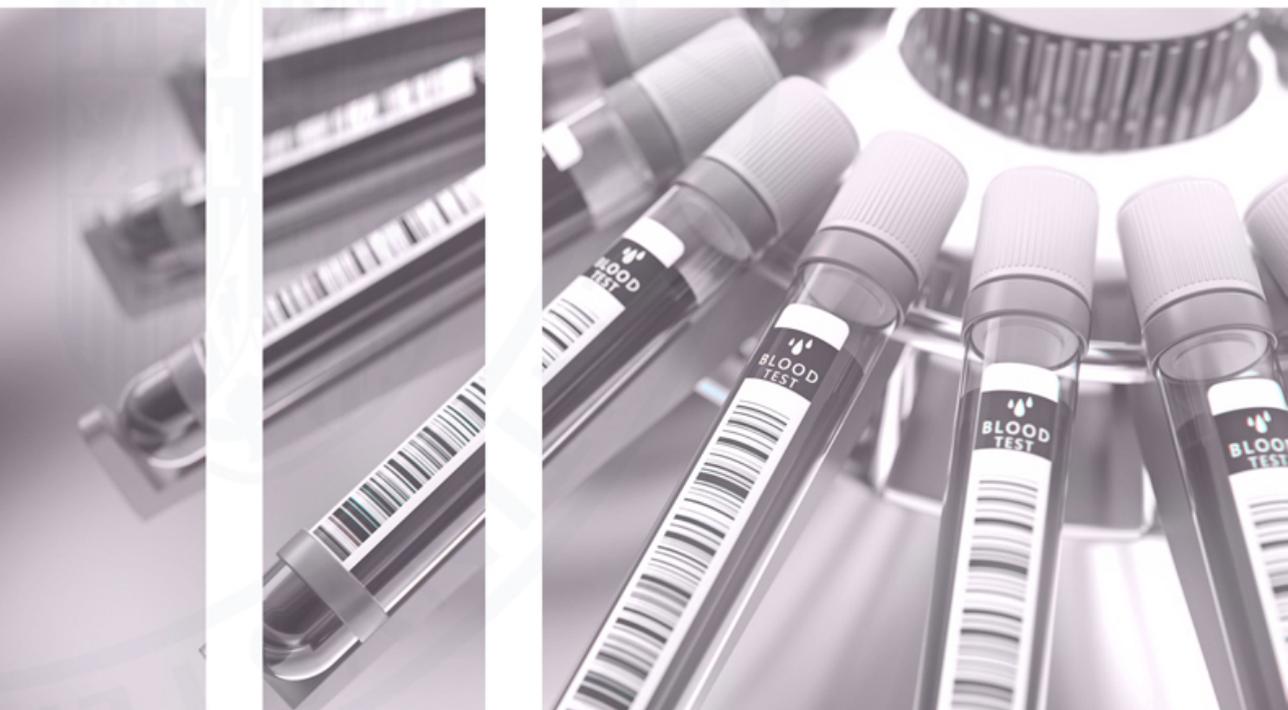
Tesis Doctoral

Dr. Francisco Dasí Fernández

Dra. Estrella Fernández Fabrellas

Dr. Francisco Sanz Herrero

Mayo 2021





DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO:
FISIOLÓGÍA (3127)

**VALOR PRONÓSTICO DEL ESTUDIO DEL PERFIL DE
MIRNAS EN LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA
COMUNIDAD.**

TESIS DOCTORAL

SILVIA VICENTE FERRER

Directores:

Dr. Francisco Dasí Fernández

Dra. Estrella Fernández Fabrellas

Dr. Francisco Sanz Herrero

Valencia, Febrero 2021

Francisco Dasí Fernández, doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Asociado Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València. Investigador del Sistema Nacional de Salud “Miguel Servet” de la Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia/Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA;

Estrella Fernández Fabrellas, doctora en Medicina, Profesora Asociada del Departamento de Medicina de UVEG y jefa del Servicio de Neumología del Consorci Hospital General universitario de València (CHGUV);

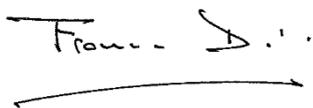
Y *Francisco Sanz Herrero*, doctor en Medicina y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y Médico adjunto del Servicio de Neumología del Consorci Hospital General Universitario de València (CHGUV).

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Valor pronóstico del estudio del perfil de miRNAs en la neumonía adquirida en la comunidad**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Silvia Vicente Ferrer, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 28 de Enero de 2021.

FIRMADO:



Prof. Dr. Francisco
Dasí Fernández



Prf^a Dra. Estrella Fernández
Fabrellas



Prof. Dr. Francisco Sanz
Herrero

*“La mente que se abre a una idea
jamás volverá a su tamaño original.”*

Albert Einstein

RESUMEN

ANTECEDENTES: La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) sigue siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad que, a menudo se diagnostica incorrectamente y se trata de manera inadecuada. La valoración de la gravedad de la NAC es una herramienta fundamental para la asistencia de estos pacientes, pudiendo estratificarlos según el riesgo, y, en su función, proporcionar la pauta de tratamiento más adecuada. Dos de las complicaciones más importantes de estos pacientes es el desarrollo de sepsis, así como de hipoxemia. Uno de los biomarcadores con mayor potencial en la actualidad son los microRNAs, que son pequeños fragmentos de RNA que regulan la expresión génica y están asociados con la patogénesis de numerosas enfermedades.

OBJETIVOS: Estudiar el perfil de expresión de una serie de microRNAs circulantes y asociarlo al desarrollo de futuras complicaciones derivadas de la NAC.

MÉTODOS: Se analizó el perfil de expresión de los microRNAs plasmáticos en un total de 223 pacientes diagnosticados con NAC, cuyas muestras fueron obtenidas durante las primeras 24 horas de su ingreso. Para ello se utilizó la RT-qPCR.

RESULTADOS: Los microRNAs son unos potenciales biomarcadores y una herramienta prometedora para mejorar el pronóstico de la NAC. La expresión de miR-122 está reducida en pacientes con sepsis, mientras que la de miR-574 está aumentada. La expresión de miR-150 está reducida en pacientes con hipoxemia. La sobreexpresión de miR-297 parece clave para el desarrollo de inflamación pulmonar, así como de la hipoxemia. Tanto la expresión de miR-223, como de miR-15a y miR-486 está reducida en pacientes que, según la escala de gravedad PSI se corresponderían como grupos de mayor riesgo.

CONCLUSIONES: El análisis del perfil de microRNAs plasmáticos en pacientes con NAC ha permitido establecer una firma genética que puede ser de gran utilidad de trasladarse a la práctica clínica, de cara al pronóstico de estos pacientes.

RESUM

ANTECEDENTS: La pneumònia adquirida a la comunitat (NAC) continua sent una important causa de morbimortalitat que sovint es diagnostica incorrectament i es tracta de manera inadequada. La valoració de la gravetat de la NAC és una eina fonamental per a l'assistència d'aquests pacients, podent estratificar-los segons el risc, i, en la seua funció, proporcionar la pauta clínica més adient. Dues de les complicacions més importants d'aquests pacients és el desenvolupament de sèpsia, així com de hipoxèmia. Un dels biomarcadors amb més potencial en l'actualitat són els microRNAs, que són petits fragments de RNA que regulen l'expressió gènica i estan associats amb la patogènesis de nombroses malalties.

OBJECTIUS: Estudiar el perfil d'expressió d'una sèrie de microRNAs circulants i associar-lo al desenvolupament de futures complicacions derivades de la NAC.

MÈTODES: Es va analitzar el perfil d'expressió dels microRNAs plasmàtics en un total de 223 pacients diagnosticats amb NAC, les mostres de les quals van ser obtingudes durant les primeres 24 hores del seu ingrés. La tècnica utilitzada va ser la RT-qPCR.

RESULTATS: Els microRNAs són uns potencials biomarcadors i una eina prometedora per millorar el pronòstic de la NAC. L'expressió de miR-122 està reduïda en pacients amb sèpsia, mentre que la de miR-574 està

augmentada. L'expressió de miR-150 està reduïda en pacients amb hipoxèmia. La sobreexpressió de miR-297 sembla clau per al desenvolupament d'inflamació pulmonar, així com de la hipoxèmia. Tant l'expressió de miR-223, com de miR-15a i miR-486 està reduïda en pacients que, segons l'escala de gravetat PSI es correspondrien com a grups de més risc.

CONCLUSIONS: L'anàlisi del perfil de microRNAs plasmàtics en pacients amb NAC ha permès establir una signatura genètica que pot ser de gran utilitat de traslladar-se a la pràctica clínica, de cara al pronòstic d'aquest pacients.

ABSTRACT

BACKGROUND: Community acquired pneumonia (CAP) remains a major cause of morbidity and mortality that is often misdiagnosed and inadequately treated. The assessment of the severity of CAP is a fundamental tool for the care of these patients, allowing them to be stratified according to risk, and, provide the most appropriate treatment regimen accordingly. Two of the most important complications in these patients are the development of sepsis, as well as hypoxemia. One of the biomarkers with the greatest potential today are microRNAs, which are small RNA fragments that regulate gene expression, and are associated with the pathogenesis of numerous diseases.

OBJECTIVES: To study the expression profile of a series of circulating microRNAs and link it with the development of future complications derived from CAP.

METHOD: The expression profile of plasma microRNAs was analyzed in a total of 223 patients diagnosed with CAP, whose samples were obtained during the first 24 hours after admission. For this analysis, RT-qPCR was used.

RESULTS: MicroRNAs are potential biomarkers and a promising tool to improve the prognosis of CAP. The expression of miR-122 is reduced in patients with sepsis, while that of miR-574 is increased. The expression of miR-150 is reduced in patients with hypoxemia, while the overexpression of miR-297 seems key to the development of lung inflammation, as well as hypoxemia. Finally, the expression of miR-223, as well as miR-15a and miR-486 are reduced in patients who, according to the PSI severity scale, would correspond to higher risk groups.

CONCLUSIONS: The analysis of the plasma microRNA profile in patients with CAP has made it possible to establish a genetic signature that can be very useful if transferred to clinical practice, regarding the prognosis of these patients.

ABREVIATURAS

abreviaturas

AGO	Argonauta (proteínas catalíticas)
AIC	Criterio de Información de Akaike
BIFAP	Base de datos para la Investigación Farmacoepidemiológica en Atención Primaria
BMRII	Biomarcadores de Respuesta Inflamatoria e Infecciosa
cDNA	DNA complementario
CEIM	Comité Ético de Investigación Médica
CHGUV	Consorci Hospital General Universitari de València
DD	Dímero D
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
endo-siRNA	<i>Endogenous Short Intrerfering RNAs</i>
ET-1	Endotelina-1
FiO₂	Fracción de Oxígeno Inspirado
HCUV	Hospital Clínic Universitari de València
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
H₀	Hipótesis nula
hspCr	Proteína C Reactiva de Alta Sensibilidad
IL	Interleucinas
Kb	Kilobase
MHV68	γ-Herpesvirus Murino 68
MR-proADM	Región Medial de la Proadrenomedulina
mRNA	RNA mensajero
NAC	Neumonía Adquirida en la Comunidad
NAV	Neumonía Asociada al Ventilador

A B R E V I A T U R A S

NATs	Transcritos Antisentido Naturales
ncRNA	RNA no codificante
rRNA	RNA ribosómico
NN	Neumonía Nosocomial
nt	Nucleótido
MCB	Cuerpos Multivesiculares
OMS	Organización Mundial de la Salud
PaCO₂	Presión Parcial de Dióxido de Carbono
PaO₂	Presión de Oxígeno en sangre arterial
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pCr	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
PORT	<i>Pneumonia Outcomes Research Team</i>
pre-miRNAs	Precursor del microRNA
pre-tRNA	Precursor de RNA de transferencia
pri-miRNA	Transcripción primaria del microRNA
proBNP	Péptido Natriurético Auricular de tipo B
Proet-1	Proendotelina 1
PSI	Índice de la Severidad de la Neumonía
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa o retrotranscripción
SaO₂	Saturación Arterial de Oxígeno
snoRNA	Pequeño RNA nucleolar
TC	Tomografía computarizada
THIN	<i>The Health Improvement Network</i>

ABREVIATURAS

tRNA	RNA de transferencia
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UDPV	Usuario de Drogas por Vía Parenteral
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
XPO5	Exportina 5

ÍNDICE

1. Introducción.....	33
1.1. Neumonía adquirida en la comunidad	34
1.1.1. Epidemiología de la NAC	36
1.1.1.1. Incidencia.....	36
1.1.1.2. Mortalidad	39
1.1.2. Etiología de la NAC.....	40
1.1.3. Factores de riesgo	42
1.1.4. Diagnóstico clínico	43
1.1.4.1. Manifestaciones clínicas y etiología de la neumonía	43
1.1.4.2. Estudios iniciales	47
1.1.4.2.1. Signos y síntomas	47
1.1.4.2.2. Marcadores biológicos	49
1.1.4.2.3. Evaluación del oxígeno arterial: pulsioximetría y oximetría	55
1.1.4.3. Estudios de imagen.....	56
1.1.4.3.1. Radiografía de tórax	56
1.1.4.3.2. Tomografía computarizada	57
1.1.4.3.3. Ecografía torácica	57
1.1.4.3. Estudios microbiológicos	58
1.1.4.3.1. Tinción de Gram y cultivo del esputo.....	59
1.1.4.3.2. Hemocultivo.....	60
1.1.4.3.3. Técnicas de diagnóstico molecular: Reacción en cadena de la polimerasa	60
1.1.4.3.4. Detección de antígenos en orina	61
1.1.5. Valoración pronóstica y estratificación del riesgo ..	62

1.1.6. Uso combinado de las escalas de riesgo y los biomarcadores.....	66
1.2. MicroRNA	68
1.2.1. Historia de los microRNAs	68
1.2.2. Organización genómica de los microRNAs	70
1.2.3. Biogénesis de los microRNAs	71
1.2.3.1. Biogénesis Drosha/DGCR8-dependiente y Dicer-independiente	75
1.2.3.1.1. Simtrons	75
1.2.3.1.1. miR-451	76
1.2.3.2. Biogénesis Drosha/DGCR8- independiente y Dicer-dependiente	76
1.2.3.2.1. Mirtrons	77
1.2.3.2.2. Endo-siRNAs	79
1.2.3.2.3. Sno-RNAs	80
1.2.3.2.4. miR-320 y mir-484	80
1.2.3.2.5. pre-tRNA	80
1.2.3.3. Biogénesis Drosha/DGCR8-indep. y Dicer-indep.: Agotrons.....	81
1.2.3. Mecanismos de regulación de la expresión génica de los microRNAs	83
1.2.4. Nomenclatura de los microRNAs	87
1.2.5. MicroRNAs circulantes.....	88
1.2.6. Desequilibrio de microRNAs y enfermedad.....	91
1.2.6.2. MicroRNAs circulantes en patologías respiratorias	91
1.2.6.1. MicroRNAs circulantes en enfermedades infecciosas	95
1.2.7. MicroRNAs como potenciales biomarcadores	98

2. Justificación del estudio, Hipótesis y Objetivos	101
2.1. Justificación del estudio.....	102
2.2. Hipótesis	102
2.3. Objetivos	103
3. Material y Métodos	105
3.1. Descripción, ámbito y duración del estudio.....	106
3.1.1. Descripción	106
3.1.2. Ámbito	106
3.1.3. Duración del estudio	106
3.2. Pacientes.....	107
3.2.1. Reclutamiento.....	107
3.2.2. Criterios de inclusión	107
3.2.3. Criterios de exclusión	107
3.3. Diseño del estudio.....	108
3.3.1. Variables analizadas	108
3.3.1.1. Datos demográficos	108
3.3.1.2. Hábitos tóxicos y comorbilidades.....	108
3.3.1.3. Manifestaciones clínicas	110
3.3.1.4. Valoración de la gravedad de la neumonía.....	110
3.3.1.5. Variables analíticas y radiológicas	111
3.3.1.6. Desenlaces	112
3.3.2. Protocolo de trabajo	113
3.3.2.1. Recogida de plasma y aislamiento de los microRNAs plasmáticos	113
3.3.2.2. Determinación del perfil de expresión de los microRNAs plasmáticos.....	114
3.3.3. Análisis estadístico	119

3.3.3.2. Comparación de variables categóricas	119
3.3.3.2. Comparación de las medias de dos poblaciones.....	121
3.4. Aspectos éticos	122
4. Resultados.....	123
4.1. Clínica vs. evolución	124
4.2. Análisis cualitativo de la expresión de los microRNAs.....	128
4.2.1. Modelo predictivo de microRNAs vs. Variables.....	128
4.2.1.1. Modelo predictivo de microRNAs para la clasificación en la escala de riesgo PSI.....	129
4.2.1.2. Modelo predictivo de microRNAs para la evolución desfavorable	131
4.2.1.3. Modelo predictivo de microRNAs para el desarrollo de sepsis grave.....	132
4.2.1.4. Modelo predictivo de microRNAs para el desarrollo hipoxemia	133
4.2.2. Modelo predictivo de microRNAs + clínica vs. Variables	135
4.2.2.1. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para clasificación en grupo de riesgo PSI IV-V	136
4.2.2.2. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para evolución desfavorable	138
4.2.2.3. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para desarrollo de sepsis.....	140
4.2.2.4. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para desarrollo de hipoxemia.....	143
4.2.2.5. Síntesis de los modelos obtenidos tras el análisis cualitativo y la clínica.....	145
4.3. Análisis cuantitativo de la expresión de los microRNAs	147

4.3.1. MicroRNAs vs. escala de gravedad	147
4.3.2. MicroRNAs vs. evolución	155
4.3.3. MicroRNAs vs. sepsis grave	161
4.3.4. MicroRNAs vs. hipoxemia	169
4.2.5. Síntesis de los resultados obtenidos tras el análisis cuantitativo de los resultados	175
4.4. Compilación de los resultados	177
5. Discusión	179
5.1. Necesidad de nuevos biomarcadores: ¿Qué aportan los microRNAs?.....	180
5.2. Relación entre los microRNAs del estudio y las variables	184
5.3. Consecuencias en la práctica clínica de los resultados obtenidos	197
5.4. Limitaciones del estudio	198
5.5. Fortalezas del estudio	200
6. Conclusiones	203
7. Referencias	207
8. Trabajos derivados	233
8.1. Comunicaciones científicas	234
8.2. Proyectos de investigación financiados	235
9. Anexos	237
<i>Anexo I. Cuaderno de recogida de datos y variables a analizar</i>	238
<i>Anexo II. Información de los microRNAs incluidos en el estudio ..</i>	249
<i>Anexo III. Hoja de información al paciente y consentimiento del proyecto de investigación</i>	250

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Distribución de las posibles etiologías en la NAC.....</i>	41
Tabla 2. <i>Microorganismos responsables de NAC y su correlación con características clínicas y epidemiológicas específicas.....</i>	44
Tabla 3. <i>Parámetros y puntuación de la escala de gravedad de neumonía PSI o Fine.....</i>	63
Tabla 4. <i>Clasificación por categorías de escala PSI, puntuación y probabilidad de muerte a los 30 días.....</i>	64
Tabla 5. <i>Parámetros y puntuación de la escala de gravedad de neumonía CURB-65.....</i>	64
Tabla 6. <i>Clasificación CURB-65, puntuación y probabilidad de muerte a los 30 días.....</i>	65
Tabla 7. <i>MicroRNAs implicados en procesos fisiológicos del pulmón.....</i>	93
Tabla 8. <i>MicroRNAs implicados en procesos patológicos del pulmón.....</i>	94
Tabla 9. <i>microRNAs incluidos en el estudio y microRNAs normalizadores.....</i>	117
Tabla 10. <i>Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.....</i>	124
Tabla 11. <i>Regresión logística del modelo óptimo para la predicción de la clasificación en la escala de gravedad PSI IV-V en función de la expresión o no de los microRNAs.....</i>	129
Tabla 12. <i>Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de los microRNAs del modelo óptimo.....</i>	130
Tabla 13. <i>Regresión logística del modelo óptimo para la predicción de la evolución desfavorable en función de la expresión o no de los microRNAs.....</i>	131

Tabla 14 <i>Odds ratio, Intervalo de confianza y p_valor de los microRNAs del modelo óptimo.....</i>	132
Tabla 15. <i>Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de sepsis grave en función de la expresión o no de los microRNAs.</i>	132
Tabla 16. <i>Odds ratio, Intervalo de confianza y p_valor de los microRNAs del modelo óptimo.....</i>	133
Tabla 17. <i>Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de hipoxemia en función de la expresión o no de los microRNAs.</i>	134
Tabla 18. <i>Odds ratio, Intervalo de confianza y p_valor de los microRNAs del modelo óptimo.....</i>	134
Tabla 19. <i>Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del grupo de riesgo PSI IV-V en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.....</i>	136
Tabla 20. <i>Odds ratio, Intervalo de confianza y p_valor de las variables del modelo óptimo.....</i>	137
Tabla 21. <i>Regresión logística del modelo óptimo para la predicción de la evolución desfavorable en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.</i>	138
Tabla 22. <i>Odds ratio, Intervalo de confianza y p_valor de las variables del modelo óptimo.....</i>	140
Tabla 23. <i>Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de sepsis grave en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.</i>	141
Tabla 24. <i>Odds ratio, Intervalo de confianza y p_valor de las variables del modelo óptimo.....</i>	142

Tabla 25. *Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de hipoxemia en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.....* 144

Tabla 26. *Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de las variables del modelo óptimo.....* 145

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Tasa de Incidencia de NAC por trimestre. BIFAP/THIN</i>	37
Figura 2. <i>Tasa de Incidencia de NAC por edad y sexo y porcentaje de ingresos por NAC por edad y sexo</i>	38
Figura 3. <i>Clasificación de las diferentes pruebas para el diagnóstico clínico de la NAC</i>	47
Figura 4. <i>Secuencias conservadas en la región 3'UTR de lin-14 y su complementariedad con el RNA de menor tamaño de lin-4</i>	69
Figura 5. <i>Estructura típica de un precursor de microRNA</i>	71
Figura 6. <i>Esquema del procesamiento de los microRNAs según la ruta canónica</i>	72
Figura 7. <i>La ruta canónica de biogénesis de microRNAs</i>	73
Figura 8. <i>Rutas de biogénesis de microRNAs alternativas o no canónicas</i>	74
Figura 9. <i>MicroRNAs cuyo proceso de biogénesis es dependiente de Drosha/DGCR8 e independiente de Dicer</i>	75
Figura 10. <i>MicroRNAs cuyo proceso de biogénesis es independiente de Drosha pero dependiente de Dicer</i>	77
Figura 11. <i>Esquema de la biogénesis canónica frente a la biogénesis de mirtron convencional la de mirtron con cola</i>	78
Figura 12. <i>Funciones propuestas de los agotrons</i>	82
Figura 13. <i>Representación esquemática que muestra que: (A) un mismo microRNA puede interactuar de manera específica con diferentes mRNAs diana y a su vez (B) un mismo mRNA puede estar regulado por diferentes microRNAs</i>	84
Figura 14. <i>Tipos de reconocimiento microRNA-mRNA</i>	85
Figura 15. <i>Modos de silenciamiento de un microRNA en función del grado de complementariedad con el mRNA</i>	86

Figura 16. <i>Mecanismos de liberación de microRNAs al espacio extracelular</i>	90
Figura 17. <i>Implicación de microRNAs descritos en procesos fisiológicos y patológicos del pulmón</i>	92
Figura 18. <i>Protocolo de extracción del RNA utilizando el kit mirVana™ PARÍS™</i>	114
Figura 19. <i>Vista general de los pasos principales de la RT-PCR según la guía de uso TaqMan™ Fast Advanced Master Mix</i>	115
Figura 20. <i>Esquema de la reacción de RT-PCR a según la guía de uso de TaqMan™ Advanced miRNA Assays</i>	116
Figura 21. <i>Esquema de la reacción de qPCR según la guía de uso TaqMan™ Fast Advanced Master Mix</i>	118
Figura 22. <i>Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs de la clasificación en el grupo de riesgo PSI IV-V, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza</i>	130
Figura 23. <i>Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs de la evolución desfavorable, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza</i>	131
Figura 24. <i>Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs del desarrollo de sepsis grave, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza</i>	133
Figura 25. <i>Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs del desarrollo de hipoxemia, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza</i>	134

Figura 26. <i>Conjunto de variables clínicas seleccionadas para estudiar su relación con las variables de estudio y los microRNAs.</i>	135
Figura 27. <i>Variables clínicas y microRNAs vs. grupo de riesgo PSI IV-V</i>	136
Figura 28. <i>Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas del grupo de riesgo PSI IV-V, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.</i>	137
Figura 29. <i>Variables clínicas y microRNAs vs. evolución desfavorable</i>	138
Figura 30. <i>Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas de la evolución desfavorable, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.</i>	139
Figura 31. <i>Variables clínicas y microRNAs vs. desarrollo de sepsis grave</i>	141
Figura 32. <i>Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas del desarrollo de sepsis grave representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza</i>	142
Figura 33. <i>Variables clínicas y microRNAs vs. desarrollo de hipoxemia</i>	143
Figura 34. <i>Gráfico que recoge de los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas del desarrollo de hipoxemia, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza</i>	144
Figura 35. <i>Resumen de los resultados hasta el momento</i>	146

Figura 36. *Expresión del miR-486 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 148*

Figura 37. *Expresión del miR-182 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 148*

Figura 38. *Expresión del miR-150 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 149*

Figura 39. *Expresión del miR-342 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 149*

Figura 40. *Expresión del miR-223 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo. 150*

Figura 41. *Expresión del miR-499a frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 150*

Figura 42. *Expresión del miR-122 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 151*

Figura 43. *Expresión del miR-15a frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo.. 151*

Figura 44. *Expresión del miR-574 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 152*

Figura 45. *Expresión del miR-291 frente a la variable escala de riesgo y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 152

Figura 46. *Representación de la expresión de miR-486 frente a la variable “escala de riesgo” en función de la media y la SEM, y curva ROC* 153

Figura 47. *Representación de la expresión de miR-223 frente a la variable “escala de riesgo” en función de la media y la SEM, y curva ROC* 154

Figura 48. *Representación de la expresión de miR-15a frente a la variable “escala de riesgo” en función de la media y la SEM, y curva ROC* 155

Figura 49. *Expresión del miR-486 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 156

Figura 50. *Expresión del miR-182 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 156

Figura 51. *Expresión del miR-150 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 157

Figura 52. *Expresión del miR-342 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 157

Figura 53. *Expresión del miR-223 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 158

Figura 54. *Expresión del miR-499a frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación*

<i>estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	158
Figura 55. <i>Expresión del miR-122 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	159
Figura 56. <i>Expresión del miR-15a frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	159
Figura 57. <i>Expresión del miR-574 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	160
Figura 58. <i>Expresión del miR-297 frente a la variable evolución y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	160
Figura 59. <i>Expresión del miR-486 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	161
Figura 60. <i>Expresión del miR-182 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	162
Figura 61. <i>Expresión del miR-150 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	162
Figura 62. <i>Expresión del miR-342 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	163
Figura 63. <i>Expresión del miR-223 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo</i>	163

Figura 64. *Expresión del miR-499a frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 164

Figura 65. *Expresión del miR-122 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 164

Figura 66. *Expresión del miR-15a frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 165

Figura 67. *Expresión del miR-574 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 165

Figura 68. *Expresión del miR-297 frente a la variable sepsis grave y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 166

Figura 69. *Representación de la expresión de miR-182 frente a la variable “sepsis grave” en función de la media y la SEM, y curva ROC* 167

Figura 70. *Representación de la expresión de miR-122 frente a la variable “sepsis grave” en función de la media y la SEM, y curva ROC* 168

Figura 71. *Representación de la expresión de miR-574 frente a la variable “sepsis grave” en función de la media y la SEM, y curva ROC* 168

Figura 72. *Expresión del miR-486 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo* 169

Figura 73. *Expresión del miR-182 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 170*

Figura 74. *Expresión del miR-150 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 170*

Figura 75. *Expresión del miR-342 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 171*

Figura 76. *Expresión del miR-223 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 171*

Figura 77. *Expresión del miR-499a frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 172*

Figura 78. *Expresión del miR-122 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 172*

Figura 79. *Expresión del miR-15a frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 173*

Figura 80. *Expresión del miR-574 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo 173*

Figura 81. *Expresión del miR-297 frente a la variable hipoxemia y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha) 174*

Figura 82. *Representación de la expresión de miR-150 frente a la variable “hipoxemia” en función de la media y la SEM, y curva ROC..*
..... 175

Figura 83. *Resumen de los resultados a partir de los valores de expresión de los microRNAs* 176

Figura 84. *Resultados finales tras combinar la información obtenida tanto de los análisis cuantitativos, como de los modelos cualitativos resultantes de analizar las variables frente a los microRNAs y los datos clínicos seleccionados.....* 178

1.

Introducción

introducción

1.1. Neumonía adquirida en la comunidad

Hace más de 100 años que Sir William Osler definió la neumonía como “La más extendida y mortal de todas las enfermedades infecciosas agudas, neumonía, es ahora “el Capitán de los Hombres de la Muerte “. Desde entonces el desarrollo de medidas higiénicas, el avance de la microbiología y el descubrimiento de la antibioterapia disminuyeron, pero no eliminaron la mortalidad por neumonía. En los siguientes años queda todavía por mejorar las medidas de soporte y aumentar la precisión de las herramientas predictivas, especialmente de los biomarcadores.

La neumonía es un proceso inflamatorio agudo del parénquima pulmonar caracterizado por una exudación e infiltración celular en los alveolos y en el intersticio, provocadas normalmente por la proliferación de microorganismos patógenos que acceden al pulmón. En la mayoría de los casos estos microorganismos acceden al órgano por vía inhalatoria, sin embargo también es posible que lo hagan por aspiración o diseminación hematógena desde un foco séptico a otro nivel, siendo estas dos últimas vías de menor frecuencia (1).

Según el lugar y la forma de aparición, las neumonías suelen clasificarse en **nosocomiales** (o intrahospitalarias) y en **adquiridas en la comunidad** (o extrahospitalarias).

Las neumonías nosocomiales (en adelante NN) son aquellas ausentes en el momento del ingreso hospitalario y que se desarrollan a partir de las 48 horas del mismo, por lo que afectan generalmente a pacientes que ya están enfermos y a menudo inmunodeprimidos. Además, en este tipo de neumonías los agentes implicados tienen una mayor virulencia además de

un mayor riesgo de desarrollo de resistencias, y afectan al 0,5-1% de los pacientes hospitalizados (2). Dentro de las NN, se denomina neumonía asociada al ventilador (en adelante NAV) a aquellas que inciden en pacientes con vía aérea artificial, y que llegan a representar más del 80% de las neumonías adquiridas en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). De este modo, mientras que la NN es por su frecuencia la segunda infección de origen hospitalario, la NAV es la infección nosocomial más frecuente en la UCI (3).

En cuanto al segundo tipo de neumonías, las denominadas adquiridas en la comunidad (en adelante NAC) constituyen el tipo de neumonía más frecuente y se definen como aquellas de origen extrahospitalario, agrupándose por tanto aquellas infecciones del parénquima pulmonar desarrolladas en el seno de la población general, con la intención de separarlas de las que afectan a individuos ingresados en hospitales, expuestos a una flora microbiana distinta. Por otro lado, también quedan fuera de este grupo los pacientes inmunodeprimidos a pesar de contraer neumonía en un ambiente extrahospitalario debido a que su inmunodepresión los hace vulnerables a patógenos que muy poco frecuentemente atacarían a un individuo sano (4). A modo de resumen, la NAC se definiría por tanto como aquella neumonía que afecta a personas que conviven en comunidad o bien a un paciente en las primeras 48 horas de su ingreso en el centro hospitalario, excluyendo a los pacientes dados de alta hospitalaria en los 7-14 días previos al comienzo de los síntomas, así como aquellos que han tenido relación en los meses previos al sistema de salud (5).

1.1.1. Epidemiología de la NAC

La NAC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población tanto en el momento del episodio como en los meses sucesivos al evento (6). Actualmente en torno al 40% de los pacientes con NAC requieren ingreso hospitalario, el 75% si se trata de pacientes mayores de 65 años. Además, según estudios españoles y británicos, entre el 1,2 y el 10% de los pacientes hospitalizados por NAC precisan ingreso en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), porcentaje que parece aumentar progresivamente en los últimos años (7). Todo ello supone un gasto sanitario global muy elevado, especialmente en lo que respecta a los gastos de hospitalización, los cuales implican más de un 90% del coste total.

Debido a que la NAC no es una enfermedad de declaración obligatoria, y a que puede tratarse de manera ambulatoria en muchas ocasiones, resulta difícil determinar su incidencia. Por este motivo, la incidencia reportada de la NAC ha sido muy variable en función del diseño de los estudios, la población diana y la localización geográfica.

1.1.1.1. Incidencia

Concretamente, en el territorio español se estima una incidencia anual de 1,6-10 episodios/1.000 habitantes, en los que se objetiva un claro aumento de la incidencia en pacientes por encima de los 75 años en los diferentes estudios realizados (8-10). Diversos estudios sitúan la incidencia de la NAC en el Reino Unido entre 1-4,7 episodios/1.000 habitantes/año (11,12), siendo mayor en Alemania donde se estiman entre 3,7-10 episodios/1.000 habitantes/año (13,14). Es en Finlandia donde se sitúa la incidencia más elevada de Europa, con un total de 11,6 episodios/1.000 habitantes/año (15).

Además, tal y como se muestra en la Figura 1, tiene un predominio en la época invernal, presentándose más casos en el primer trimestre en comparación con el resto del año, según un estudio llevado a cabo por Chacón García *et al.* en el que utilizaron la información recogida por la Base de datos para la Investigación Farmacoepidemiológica en atención primaria (BIFAP) así como en la base de datos en atención primaria del Reino Unido THIN (*The Health Improvement Network*) (16).

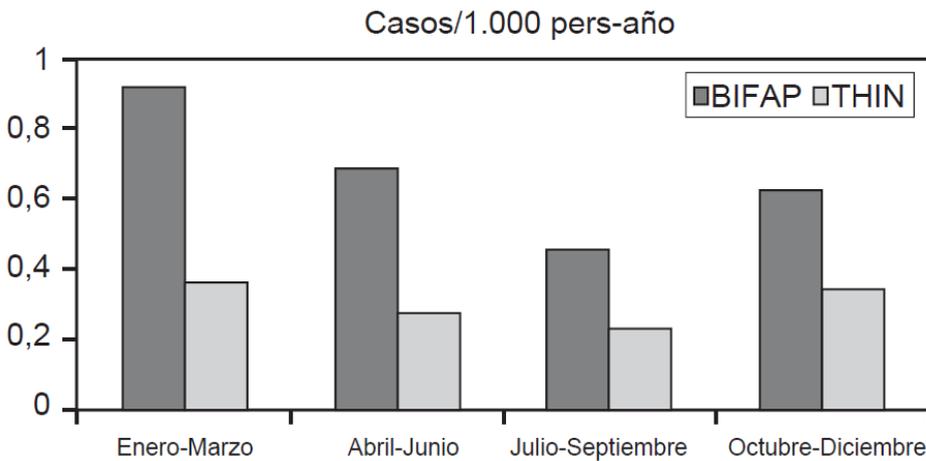


Figura 1. Tasa de Incidencia de NAC por trimestre. BIFAP/THIN Tomada de Chacón García *et al.* (16)

Por otro lado, está también demostrada su mayor relevancia en hombres frente a mujeres, como puede apreciarse en la Figura 2, especialmente a partir de los 65 años, así como en la infancia, período que no se muestra en las gráficas pero que también es especialmente vulnerable.

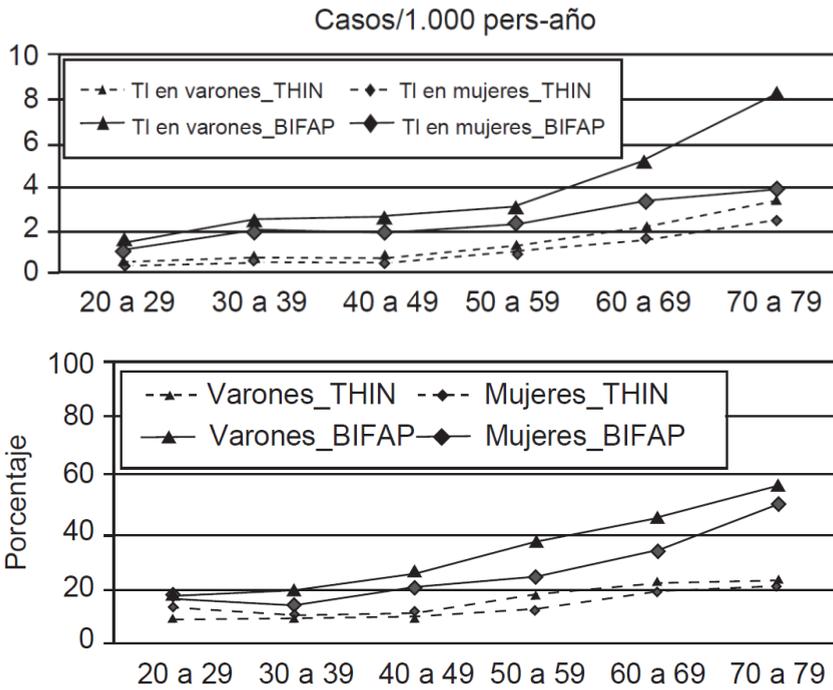


Figura 2. Tasa de Incidencia de NAC por edad y sexo (arriba) y porcentaje de ingresos por NAC por edad y sexo (abajo). BIFAP/THIN. Tomada de Chacón García et al. (16)

Como se ha mencionado anteriormente, la incidencia de la NAC, especialmente de aquellas causadas por neumococo, se acentúa y tiene mayor relevancia en los grupos de edad comprendidos en ambos extremos de la vida, siendo por tanto los grupos más vulnerables los niños, especialmente los menores de 5 años, y los adultos mayores de 65 años. Por lo que respecta al primero de los grupos de mayor riesgo, que agruparía las edades comprendidas entre 1 mes y 14 años, la neumonía supone una de las infecciones más frecuentes y una importante causa de muerte durante esta etapa, especialmente en los países en vías de desarrollo. En estos países la incidencia de la neumonía es inversamente proporcional a la edad, situándose para los menores de 5 años entre 30-45 episodios/1.000

niños <5/año, etapa en la que, junto con los adultos mayores de 75-80 años, tiene la mayor incidencia. Así pues, los casos anuales para los niños de edades comprendidas entre 5 y 9 años, así como para los mayores de esta edad, se sitúan entre 16-20 episodios/1.000 niños_{5-9años} y 6-12 episodios/1.000_{>9años} (17,18). Estos datos se incrementan aún más para los niños de países en vías de desarrollo, en los cuales la frecuencia de la NAC es de 2 a 10 veces mayor que en los países desarrollados (19,20).

En cuanto al segundo de los grupos de mayor riesgo, los mayores de 65 años, la neumonía supone la cuarta causa de muerte, y la primera si sólo se consideran las enfermedades infecciosas (21). En esta etapa la incidencia de la NAC se incrementa drásticamente con la edad (Figura 2), de manera que si en pacientes de entre 65 y 69 años se sitúa en una media de 18,2 casos/1.000 habitantes_{65-69/año}, en pacientes mayores de 85 años se estima una incidencia anual de 52,3 casos/1000 habitantes₈₅ (22). Así mismo, la neumonía es la tercera causa más común de hospitalización en personas mayores de 65 años, lo cual es alarmante si se considera que en el año 2050 aproximadamente el 20% de la población mundial superará esta edad (23,24).

1.1.1.2. Mortalidad

Por lo que respecta a la mortalidad asociada a la NAC, parece claro que es baja para los que precisan tratamiento ambulatorio, situándose por debajo del 1%. Por el contrario, los datos de aquellos que precisan asistencia hospitalaria son muy variables, llegando a alcanzar hasta el 48% en distintas zonas de un mismo país (25) dependiendo de las series, el nivel donde se atiende al paciente (entre el 5,7 y el 14% en los hospitalizados y del 34 al 50% en los ingresados en la UCI), de las comorbilidades que

presentan, de la existencia de un ingreso previo reciente o de la propia gravedad de la NAC, entre otros, y muy especialmente de la edad (26). Una vez más, la edad es un factor determinante de las tasas de mortalidad, llegando a ser, según los estudios realizados (27,28), hasta 5 veces mayor en el caso de un paciente por encima de 80 años frente a un paciente menor de 50 años. A su vez, la tasa de mortalidad se incrementa de manera considerable al incluir el periodo inmediato posterior al ingreso, situándose en torno al 8% a los 90 días, al 21% al año y al 3% a los 5 años (26).

1.1.2. Etiología de la NAC

En general, el diagnóstico etiológico de las NAC no supera el 40-60% de los casos, dependiendo de la estratificación de riesgo del proceso (tratamiento ambulatorio, hospitalización, requerimiento de ingreso en un UCI) (5); de hecho en los casos de neumonía leve, en general tratada fuera del hospital, en muy pocas ocasiones está indicado establecer su causa.

Así mismo, la prevalencia de los diferentes microorganismos causantes de neumonía varía también según la edad, los criterios diagnósticos utilizados, las pruebas empleadas o la presencia de diferentes comorbilidades (26). Hay que tener en cuenta pues, que el porcentaje de casos cuyo agente causal es desconocido es muy elevado; no obstante, en los todos estudios llevados a cabo, y en la práctica totalidad de los países, sigue siendo *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) el agente etiológico más frecuente, seguido por *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), si bien su frecuencia de hallazgo puede depender de si el estudio se ha realizado en años epidémicos o no. Así pues, en pacientes ingresados en UCI son más frecuentes las neumonías causadas por

Staphylococcus aureus, *Legionella* spp. y neumococo resistente. Por otra parte, la identificación de microorganismos atípicos (*M. pneumoniae*, *Legionella* spp., *Chlamydophila psittaci* y *Coxiella burnetii*. En la Tabla 1 se muestra la distribución de las posibles etiologías en la NAC según dónde tiene lugar la infección. (29).

Tabla 1. Distribución de las posibles etiologías en la NAC.

Microorganismo	Comunidad %	Hospital, %	UCI, %
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14	25	17
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16	6	
Virus	15	10	4
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	12	3	
<i>Legionella</i> spp.	2	3	10
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	5	3
Bacilos entéricos gramnegativos			5
<i>Staphylococcus aureus</i>			5
No identificados	44	37	41

Fuente: Normativa SEPAR (29)

S. pneumoniae es, como ya se ha indicado en líneas anteriores, el patógeno más habitual en cualquiera de los niveles de gravedad, sin embargo, se señalan también diferentes agentes etiológicos en función del índice de gravedad de NAC reportado en cada caso. De este modo, las bacterias atípicas parecen presentarse significativamente con más frecuencia en casos de NAC con índices de gravedad más bajos (neumonías leves de atención ambulatoria). Sin embargo, parece ocurrir lo contrario con la presencia de enterobacterias y bacilos gramnegativos, asociados a NAC de mayor gravedad y que afecta a pacientes con importantes comorbilidades.

1.1.3. Factores de riesgo

En cuanto a los factores de riesgo, así como a la asociación entre diferentes comorbilidades y gérmenes causantes de NAC, muchos han sido los estudios llevados a cabo al respecto. Uno de los más recientes, el realizado por Almirall *et al.* en 2017, establece como factores de riesgo definitivos los siguientes: la edad, el tabaquismo, la exposición ambiental, la desnutrición, la NAC previa, la bronquitis crónica/EPOC, el asma, el deterioro funcional, la mala salud dental, la terapia inmunosupresora, los esteroides orales y el tratamiento con fármacos supresores del ácido gástrico. En cuanto a otros factores, como el género, el sobrepeso, el consumo de alcohol, las infecciones recientes del tracto respiratorio, la vacunación antineumocócica y antigripal, la terapia de inhalación, los trastornos de la deglución, la disfunción renal y hepática, la diabetes o el cáncer, los resultados de este estudio no permitieron obtener una conclusión definitiva sobre su papel como factor de riesgo y por tanto su asociación con una mayor incidencia de NAC (30).

Hay estudios enfocados a demostrar la asociación entre diferentes comorbilidades y gérmenes causantes de NAC, sin embargo, a pesar de que en muchos casos la variabilidad de los resultados es elevada y poco concluyente, algunas de las relaciones son significativas. El estudio llevado a cabo en 2009 por Falguera *et al.* muestra la relación entre la presencia de EPOC, la utilización de corticoides, la taquipnea al ingreso y el uso previo de antibióticos con la NAC por bacilos gramnegativos (31), por otro lado menos frecuentes en pacientes mayores, en los que la NAC por aspiración y por *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) se dan con mayor prevalencia. Además, el estudio llevado a cabo en el mismo año por Kallen *et al.* confirman la asociación entre infección por virus Influenza y neumonía por

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)(32), siendo el factor de mayor relevancia para desarrollar una neumonía por este microorganismo. El antecedente de infección viral previa se recoge en prácticamente la mitad de los pacientes, y en un tercio de estos la infección está causada por el virus Influenza. Otros estudios relacionan los casos de NAC que tienen como agente causal *M. pneumoniae* con pacientes jóvenes, cuadros clínicos más leves y brotes microepidémicos (33).

1.1.4. Diagnóstico clínico

La historia clínica del paciente es fundamental y clave en el diagnóstico de la enfermedad. La presencia de 2 o más síntomas o signos clínicos como fiebre, tos, expectoración, disnea, dolor pleurítico y signos físicos característicos puede ser un indicador de posible NAC (34). No obstante, en los ancianos puede cursar de un modo paucisintomático con disminución del nivel de consciencia, confusión o fiebre pero ninguna manifestación respiratoria, lo que puede retrasar su diagnóstico (35). Sin embargo, la ausencia de datos clínicos específicos de neumonía requerirá siempre descartar otras opciones diagnósticas.

1.1.4.1. Manifestaciones clínicas y etiología de la neumonía

Clásicamente se ha diferenciado entre pacientes con cuadro clínico de NAC típico o atípico, según la presencia o ausencia respectivamente de 3 o más de las siguientes manifestaciones: inicio brusco, escalofríos, dolor pleurítico, expectoración purulenta, semiología franca y leucocitosis. Si bien esta clasificación no tiene una utilidad predictiva absoluta, se correlaciona con una mayor o menor probabilidad de agentes

convencionales o atípicos. En la Tabla 2 se recoge la correlación entre los patógenos más comunes y los hallazgos clínicos y epidemiológicos más específicos de estos.

Tabla 2. *Microorganismos responsables de NAC y su correlación con características clínicas y epidemiológicas específicas.*

M.O.	Datos epidemiológicos	Datos clínicos y radiológicos
<i>S. pneumoniae</i>	El más común en cualquier circunstancia. Predominio invernal	Cuadro clínico típico: escalofríos, esputo herrumbroso, dolor pleurítico, leucocitosis
<i>Haemophilus influenzae</i>	Personas con enfermedades de base, especialmente fumadores y pacientes con EPOC	Cuadro clínico típico: escalofríos, esputo herrumbroso, dolor pleurítico, leucocitosis
<i>S. aureus</i>	Drogadicción, infección previa por virus influenza	Cuadros muy graves con infiltrados bilaterales, cavitaciones y derrame pleural. Bacteremia frecuente
Bacilos Gram negativos y <i>P. aeruginosa</i>	Inmunosupresión, pacientes con EPOC avanzada, tratamiento con corticoides sistémicos o bronquiectasias	Cuadro clínico muy grave con shock séptico. Cavitación radiológica
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Personas jóvenes sin enfermedades de base. Brotes en comunidades o familiares	Cuadros clínicos generalmente leves y poco sintomáticos (cuadro clínico atípico)
<i>Chlamy-dophila pneumoniae</i>	Afecta por igual a todos los grupos de la población	Cuadro clínico sin características particulares
<i>Coxiella burnetti</i>	Más frecuente en zonas montañosas; contacto con el ganado	Cuadros sintomáticos o síndrome febril sin focalidad. Alteración hepática
<i>Legionella pneumophila</i>	Predominio estival, relación con periodos lluviosos. Brotes epidémicos	Cuadros clínicos graves. Alteraciones neurológicas y gastrointestinales (diarrea), hiponatremia
Virus	Brotes epidémicos. Durante las pandemias se afectan con preferencia personas obesas y embarazadas	Síntomas de las vías respiratorias altas y cefalea. Infiltrado multilobar parcheado

Fuente: Falguera M. y Ramírez M. F. (2015)

De este modo, y como se ha mencionado brevemente en el apartado de la etiología de la NAC, es *S. pneumoniae* el agente etiológico más frecuente

seguido, dentro de las bacterias convencionales y que afectan especialmente a pacientes con enfermedades de base, de *H. influenzae*, *S. aureus*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos (26,35). Generalmente *P. aeruginosa*, como la mayoría de bacilos Gram negativos entéricos, se asocian a NAC más grave al aparecer con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos, con EPOC avanzada, bronquiectasias o tratados con corticoides por vía sistémica, si bien también hay documentados casos de infecciones bacterianas de este tipo en personas previamente sanas (31,36).

Así mismo, en cuanto a los agentes denominados atípicos, y como también se ha mencionado, *M. pneumoniae* suele ser el responsable de pacientes jóvenes que presentan cuadros clínicos con escasa sintomatología, provocando un cuadro clínico subagudo y, raramente de gravedad; si bien también se ha descrito algún caso de NAC causada por este microorganismo grave o fulminante (37). Por otro lado, *C. pneumoniae*, *C. psitaci* y *Coxiella burnetii*, también agentes atípicos de neumonía, tienen una importancia relativa, según los estudios epidemiológicos llevados a cabo, en función de las pruebas diagnósticas practicadas, la existencia de brotes epidémicos o las regiones geográficas consideradas (35).

En cuanto a *L. pneumophila* como agente causante de NAC, suele relacionarse con cuadros clínicos graves que incluso pueden precisar de ingreso en UCI, y que puede asociarse a manifestaciones clínicas particulares. Entre estas, destaca la presencia de alteraciones neurológicas o gastrointestinales o hiponatremia (38).

Por otro lado, el papel de los virus como causantes directos de NAC es evidente, más aún después de la pandemia causada por el virus influenza H1N1 en 2009. Sin embargo, en la mayoría de los casos aparece asociado

con otras bacterias patógenas causantes de neumonía, principalmente con *S. pneumoniae* y *S. aureus*, como apunta el estudio llevado a cabo por Viasus *et al.* en 2013 (39). Si bien los estudios que utilizan técnicas diagnósticas moleculares elevan notablemente la frecuencia con la que se aíslan virus en los pacientes con neumonía. No obstante, la presencia de manifestaciones extrapulmonares, como cefalea o rinorrea, sí que sugieren una etiología vírica (40).

En cuanto a las personas inmunodeprimidas, especialmente para aquellos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), si bien *S. pneumoniae* es el agente causal más frecuente cuando la inmunidad es aceptable, para los pacientes con inmunodeficiencia más intensa (linfocitos CD4 por debajo de 200/mm³) pasa a ser *Pneumocystis jirovecii* la etiología más frecuente (41). Por su parte, *S. aureus* se caracteriza por causar cuadros clínicos graves, con infiltrados bilaterales, a menudo cavitados, asociados a derrame pleural e infección previa por el virus influenza; además, la potencial resistencia de éste a la metilicina aumenta la relevancia de este microorganismo (42).

No obstante, tal y como se ha indicado en líneas anteriores, en ausencia de datos clínicos específicos que permitan confirmar una neumonía será necesario recurrir a exploraciones complementarias que confirmen el diagnóstico. Estas pruebas son esencialmente las que se muestran en la Figura 3, y serán desarrolladas en los apartados siguientes.

Diagnóstico Clínico



Figura 3. Clasificación de las diferentes pruebas para el diagnóstico clínico de la NAC. [Elaboración propia]

1.1.4.2. Estudios iniciales

Dado que se trata de una de las infecciones más relevantes, especialmente para los servicios de urgencias, es fundamental determinar correctamente la necesidad de ingreso así como la ubicación y la intensidad de los cuidados, pues esta primera actuación va a condicionar el pronóstico, la mortalidad, la solicitud de pruebas y estudios microbiológicos o el tratamiento antibiótico administrado, entre otros (43).

1.1.4.2.1. Signos y síntomas

La utilidad de las manifestaciones clínicas, así como la exploración física y las pruebas de laboratorio en el diagnóstico de la NAC es un tanto controvertida, pues se ha observado un bajo rendimiento de estos aspectos. No obstante, diversos estudios han mostrado la relación entre la presencia de signos clínicos como fiebre $> 38^{\circ}C$, taquicardia > 100 lpm o taquipnea > 20 rpm, así como de alteraciones en la exploración (crepitantes,

hipofonesis, matidez en la percusión o sibilancias), con una elevada sensibilidad y especificidad para detectar NAC (44).

Por otro lado, los signos y síntomas tampoco suponen una herramienta diagnóstica definitiva de la neumonía, pues estos a menudo se solapan con los de otras infecciones respiratorias, por lo que resulta poco fiable establecer un diagnóstico de NAC únicamente en base a ellos.

Así pues, y como norma general, el diagnóstico de la neumonía estaría basado en la combinación de una serie de manifestaciones clínicas y la presencia de infiltrados radiológicos de nueva aparición en la radiografía de tórax.

No obstante, y considerando numerosas limitaciones, existen trabajos que han descrito la relación entre algunas manifestaciones clínicas de la neumonía como orientativas de alguna etiología determinada. En este contexto, los casos de NAC causados por *S. pneumoniae* se asocian según diversos estudios con menos días previos de clínica, mayor edad, presencia de infiltrados radiológicos, fiebre alta (>39°C), esputo hemoptoico y dolor torácico (45,46). Así mismo, conocer la historia clínica y los antecedentes personales del paciente puede suponer de ayuda en el diagnóstico de la NAC, como en el caso de la asociación entre infección previa por el virus influenza y la neumonía causada por *S. aureus* (39). La neumonía por *M. pneumoniae* se ha relacionado clásicamente con pacientes jóvenes, cuadros clínicos más leves y la aparición de microepidemias familiares, además de con cifras significativamente más bajas de leucocitos y valores de proteína C reactiva en sangre (pCr) (33). En el caso de la neumonía causada por *L. pneumophila*, varios estudios prospectivos demuestran una asociación positiva con el sexo masculino, el antecedente de alcoholismo y los síntomas gastrointestinales y neurológicos, tales como dolor abdominal,

náuseas, vómitos, diarrea, cefalea o confusión del paciente. A su vez, describen una asociación negativa entre este agente causal y la NAC con el esputo purulento, el dolor torácico pleurítico y la infección previa de tracto respiratorio superior (47,48). Según los estudios llevados a cabo hasta el momento, la neumonía causada por *C. burnetii* tiene como síntomas más comunes fiebre elevada, tos, cefalea y mialgias, estando ausentes en la mayoría de los casos los síntomas respiratorios y los antecedentes de exposición zoonótica (49). Finalmente, a la neumonía por bacilos gramnegativos se le atribuyen cuadros clínicos de mayor gravedad, así como riesgo de aspiración, ingreso hospitalario previo, tratamiento reciente con antibióticos o corticoides y comorbilidad pulmonar (31).

1.1.4.2.2. Marcadores biológicos

Durante los últimos años son muchos los estudios llevados a cabo con el fin de encontrar marcadores biológicos o biomarcadores que tengan una utilidad pronóstica y diagnóstica en la NAC, que sean económicos y con resultados rápidos (point-of-care). Este término hace referencia a moléculas medibles en muestras biológicas cuyas concentraciones pueden ser un indicador del grado de respuesta del estado biológico. En el caso de la neumonía, la determinación de biomarcadores de respuesta inflamatoria e infecciosa (BMRII), además de proporcionar información adicional a la obtenida con los datos clínicos, podrían constituir un indicador del grado de respuesta inflamatoria, además de monitorizar la respuesta al tratamiento y servir de guía de la terapia antibiótica, facilitando la toma de decisiones (50). En resumen, las principales utilidades que los BMRII podrían tener sobre la NAC son las siguientes.

- a) Establecer un diagnóstico precoz de NAC bacteriana, descartando otras enfermedades con sintomatología y clínica similar.
- b) Identificar de manera precoz a los pacientes con NAC grave con la mayor sensibilidad y valor predictivo positivo (VPP) posible. (50).
- c) Estratificar el riesgo de evolución desfavorable, complicaciones y mortalidad, bien de manera independiente o combinando los resultados con las escalas pronósticas de gravedad existentes para llevar a cabo el ingreso hospitalario en el lugar más adecuado para el paciente.
- d) Se han propuesto también como posible guía para determinar la duración del tratamiento antibiótico, como es el caso de la procalcitonina (51).

Los marcadores biológicos más estudiados hasta la fecha son la proteína C reactiva (pCr) y la procalcitonina (PCT), así como el lactato. No obstante, cabe mencionar también el papel de diversas interleucinas (IL), especialmente de la IL-6 y la IL-8, el dímero-D, de la coceptina y los péptidos natriuréticos (34), así como la región medial de la proadrenomedulina (52), los cuales también se han asociado de manera prometedora al diagnóstico y pronóstico de la NAC, aunque actualmente menos disponibles en la práctica clínica.

Proteína C reactiva (pCr)

La pCr es una proteína sintetizada en el hígado y liberada por los hepatocitos tras la estimulación de la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 8 (IL-8), citosinas que activan la respuesta del organismo frente a cualquier

tipo de inflamación, infecciones víricas, bacterianas o NAC mixtas (50). Se trata de uno de los biomarcadores de respuesta inflamatoria más estudiados, y, si bien su uso se ha limitado a complementar las escalas pronósticas existentes en la decisión del ingreso hospitalario, así como a estimar la gravedad del paciente hospitalizado (53), diversas investigaciones le otorgan un papel más relevante. En pacientes mayores de 65 años se ha conseguido establecer un punto de corte para diagnosticar NAC frente a otros procesos pulmonares agudos (54,55). Así mismo, puede resultar útil el análisis de los valores de pCr de muestras de líquido pleural, pues los estudios de Bielsa *et al.* indican diferencias significativas de estos valores entre pacientes con derrame pleural simple y derrame pleural complicado (56).

Sin embargo, el uso de este biomarcador cuenta con una serie de limitaciones, y es que sus valores dependen de la edad, el sexo y la raza, lo que requiere ajustar e interpretar las concentraciones séricas de cada paciente. Por otro lado, se trata de una proteína con una cinética lenta, lo cual podría dar lugar a falsos negativos al inicio de la NAC (50).

Procalcitonina

Otro de los biomarcadores más estudiados, y con resultados más favorables que el mencionado anteriormente, es la procalcitonina (PCT). Se trata de una proteína sintetizada en la glándula tiroides y las células neuroendocrinas del pulmón principalmente, si bien puede producirse en otros tejidos como respuesta a una infección bacteriana. Numerosos estudios han demostrado la elevada capacidad de la PCT a la hora discernir una infección bacteriana de una vírica, e incluso detectar sobreinfección bacteriana en pacientes con neumonía viral (57–60). Este papel es de especial relevancia ya que, además de tener un importante significado

diagnóstico y pronóstico, condicionará la decisión de solicitud de estudios microbiológicos, de ingreso o alta, y la elección del tratamiento antimicrobiano, convirtiendo a la PCT en una eficaz herramienta en los servicios de urgencias (43). Cabe destacar también la utilidad de la PCT para discriminar entre microorganismos intracelulares y neumococos y bacilos gran negativos, siendo especialmente útil a la hora de predecir la etiología de NAC por neumococo con una elevada sensibilidad y especificidad, considerándose hasta la fecha el biomarcador con mayor capacidad discriminativa (52). Su cinética ha sido estudiada para establecer la duración del tratamiento antibiótico (61).

Por otro lado, parece clara también la relación entre las concentraciones de PCT y la progresión de la neumonía a sepsis *grave-shock séptico*, así como la mala evolución de los pacientes (59). Los estudios llevados a cabo al respecto parecen confirmar la asociación existente entre valores elevados de PCT con una mayor evolución a cuadros de sepsis *grave y shock séptico* y a una mayor mortalidad (59,62).

Lactato

El lactato se considera el mejor marcador de hipoperfusión e hipoxia tisular, además de relacionarse significativamente con la supervivencia de los pacientes. Cuando los valores del mismo son mayores a 2,5 mmol/l, los pacientes deben ser monitorizados, pues se asocian a una mayor gravedad (sepsis-shock séptico), mala evolución y mortalidad (63). Los autores que llevaron a cabo este estudio concluyeron, además, que tanto si el paciente con NAC presenta hipotensión como si no, si el lactato es mayor de 2,5mmol/l y/o si su valor de PCT es superior a 1ng/ml, no debería ser dado de alta. Si además el lactato supera los 4mmol/l y la PCT es mayor a

10ng/ml, el paciente tendría altas probabilidades de bacteriemia y shock séptico, por lo que sería conveniente su ingreso y valoración en la UCI.

Es interesante por tanto combinar el lactato con algún otro biomarcador, como la PCT, pues permite mejorar la valoración pronóstica y diagnóstica en urgencias, ya que por sí solo no es capaz de distinguir la infección de otras causas de síndrome de respuesta inflamatoria ni, *a priori*, sospechas bacteriemia (52).

Proendotelina-1

En humanos, durante infecciones sistémicas tiene lugar el aumento de los niveles plasmáticos de endotelina-1 (ET-1) madura, lo que se correlaciona con un mayor riesgo de mortalidad. Un estudio llevado a cabo en 2008 por los autores Schuetz *et al.* demostró que el precursor de este péptido, la proendotelina-1 (proet-1) tendría utilidad diagnóstica y pronóstica como predictor temprano de riesgo de muerte y necesidad de ingreso en UCI en pacientes con NAC, correlacionándose por tanto con la gravedad de esta enfermedad. No obstante, se requieren de más estudios para valorar si este biomarcador supondría una mejora considerable tanto en la predicción del riesgo como en la mejora del manejo clínico de los pacientes con NAC, por lo que su uso por el momento todavía estaría alejado de la clínica diaria (64).

Dímero-D

El dímero-D (DD) se encuentra frecuentemente elevado en procesos inflamatorios, como la neumonía, pero de manera inespecífica y sin asociación estadísticamente significativa con reactantes de fase aguda como la pCr, motivo por el cual su interpretación puede llegar a ser difícil y causar confusión (65). No obstante, a falta de estudios complementarios,

se propone como un biomarcador pronóstico al estar relacionado con la gravedad, la mala evolución y la mortalidad a los 28 días, si bien todavía no se utiliza para establecer el pronóstico de la NAC (66).

Copeptina

Lo copeptina es una hormona de estrés de importancia pronóstica y discriminadora de diagnóstico (67). Utilizada como biomarcador la copeptina se ha relacionado significativamente con la mortalidad de los pacientes de NAC (68). En pacientes con NAC, las concentraciones de copeptina detectadas son significativamente más altas que las detectadas en controles sanos; además, este incremento es gradual en función de la gravedad del caso, encontrándose en concentraciones significativamente mayores en pacientes con neumonía frente a pacientes sanos. Además, las concentraciones de esta son significativamente mayores en los pacientes que fallecen como consecuencia del proceso infeccioso pulmonar, lo que la podría convertir en un biomarcador cuantificable y confiable que reflejaría los distintos mecanismos patogénicos de enfermedad, además de servir como predictor de evolución, de gravedad de la enfermedad y de pronóstico. Sin embargo, y del mismo modo que los anteriores, su papel como biomarcador pronóstico para la NAC todavía se encuentra en investigación, por lo que su uso todavía no ha sido trasladado a la clínica (69).

Péptidos natriuréticos

Tanto el precursor del péptido natriurético auricular como el de tipo B (proBNP), han sido estudiado como factores pronósticos de mortalidad en NAC (52). No obstante, la utilidad de este último ha sido más ampliamente demostrada, concretamente por las investigaciones de Usuda *et al.*, quienes compararon los niveles de este péptido con pacientes con NAC, neumonía

por aspiración, neumonía asociada a los cuidados sanitarios y neumonía con insuficiencia cardíaca aguda, encontrando diferencias significativas que validaban a proBNP como un marcador pronóstico (70).

Pro-adrenomedulina

La región medial de la proadrenomedulina (MR-proADM) es un biomarcador pronóstico en pacientes con NAC descrito recientemente. Se trata de un péptido producido por múltiples tejidos en condiciones de estrés con propiedades vasodilatadoras, inmunomoduladoras, metabólicas y bactericidas, entre otras. En los servicios de urgencias su medida resulta útil para predecir un mal resultado clínico de los pacientes con NAC, mostrando una capacidad predictiva similar a la predicha por la escala de gravedad PSI (71). Además, al igual que la procalcitonina, la MR-proADM ha demostrado ser muy sensible y específica para la predicción de infección bacteriana y la orientación sobre el agente causal, su evolución clínica, la posibilidad de bacteremia, y mortalidad, además de servir de guía del tratamiento antibiótico. Se trata por tanto de un prometedor biomarcador para el pronóstico de la NAC (72).

1.1.4.1.3. Evaluación del oxígeno arterial: pulsioximetría y oximetría

La medida del estado de oxigenación es importante en la evaluación inicial de pacientes con NAC, ya que la hipoxemia se ha asociado con el ingreso posterior en la UCI y la mortalidad de los pacientes, lo que refleja la gravedad de la insuficiencia orgánica primaria en esta enfermedad (73).

Para determinar la oxigenación arterial y poder detectar lo antes posible si hay hipoxemia, se han de llevar a cabo las técnicas de pulsioximetría u oximetría. En el caso de la primera, resultados de SaO₂ <

90% supondrían que el paciente presenta hipoxemia, mientras que en el caso de la oximetría valores de $\text{PaO}_2 < 60$ mmHg serían el indicador (26).

Mediante el uso de la gasometría arterial se puede determinar los valores de PaO_2 y su relación con la fracción inspiratoria de oxígeno (FiO_2). La aparición de hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$) se ha establecido como un factor de mal pronóstico independiente del grado de severidad de la neumonía según las escalas pronósticas habituales y puede estar presente hasta en el 30% de las neumonías consideradas inicialmente como de bajo riesgo (74,75).

1.1.4.3. Estudios de imagen

Dentro de las pruebas de estudio de imagen que suelen llevarse a cabo para diagnosticar un posible caso de NAC, la más importante y comúnmente utilizada es la radiografía de tórax, si bien también se cuenta con la tomografía computarizada.

1.1.4.3.1. Radiografía de tórax

La radiografía de tórax, a diferencia de la inespecificidad de las manifestaciones clínicas, puede ser de gran utilidad a la hora de establecer el diagnóstico, la localización y la extensión, sus posibles complicaciones, detectar alguna enfermedad pulmonar asociada, así como otros posibles diagnósticos, y evaluar la evolución de la NAC. La aparición de nuevos infiltrados alveolares en la radiografía de tórax apoya el diagnóstico de neumonía. Si bien no se ha determinado que esta prueba permita establecer un diagnóstico etiológico, al no haberse observado asociación entre las interpretaciones de las radiografías con el patógeno causante, un estudio preciso de éstas proporciona información útil sobre la localización

de la neumonía, su extensión (afectación multilobar o bilateral) y la presencia o no de derrame pleural, lo que puede guiar a la hora de estimar la gravedad de la neumonía. La determinación de los antibióticos, por tanto, no ha de basarse en los hallazgos radiográficos, sino en el cuadro clínico completo, incluidas las pruebas microbiológicas (76).

1.1.4.3.2 Tomografía computarizada

Según diversos estudios, teniendo en cuenta los diferentes agentes patógenos causantes de NAC y los métodos diagnósticos disponibles en la actualidad, hay una elevada incidencia de diagnósticos erróneos de NAC, lo que en ocasiones conduce a un uso inadecuado de antibióticos. Según diversas investigaciones, entre ellas la llevada a cabo recientemente por los investigadores Garin *et al.*, la tomografía computarizada (TC) reduciría el diagnóstico excesivo y sería especialmente útil para descartar neumonía, por lo que tendría un impacto importante para los pacientes con probabilidad intermedia de enfermedad. De este modo, el uso de la TC podría reducir la prescripción inadecuada de antibióticos e identificar una causa alternativa para los síntomas del paciente con sospecha de NAC, sin embargo, es necesario evaluar la relación coste-efectividad de esta técnica, por lo que hasta ahora su papel está limitado en la práctica clínica y se usa principalmente en casos dudosos o en neumonías complicadas (77).

1.1.4.3.3. Ecografía torácica

Si bien la radiografía de tórax es la principal herramienta de diagnóstico para la neumonía adquirida en la comunidad, recientemente está ganando popularidad como una posible herramienta complementaria para el diagnóstico de enfermedades pulmonares la ecografía de tórax. Se trata de una técnica no invasiva y libre de radiación, fácilmente disponible en

muchos departamentos clínicos y adecuada para el examen de cabecera en entornos de cuidados más críticos, y con una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la NAC. Es por ello que se está empezando a proponer la ecografía torácica como posible alternativa o complemento de la radiografía de tórax en el diagnóstico de la NAC, al menos en grupos de pacientes sensibles a la radiación como mujeres embarazadas o niños (78).

No obstante, debe tenerse en cuenta que hasta ahora las guías actuales sobre el diagnóstico y manejo de la neumonía no incluyen esta técnica, por lo que si bien parece prometedora, su total aplicación en la clínica diaria aún no se ha producido. Sin embargo, y como ya se ha comentado, la ecografía torácica podría desempeñar un papel complementario de gran relevancia en el diagnóstico y manejo de la NAC, así como ser una buena opción para controlar la evolución de los focos de neumonía después de un diagnóstico confirmado por radiografía de tórax o diagnosticar derrames pleurales paraneumocócicos (79).

1.1.4.3. Estudios microbiológicos

Actualmente se dispone de buenas pruebas microbiológicas con una alta fiabilidad para el diagnóstico etiológico de la neumonía, no obstante, la rentabilidad de estos suele ser baja. Esto es debido a que dependen del momento en el que se encuentre la infección, motivo por el cual tan solo en el 40-60% de los casos de neumonías se puede determinar el patógeno causante. Si bien hay cierta controversia respecto a la utilidad de conocer el agente causal y de cómo este puede influir en el pronóstico de cada paciente, habiendo quien cuestione la necesidad de realizar estudios microbiológicos, sí parece haber una correlación clara entre un diagnóstico

etiológico precoz y una mejora más rápida tras el inicio del tratamiento. El principal interés en el conocimiento del agente causal de la neumonía es ajustar el tratamiento antibiótico empírico ajustando su espectro, evitando así la generación de resistencias, y por otra parte conocer los patógenos existentes en el área de trabajo. Del mismo modo, también se ha correlacionado la administración de antibióticos inadecuados con el mal pronóstico de los pacientes de NAC (80).

Así pues, a continuación, se recogen las pruebas diagnósticas más conocidas y comúnmente utilizadas para la identificación de los agentes causales de la NAC.

1.1.4.3.1. Tinción de Gram y cultivo del esputo

La tinción de Gram realizada en una muestra de esputo sí ha demostrado servir como guía para la selección inicial de la terapia antimicrobiana a administrar en pacientes con neumonías bacterianas, con una sensibilidad en torno al 80%, cuando el esputo es aceptable. Esta prueba es ampliamente aceptada y utilizada ya que resulta un método barato, no supone ningún riesgo para el paciente, no requiere de un equipo sofisticado para llevarla a cabo y la evaluación se completa en unos pocos minutos y proporciona información valiosa sobre el diagnóstico y pronóstico del paciente (81).

El diagnóstico microbiológico de la neumonía a través del cultivo de esputo tiene cierta controversia, ya que ha demostrado no ser del todo fiable, además de precisar 48 horas antes de tener los resultados. Es necesario que el esputo tenga características válidas para ser procesado, lo cual sólo ocurre en un 40-60% de los casos. No obstante, para muestras obtenidas de manera invasiva (como en pacientes de UCI) sí se han

demostrado mejores resultados (34).

1.1.4.3.2. Hemocultivo

Los hemocultivos constituyen parte de la investigación microbiológica rutinaria realizada a pacientes con NAC que requieren hospitalización, si bien su rentabilidad y aplicación ha sido cuestionada ya que tan sólo alrededor del 10% presentará bacteriemia y aún en estos casos, no siempre condicionará la modificación del tratamiento inicial dado que los resultados siempre van a ser diferidos (26). Por este motivo, parece lógico limitar esta prueba a los casos más graves, especialmente si presentan shock séptico, están inmunodeprimidos o se sospecha fracaso del tratamiento empírico, pues son los que mayor probabilidad de resultado positivo presentan; así como de excluirla en los casos en los que haya habido una toma reciente de antibióticos, pues limitará los resultados (82).

De cualquier modo debe valorarse la importancia no sólo de la detección del patógeno mediante hemocultivos o cultivos de esputo, sino también la sensibilidad de los métodos diagnósticos a agentes antibacterianos dada la era actual en la que las resistencias a antibióticos están en claro aumento (83).

1.1.4.3.3. Técnicas de diagnóstico molecular: Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar DNA de los patógenos causantes de NAC en muestras biológicas, como esputo, sangre, líquido pleural u orina, ha demostrado tener una sensibilidad superior a la de los demás métodos diagnósticos, por lo que es de gran utilidad para incrementar el número de diagnósticos etiológicos de pacientes con NAC (80). Especialmente, la técnica de PCR a tiempo real

permite que los resultados estén disponibles rápidamente y, por lo tanto, en un período de tiempo clínicamente relevante (84).

Los estudios llevados a cabo sobre el papel de esta técnica en el diagnóstico de la NAC demuestran un aumento significativo de detección de patógenos respiratorios de alrededor de un 30% frente a las técnicas más tradicionales. Este incremento es debido, en gran parte, a que la PCR a tiempo real permite la detección de virus respiratorios, que raras veces son detectados por otras técnicas, así como de bacterias atípicas (84,85). Además, según el estudio de Templeton *et al.*, se obtuvo un mayor porcentaje de éxito en los diagnósticos microbiológicos de pacientes mayores de 60 años (un 87%) así como en pacientes con neumonía grave (90%), lo que sugiere que esta técnica puede tener un papel importante en el diagnóstico de infecciones con las tasas de mortalidad y morbilidad más elevadas (84).

1.1.4.3.4. Detección de antígenos en orina

Los métodos inmunológicos más empleados en el diagnóstico de la NAC son la detección de antígenos mediante inmunocromatografía. Concretamente, el examen de orina obedece a que los antígenos microbianos se concentran en la misma más que en otros fluidos sin que existan anticuerpos que alteren los resultados. La detección de antígenos en orina es, por tanto, una técnica comúnmente utilizada, con una sensibilidad de pacientes sin bacteriemia y con bacteriemia del 50-80% y de 75-85% respectivamente, siendo la especificidad superior al 95%, parámetros que no se verían afectados por el uso de antibióticos (86).

Otro agente causante de NAC que puede detectarse a través de la orina es *Legionella pneumophila* serogrupo 1, de hecho ésta es la técnica de

elección para el diagnóstico de pacientes con criterios sugestivos de esta etiología, ya que la detección en orina de su antígeno es muy sensible (entre el 85-90%) y con un elevado valor predictivo negativo, cercano al 100% (86).

Sin embargo, esta técnica cuenta principalmente con 2 inconvenientes: no permite conocer la sensibilidad antibacteriana y sólo permite la detección de un antígeno en cada caso, cuya cobertura seguramente esté contemplada en cualquier pauta. Por ello los beneficios relativos a su uso serían la reducción en el espectro antibacteriano del tratamiento y los efectos secundarios asociados al mismo, pero no beneficios en términos de supervivencia. Además, en ninguno de los dos casos, la relación coste-beneficio resulta positiva, por lo que su uso no debe ser indiscriminado (26).

1.1.5. Valoración pronóstica y estratificación del riesgo

La valoración de la gravedad de la NAC es fundamental para la estimación del tratamiento que necesita el paciente, decidir su ingreso hospitalario, así como disminuir la proporción de neumonías de bajo riesgo ingresadas inadecuadamente. Si bien esta valoración depende en gran medida de la experiencia del médico responsable, existen diversos índices de gravedad o escalas de pronóstico que clasifican a los pacientes en diferentes niveles en función de la probabilidad de fallecer dentro de 30 días y ayudar a la decisión del médico, más basada en la clínica. Los más utilizados en la práctica son el índice de Fine o **PSI** (Pneumonia Severity Index) y el **CURB-65**.

La escala de Fine o el índice PSI fue publicado por los investigadores Fine *et al.* en el año 1997 con el fin de estratificar a los pacientes con NAC en subgrupos en función de sus criterios evolutivos (87). Para ello se tienen en cuenta un total de 20 parámetros que incluyen datos demográficos, comorbilidades, datos clínicos y resultados de pruebas complementarias (Tabla 3), a los que se les asigna una determinada puntuación.

Tabla 3. Parámetros y puntuación de la escala de gravedad de neumonía PSI o Fine.

	Parámetros	Puntuación
Factores epidemiológicos	Hombre	Años
	Mujer	Años - 10
	Asilo o residencia	+10
Comorbilidades	Enfermedad neoplásica	+30
	Enfermedad hepática	+20
	Insuficiencia cardíaca congestiva	+10
	Enfermedad cerebrovascular	+10
	Enfermedad renal	+10
Exploración clínica	Estado mental alterado	+20
	Frecuencia respiratoria ≥ 30 /min	+20
	PA sistólica < 90	+20
	Temperatura $< 35^{\circ}\text{C}$ o $\geq 40^{\circ}\text{C}$	+15
	Pulso ≥ 125 /min	+10
Pruebas complementarias	pH arterial $< 7,35$	+30
	Nitrógeno ureico en sangre (BUN) ≥ 30 mg/dl	+20
	Na < 130 nmol/l	+20
	Glucosa ≥ 250 mg/dl	+10
	Hematocrito $< 30\%$	+10
	PaO ₂ < 60 mmHg	+10
	Derrame pleural	+10

Fine *et al.* 1997 (87)

De este modo, el sumatorio de las puntuaciones clasificaría a los pacientes en 5 categorías o clases (Tabla 4) en función de la probabilidad de mortalidad a los 30 días, de manera que las clases I, II y III agruparían a los pacientes con NAC leve y bajo riesgo de mortalidad, mientras que las clases

IV y V agruparían a los pacientes con riesgo intermedio (IV) y elevado (V) de morir (26).

Tabla 4. Clasificación por categorías de escala PSI, puntuación y probabilidad de muerte a los 30 días.

Grupo de riesgo	Puntuación	Prob. de muerte a los 30 días (%)
I	Si < 50 años, sin neoplasia ni insuficiencia cardíaca, enfermedad Cerebrovascular, hepática o renal	0,1
II	<70	0,6
III	71-90	0,9-2,8
IV	91-130	8,2-9,3
V	>130	27-29,2

Fine *et al.* 1997 (87)

Por otro lado, la escala de gravedad o índice de CURB-65, fue desarrollado en el año 1987 por la *British Thoracic Society Research Committee* (88) y modificado posteriormente incluyendo la edad como parámetro, además de los 4 parámetros iniciales, recogidos todos ellos en la Tabla 5. Es rápida sencilla y su uso se ha valorado también a nivel ambulatorio prescindiendo de la urea y conservando su valor pronóstico.

Tabla 5. Parámetros y puntuación de la escala de gravedad de neumonía CURB-65.

Parámetros	Puntuación
Confusión mental	1
Urea > 44 mg/dl o BUN > 20 mg/dl	1
Respiratory Rate: frecuencia respiratoria > 30 rpm	1
Blood Pressure: tensión arterial sistólica < 90 mmHg y/o tensión arterial diastólica < 60 mmHg	1
65. Edad mayor o igual a 65 años	1

Cada uno de los criterios anteriores se puntúa como presente (1punto) o ausente (0 puntos).

Mortalidad estimada a los 30 días en función de la suma de criterios CURB-65: 0-1, riesgo bajo (<2%); 1-2, riesgo intermedio (9%) y 3-5, riesgo elevado (>20%).

Se recomendará ingreso hospitalario a los pacientes con CURB-65 > 1

Girón-Ortega, J. A., Pérez, S., y Girón-González, J.A. 2018 (83)

Cada uno de estos parámetros tiene asignada la misma puntuación, de manera que el resultado del sumatorio de las variables permite clasificar a los pacientes en 3 niveles de gravedad, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación CURB-65, puntuación y probabilidad de muerte a los 30 días.

Grupo de riesgo	Puntuación	Probabilidad de muerte a los 30 días (%)
I	0-1	<3
II	2	9,2
III	>3	31

Lim W.S, Baudouin S.S, George R.C *et al.* 2009 (89)

Tanto el índice PSI como el CURB-65 han demostrado tener una capacidad de discriminación muy similar para predecir el riesgo de muerte a los 30 días, y además son complementarias, pues cada una está enfocada para identificar unos pacientes y tiene, por tanto, una serie de limitaciones. La escala PSI está más dirigida a la identificación de pacientes de bajo riesgo, por lo que puede infravalorar la magnitud de la afectación aguda, especialmente en pacientes jóvenes sin enfermedades coexistentes, ya que da mucho peso a la edad y a las comorbilidades. Por el contrario, la escala CURB-65 está más enfocada a la identificación de pacientes de elevado riesgo, si bien una de sus limitaciones es que no ha sido validada en mayores de 65 años. Además, en esta escala la hipoxemia no es un factor de riesgo. No obstante, a pesar de las limitaciones, cuando no se usan combinadas, está más extendido el uso de esta última, CURB-65, al ser más simple y fácil de utilizar (26).

1.1.6. Uso combinado de las escalas de riesgo y los biomarcadores

Como se ha visto a lo largo de los apartados, la NAC continúa siendo un importante problema de salud a nivel mundial, lo que justifica el interés en identificar factores pronósticos y desarrollar herramientas capaces de predecir la mortalidad de la misma. La escala de riesgo de Fine o índice PSI, así como el CURB-65, descritos anteriormente, han sido validados, pero como se ha visto, ambos poseen limitaciones, y se considera que evalúan espectros de gravedad opuesta. Tanto el índice de PSI como el CURB-65 calculan la probabilidad de muerte en el momento del diagnóstico, sin embargo en ninguna de las dos se evalúa la respuesta inflamatoria del huésped, lo cual actualmente es considerado un aspecto clave en el pronóstico del paciente (90). Por tanto, la evaluación de determinados parámetros pronósticos (como la expresión de la respuesta inflamatoria contra el microorganismo) mediante el uso de biomarcadores permitiría identificar el componente inflamatorio del paciente, así como individualizar el pronóstico. En línea con la expresión de la respuesta inflamatoria, se sabe que durante esta el paciente produce una cantidad de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, dependiendo de los polimorfismos genéticos del huésped, el agente causal de la NAC y la gravedad inicial de la misma (91). Sin embargo, si bien estos mediadores tienen un efecto beneficioso, una liberación excesiva de citocinas ha sido asociada a una serie de efectos nocivos, como hipotensión, disfunción miocárdica, hipoperfusión de órganos vitales, acidosis láctica, shock séptico y mayor mortalidad (91,92). Es por ello por lo que los marcadores biológicos de infección e inflamación han despertado mucho interés debido a su capacidad para reflejar la respuesta inflamatoria del huésped de

manera más rápida y factible. De hecho, ya se han llevado a cabo estudios previos con la proteína C reactiva, la procalcitonina y la proadrenomedulina, los cuales que han demostrado su correlación con la gravedad inicial y con una mala evolución, como se ha descrito en apartados anteriores.

Por consiguiente, parece evidente que la combinación los resultados de marcadores biológicos que se hayan demostrado significativos para predecir el pronóstico de pacientes con NAC, mejoraría la predicción de mortalidad a los 30 días de las dos escalas de pronóstico más utilizadas para pacientes hospitalizados por NAC. En esta línea, la búsqueda de un biomarcador con buena capacidad predictiva de gravedad y con menos limitaciones que los ya vistos, así como con una relación coste-beneficio mayor, podrían suponer un diagnóstico precoz más preciso y, con ello, mejorar la adecuación del tratamiento de los pacientes con NAC.

1.2. MicroRNA

1.2.1. Historia de los microRNAs

Los microRNAs (también denominados miRNAs), son una clase de RNAs de pequeño tamaño, (de aproximadamente 19-24 nucleótidos de longitud), endógenos y evolutivamente conservados, que funcionan como reguladores posttranscripcionales de la expresión génica. Principalmente llevan a cabo su función reguladora mediante su unión a secuencias diana situadas en el RNA mensajero (mRNA), interfiriendo con la maquinaria de traducción y, como resultado, evitando o alternando la producción de proteína. Sin embargo, parece ser que además de reprimir la traducción, la unión del microRNA a la secuencia diana del mRNA desencadena el reclutamiento y la asociación de los factores de desintegración del mRNA, y con ello su desestabilización, degradación y la disminución resultante de sus niveles de expresión (93).

Su descubrimiento tuvo lugar en 1993 por Lee, Feinbaum y Ambros, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (94). Estos investigadores observaron que para que estos organismos pasasen de la primera etapa larval (L1) a la segunda (L2), tenía que darse una regulación a la baja de la proteína LIN-14, y que, a su vez, esta regulación a la baja dependía de la transcripción de un segundo gen, llamado *lin-4*. Curiosamente, se observó que la traducción del transcrito del gen *lin-4* no daba como resultado una proteína biológicamente activa, sino dos pequeños fragmentos de RNA (de aproximadamente 21 y 67 nucleótidos de longitud). Poco tiempo después, el Lee *et al.* (94), junto con el grupo de Wightman (95), descubrieron que la secuencia de menor tamaño tenía complementariedad antisentido para

múltiples sitios de la región 3'UTR (3' *UnTranslated Region*) del mRNA de *lin-4*, tal y como se muestra en la Figura 4.

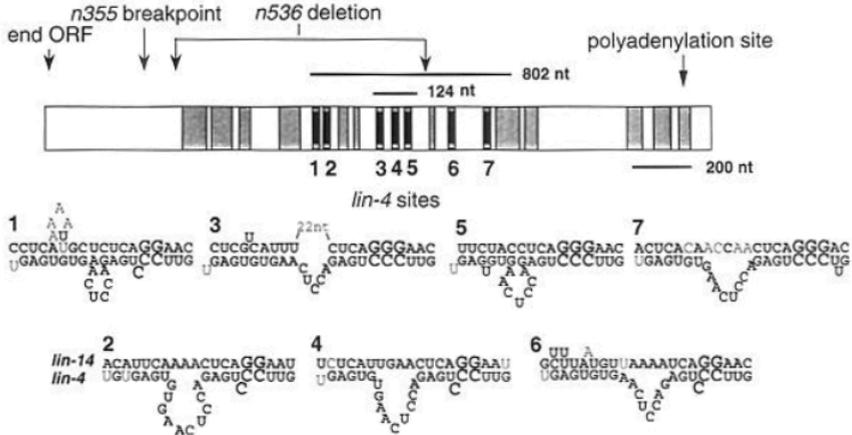


Figura 4. Secuencias conservadas en la región 3'UTR de *lin-14* y su complementariedad con el RNA de menor tamaño de *lin-4*. (95)

De esta manera, se vio que la unión entre esta pequeña secuencia de alrededor de 21 nucleótidos a la región complementaria del mRNA de *lin-4* era capaz de disminuir la expresión de la proteína LIN-14 sin causar cambios significativos en sus niveles de mRNA. Los estudios de ambos equipos de investigadores permitieron la elaboración de un modelo en el cual la unión de múltiples RNAs pequeños de *lin-4* con sus sitios complementarios en la región 3'UTR del mRNA de *lin-4*, tenían como resultado la represión traduccional de LIN-14 y la progresión embrionaria de *C. elegans*, de L1 a L2. Posteriores estudios llevados a cabo por distintos grupos de manera independiente (96,97), descubrieron en el año 2000 la existencia de *let-7*, otro pequeño RNA esencial para el paso del estadio larvario al adulto en *C. elegans*.

Si bien en un principio se pensó que este nuevo mecanismo de regulación era exclusivo de los nematodos, Pasquinelli y su grupo

descubrieron homólogos del gen *let-7* en muchos otros organismos, como artrópodos, peces, ratones e incluso humanos (98). Con el paso de los años y de los numerosos estudios llevados a cabo desde el descubrimiento de estas pequeñas secuencias reguladoras, se sabe que muchas de ellas se han conservado evolutivamente entre especies y que, además, presentan especificidad de tipo celular, lo que las ha hecho potencialmente interesantes de cara al descubrimiento de nuevos microRNAs, tanto en plantas como en animales. Tanto es así que en 2002 se creó un registro de microRNAs, denominado miRBase (www.mirbase.org), y que sirve como repositorio principal on-line de secuencias, anotación, nomenclatura y predicción de dianas de los microRNAs incluidos (99,100). En la actualidad se recogen en miRBase un total de 24.521 entradas que representan precursores del microRNA, los cuales expresarían 30.424 microRNAs maduros, en 206 especies. No obstante, el significado biológico de la mayoría de los microRNAs anotados es todavía desconocido y requiere de validación funcional.

1.2.2. Organización genómica de los microRNAs

Los genes de los microRNAs pueden variar ampliamente su ubicación en el genoma. Si bien aproximadamente la mitad están distribuidos a lo largo del genoma, el 50% restante se encuentran adyacentes formando grupos, de modo que son expresados de manera coordinada. La regulación de la transcripción precisa de los mismos es posible gracias a la síntesis de transcritos policistrónicos que serán posteriormente fragmentados para generar múltiples microRNAs, lo que sugiere en algunos casos una organización de tipo operón (101). Así mismo, los genes de los microRNAs

pueden estar localizados tanto en exones como en intrones de RNA no codificante, lo que evidencia la complejidad asociada al proceso de los microRNAs (102), que será descrita en los apartados siguientes.

1.2.3. Biogénesis de los microRNAs

Como todas las moléculas del organismo, los microRNAs siguen un complejo proceso de biogénesis y maduración hasta llegar a ser las moléculas funcionales y reguladoras que se conocen. En la Figura 5 se representa la estructura característica de un microRNA, diferenciando las partes principales del mismo, así como esquematizando lo que se conoce como pri-miRNA y pre-miRNA.

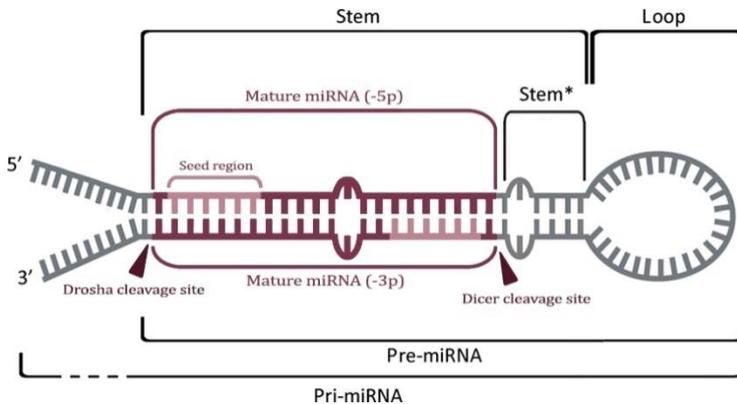


Figura 5. Estructura típica de un precursor de microRNA. Dos cadenas o (stems), unidas por un bucle terminal (terminal loop), que engloban las dos cadenas 5' y 3' que constituyen los microRNAs maduros. (103)

La mayoría de los microRNAs se producen mediante la conocida como **ruta canónica**, en la cual intervienen fundamentalmente la RNA polimerasa II, así como dos enzimas clave en el proceso de maduración, conocidos como Drosha y Dicer. No obstante, recientes investigaciones han demostrado la existencia de rutas no-canónicas, en las cuales no interviene alguna de estas dos enzimas, o ninguna (104). En la Figura 6 se representa

esquemáticamente el proceso de biogénesis de los microRNAs según la ruta canónica. Los microRNAs se transcriben como largas transcripciones primarias (pri-miRNAs) cuya maduración se produce mediante eventos de procesamiento secuencial en el núcleo por la enzima Drosha (pre-microRNA) y en el citoplasma por la enzima Dicer (microRNA maduro) (105), cuyos puntos de corte se muestran en la figura anterior.



Figura 6. Esquema del procesamiento de los microRNAs según la ruta canónica.

Más detalladamente se muestran en la Figura 7 los pasos necesarios en la biogénesis de los microRNAs por la ruta canónica. Inicialmente tiene lugar la transcripción de los microRNAs, la cual es llevada a cabo por la RNA polimerasa II y tiene como resultado un largo microRNA primario (pri-miRNA) con un casquete (7-metil-guanosina) en 5' y una cola de poli(A) en 3'. Este largo pri-miRNA se autocomplementa, de modo que forma una estructura en forma de tallo y bucle de unos 80 nucleótidos de longitud. A continuación, este pri-miRNA es procesado por un complejo denominado Microprocesador, el cual contiene a la enzima RNasa III conocida como Drosha y la proteína DGCR8 encargados de generar un precursor de menor tamaño (~65nt), conocido como pre-miRNA (105). El pre-miRNA es exportado al citoplasma por la exportina-5, donde tendrá lugar el procesamiento final a microRNA maduro. En el citoplasma otra enzima RNasa III, conocida como Dicer, se encarga de generar una doble cadena a partir del pre-miRNA para, a continuación, separar las hebras, una de las cuales será degradada, mientras que la otra, denominada "hebra guía", se asociará a proteínas catalíticas Argonauta (AGO) formando el complejo RISC.

Finalmente, será la hebra guía la que dirija el complejo RISC al mRNA diana, degradándolo o causando la represión de su traducción (106).

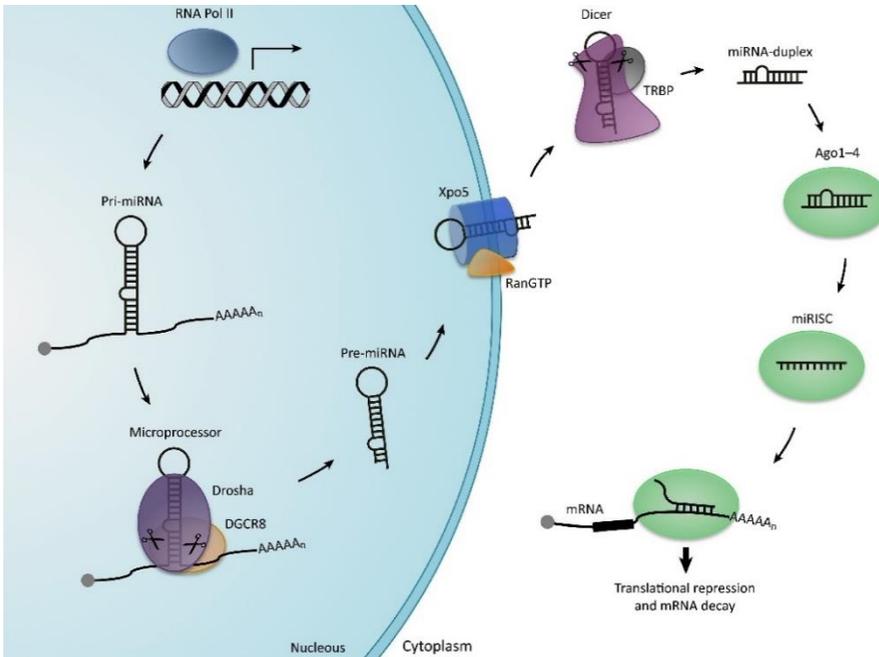


Figura 7. La ruta canónica de biogénesis de microRNAs. Los microRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II como largos pri-miRNAs (>1 kb) y a pre-miRNAs (aproximadamente 70nt) por el microprocesador, consistente en la enzima RNasa III llamada Drosha y una proteína de unión, DGCR8. Los pre-miRNAs son exportados al citoplasma por la exportina 5, donde son procesados por otra enzima RNasa III, Dicer, que separa el bucle termina del pre-miRNA, dando lugar a microRNAs de doble cadena. A continuación el dúplex de miRNA se une a proteínas las Argonauta y una de las hebras es dirigida al complejo miRISC, el cual guiará a los microRNAs a los mRNAs diana para degradarlo o reprimir su traducción (106)

No obstante, con el paso del tiempo y gracias a los esfuerzos dedicados a conocer y caracterizar el total de los RNAs con función reguladora existente en las células y los tejidos humanos se han descubierto una serie de microRNAs cuyo proceso de biogénesis difiere al descrito anteriormente. Si bien la mayoría de los microRNAs conocidos siguen la ruta canónica de biogénesis, las nuevas tecnologías de secuenciación han

revelado diferentes moléculas de RNA cuya función es la misma que la de los microRNAs típicos (aquellos que siguen la ruta canónica), pero que siguen estrategias de biogénesis alternativas a las propias de la ruta canónica (104,107–109). Estas excepciones se han agrupado bajo el nombre de biogénesis no canónica, y dentro de esta denominación se encuentran aquellas que son Drosha/DGCR8 dependientes pero Dicer/independientes, aquellas que son Drosha/DGCR8 independientes pero Dicer/dependientes, y una última ruta recientemente descubierta, la cual es Drosha/DGCR8 y Dicer independiente. En la Figura 8 se esquematizan las tres rutas no canónicas, que serán desarrolladas en los apartados siguientes.

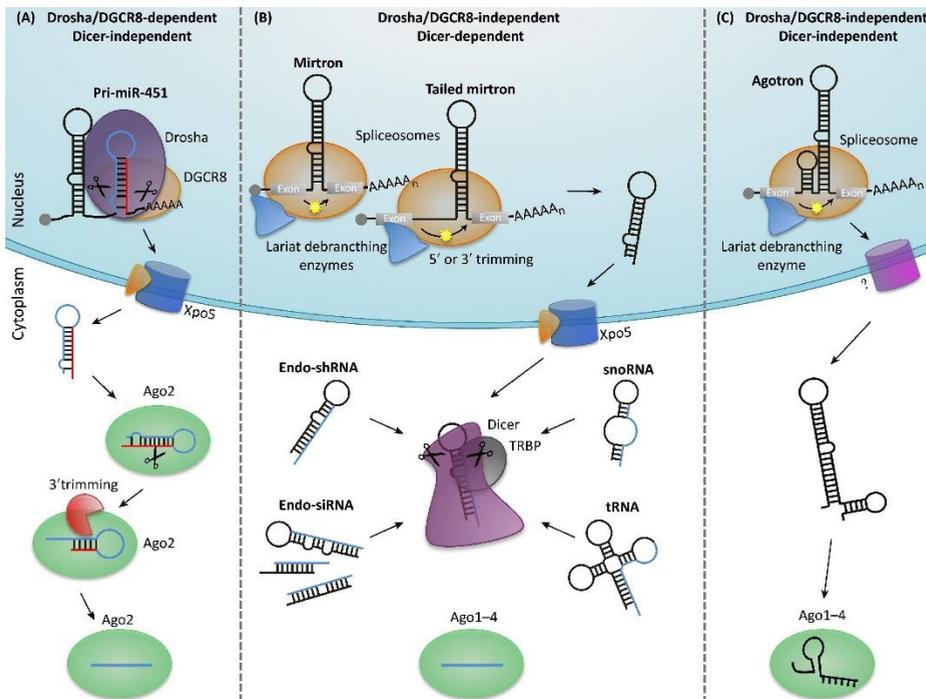


Figura 8. Rutas de biogénesis de microRNAs alternativas o no canónicas. (A) Biogénesis Drosha/DGCR8-dependiente, Dicer-independiente, característica de miR-451. (B) Biogénesis Drosha/DGCR8-independiente, Dicer-dependiente, característica de

mirtrons, endo-siRNAs, snoRNAs o tRNAs. (C) Biogénesis Drosha/DGCR8-independiente, Dicer-independiente, propia de los agotrons (106).

1.2.3.1. Biogénesis Drosha/DGCR8-dependiente y Dicer-independiente

Esta estrategia alternativa a la biogénesis canónica requiere la acción de la enzima Drosha, sin embargo, dado que los pre-miRNA que se generan son de pequeño tamaño como para ser sustratos de Dicer, su maduración se produce directamente por la proteína argonauta 2 (Ago2). Este tipo de biogénesis ha sido descrita para un microRNA conservado en vertebrados, el miR-451 (110), así para los recientemente descubiertos simtrons (107); así mismo, algunos pre-tRNAs también maduran sin necesidad de Dicer, como se muestra en la Figura 9.

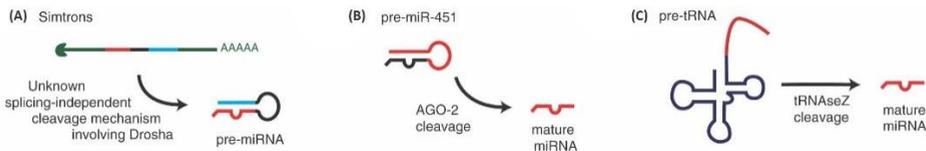


Figura 9. *MicroRNAs cuyo proceso de biogénesis es dependiente de Drosha/DGCR8 e independiente de Dicer. [Modificado de (108)].*

1.2.3.1.1. Simtrons

Los simtrons (Fig. 9A) son una variante de los mirtrons, cuya biogénesis, al contrario que la de los mirtrons que son independientes de Drosha y requieren de la maquinaria del spliceosoma como se verá más adelante, se produce en ausencia de *splicing* (simtrons= mirtrons *splicing*-independientes). Al igual que los microRNAs sintetizados por la vía canónica, los simtrons tienen como función el silenciamiento de los transcritos diana, lo que demuestra que las rutas alternativas o no

canónicas son también capaces de producir RNAs reguladores perfectamente funcionales (107).

1.2.3.1.1. miR-451

El miR-451 (Fig. 9B) es un microRNA eritropoyético, altamente conservado en los vertebrados y cuya biogénesis es independiente de Dicer (111). De manera similar a los microRNAs convencionales, el pri-miR-451 es procesado por el complejo enzimático Drosha/DGCR8, dando como resultado un pre-miR-451 en horquilla de 17pb. Dado que se trata de un sustrato de menor tamaño que los que Dicer es capaz de reconocer, el proceso de maduración se completa directamente por la actuación de la proteína Ago2, como quedaba reflejado en la Figura 8A (106).

1.2.3.2. Biogénesis Drosha/DGCR8- independiente y Dicer-dependiente

De igual modo que existen microRNAs en cuya biogénesis no interviene el enzima Dicer, como se ha descrito en el apartado anterior, existen una serie de microRNAs que son sintetizados sin la presencia del complejo nuclear Drosha/DGCR8.

Son muchos los tipos de RNAs cuya biogénesis es independiente de Drosha pero dependiente de Dicer, si bien el mejor descrito hasta el momento son los mirtrons, en los cuales el complejo enzimático Drosha/DGCR8 es sustituido por un espliceosoma que los procesará antes de su salida al citoplasma, tal y como se reflejaba en la Figura 8B. No obstante, además de los mirtrons, existen otros microRNAs que siguen esta vía de biogénesis alternativa (Fig. 10), como los endo-siRNAs (*endogenoys short interfering RNAs*), los snoRNAs (*small nucleolar RNAs*), el miR-320 y el miR-484, así como algunos tRNAs. Si bien en algunos de estos casos aún

se desconoce el proceso que siguen antes de ser reconocidos por Dicer, en los apartados siguientes se recopila la información obtenida hasta el momento.

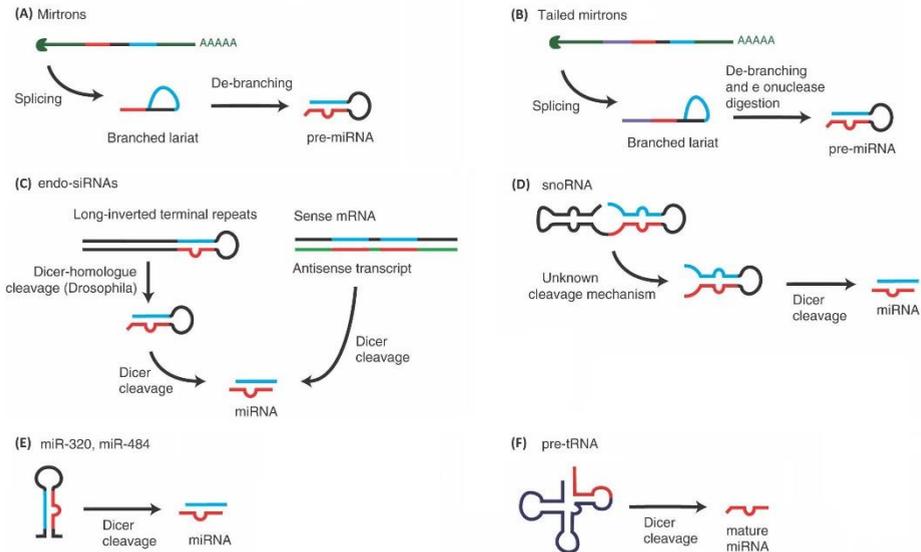


Figura 10. MicroRNAs cuyo proceso de biogénesis es independiente de Drosha pero dependiente de Dicer. [Modificado de (108)].

1.2.3.2.1. Mirtrons

Los **mirtrons** son un subtipo de microRNAs localizados en regiones intrónicas de genes codificantes, que pueden generar RNAs reguladores funcionales, del mismo modo que los microRNAs que siguen la ruta canónica, pero en cuya biogénesis no interviene Drosha, sino que los pri-miRNAs son procesados por la maquinaria de *splicing* o espliceosoma (112,113). Fue la primera estrategia de biogénesis no canónica en ser descubierta y, si bien inicialmente se creyó que era propia de *Drosophila Melanogaster*, estudios posteriores demostraron su existencia en diferentes organismo, como mamíferos, aves y plantas (114). Así pues, tal y como muestra la Figura 9B, dado que los mirtrons se encuentran en

regiones intrónicas, y por tanto entre exones, son en primer lugar procesados por el espliceosoma y posteriormente por la enzima desramificante Lariat para generar la estructura clásica de horquilla de los pre-miRNAs (106). El pre-miRNA generado será transportado al citoplasma por la exportina 5 (XPO5) donde completará su maduración por Dicer, del mismo modo que por la ruta canónica (107). A través de esta ruta se sintetizan entre el 1% y el 2% de todos los microRNAs humanos (108).

Los mirtrons se subdividen en cuatro categorías dependiendo de la naturaleza de lo que sobresale por sus extremos 3' y 5': convencional (Fig. 10A), con cola en 3' o en 5' (Fig. 10B) o en ambos extremos. Los tres últimos casos, se producen a partir de intrones más largos, por lo que después de la desramificación de Lariat, es necesaria la actuación de una exonucleasa para eliminar las secuencias sobresalientes y poder generar la estructura de horquilla propia de un pre-miRNA (Fig. 11) (115).

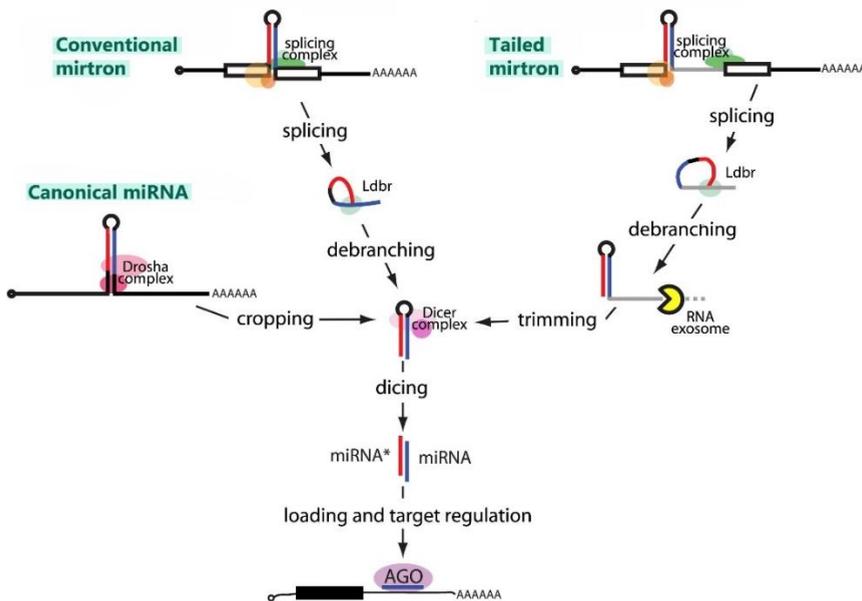


Figura 11. Esquema de la biogénesis canónica frente a la biogénesis de mirtron convencional la de mirtron con cola (115)

1.2.3.2.2. Endo-siRNAs

Otro grupo de RNAs de pequeño tamaño que sigue un proceso de biogénesis dependiente de Dicer, pero independiente del complejo Drosha/DGCR8, son los siRNAs endógenos (endo-siRNAs) (106). Se trata de pequeños RNAs cuya peculiaridad frente a otros sustratos de Dicer es que naturalmente se encuentran formando una doble cadena, como se observa en las Figuras 8B y 10C. Estas moléculas de doble cadena pueden derivar de transcripciones de repeticiones invertidas que dan lugar a horquilla con una larga estructura de doble cadena, o de apareamientos de bases con transcritos antisentido naturales (NATs), como los *cis*-endo-siRNAs, producidos por transcripción bidireccional, o los *trans*-endo-siRNAs, formados por la hibridación de NATs procedentes de distintas regiones genómicas (116). Tras su procesamiento y maduración por Dicer, los endo-siRNAs se asocian con la proteína Ago2 para llevar a cabo sus funciones regulatorias de manera similar a los microRNAs convencionales.

Si bien los endo-siRNAs han sido observados en plantas, *Drosophila Melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, su presencia en mamíferos es bastante controvertida. Los estudios realizados al respecto consistentes en el estudio del microRNAoma en diferentes líneas celulares de mamíferos no han permitido detectar endo-siRNA en ningún caso, salvo en ovocitos murinos y en células madre embrionarias, lo cual sugiere que su presencia es biológicamente relevante (117). Por otro lado, algunos endo-siRNAs juegan también un importante papel en la regulación de la cromatina y el silenciamiento de elementos transponibles, pudiendo actuar también como silenciadores cotranscripcionales en la expresión génica (118).

1.2.3.2.3. Sno-RNAs

Los snoRNAs (*some small nucleolar RNAs*) son un tipo de pequeñas moléculas de RNA no codificante (ncRNA), de entre 60-170 nucleótidos, cuya función principal se asocia a las modificaciones post-transcripcionales de otros ncRNAs, principalmente de rRNAs y pequeños RNAs nucleares (snRNAs)(106,119). Sin embargo, además de tener un papel fundamental en la biogénesis de los ribosomas, también parecen ser claves en otros procesos regulatorios celulares (120). En cuanto a su biogénesis, el procesamiento del pri-miRNA se lleva a cabo por mecanismos desconocidos pero independientes de Drosha, que dan lugar a pre-miRNAs en forma de horquilla que sí son reconocidos y procesados por Dicer en miRNAs maduros (Fig. 10D).

1.2.3.2.4. miR-320 y miR-484

Las rutas no canónicas independientes de Drosha no necesariamente implican el procesamiento del pri-miRNA por la maquinaria de *splicing*, un ejemplo de ello son los microRNAs miR-320 y miR-484. Estos microRNAs parecen ser transcritos como pre-miRNAs cortos en forma de horquilla, desprovistos de secuencias de reconocimiento para Drosha/DGCR8, motivo por el cual su maduración se produce directamente por Dicer, tal y como se representa en la Figura 10E (108).

1.2.3.2.5. pre-tRNA

Existen tres rutas de biogénesis de microRNAs a partir de estructuras de RNA de transferencia (tRNA), dos de ellas independientes de Drosha y una independiente de Dicer. La primera de las rutas de biogénesis de microRNAs independiente de Drosha es la que se da a partir de RNAs endógenos de mamíferos (Fig. 10F), mientras que la segunda es a partir de pre-tRNAs codificados por γ -herpesvirus murino 68 (MHV68). Si bien,

como se ha comentado en líneas anteriores, ambas rutas son Drosha-independientes, se observa una pequeña variación en la biogénesis de cada una. Mientras que en los mamíferos el microRNA parece procesarse directamente a partir de tRNA exclusivamente por Dicer, los pre-tRNAs codificados por MHV68 necesitan ser procesados en primer lugar por una enzima tRNasaZ, que segmenta el extremo 3' del tRNA para liberar las horquillas de pre-miRNA, que luego son procesadas antes de su maduración por Dicer (121). Por otra parte, estructuras secundarias de tRNA pueden también ser procesadas por la enzima tRNasaZ dando lugar a un microRNA maduro de manera independiente de Dicer (Fig. 10c) (108).

1.2.3.3. Biogénesis Drosha/DGCR8-indep. y Dicer-indep.: Agotrons

Uno de los descubrimientos más recientes acerca de las especies de RNA conservadas asociadas a las proteínas Ago son los denominados agotrons (Figura 8C). Al contrario que el resto de RNAs Ago-asociados descritos hasta la fecha, los agotrons son los únicos que evitan por completo la ruta de biogénesis canónica, siendo el primer ejemplo endógeno cuya estrategia de biogénesis es independiente tanto del complejo Drosha/DGCR8 como de Dicer (122).

En cuanto a las funciones exactas de estos recién descubiertos RNAs asociada a las proteínas Ago de manera funcional, siguen siendo un misterio. No obstante, los investigadores Daugaard y Hansens proponen tres escenarios posibles respecto a la función y a la relevancia biológica de los agotrons. El primero de ellos hace referencia a los agotrons como un tipo de microRNA muy preciso al suponer que el grupo de mRNAs diana de los mismos es mucho más limitado que el de lo microRNAs convencionales

(Fig. 12A). Esta suposición se basa en que dos aspectos: en primer lugar, mientras que en la biogénesis de los microRNAs convencionales los pre-miRNAs dan lugar a dos microRNAs maduros diferentes, que son liberados por Dicer, en la biogénesis de los agotrons se genera tan solo un RNA guía maduro, lo que reduce sus dianas en un 50%; en segundo lugar, las regiones de unión del agotron al mRNA diana están enriquecidas con un elevado porcentaje (57%) de GC, frente al resto de microRNAs (entre 42 y 45%), lo que reduce todavía más las uniones inespecíficas, haciendo más precisos a los agotrons que a la mayoría de microRNAs (106,122).

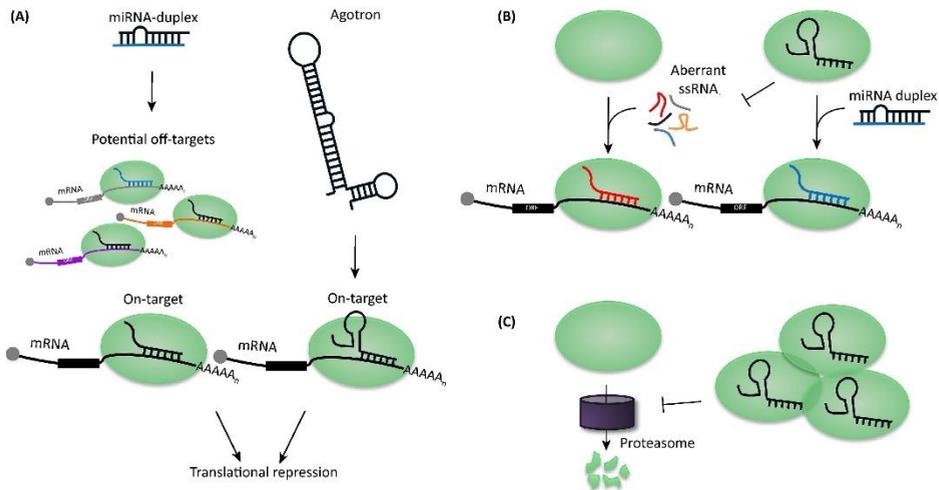


Figura 12. Funciones propuestas de los agotrons. (A) Agotrons como guías precisas. Los agotrons tienen un grupo mucho más restringido de mRNAs objetivo que los microRNAs convencionales, por lo que podrían servir como un tipo similar de microRNA muy preciso con efectos limitados fuera de sus dianas. (B) Agotrons como protectores de las proteínas Ago para evitar la conversión de RNAs de cadena simple (ssRNA) no deseados. Los agotrons ocupan el anal de unión de las proteínas Ago, lo que impide la entrada y asociación con Ago de ssRNAs. Gracias a los agotrons, permitiendo la entrada solo a los sustratos apropiados de Ago y garantizando de este modo la regulación postranscripcional apropiada de la expresión génica. (C) Agotrons como reguladores de la rotación de las proteínas Ago. En ausencia de sustratos, los agotrons pueden unirse y estabilizar a las proteínas Ago descargadas, evitando su degradación por el proteasoma y aumentando de este modo los niveles adecuados de proteínas Ago (106).

El segundo escenario propuesto por los investigadores anteriormente mencionados plantea que la estructura secundaria de los agotrons les permite cargarse en Ago y bloquear de manera efectiva la asociación RNAs aberrantes o de cadena simple (ssRNA), evitando que se conviertan en moléculas reguladoras funcionales no deseadas, al mismo tiempo que desplazarse fácilmente cuando el sustrato de Ago es el adecuado (Fig. 12B).

Por último, dado que se sabe que las proteínas argonauta son altamente inestables en ausencia de sustrato, los autores también proponen a los agotrons como protectores de la degradación de Ago, y por tanto participando en la regulación de la rotación de estas proteínas, como se representa en la Figura 12C.

1.2.3. Mecanismos de regulación de la expresión génica de los microRNAs

Los pequeños transcritos de RNA no codificante, denominados microRNAs, tienen un importante papel como reguladores de la expresión génica, motivo por el cual son fundamentales durante procesos de diferenciación celular y desarrollo, así como durante la proliferación, adquisición y mantenimiento fenotípico, entre otros (101).

Según las predicciones computacionales, alrededor del 60% de los genes codificantes de proteínas humanas estarían regulados por microRNAs. Se estima que existen más de 2.000 microRNAs en el genoma humano según la miRBase (123), cada uno de los cuales puede actuar sobre múltiples mRNAs diana, como se representa en la Figura 13A. Del mismo modo pero a la inversa, un mRNA puede estar regulado por múltiples microRNAs (Fig. 13B), lo cual tiene como resultado un sistema de

regulación mucho más potente y robusto que el que tendría lugar si cada microRNA fuera exclusivo para un mRNA (124).

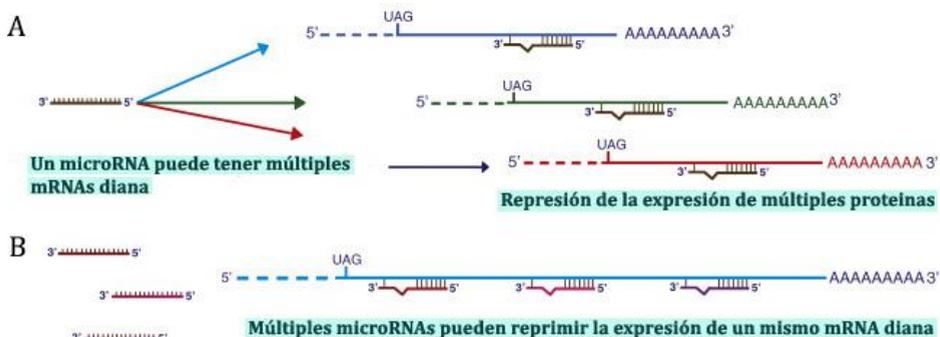


Figura 13. Representación esquemática que muestra que: (A) un mismo microRNA puede interactuar de manera específica con diferentes mRNAs diana y a su vez (B) un mismo mRNA puede estar regulado por diferentes microRNAs. [Modificado de (125)]

Las alteraciones de la regulación llevada a cabo por los microRNAs se relacionan con muchas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares (126), trastornos neurológicos (127) e incluso diversos tipos de cáncer (128). Además, todas las alteraciones detectadas hasta el momento son causadas en última instancia por una desregulación en la expresión del gen objetivo o diana, por lo que identificar las dianas de los microRNAs es clave para entender su función. Sin embargo, la principal limitación que tienen este tipo de investigaciones es la de delinear un principio general para identificar las dianas de RNA, pues la mayoría de estas tiene una complementariedad parcial, lo que dificulta su identificación (129).

Los microRNAs maduros reconocen a su diana por interacciones de complementariedad de bases entre la región semilla (región más conservada del microRNA) y el mRNA (125). La región semilla del microRNA se localiza en las posiciones 2-9 del extremo 5' del mismo

(Fig.14A), y tradicionalmente se une a la región 3'UTR del mRNA diana (Fig. 14B). Este tipo de reconocimiento se conoce como 5' dominante (130).

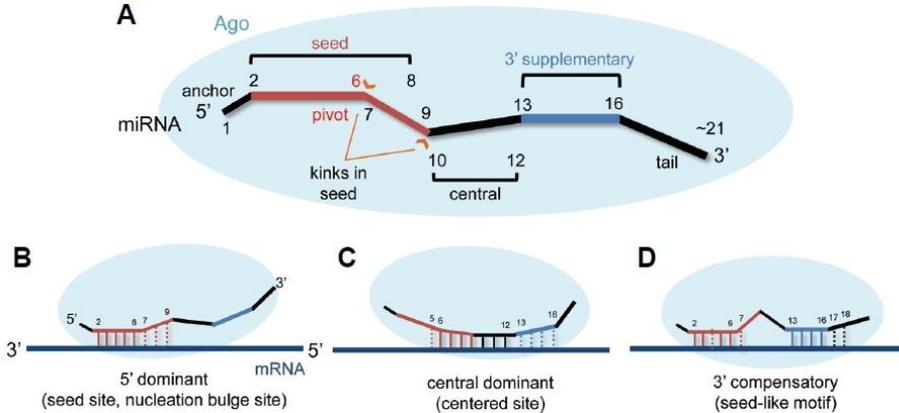


Figura 14. Tipos de reconocimiento microRNA-mRNA. (A) Dominios de un microRNA funcional estructurados por Ago. Modelo de reconocimiento del mRNA por: (B) unión del extremo dominante 5' (sitio "semilla"); (C) apareamiento central dominante (sitio centrado); (D) interacciones compensatorias en 3' (motivos similares a "semilla") (131).

No obstante, recientemente se han descubierto otras formas de reconocimiento microRNA-mRNA además de la mencionada anteriormente. Existen las interacciones dominantes centrales (Fig. 14C), en las cuales el microRNA iniciaría la interacción con el mRNA diana en sus posiciones 7-9 junto con la región central, la cual se extendería hacia la región 3' (posiciones 13-16) (132). Por otro lado, en ocasiones la región semilla contiene *mismatches* o deleciones, por lo que la unión del microRNA y su mRNA no podría tener lugar sin la presencia de interacciones compensatorias (Fig. 14D). Este tipo de reconocimiento recibe el nombre de 3' compensatorio, ya que es la región conocida como 3' suplementaria del microRNA (posiciones 13-16) hace el papel de una segunda región semilla (133).

La no existencia de un único modo de reconocimiento microRNA-mRNA, así como el apareamiento de bases imperfecto que tiene lugar (la hibridación no se produce al 100% como se muestra en las figuras anteriores), no hace sino dificultar la posibilidad de predecir posibles dianas de microRNAs, lo cual continúa siendo un gran reto (130).

En cuanto al funcionamiento de los microRNAs es importante conocer que no trabajan solos, sino que el silenciamiento de los mRNAs diana tiene lugar tras el reconocimiento de los mismos con los microRNAs asociados al complejo RISC (134). Vía RISC, los microRNAs llevan a cabo dos modos de silenciamiento génico en función de la complementariedad que tengan con el mensajero, tal y como se muestra en la Figura 15 (135).

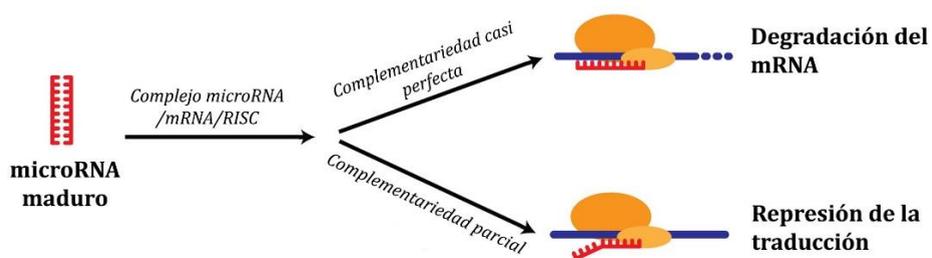


Figura 15. Modos de silenciamiento de un microRNA en función del grado de complementariedad con el mRNA [Modificado de (135)]

Si la complementariedad entre el microRNA y el mRNA es casi perfecta, se produce una escisión endonucleolítica por RISC del mRNA, induciendo la desintegración del mismo. Sin embargo, si la complementariedad microRNA-mRNA es parcial, el silenciamiento de los genes diana viene mediado por el reclutamiento, por parte de RISC, de una serie de proteínas efectoras adicionales que inducen la represión de la traducción (134).

Así mismo, se estima que un 48% de los genes diana están regulados predominantemente mediante la represión de la traducción, un 29 % lo

estaría por la degradación del mensajero y el 23% restante lo estaría por ambos mecanismos, según el estudio llevado a cabo por Jin H. y Xiao C. en 2015 (136). Además, las investigaciones de estos autores apuntan a que los RNAs implicados en el desarrollo celular o tisular están principalmente regulados por la degradación del mensajero (mecanismo irreversible pero eficiente para determinar el destino celular), mientras que los genes identificados en células totalmente diferenciadas son predominantemente regulados por la represión de la traducción (mecanismo más inmediato, transitorio y reversible, más adaptado a contrarrestar el estrés ambiental) (136).

1.2.4. Nomenclatura de los microRNAs

La numeración de los genes que codifican para microRNAs es simplemente secuencial. Sin embargo, si se identifican microRNAs idénticos entre especies, es decir microRNAs ortólogos, se les denomina con el mismo número (137). Así mismo, las tres primeras letras de los microRNAs están destinadas a la identificación del organismo utilizándose por ejemplo el prefijo *hsa-* en el caso de los microRNAs humanos (ej.: *hsa-miR-16*), el prefijo *rno-* si se trata de ratas (ej.: *rno-miR-16*) o el prefijo *mmu-* si son de ratón (ej.: *mmu-miR-16*).

La nomenclatura también difiere según el grado de madurez del microRNA. De este modo, un microRNA maduro se designa como **miR-121**, mientras que **mir-121** hace referencia al gen del microRNA y a la porción predicha de la transcripción primaria. Además, dado que secuencias precursoras distintas pueden expresar secuencias maduras idénticas, para diferenciarlas se añaden sufijos numéricos, es decir: *hsa-mir-121-1* y *mir-121-2*. Mientras que los sufijos con letras denotan secuencias maduras

estrechamente relacionadas, por ejemplo los microRNAs maduros hsa-miR-121**a** y hsa-miR-121**b**, expresados a partir de los precursores hsa-mir-121**a** y hsa-mir-121**b** respectivamente (137).

En cuanto a la abundancia de las distintas secuencias precursoras de un mismo microRNA, si se conoce la abundancia relativa, al microRNA expresado predominantemente se le denominaría, por ejemplo, miR-56, mientras que el menos expresado se representaría como miR-56* (brazo opuesto del precursor). Si por el contrario los datos no permiten determinar qué secuencia es la predominante, se nombraría en función del brazo del que proceden, utilizando para ello los sufijos -5p (si proceden del brazo 5') y -3p (si proceden del brazo 3'), es decir: miR-121-**5p** y miR-121-**3p** (137).

Si bien algunos de los microRNAs que inicialmente no se ajustaban a la actual nomenclatura han sido renombrados, existen algunas excepciones a estas reglas que se han mantenido. Es el ejemplo de los microRNAs de plantas, los cuales están publicados en mayúsculas [ej.: MIR121]. También los microRNAs virales tienen un patrón de denominación ligeramente diferente al descrito anteriormente, por lo que no es del todo fiable la distinción de mir/miR para distinguir entre precursor/maduro. Otras excepciones obvias al esquema de numeración son let-7 y lin-4, cuyos nombres se conservan por razones históricas, manteniéndose además en las nuevas presentaciones de homólogos de ambos (137).

1.2.5. MicroRNAs circulantes

Después del descubrimiento de los microRNAs en 1993, pasaron más de 10 años hasta que las investigaciones de Chim *et al.* en 2008 (138) demostraron su presencia en fluidos biológicos, concretamente la

presencia de microRNA placentarios en el plasma sanguíneo materno. Ese mismo año, y casi simultáneamente, Lawrie y co-autores reportaron la detección de una serie de microRNAs asociados a tumores en muestras de suero de pacientes con linfoma difuso de células B (139). Posteriormente, y tras el descubrimiento de la presencia de microRNAs extracelulares en sangre, plasma y suero, numerosas investigaciones han permitido demostrar también su presencia en otros muchos fluidos corporales, tales como la saliva, la orina, la leche materna, el plasma seminal, las lágrimas, el fluido amniótico, el calostro, el lavado bronquial, el líquido cefalorraquídeo, y los líquidos peritoneales y pleurales (140–142). No obstante, la concentración de los microRNAs, así como su composición relativa, varían significativamente entre los diferentes fluidos. Es por ello que no existe un consenso con respecto al origen y a la función biológica de los microRNAs extracelulares, pues no son una población homogénea y, además, existen en formas empaquetadas de diferentes maneras, como se verá a continuación.

Poco antes del descubrimiento de los microRNAs en los fluidos biológicos, se demostró su presencia en los exosomas de células en cultivo, lo que planteó la hipótesis de que los microRNAs extracelulares se encapsulaban en exosomas y microvesículas, como se representa en la Figura 16.1-2. El hecho de que este tipo de vesículas sean impermeables a las RNAsas explicaba la gran estabilidad de los microRNAs extracelulares (143). Sin embargo, más adelante se descubrió que los microRNAs extracelulares no están presentes únicamente encapsulados en microvesículas o exosomas, sino que la mayor parte de los mismos (entre el 90-95% de los microRNAs circulantes) residen en el espacio extracelular libres de vesículas de membrana, asociados con proteínas AGO (Fig. 16.3) (144). Dado el importante papel de estas proteínas en la

biogénesis de los microRNAs, no es sorprendente que los microRNAs maduros extracelulares se asocien a ellas, las cuales se ha demostrado que confieren una mayor estabilidad a los microRNAs, por lo que este tipo de uniones se da especialmente en los microRNAs liberados en ambientes ricos en nucleasas y proteasas. Así mismo, en el espacio extracelular se han encontrado también microRNAs asociados a lipoproteínas de alta densidad (HDL), Figura 16.4, si bien la proporción de este tipo de uniones todavía no se conoce con precisión (145).

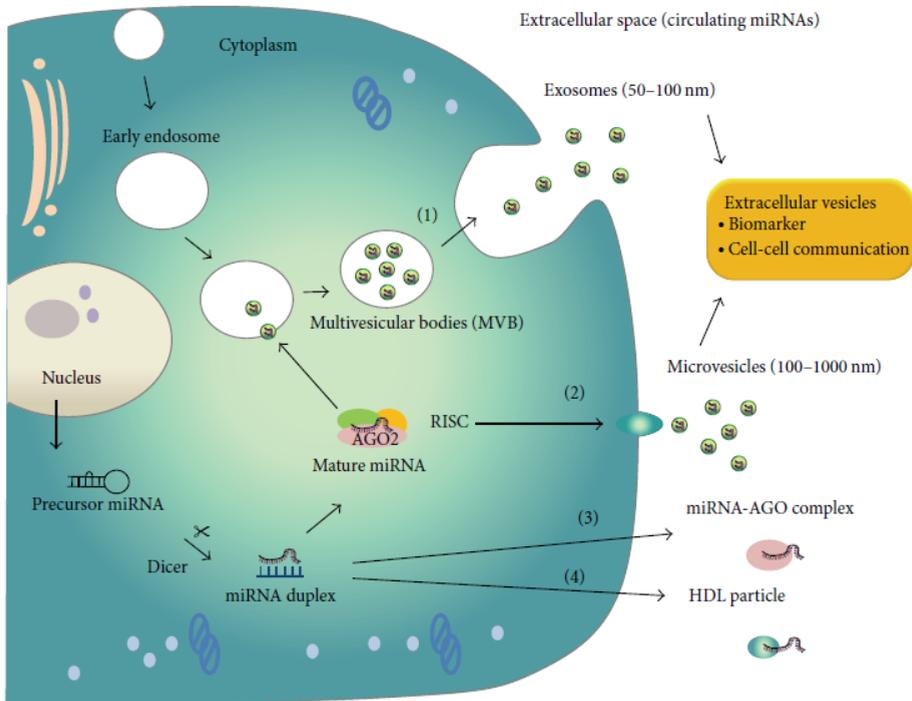


Figura 16. Mecanismos de liberación de microRNAs al espacio extracelular. (1) A través de cuerpos multivesiculares (MVB) y secreción a través de exosomas. (2) Incorporados en microvesículas que se forman por desprendimiento externo de la membrana plasmática. (3) Asociados a proteínas de unión (como AGO) y liberación del complejo resultante. (4) Exportación del microRNA y asociación en el espacio extracelular a lipoproteínas de alta densidad (HDL). (145)

1.2.6. Desequilibrio de microRNAs y enfermedad

Teniendo en cuenta el papel que desempeñan los microRNAs en la regulación de la expresión del genoma, así como el intrincado sistema de control en el que se encuentran inmersos, no es sorprendente que la desregulación de estos tenga un impacto significativo sobre la homeostasis del organismo. Así mismo, conocer la relación entre el desequilibrio de los microRNAs con determinadas enfermedades, trasladado a la clínica podría constituir una poderosa herramienta diagnóstica, pronóstica e incluso terapéutica.

A continuación, se muestra una recopilación de casos en los que el desequilibrio de una serie de microRNAs se ha asociado a determinadas enfermedades de afectación pulmonar, así como en enfermedades de origen infeccioso, como la protagonista de esta tesis.

1.2.6.2. MicroRNAs circulantes en patologías respiratorias

El pulmón tiene un perfil de expresión de microRNAs muy específico y altamente conservado entre mamíferos, sin embargo, el conocimiento del papel de los microRNAs en condiciones fisiológicas y patológicas en el compartimento pulmonar es aún limitado, y está basado mayoritariamente en estudios con modelos animales. A pesar de ello, parece clara la implicación de los microRNAs en el desarrollo del pulmón y su homeostasis, en el control de la inflamación y respuesta a la infección, y en que la desregulación de los mismos puede contribuir al desarrollo de numerosas enfermedades pulmonares. En la Figura 17 se recogen los principales microRNAs que, en condiciones fisiológicas, están implicados

en la homeostasis y el desarrollo pulmonar, así como las consecuencias que la desregulación los microRNAs tiene en el desarrollo de enfermedades pulmonares (146).

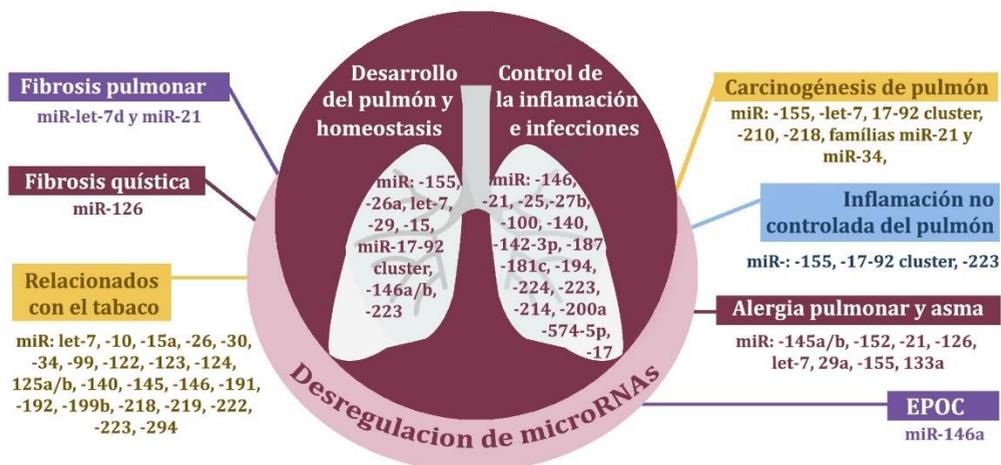


Figura 17. Implicación de microRNAs descritos en procesos fisiológicos y patológicos del pulmón. Se ha demostrado que muchos microRNAs están implicados en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar y el desarrollo, por lo que su desregulación puede dar lugar a la aparición de procesos patológicos y conducir al desarrollo de enfermedades pulmonares. [Modificado de (146)]

Muchos microRNAs han sido descritos como esenciales para la homeostasis y el desarrollo pulmonar, entre los cuales destacan por ejemplo el miR-155, el miR- 26a, el let 7, el miR-29, el miR 15, el miR-146a/b y el *cluster* miR 17-92, cuyas funciones más importantes relacionadas con el pulmón se recogen en la Tabla 6. Es por ello que la desregulación de los mismos puede tener graves consecuencias, como las descritas por los investigadores Banerjee y colaboradores en ratones deficientes de miR-155 (147). En sus investigaciones observaron que este microRNA tenía un papel esencial en la diferenciación de los linfocitos-T *naive* a células Th1 y Th2, al apreciar que ratones deficientes de miR-155 se volvían inmunodeficientes y presentaban una remodelación del pulmón

aumentada, así como respuestas alteradas de los linfocitos B y T a los estímulos inflamatorios. Otro ejemplos de microRNAs implicados en la homeostasis pulmonar, son los miembros de la familia let-7, miR-29 y miR-15, los cuales funcionan como supresor de las células tumorales en el pulmón (146).

Tabla 7. MicroRNAs implicados en procesos fisiológicos del pulmón [Modificado de (146)].

MicroRNAs	Función (A estudios animales, H estudios humanos)
miR-17-92 cluster	Importante en el desarrollo pulmonar y la homeostasis (A)
miR-155	Importante para la remodelación normal de las vías respiratorias (A)
	Alteración de la diferenciación de células-T (A)
miR-26a	Altamente expresado en células epiteliales y bronquiales, importante para el desarrollo pulmonar (H)
let-7	Altamente expresado en tejido normal de pulmón, funciona como supresor de tumor en células del pulmón (H)
miR-29	Supresor de tumor en células pulmonares (H)
miR-15, miR-16	Supresor de tumor (H)
miR-223	Control de la producción de granulocitos y función (A)
miR-146a/b	Regulación de la retroalimentación negativa de IL-1 β de inflamación inducida (H)
miR-200a, miR-223	Contribución a la extrema virulencia de r1918 <i>influenza</i> virus (A)
Familia miR-17, miR-574-5p, miR-124	Facilitar evasión de virus por el sistema inmune durante el inicio de la infección

IL: Interleucina

Como ya se ha comentado en líneas anteriores, los microRNAs son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis del pulmón, por lo que el desequilibrio de los mismos, tanto a la baja como a la alta, puede contribuir al desarrollo de afecciones pulmonares patológicas, como las enfermedades relacionadas con el tabaquismo, el cáncer de pulmón, la fibrosis o algunos trastornos inmunitarios, como la alergia (146). En la

tabla siguiente se recogen algunos de los microRNAs implicados en procesos patológicos del pulmón.

Tabla 8. *MicroRNAs implicados en procesos patológicos del pulmón* [Modificado de (146)]

MicroRNAs	Función (A estudios animales, H estudios humanos)
miR-155, miR-17-92 cluster	Su desregulación produce inflamación descontrolada (A)
miR: -21, -27b, -100 -181c, -223, -224	Aumentados después de la exposición a lipopolisacáridos (A)
miR-155	Sobre-expresado en tumores sólidos, inhibición de los genes supresores de tumores (A, H)
miR-223	Altera la función granulocitaria, regula la producción de granulocitos y la respuesta inflamatoria (A)
miR-148a/b, miR-152	Regulación del gen de susceptibilidad al asma HLA-G (H)
miR-21	Papel clave en el asma (A) Sobre-expresados en tumores malignos sólidos (A, H)
miR-126	Supresión del fenotipo asmático por el bloqueo de miR-126 (A)
let-7, miR-29a, miR-155	Regulación a la baja en células epiteliales de las vías respiratorias en fibrosis quística (H)
let-7	Regulación de la inflamación alérgica en células del epitelio bronquial (A,H)
miR-133a	Efecto pro-inflamatorio en el asma experimental (A) Papel en la progresión del cáncer de pulmón (H)
miR-146a	Regulador de la expresión de RhoA, diana para la terapia del asma (A, H)
miR-146a	Expresión reducida en fibroblastos en EPOC (H)
miR: -218, -15a, -199b, -125a/b, -294	Desregulados en pacientes fumadores (A, H)
miR-218	Supresor de tumores en cáncer de pulmón no microcítico (H)
cluster miR-17-92	Sobre-expresado en cáncer de pulmón (H)
miR-34	Regulación de la apoptosis en células de cáncer de pulmón (H)
miR-210	Sobre-expresado en cáncer de pulmón (H)
miR-let-7d	Efecto pro-fibrótico en fibrosis pulmonar (A, H)

Como se ha recogido en las tablas anteriores, es evidente que el pulmón tiene un perfil muy específico de microRNAs que sufre cambios a lo largo del desarrollo del pulmón, así como durante los procesos de enfermedad pulmonar. Diversas investigaciones han permitido caracterizar el perfil de expresión de una serie de microRNAs característicos de enfermedades provocadas por el tabaco, como la EPOC o el cáncer de pulmón, entre otras. También se ha relacionado el desequilibrio de algunos microRNAs, tales como el miR-155 o el *cluster* miR-19-72 con alergias pulmonares o asma. Todo ello lo que demuestra es que el conocimiento de los perfiles de expresión de microRNAs, alterados en un pulmón enfermo, puede ofrecer nuevos conocimientos sobre la biología de las enfermedades pulmonares.

No obstante, dado que la enfermedad protagonista de esta investigación está causada en la mayor parte de los casos por una bacteria, considerándose por tanto una enfermedad infecciosa, es conveniente conocer el papel de los microRNAs en este tipo de enfermedades, lo cual se recoge en las líneas siguientes.

1.2.6.1. MicroRNAs circulantes en enfermedades infecciosas

Las células del sistema inmune actúan de manera coordinada gracias, en buena parte, a los microRNAs, los cuales tienen un importante papel en la comunicación y control celular. Así pues, la presencia de agentes patógenos, como *S. pneumoniae* en el caso de la NAC, altera el equilibrio homeostático de los microRNAs, y por tanto la regulación llevada a cabo por los mismos, de varias maneras que pueden simplificarse en dos mecanismos: la **codificación de microRNAs por el patógeno**, y la

alteración de los niveles de expresión de los microRNAs del huésped (148).

En cuanto al primero de los mecanismos, se sabe que los patógenos codifican microRNAs destinados a falsificar los del huésped, lo que les proporciona una ventaja para la multiplicación y supervivencia del patógeno. Este mecanismo fue descrito en virus en el año 2004, por los investigadores Pfeffer y colaboradores (149), y no fue hasta diez años más tarde cuando se demostró también la presencia de microRNAs codificados por bacterias (150). Por lo que respecta al segundo de los mecanismos mencionado anteriormente, la alteración por parte de los patógenos del sistema del huésped para su beneficio afectando a los niveles de expresión de sus microRNAs, se ha descrito para muchos tipos de infección, tanto virales como bacterianas (148). En concreto, la neumonía causada por *S. pneumoniae* ha sido estudiada en ratones por los investigadores Verschoor y colaboradores, demostrando que el miR-155 es crítico para la eliminación eficaz del patógeno. Según los resultados de su investigación, los ratones deficientes de miR-155 previenen más eficazmente la infección neumocócica invasiva aguda, pero tienen cargas significativamente mayores tras la colonización (151). Por otro lado, el perfil de expresión de pacientes con neumonía también ha sido estudiado por Amal y colaboradores, los cuales han observado que los niveles séricos de miR-21, miR-155 y miR-197 están, significativamente, más elevados en pacientes con cáncer de pulmón y neumonía (152).

Una de las complicaciones más graves que puede tener un paciente con NAC es el desarrollo de sepsis. Se trata de la mayor causa de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos, y se produce cuando el paciente tiene una respuesta inmunitaria fulminante frente a una infección, liberando

sustancias químicas inmunitarias a la sangre para combatirla, lo que, en última instancia, puede causar fallo multiorgánico letal (153). Del mismo modo que los microRNAs varían su presencia en función de determinados problemas patológicos, es de esperar que también se alteren sus niveles durante la sepsis. En esta línea, se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de identificar microRNAs circulantes que sirvan como biomarcadores de sepsis de diversos focos. Dentro de estos estudios se encuentra el de los investigadores Vasilescu *et al.* quienes comunicaron que miR-150, miR-182, miR-342-5p y miR-486 tenían perfiles de expresión diferentes entre pacientes con sepsis y controles sanos, especialmente el miR-150, el cual se mostraba disminuido en los pacientes con sepsis (sin tener en cuenta la infección del órgano que la desencadenaba) (154). También los investigadores Wang *et al.*, en el año 2012, identificaron una serie de microRNAs cuya expresión era significativamente distinta entre pacientes que sobrevivieron a la sepsis (genérica, sin origen específico) y pacientes que no lo hicieron, concretamente miR-223, miR-15a, mir-16, mir-122, miR-193 y miR-483-5p. En su investigación concluyeron que tanto miR-223 como miR-16 estaban disminuidos en los que no sobrevivieron, mientras que el resto se encontraban aumentados (155).

Todos estos resultados demuestran que las patologías provocan un desequilibrio en las concentraciones de determinados microRNAs, lo cual se refleja en la presencia de los microRNAs circulantes, lo que supone una interesante vía de investigación para conseguir una firma genética que sirva como biomarcador de enfermedades, en este caso de la neumonía adquirida en la comunidad e incluso puedan definir una distinta expresión clínica frente a la infección.

1.2.7. MicroRNAs como potenciales biomarcadores

El descubrimiento y desarrollo de mejores biomarcadores diagnósticos y no invasivos supone una vía clave y de gran potencial para mejorar tanto el diagnóstico como el tratamiento individualizado de un gran número de enfermedades humanas, así como para reducir sustancialmente el coste de los cuidados médicos que suponen (156). En este contexto, el descubrimiento de los microRNAs y el hecho de que varían su expresión en tejidos enfermos, lo cual puede detectarse fácilmente en determinados fluidos corporales como el suero o el plasma, los hace potencialmente útiles para el diagnóstico de rutina. Este hecho los hace especialmente interesantes porque podría permitir el establecimiento de firmas de microRNAs de determinadas enfermedades, facilitando su diagnóstico precoz e incluso predecir complicaciones de las mismas (157). Por otro lado, además del potencial como biomarcador diagnóstico, los microRNAs circulantes suponen una herramienta incluso más valiosa como biomarcadores de seguimiento y pronóstico de una enfermedad y sus fases. Dentro de este campo, se han llevado a cabo una serie de investigaciones acerca del papel de los microRNAs circulantes en varios cánceres humanos, como cáncer de pulmón, de mama o de próstata, entre otros, con prometedores resultados (156). En el caso de la sepsis, que es una de las complicaciones más críticas y potencialmente mortal de los pacientes con NAC, es necesaria la estratificación precoz de los pacientes críticamente enfermos y sépticos para identificar aquellos con mayor riesgo de muerte, por lo que el uso de microRNAs como biomarcador para el diagnóstico temprano de la sepsis sería de gran importancia clínica (153).

Si bien no se trata de una tarea fácil, pues uno de los desafíos más importantes al respecto pasa por descubrir y establecer los microRNAs específicos que pueden usarse de manera consistente y fiable como biomarcador ideal de cada enfermedad (157), la gran estabilidad de los microRNAs en determinados fluidos, su obtención no invasiva, su rápida y precisa cuantificación, su relación directa con los diferentes estados de enfermedad, así como su bajo coste, convierte a los microRNAs en biomarcadores ideales.

2.

**Justificación
del estudio,
Hipótesis y
Objetivos**

2.1. Justificación del estudio

Existen múltiples estudios que han analizado el papel de distintos biomarcadores como pronóstico en la neumonía comunitaria, concretamente en la predicción de mortalidad. Sin embargo, el estudio de los microRNAs supondría un avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en complicaciones específicas de la neumonía y podría sentar las bases para la identificación de endotipos en esta enfermedad. Además, tiene una serie de ventajas frente a los biomarcadores proteicos convencionales, principalmente su menor coste y su menor tiempo de procesado.

2.2. Hipótesis

Los datos procedentes de estudios en modelos experimentales y en series de pacientes con sepsis de distintos orígenes avalaría la posibilidad del uso de los microRNAs como biomarcadores de infección grave. El perfil de microRNAs, debido a la influencia de estos en la respuesta inflamatoria desencadenada ante la infección, podría condicionar el desarrollo de una serie de complicaciones (insuficiencia respiratoria hipoxémica, derrame pleural o sepsis, entre otras), lo que lleva a pensar en su uso como biomarcador a la hora de predecir estas complicaciones durante las primeras horas del ingreso del paciente

Tal y como se ha expuesto en el apartado introducción, los modelos experimentales sobre el estudio de microRNAs en sepsis de distintos orígenes muestran un punto de partida plausible y de interés para el desarrollo de nuestra investigación centrado en la neumonía comunitaria,

sin duda, una de las patologías respiratorias con más incidencia en la población general.

2.3. Objetivos

El **objetivo primario** de nuestro estudio es analizar la correlación pronóstica entre los niveles de microRNAs circulantes en sangre periférica y el desarrollo de complicaciones en la neumonía comunitaria que requiere ingreso hospitalario.

El **objetivo secundario** es analizar la capacidad para predecir complicaciones y mortalidad a partir de la expresión de los microRNAs incluidos en el estudio, tomando como referencia las escalas pronósticas de gravedad de la neumonía y sepsis existentes.

3.

**Material y
Métodos**

3.1. Descripción, ámbito y duración del estudio

3.1.1. Descripción

Se trata de un estudio prospectivo, observacional, longitudinal con la selección de manera consecutiva de los pacientes hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad que cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

3.1.2. Ámbito

El ámbito de estudio fue el Consorci Hospital General Universitari de València (CHGUV) y Hospital Clínic Universitari de València (HCUV); centros de tercer nivel, de referencia para los departamentos de salud Valencia-Hospital General y Valencia-Clínico-Malvarrosa de la Comunidad Valenciana, respectivamente. El CHGUV dispone de 503 camas hospitalarias para la atención de una población potencial de 372.325 habitantes, mientras que el HUCV cuenta con 587 camas para una población de referencia de 357.388 habitantes. Los pacientes ingresados fueron seleccionados principalmente por los servicios de Neumología.

3.1.3. Duración del estudio

La duración del trabajo fue de tres años. El periodo de recogida de datos se inició en abril de 2016, finalizando la misma en enero de 2019.

3.2. Pacientes

3.2.1. Reclutamiento

El reclutamiento de los pacientes se realizó de manera consecutiva durante las primeras 24 horas de su ingreso, donde se comprobó que cumplieran los criterios de inclusión y no cumplieran ninguno de exclusión. El personal facultativo ofreció la participación en el estudio proporcionando información verbal y ofreciendo el consentimiento informado sobre el mismo.

3.2.2. Criterios de inclusión

El criterio de inclusión fue la presencia de neumonía adquirida en la comunidad, en pacientes mayores de 18 años que precisaban ingreso hospitalario. Se define “neumonía adquirida en la comunidad” a la presencia de un cuadro clínico compatible consistente en fiebre ($T^a > 38^{\circ}\text{C}$), tos, expectoración, dolor torácico y disnea, junto a la presencia de un infiltrado radiológico de nueva aparición en la radiografía de tórax.

3.2.3. Criterios de exclusión

Los pacientes que presentaban una o más de las siguientes características no fueron seleccionados para el estudio:

- a) Antecedentes de hospitalización en los 14 días previos al ingreso.
- b) Diagnóstico de neumonía tras 48 horas de ingreso.
- c) Pacientes diagnosticados con neumonía tratados de manera ambulatoria, con el consecuente problema clínico.

- d) Negativa a participar en el estudio y/o a firmar el consentimiento informado.

3.3. Diseño del estudio

3.3.1. Variables analizadas

Para la realización de este trabajo se analizaron las variables que se recogen en los siguientes apartados. Toda esta información se introdujo en la hoja de recogida de datos adjunta en el Anexo I.

3.3.1.1. Datos demográficos

Incluyen la edad y el sexo de los pacientes, así como las fechas del episodio de neumonía y el lugar de residencia (domicilio propio o institución).

3.3.1.2. Hábitos tóxicos y comorbilidades

Considerándose como hábitos tóxicos:

- **Hábito tabáquico.** Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), “fumador” es la persona que ha consumido diariamente durante el último mes cualquier cantidad de cigarrillos, incluso uno. La cuantificación del hábito se realizó mediante el cálculo de los paquetes/año (número de cigarrillos diarios multiplicados por el número de años que lleva fumando y dividido entre 20).
- **Exfumador.** Se considera a la persona que, habiendo sido fumador, lleva al menos 6 meses sin fumar.
- **Hábito enólico.** Consumo habitual de alcohol en cantidad superior a 80 gramos/día durante el año precedente.

- **UDVP.** Usuarios de drogas ilícitas por vía parenteral con regularidad (varias veces por semana).

Y considerando la presencia de las siguientes comorbilidades:

- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (**EPOC**), excluyendo bronquiectasias u otras alteraciones no obstructivas.
- **Comorbilidad cardiológica:** antecedentes de insuficiencia cardíaca, valvulopatía, arritmias o cardiopatía isquémica.
- **Factores asociados a la inmunodepresión:** incluyen la infección VIH, neoplasias hematológicas, trasplante del órgano sólido, esplenectomía, tratamiento con corticoides (al menos 20 mg de prednisona durante las dos semanas previas a la neumonía) y tratamiento quimioterápico en las 4 semanas previas.
- **Neoplasia:** enfermedad de órgano sólido en el momento de la presentación de la neumonía o que haya requerido tratamiento quimioterápico durante el año previo.
- **Hepatopatía crónica:** afectación hepática de origen tóxico, alcohólico o vírico, incluyendo la degeneración a cirrosis hepática.
- **Enfermedad renal:** historia de enfermedad renal crónica o pacientes con valores de urea y creatinina sanguínea anormales, documentados en la historia clínica.
- **Enfermedad cerebrovascular:** evento vascular neurológico central agudo o crónico de causa isquémica o hemorrágica, así como alteraciones en la deglución.
- **Diabetes mellitus:** Hiperglucemia mantenida (glucemia en ayunas mayor de 126 mg/dl), con necesidad de tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.

3.3.1.3. Manifestaciones clínicas

Los **síntomas** consignados fueron: escalofríos, disnea, tos, expectoración, dolor torácico, artromialgias, cefalea, confusión, náuseas, vómitos y diarrea, así como los días de evolución de estos previos al diagnóstico.

Se recogieron los **signos** clínicos de: fiebre (temperatura axilar mayor de 38°C), taquicardia (frecuencia cardíaca mayor de 100 latidos/minuto), taquipnea (frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones/minuto), presión arterial sistólica y diastólica y saturación de oxígeno.

3.3.1.4. Valoración de la gravedad de la neumonía

Para la valoración de la gravedad de la neumonía se utilizó la escala diseñada por Fine en 1997, conocida como clases de riesgo de Fine o PSI (*Pneumonia Severity Index*). La escala deriva de un estudio multicéntrico sobre 14.199 pacientes con neumonía, que posteriormente fue validada en más de 50.000 pacientes en el estudio del PORT (*Pneumonia Outcomes Research Team*). Mediante un sistema de dos pasos, los pacientes con neumonía se estratifican, según el riesgo de muerte en 5 clases diferentes. La clase I agrupa a los pacientes menores de 50 años, que no presentan comorbilidades ni signos ni síntomas de gravedad. En un segundo paso, los pacientes que no han sido asignados en la clase I se clasifican en clases II a V basándose en la puntuación obtenida por las variables demográficas (edad, sexo, vivir en asilo o residencias) y por la existencia de comorbilidades (neoplasia, enfermedad hepática, insuficiencia cardíaca, enfermedad cerebrovascular y enfermedad renal), exploración física (confusión, taquipnea, taquicardia, hipotensión sistólica, hipotermia o hipertemia) y hallazgos radiológicos y analíticos (academia, urea sérica

elevada, hiponatremia, hiperglucemia, anemia, hipoxemia y derrame pleural). La puntuación asignada se corresponde con las siguientes clases de riesgo: clase II, >70; clase III, 71-90; clase IV, 91-130 y clase V, >130 puntos. El riesgo de muerte se incrementa con la clase de riesgo, así, los pacientes con clase de riesgo I-II, presentan una mortalidad del 0,1-0,6%, siendo más elevada en la clase III (0,9-2,8%), y aumentando significativamente en las clases IV (8,2-9,3%) y V (27-29,2%). Dada la adecuada identificación de los pacientes con menor riesgo de muerte, esta escala es de utilidad para la decisión del ingreso hospitalario en los pacientes con neumonía. De este modo, se consideró neumonía leve a aquellos pacientes con una clase de riesgo I-III mientras que los pacientes con clase de riesgo IV-V fueron considerados como graves (Tabla 4).

3.3.1.5. Variables analíticas y radiológicas

La descripción radiológica de la neumonía se basó en el carácter lobar, multilobar, en el caso de que participaran dos o más lóbulos pulmonares, afectación bilateral y aparición de derrame pleural de la misma.

Se consideraron para el estudio los siguientes parámetros analíticos obtenidos bien en el momento del diagnóstico (visita a urgencias) o determinados en no más de 24 horas tras el mismo:

- **Bioquímica sanguínea:** La determinación de los niveles de glucemia fue en mg/dl, considerando hiperglucemia cifras superiores a 126 mg/dl. Se estableció que existía urea sanguínea elevada ante cifras superiores a 42 mg/dl o 7 mmol/L. Se determinaron las proteínas séricas totales (medidas en g/dL), definiendo hipoalbuminemia como cifras inferiores a 3,2 g/dL.

- **Hemograma:** Se analizaron los parámetros del hemograma que han demostrado estar relacionados con un peor pronóstico de la neumonía o desarrollo de complicaciones. Se consideró leucopenia cuando la cifra de leucocitos era menor de $4 \text{ células} \times 10^9/\text{L}$, leucocitosis en valores superiores a $11 \times 10^9/\text{L}$ y neutropenia cuando los neutrófilos totales eran inferiores a $500/\mu\text{L}$. Se consideró anemia cuando los valores de la hemoglobina eran inferiores a $13,5 \text{ g/dL}$ o ante un hematocrito inferior a 30%.
- **Gasometría arterial:** Se recogieron los datos de la PaO_2 , PaCO_2 y pH, y la FiO_2 , siempre que fuera posible. El punto de corte de la PaO_2 para considerar hipoxemia fue 60 mmHg. Se calculó la relación $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$.

3.3.1.6. Desenlaces

Se valoraron el desarrollo de complicaciones y mortalidad durante el ingreso hospitalario y tras 30 días de seguimiento. Las complicaciones acontecidas se clasificaron del siguiente modo:

- Mortalidad:** evento relacionado con la neumonía que ocurre durante (y hasta) los primeros 30 días tras el diagnóstico.
- Insuficiencia respiratoria hipoxémica:** definida en relación con los datos de la gasometría, como una $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$.
- Sepsis:** Para la definición de sepsis se tuvo en cuenta la del *Sepsis Definition Task Force*, que considera la sepsis como una disfunción orgánica potencialmente mortal que es causada por una respuesta excesiva del huésped a la infección (158). Se utilizaron los criterios qSOFA para la valoración de sepsis al ingreso (estado mental alterado o empeorado; frecuencia respiratoria mayor o igual que 22 por minuto; presión arterial sistólica igual o menor a

100 mmHg) (159).

- d) **Evolución desfavorable:** definida como un enlace compuesto con las siguientes variables: muerte, fracaso renal agudo, ingreso en UCI, ventilación mecánica y/o arritmia.
- e) **Ingreso en UCI**
- f) **Estancia media de los pacientes**

3.3.2. Protocolo de trabajo

3.3.2.1. Recogida de plasma y aislamiento de los microRNAs plasmáticos

A los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, y accedieron a firmar la hoja del consentimiento informado, se les extrajo una muestra de sangre venosa (8 ml) durante las primeras 24 horas del ingreso en un tubo BD Vacutainer CPT con EDTA como anticoagulante (REF: 367863). La posterior separación del plasma de las muestras recogidas se realizó mediante centrifugación a 1500 x g durante 20 minutos, traspasando previamente la sangre a un tubo BD Vacutainer con gelosa (REF: 368175). Pasado este tiempo el plasma obtenido se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Para llevar a cabo el aislamiento de los microRNAs se utilizó el *kit* mirVana™ PARÍS™ (REF: AM1560; Life Technologies), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante para la obtención óptima del RNA total circulante de cada muestra, tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura 18.

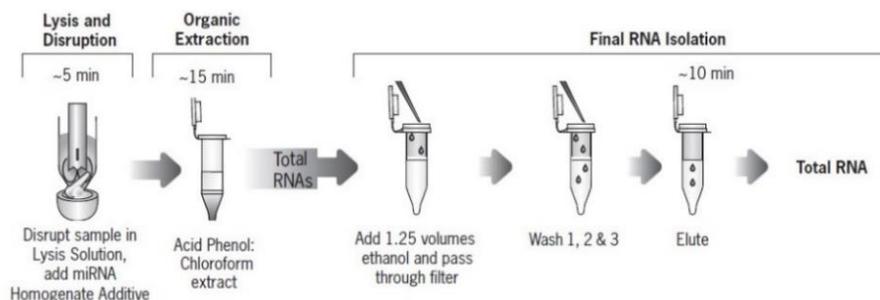


Figura 18. Protocolo de extracción del RNA utilizando el *kit* mirVana™ PARÍS™. Modificado del protocolo de mirVana (160).

El primer paso del protocolo consiste en lisar las células a partir del plasma obtenido por centrifugación, para lo cual es necesario añadir la solución de lisis desnaturante, encargada de estabilizar el RNA e inactivar las RNAsas. A continuación, la extracción del resultado de la lisis anterior se lleva a cabo utilizando ácido-fenol:cloroformo, el cual se encarga de eliminar la mayoría de componentes celulares, incluyendo la mayor parte del DNA y posibilitando de este modo la obtención de una muestra de RNA semipura. El siguiente paso del protocolo del *kit* mirVana es la adición de etanol a la solución recuperada del paso anterior con el fin de favorecer la retención de los microRNAs, así como evitar la pérdida de los RNAs pequeños, a su paso por el filtro de fibra de vidrio utilizado en la fase final de aislamiento para inmovilizar el RNA. Por último, el RNA fijado en el filtro se lava varias veces con las soluciones de lavado del kit para, finalmente, eluirlo utilizando una solución de baja fuerza iónica.

3.3.2.2. Determinación del perfil de expresión de los microRNAs plasmáticos

Para determinar el perfil de expresión de los microRNAs estudiados de cada una de las muestras, se procedió a llevar a cabo en primer lugar una reacción de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). El

objetivo de esta reacción es pasar de la información extraída de cada muestra de RNA a cDNA, que servirá de molde para el paso posterior de PCR cuantitativa (qPCR). Esta reacción se lleva a cabo mediante dos pasos (Figura 19), el primer paso consiste propiamente en la reacción de retrotranscripción o transcripción reversa (esto es, el paso de RNA a cDNA), mientras que el segundo paso se basa en la amplificación por PCR de lo obtenido en el paso previo.

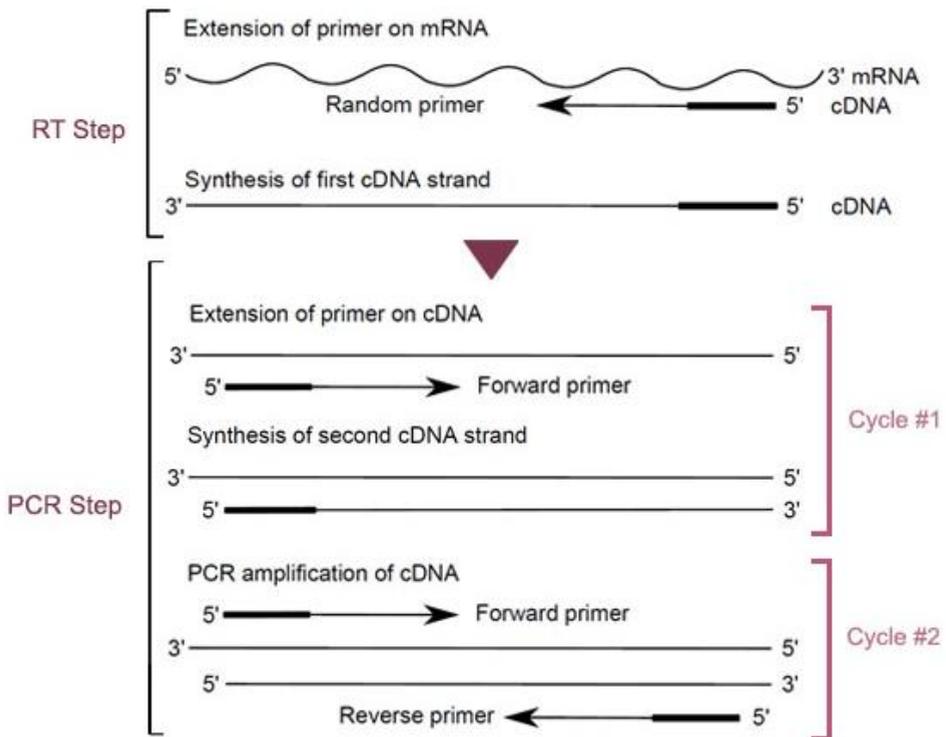


Figura 19. Vista general de los pasos principales de la RT-PCR según la guía de uso *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* (161)

Para la realización de la RT-PCR se utilizó el nuevo *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (REF: AM1556; Applied Biosystems), el cual tiene cuatro pasos fundamentales, como se muestra en la Figura 20.

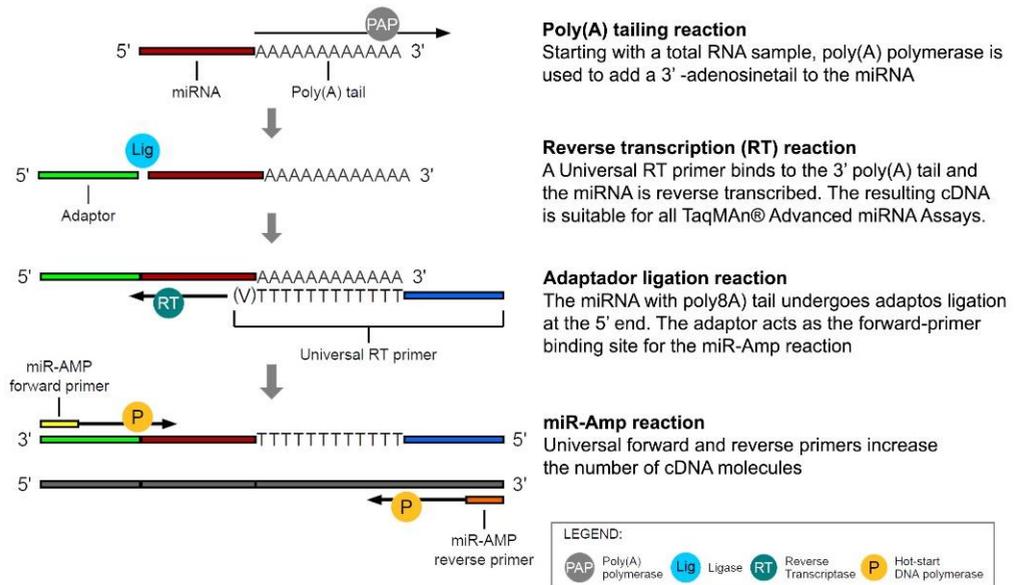


Figura 20. Esquema de la reacción de RT-PCR a según la guía de uso de *TaqMan™ Advanced miRNA Assays* (162).

Este kit permite la retrotranscripción simultánea de todo el conjunto de microRNAs de la muestra, gracias al uso de los *primers* universales que reconocen las secuencias adheridas a los extremos 3' y 5' de los microRNAs de partida. La primera de estas secuencias consiste en una cola de poliadenosinas (o poli-A), la cual es añadida gracias a la acción de la enzima poli(A)-polimerasa, reacción conocida como poliadenilación. Seguidamente, tras añadir los reactivos necesarios, se incorpora al extremo 5' de los microRNAs la segunda secuencia universal, la secuencia adaptadora (o adaptador), mediante una ligasa.

Tras la incorporación de las secuencias universales, como se ha indicado anteriormente, los *primers* universales de transcripción reversa incluidos en el kit las reconocen y tiene comienzo la transcripción de los microRNAs maduros (aquellos que han incorporado las secuencias en sus extremos 3' y 5') a cDNA, tal y como se representa en la figura 5.

Una vez obtenido el cDNA de cada una de las muestras mediante la reacción de RT-PCR anteriormente descrita, se procedió a llevar a cabo la PCR cuantitativa a tiempo real, con el fin de detectar diferencias significativas a nivel de expresión de una serie de microRNAs seleccionados previamente. En total fueron 11 los microRNAs escogidos para el estudio, todos ellos con antecedentes descritos por otros autores en procesos de inflamación o sepsis, principalmente. Para la amplificación del cDNA en cada una de las muestras se utilizaron *primers* específicos de los microRNAs seleccionados, recopilados en la Tabla 9 [REF. genérica A25575, Thermo Fisher Scientific; REF. específica de cada microRNA adjuntada en el Anexo II]. Por otro lado, para la normalización de las expresiones obtenidas se escogieron 4 microRNAs cuya expresión se ha visto que no varía considerablemente entre individuos.

Tabla 9. microRNAs incluidos en el estudio y microRNAs normalizadores.

microRNAs estudiados			Normalizadores
miR-486	miR-223	miR-15a	miR-191
miR-182	miR-499 ^a	miR-574	miR-103 ^a
miR-150	miR-122	miR-297	miR-let-7 ^a
miR-342	miR-193b		miR-16-5p

Se utilizó, junto con los *primers* específicos para los microRNAs seleccionados, el *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* (REF: 4444556, Applied Biosystems), cuyo fundamento se resume en la Figura 21.

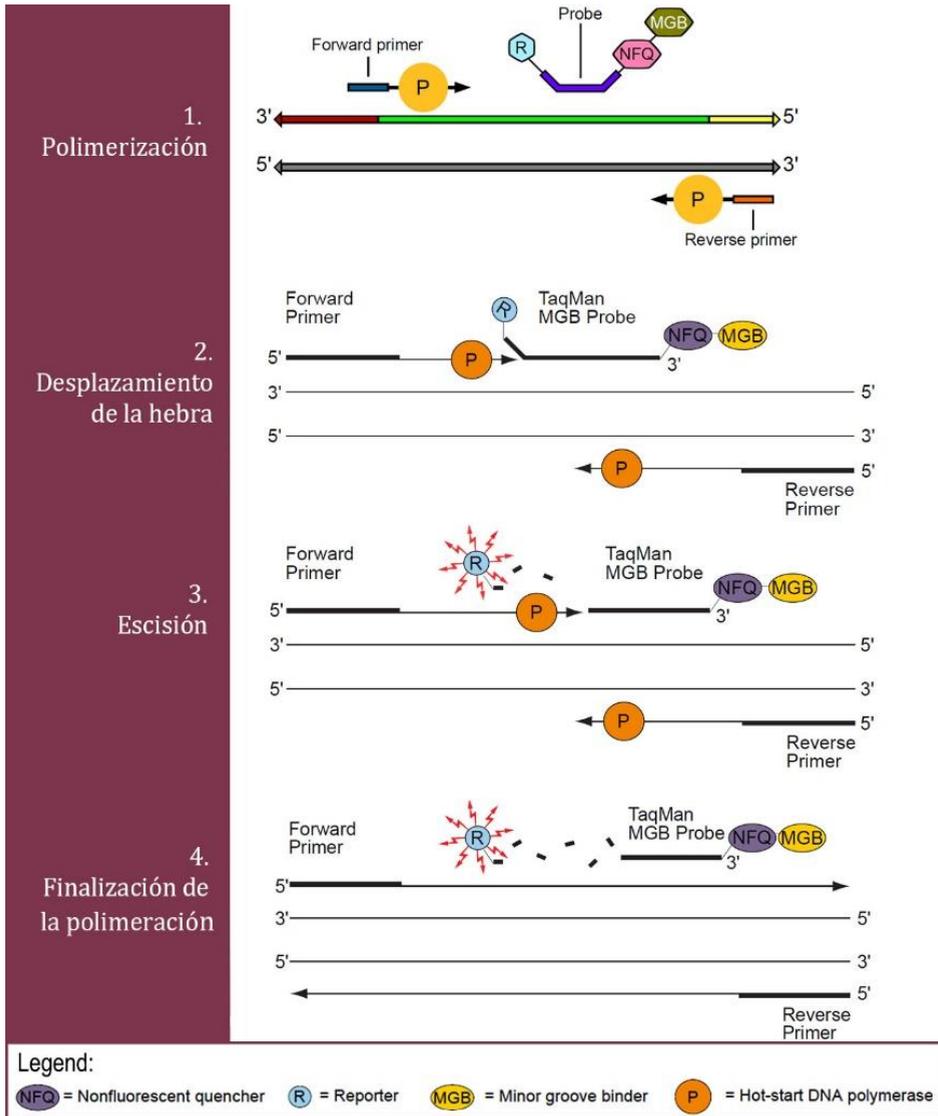


Figura 21. Esquema de la reacción de qPCR según la guía de uso *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* (161)

Como puede observarse en la anterior, durante la PCR la sonda TaqMan@MGB se alinea específicamente a la secuencia complementaria situada entre los sitios de unión de los *primers* directo y reverso. Cuando la sonda está intacta (pasos 1 y 2), la proximidad del reportero al *quencher*

tiene como resultado la supresión de la fluorescencia del reportero. Seguidamente, la DNA polimerasa escinde las sondas que han hibridado con el objetivo (paso 3), produciendo esta escisión la separación entre el reportero y el *quencher* y dando como resultado un aumento de la fluorescencia. Este aumento de la fluorescencia tendrá lugar solo si la secuencia diana es complementaria a la sonda y amplificada durante la PCR, de manera que las amplificaciones no específicas no se detectan. Finalmente, la polimerización de las hebras continúa si bien no se produce la extensión de la sonda debido a que el extremo 3' está bloqueado (paso 4).

En cada ensayo de qPCR realizado se analizaron las muestras por duplicado, y la expresión de cada microRNA fue determinada posteriormente utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$, dando como resultado la expresión relativa de cada microRNA en cada muestra frente a los normalizadores escogidos.

3.3.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con los *softwares* GraphPad Prism versión 8.0 para Windows (La Jolla, California, Estados Unidos), IBM SPSS statistics 20 para Windows (Armonk, Nueva York, Estados Unidos) y R para Windows (Boston, Massachusetts, Estados Unidos).

En todos los test se ha establecido un nivel de significación estadística, que representa la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera, del 5% ($\alpha=0,05$).

3.3.3.2. Comparación de variables categóricas

Inicialmente llevamos a cabo un primer análisis para comprobar si una serie de variables seleccionadas tenían relación o eran estadísticamente

independientes de nuestra variable más genérica, la “evolución desfavorable”. Existen diferentes pruebas para analizar la relación entre las variables, en función del tipo de variables, así como de la distribución de estas. Así pues, en el caso del análisis de variables categóricas (como el sexo o la presencia de comorbilidades), utilizamos el test **Chi-cuadrado (χ^2)**. En este test, la H_0 indica la igualdad de proporciones entre ambos grupos, mientras que la H_A , al contrario, indica que las proporciones no son iguales en ambos grupos. De este modo, si en el test se obtuvo un p-valor inferior a α se rechazó la hipótesis nula.

Para el análisis de los microRNAs como variable categórica se llevaron a cabo diferentes pruebas. Para ello consideramos que los microRNAs cuya expresión era inferior a 10^{-4} , como un “0” (“no expresión” o “infraexpresión”), mientras que los que dieron un valor superior se consideraron como un “1”. Partiendo de este planteamiento, realizamos en primer lugar **regresiones logísticas simples**, sin considerar ninguna covariable, tan sólo los microRNAs, con el fin de detectar alguna relación o modelo entre los diferentes microRNAs para cada una de nuestras variables.

A continuación, y con el fin de presentar unos resultados más completos, así como de establecer posibles relaciones con co-variables que consideramos de interés. Para cada variable de estudio se llevaron a cabo **regresiones logísticas múltiples**, que no son más que una extensión de las simples en las que se predice una respuesta o modelo en función de múltiples predictores. Para ello se tuvo en cuenta la expresión de los microRNAs, el sexo, la NAC previa, el alcoholismo y el tabaquismo, la EPOC, el Asma, la presencia de arritmias o disnea, los valores de Urea, PCR y Lactato, así como antecedentes de insuficiencia renal crónica o el desarrollo de fracaso renal agudo durante el ingreso.

Al contrario que otros test, este tipo de análisis no requiere de condiciones como linealidad, normalidad ni homocedasticidad de los residuos, si bien precisa que la variable dependiente sea **binaria**, que haya **independencia** entre las observaciones, y que el tamaño muestra para el caso de la variable independiente menos frecuente del modelo sea de un mínimo de 10 casos.

El criterio de selección para la formación de modelos tras las regresiones logísticas fue el **criterio de información de Akaike (AIC)**. Se trata de una medida de calidad relativa de un modelo estadístico para un conjunto de datos, si bien no garantiza la calidad del modelo en el sentido absoluto (no tiene en cuenta la significatividad).

3.3.3.2. Comparación de las medias de dos poblaciones

Se han realizado test estadísticos para comparar una variable cuantitativa entre dos grupos, como los pacientes clasificados en el grupo PSI I-III y los clasificados en el grupo PSI IV-V, o los que desarrollaron sepsis y los que no, entre otros. En este test, la hipótesis nula o H_0 indica que no existen diferencias entre medias, mientras que la hipótesis alternativa H_A indica que las medias de las variables de estudio presentan diferencias entre los dos grupos. De este modo, si en el test aplicado el **p-valor obtenido era inferior a α** , se consideraba que había evidencias estadísticas suficientes para rechazar la H_0 .

Para la elección del test adecuado para la realización del contraste de hipótesis, se comprobó previamente la existencia de **normalidad** en los grupos de estudio.

Dado que en ninguno de los mismos se cumplía el supuesto de normalidad, el contraste de hipótesis se realizó mediante el test **no**

paramétrico de Mann-Whitney, expresando los resultados como medianas y rango intercuartil.

3.4. Aspectos éticos

La privacidad de los pacientes se garantizó codificando cada caso de manera que no existiera ningún dato identificativo personal. Los datos clínicos de los casos se introdujeron en una base de datos informática, cuyo manejo fue exclusivo de la investigadora, custodiando la confidencialidad de los mismos.

Así mismo, en los dos hospitales en los que tuvo lugar el reclutamiento de los pacientes incluidos en el estudio, el proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Médica (CEIM), y cada uno de los sujetos participantes expresó su aprobación a la participación en el mismo mediante la firma del consentimiento informado, adjunto en el Anexo III.

4.

Resultados

resultados

4.1. Clínica vs. evolución

En este estudio participaron un total de 223 pacientes con NAC, de los cuales 152 pacientes (68,2%) presentaron una evolución desfavorable. En la siguiente tabla se recogen las principales características clínico-patológicas de estos pacientes en función de la evolución de la enfermedad.

Tabla 10. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

	Total (n=223)	Evolución favorable (n=71)	Evolución desfavorable (n=152)	p valor
Datos demográficos				
EDAD media	67,04 (15,25)	62,48 (16,54)	69,18 (14,16)	0,002
EDAD (>65 años)	133 (59,64)	34 (41,89)	99 (65,13)	0,014
SEXO (varones)	140 (62,78)	38 (53,52)	102 (67,105)	0,145
Comorbilidades				
Tabaco	26 (11,66)	1 (1,41)	25 (16,48)	0,001
EPOC	58 (26,01)	16 (22,54)	42 (27,63)	0,419
Asma	18 (8,07)	10 (14,08)	8 (5,26)	0,024
Corticoides inhalados	43 (19,28)	16 (22,54)	27 (17,76)	0,400
Insuficiencia cardíaca	23 (10,31)	6 (8,45)	17 (11,18)	0,532
Arritmia	25 (11,21)	2 (2,82)	23 (15,13)	0,007
Cardiopatía isquémica	21 (9,42)	7 (9,86)	14 (9,21)	0,877
Diabetes	63 (28,25)	17 (23,94)	46 (30,26)	0,477
Hepatopatía	9 (4,06)	2 (2,82)	7 (4,61)	0,527
Enf. Cerebrovascular	21 (9,42)	4 (5,63)	17 (11,18)	0,186
Insuficiencia renal crónica	15 (6,73)	1 (1,41)	14 (9,21)	0,030
Sintomatología				
Días de evolución de los síntomas	5,61 (5,49)	5 (5,45)	6 (5,68)	0,668
Fiebre	174 (78,03)	59 (83,10)	115 (75,66)	0,398
Disnea	131 (58,74)	34 (47,89)	97 (63,82)	0,03
Tos	181 (81,17)	58 (81,69)	123 (80,92)	0,623
Expectoración	131 (58,74)	39 (54,93)	92 (60,53)	0,429
Dolor torácico	97 (43,50)	31 (43,66)	66 (43,42)	0,791
Confusión	25 (11,21)	8 (11,27)	17 (11,18)	0,791
Estancia media	6,45 (5,73)	4,06 (2,14)	7,57 (6,5)	0,001
PSI IV-V	123 (55,16)	17 (23,94)	106 (69,74)	0,001
Parámetros analíticos				
Glucemia (mg/dl)	151,71 (67,82)	142,54 (63,98)	156 (69,34)	0,099
Urea (mg/dl)	48,57 (25,49)	39,5 (19,91)	52,8 (26,75)	0,001
Hemoglobina (g/dl)	12,98 (1,89)	13,05 (1,64)	12,94 (2,00)	0,854
PaO₂/FiO₂	268,51 (59,59)	319,75 (53,39)	254,20 (54,93)	0,001
PaO₂/FiO₂ <250	57 (25,56)	3 (4,23)	54 (35,53)	0,001
Lactato (mmol/L)	1,88 (1,46)	1,51 (1,28)	2,00 (1,50)	0,002
PCR (mg/dL)	23,44 (14,39)	25,13 (15,02)	22,66 (14,07)	0,334
Etiología de la neumonía	83 (37,22)	15 (21,13)	68 (44,74)	0,003

Los resultados están expresados como número absoluto y porcentaje (para las variables categóricas), o como media y desviación estándar (para variables numéricas). La última

columna muestra el p-valor de los contrastes de hipótesis (Chi-cuadrado para las variables: Edad>65, sexo, comorbilidades, sintomatología, PaO₂/FiO₂<250, y etiología de la neumonía; Mann Whitney para las variables: Edad media, días de evolución de síntomas, estancia media, y resto de parámetros analíticos). Se consideraron estadísticamente significativos todos aquellos valores con p-valor<0.05, resaltados en negra.

En la tabla anterior se observa que la edad media de los pacientes incluidos en el estudio es de 67,04 años, siendo significativamente más elevada la edad media de los pacientes que evolucionaron desfavorablemente (69,18 años) frente a los que evolucionaron favorablemente (62,48 años). Como cabría esperar, si la variable edad se categoriza en pacientes menores o mayores de 65 años, el p-valor del contraste de hipótesis Chi-cuadrado en este caso, indica también diferencias estadísticamente significativas, evolucionando estos últimos desfavorablemente con mayor probabilidad que los menores de 65 años.

En cuanto al sexo, 140 de los pacientes fueron varones (62,78%), frente a 83 mujeres participantes (37,22%). Si bien el p-valor obtenido para esta variable frente a la evolución no resulta significativo, los porcentajes anteriores si permiten apreciar una mayor incidencia de NAC en hombres que en mujeres.

Si se observa la primera de las comorbilidades incluidas en la tabla anterior, se aprecia una relación significativa entre el tabaquismo y la evolución. Un total de 26 de los pacientes del estudio declaró que fumaba (11,66%), de los cuales 25 (96,15%) tuvieron complicaciones y por tanto una evolución desfavorable. En cuanto al papel de la EPOC, 58 de los pacientes ingresados (26,01%) presentó esta comorbilidad, de los cuales 16 tuvieron una evolución favorable frente a 42 que evolucionaron desfavorablemente. Si bien se atisba un aumento de este último grupo, el p-valor obtenido del contraste de hipótesis Chi-cuadrado indica que no hay diferencias significativas entre la EPOC y la evolución de la NAC. De

igual manera sucede para la insuficiencia cardíaca (comorbilidad de un 10,31% de los pacientes), la cardiopatía isquémica (9,42%), la diabetes (28,25%), la hepatopatía (4,06%), la enfermedad cerebrovascular (9,42%) o la demencia (1,35%), así como los pacientes con terapias por corticoides inhalados (un 19,28% del total) o sometidos a tratamiento inmunosupresor (0,45%). No ocurre lo mismo para los pacientes asmáticos (8,07%), que no presentaron una evolución desfavorable en nuestra serie, asociando este estado significativamente con menores complicaciones. En el caso de los pacientes con arritmia (11,21%), el p-valor resultante del contraste de hipótesis aplicado sí que indica una relación significativa entre ambas variables siendo aquellos que la padecen más propensos a presentar complicaciones y evolucionar desfavorablemente. De igual manera, la insuficiencia cardíaca (6,73%) también presenta una relación significativa con la evolución de la NAC, siendo desfavorable para los que la padecen.

Por lo que respecta a la sintomatología, 131 pacientes manifestaron disnea (un 58,74% del total), de los cuales 34 (25,95%), tuvieron una evolución sin complicaciones, frente a 97 (74,04%) que evolucionaron desfavorablemente. En este caso, el p-valor obtenido del contraste de hipótesis Chi-cuadrado para esta variable categórica indica diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de disnea y la evolución, siendo más desfavorable esta última para los pacientes con NAC que manifiestan este síntoma. Así mismo sucede al comparar la clasificación de los pacientes por la escala de riesgo PSI, o índice de Fine, con la evolución. En el grupo de riesgo IV-V se incluyó a 123 de los pacientes (55,16%), de los cuales 17 evolucionaron favorablemente frente a 106 que tuvieron complicaciones. Como cabría esperar dado el objetivo de esta escala de riesgo, el p-valor resultó significativo, siendo

los pacientes previamente clasificados en el grupo de riesgo IV-V más propensos a tener una evolución desfavorable. En cuanto a la estancia media de los pacientes fue de 6,45 días, siendo significativamente más elevada en aquellos pacientes que presentaron complicaciones (7,57 días) frente a los que no (4,06 días), según el p-valor obtenido del contraste de hipótesis aplicado.

Por último, si se observan los parámetros analíticos incluidos en la Tabla 10, pueden apreciarse una serie de resultados significativos. En el caso de la urea, el valor medio de los pacientes fue de 48,57 mg/dl, pero al clasificarlos según su evolución, este valor medio desciende a 39,5 mg/dl en el caso de aquellos que evolucionaron favorablemente, y se incrementa a 52,8 mg/dl en los que lo hicieron desfavorablemente. Según el p-valor del contraste de hipótesis, Mann Whitney en este caso, debido a la distribución no normal de los datos, estas diferencias son estadísticamente significativas. Del mismo modo sucede con el lactato, cuyo valor medio es de 1,88 mmol/L, pero al clasificar a los pacientes en si su evolución fue favorable o desfavorable, el valor medio varía significativamente y pasa a ser de 1,51 mmol/L y 2,00 mmol/L respectivamente. Otro parámetro del estudio cuya relación con la evolución se demuestra significativo es el cociente presión parcial de oxígeno en sangre arterial, entre la concentración de oxígeno inspirado, representado como $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, y conocido como índice de Kirby. Con este parámetro se representan dos variables en la tabla anterior, la primera, numérica, engloba el valor medio de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ de todos los pacientes, y la segunda, categórica, tiene en cuenta si el cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ fue inferior a 250 y que por tanto presentaba hipoxemia. En ambos casos, los p-valores de los contrastes de hipótesis, Mann Whitney para la comparación de medias de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ y Chi-cuadrado para la categórica, indican diferencias estadísticamente

significativas entre ambos grupos, presentando los pacientes con valores de PaO₂/FiO₂ bajos, mayor frecuencia de una peor evolución.

4.2. Análisis cualitativo de la expresión de los microRNAs

Una vez analizada la relación entre las variables clínico-patológicas seleccionadas anteriormente y la evolución que presentaron los pacientes incluidos en el estudio, se procedió a estudiar la relación entre los biomarcadores protagonistas de este trabajo, los microRNAs, y una serie de variables de estudio. Estas variables fueron la **escala de gravedad**, la **evolución**, el **desarrollo de sepsis grave** y la **hipoxemia**. Este análisis lo hemos dividido en dos partes: una primera (parte cualitativa) que se desarrollará a lo largo de este apartado, y una segunda (parte cuantitativa), que se desarrollará en el apartado siguiente.

A su vez, este primer análisis cualitativo, que se desarrollará a continuación, puede subdividirse en varios apartados. El primero de ellos dedicado **al análisis y del estudio de todos los modelos posibles que existan para cada una de las variables de interés y los microRNA, de manera individual o agrupada**, mientras que el segundo estaría orientado al mismo fin, pero considerando también una serie de variables clínicas, y será comentado más adelante.

4.2.1. Modelo predictivo de microRNAs vs. Variables

En este primer subapartado hubo que tener en cuenta un total de 1024 modelos, el método estadístico utilizado fueron las regresiones logísticas, las cuales pronostican la pertenencia a un grupo a partir de una variable

independiente cualitativa (en este caso, la expresión (“Sí=1” o “No=0), y el criterio de selección del mejor modelo se basó en los que tuvieran un AIC (*Akaike Information Criterion*) menor. Este criterio de selección, no obstante, no mira la significatividad, por lo que puede suceder que alguno de los microRNAs escogidos no sea significativo. A continuación, se explica más claramente para cada caso.

4.2.1.1. Modelo predictivo de microRNAs para la clasificación en la escala de riesgo PSI

En esta primera variable de estudio se consideró como “0” a los pacientes clasificados en el grupo de riesgo PSI I-III, y como “1” a los clasificados en el grupo PSI IV-V.

El mejor modelo de todos, aquel con menor valor de AIC como se ha comentado, fue el constituido por los microRNAs **miR150, miR-223, miR-15a y miR-574**, cuyos datos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 11. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción de la clasificación en la escala de gravedad PSI IV-V en función de la expresión o no de los microRNAs.

	Estimate std.	Error	p-valor
miR-150	-1,1359	0,4320	0,00856
miR-223	0,4705	0,3078	0,12641
miR-15a	1,0217	0,6486	0,11520
miR-574	-0,8826	0,2866	0,00207

No obstante, tal y como se deduce de dicha tabla, de los 4 microRNAs que compondrían el modelo óptimo para la predicción de la escala de riesgo PSI, tan sólo el miR-150 y el miR-574 serían significativos (debido a que, como se ha comentado, el criterio de selección no contempla la significatividad). Es por ello que una interesante manera de interpretar los resultados es hacerlo en función de su Odds ratio y sus intervalos de

confianza, lo que permite saber de qué forma afectan las variables independientes a las dependientes. De este modo, si el microRNA es significativo y su Odds ratio es inferior a 1 puede afirmarse que se trata de un factor protector, mientras que si es superior a uno incrementaría el riesgo de que se produjera la variable de estudio.

A continuación, se representa de manera gráfica los Odds ratio y los intervalos de confianza de los microRNAs del modelo, acompañados de la tabla de datos.

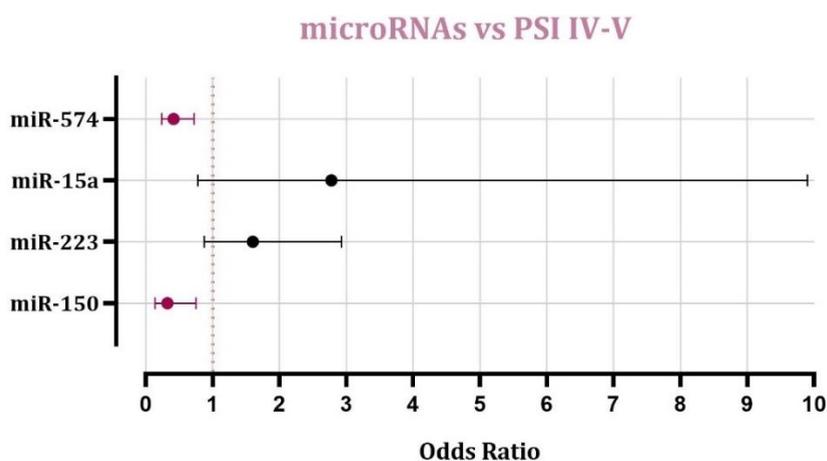


Figura 22. Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs de la clasificación en el grupo de riesgo PSI IV-V, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.

Tabla 12. Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de los microRNAs del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-150	0,32112	0,13769	0,74889	0,00856
miR-223	0,16007	0,087562	2,92630	0,12641
miR-15a	2,7778	0,77917	9,90229	0,11520
miR-574	0,4137	0,23591	0,72552	0,00207

Como puede apreciarse, tan sólo dos de los microRNAs son significativos, y dado que ambos tienen un Odds ratio inferior a 1 se trataría de factores protectores, estando relacionada su mayor expresión con la menor probabilidad de clasificar en el grupo de riesgo PSI IV-V.

4.2.1.2. Modelo predictivo de microRNAs para la *evolución desfavorable*

Se consideró en este caso los eventos de evolución favorable como “0”, mientras que a la evolución desfavorable se le asignó el “1”. En este caso el mejor modelo predictivo obtenido fue el compuesto por los microRNAs **miR_150, miR-499a y miR-15a**, cuyos datos quedan recogidos en la tabla siguiente:

Tabla 13. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción de la evolución desfavorable en función de la expresión o no de los microRNAs

	Estimate	std. Error	p-valor
miR-150	-1,2330	0,4887	0,0116
miR-499a	0,5026	0,3232	0,1199
miR-15a	1,1627	0,6796	0,0871

Como puede apreciarse, de todos ellos tan sólo el miR-150 resultó significativo, con un p-valor inferior a 0,05.

Del mismo modo que anteriormente, en función del su Odds ratio y sus intervalos de confianza puede deducirse que el miR-150 se trata de un factor protector frente a presentar una evolución desfavorable, como se aprecia en el gráfico siguiente, y en la Tabla 14:

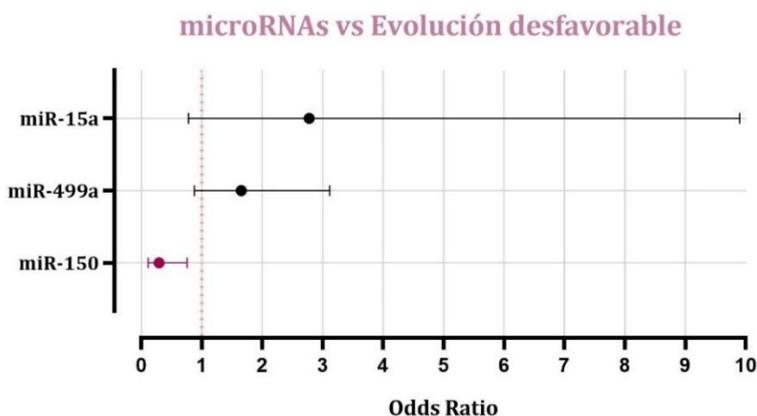


Figura 23. Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs de la evolución desfavorable, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.

Tabla 14 Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de los microRNAs del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-150	0,29115	0,11172	0,75873	0,0116
miR-223	1,65295	0,87736	3,11414	0,1199
miR-574	2,77778	0,77918	9,90229	0,0871

La infraexpresión del miR-150, estaría por tanto relacionada significativamente con la evolución desfavorable, o lo que es lo mismo, su expresión se relacionaría con la evolución favorable y sin complicaciones ya que, como se ha dicho, se trataría de un factor protector (Odds ratio < 1).

4.2.1.3. Modelo predictivo de microRNAs para el desarrollo de sepsis grave

Para el estudio de la variable sepsis grave, se consideró con un “0” los caso de no desarrollo de sepsis, haciendo referencia el “1” al desarrollo de la misma.

De todos los modelos posibles teniendo en cuenta todos los microRNAs del estudio, tanto individualmente como en grupo, el modelo de mayor predicción fue el compuesto por los microRNAs **miR-486 y miR-499a**. Ambos, tal y como se observa en la Tabla 15, significativos.

Tabla 15. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de sepsis grave en función de la expresión o no de los microRNAs.

	Estimate	std. Error	p-valor
miR-486	-1,1142	0,5012	0,0262
miR-499a	1,1177	0,4158	0,0718

Del mismo modo que en los apartados anteriores, si atendemos a los valores de los Odds ratios y os intervalos de confianza, los resultados quedarían representados de la siguiente manera:

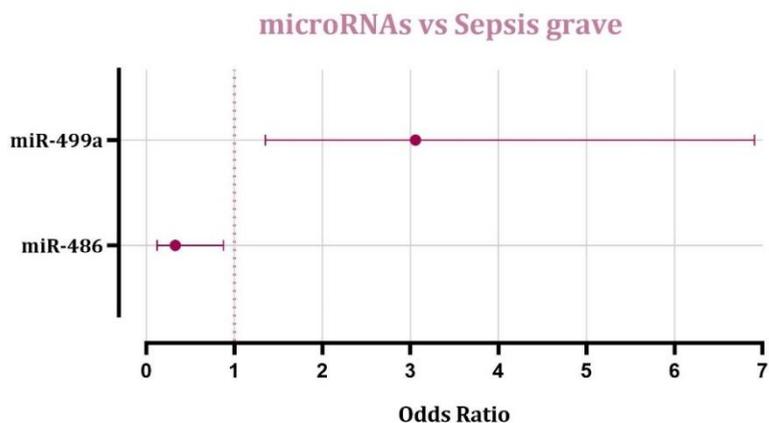


Figura 24. Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs del desarrollo de sepsis grave, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.

Cuyos valores numéricos se recogen en la tabla siguiente:

Tabla 16. Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de los microRNAs del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-486	0,32817	0,12287	0,87650	0,0262
miR-499a	3,05789	1,35367	6,90762	0,0718

De este modo, mientras que el miR-486 se trataría de un factor protector, el miR-499a actuaría de manera opuesta siendo un factor de riesgo, aumentando su expresión la mayor probabilidad de desarrollo de sepsis.

4.2.1.4. Modelo predictivo de microRNAs para el desarrollo hipoxemia

Como en los apartados anteriores, se asignó con un “0” la no presencia de la variable negativa, mientras que el “1” se asignó a los pacientes que presentaron valores de Pa_{Fi}<250, y por tanto hipoxemia.

En este caso el mejor modelo predictivo fue el que tenía en cuenta los

RESULTADOS

microRNAs **miR-486, miR-122, miR-574 y miR-297**, cuyos valores se indican en la Tabla 17.

Tabla 17. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de hipoxemia en función de la expresión o no de los microRNAs.

	Estimate std.	Error	p-valor
miR-486	-0,7752	0,4985	0,1199
miR-122	1,2984	0,5347	0,0152
miR-574	-0,8506	0,3672	0,0205
miR-297	1,1655	0,4446	0,0088

De todos ellos, tanto el miR-122 como el miR-574 y el miR-297 resultaron significativos, de manera que atendiendo a sus Odds ratio y sus intervalos de confianza, y representándolos gráficamente se obtuvo la figura siguiente.

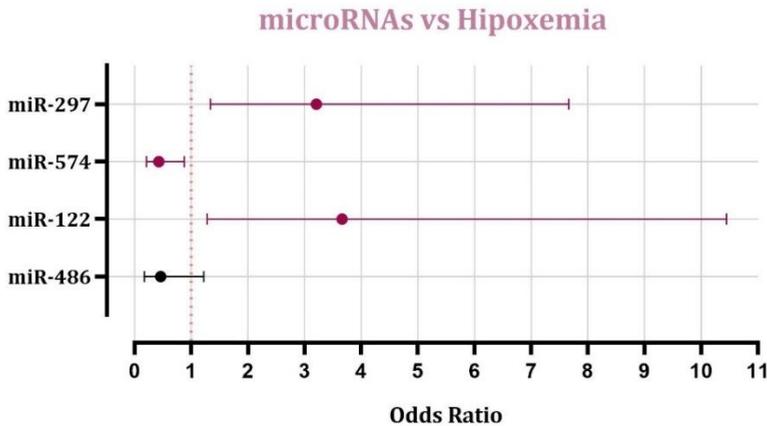


Figura 25. Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs del desarrollo de hipoxemia, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.

Tabla 18. Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de los microRNAs del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-486	0,46061	0,17338	1,22370	0,1199
miR-122	3,66352	1,28463	10,44768	0,0152
miR-574	0,42716	0,20800	0,87726	0,0205
miR-297	3,20641	1,34144	7,66424	0,0088

Tal y como puede interpretarse, tanto del gráfico anterior como de la tabla, mientras que el miR-574 actuaría como factor protector, la expresión del miR-122 y el miR-297 estaría relacionada con el desarrollo de hipoxemia, tratándose por tanto de factores de riesgo.

4.2.2. Modelo predictivo de microRNAs + clínica vs. Variables

Hasta ahora todos los análisis llevados a cabo han tenido en cuenta tan solo a los microRNAs y a las variables dependientes analizadas (PSI IV-V, evolución desfavorable, sepsis grave e hipoxemia). No obstante, también se consideró de interés el llevar a cabo un análisis que contemplara además una serie de variables clínicas con el fin de ver si la interacción de los microRNAs significativos anteriormente seguiría destacando como herramienta pronóstica, aunque el modelo tuviera muchas más variables.

Las variables clínicas seleccionadas para incorporarse en la elaboración y análisis de los modelos fueron algunas de las que salieron significativas en el apartado 4.1., y se recogen en la siguiente Figura.

Sexo	Alcohol	Tabaquismo	EPOC	Asma
NAC previa	Arritmia	Disnea	Urea	PCR
	Lactato	Insuficiencia renal crónica	Fracaso renal agudo	

Figura 26. Conjunto de variables clínicas seleccionadas para estudiar su relación con las variables de estudio y los microRNAs.

Este tipo de análisis radica en la multitud de variables que presenta, lo que implicaría un elevado número de modelos posibles (en concreto 2^{24} , es decir, 1.677.216), por lo que se optó realizarlo por la técnica que se conoce como **algoritmo genético**. Esta técnica consiste en la selección de los modelos más probables, los que considera que tendrán mejores resultados,

sesgando hacia el que crea que será el modelo óptimo.

Así pues, del mismo modo que anteriormente, a lo largo de los siguientes apartados se desarrollarán los modelos resultantes obtenidos teniendo en cuenta tanto los microRNAs como las variables clínicas seleccionadas, para cada una de las variables de estudio.

4.2.2.1. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para clasificación en grupo de riesgo PSI IV-V



Figura 27. Variables clínicas y microRNAs vs. grupo de riesgo PSI IV-V

Del mismo modo que anteriormente, el método estadístico utilizado fueron las regresiones logísticas con el ACI más bajo como criterio de selección. De todos los modelos que incorporaría el análisis (Figura 27) el modelo óptimo obtenido para predecir el grupo de riesgo fue el compuesto por el **miR-574, Edad, Tabaquismo, Asma, Urea, PCR y Lactato**, cuyos datos quedan recogidos en la tabla siguiente.

Tabla 19. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del grupo de riesgo PSI IV-V en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.

	Estimate	std. Error	p-valor
miR-574	-1,20993	0,49887	0,01534
Edad	0,05191	0,01879	0,00574
Tabaquismo	1,57081	0,86548	0,06952
Asma	-1,43950	0,76406	0,05956
Urea	0,08986	0,01803	6,24e-07
PCR	-0,02594	0,01769	0,14251
Lactato	0,10828	0,17481	0,53565

Tal y como se aprecia en la tabla, de todos ellos tan sólo las variables del

modelo miR-182, miR-297, Asma, Urea y PCR resultan estadísticamente significativas. Gráficamente, en función de sus Odds ratio y sus intervalos de confianza (Tabla 16), los resultados quedarían de la siguiente manera:

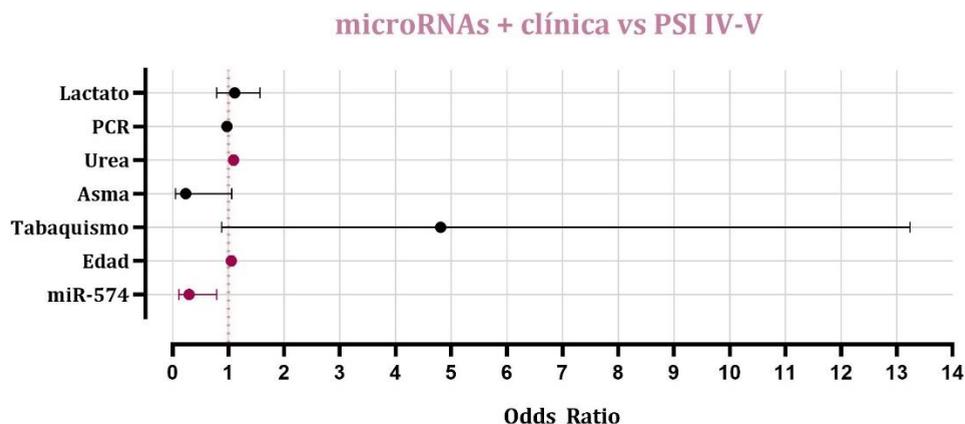


Figura 28. Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas del grupo de riesgo PSI IV-V, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.

Tabla 20. Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de las variables del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-574	0,29838	0,11223	0,79326	0,01534
Edad	1,05327	1,015188	1,09279	0,00574
Tabaquismo	4,81052	0,882061	13,2353	0,06952
Asma	0,23704	0,053022	1,05973	0,05956
Urea	1,09402	1,056034	1,13337	6,24e-07
PCR	0,97438	0,941181	1,00876	0,14251
Lactato	1,11435	0,791092	1,56971	0,53565

Teniendo en consideración los datos anteriores, puede deducirse el papel protector del miR-564, pues su infraexpresión está significativamente relacionada con la clasificación en el grupo de riesgo PSI IV-V, mientras que la Edad y la Urea serían importantes factores de riesgo, pues a mayor valor, mayor probabilidad de clasificar en el grupo mayor riesgo.

4.2.2.2. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para **evolución desfavorable**

En este caso al tratar de buscar un modelo con todas las variables clínicas inicialmente propuestas y recogidas en la Figura 29, ninguna de las variables parece ser significativa. Esto es debido a que, con el gran número de variables, el algoritmo no es capaz de resolver un modelo óptimo, por lo que se decidió omitir algunas de las variables: Tabaquismo, arritmia, fracaso renal agudo e insuficiencia respiratoria. El análisis propuesto quedaría de la siguiente manera:

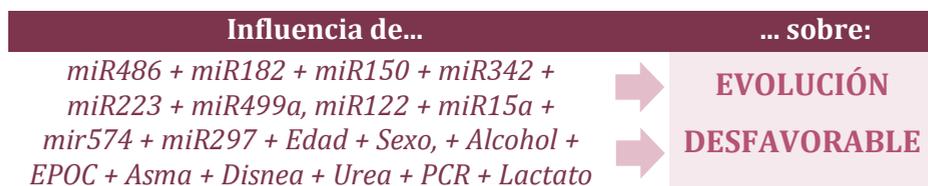


Figura 29. Variables clínicas y microRNAs vs. evolución desfavorable

Con estas variables de partida, el modelo óptimo de predicción de la evolución desfavorable obtenido fue el compuesto por: **miR-486, miR-182, miR-342, miR-223, miR-297, Edad, Asma, Urea, PCR y Lactato.**

Tabla 21. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción de la evolución desfavorable en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.

	Estimate	std. Error	p-valor
miR-486	-0,57067	0,74811	0,06861
miR-182	-1,75208	0,61143	0,00416
miR-342	1,14007	0,76071	0,13395
miR-223	0,93735	0,51019	0,06617
miR-297	2,09079	0,85776	0,01479
Edad	0,02858	0,01643	0,08194
Asma	-2,48173	0,75330	0,00098
Urea	0,02821	0,01259	0,02509
PCR	-0,4713	0,01865	0,01152
Lactato	0,38825	0,27618	0,15978

No obstante, como es habitual debido al criterio de selección de las regresiones logísticas, no todas las variables del modelo son significativas. Como se aprecia al observar los p-valores, de todas las variables del modelo, tan sólo el miR-182, el miR-297, el Asma, la Urea y la PCR resultarían estadísticamente significativas y, por tanto, su mayor o menor expresión influiría significativamente a la hora de predecir las evoluciones desfavorables.

Si se representan de manera gráfica en función de sus Odds ratio y sus intervalos de confianza las variables anteriores, los resultados quedarían de la siguiente manera:

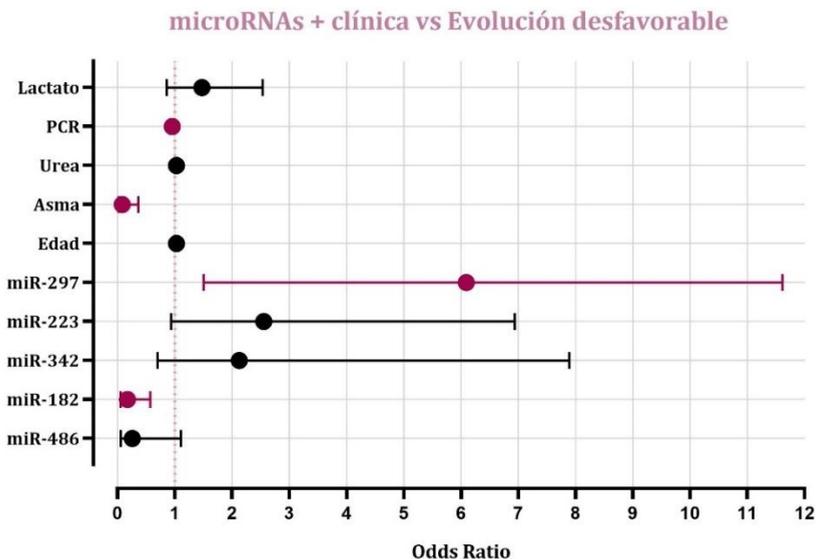


Figura 30. Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas de la evolución desfavorable, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza.

Como se deduce de la gráfica y de la tabla que se muestra bajo estas líneas, dado que el Odds ratio de las variables miR-182, Asma y Urea es inferior a 1, estarían actuando como variables protectoras. O lo que es lo mismo, los valores bajos estarían significativamente relacionados con la clasificación en el grupo de riesgo PSI IV-V. Por el contrario, tanto el miR-

297 como la Urea, la expresión elevada estaría significativamente relacionada con la clasificación en el grupo de riesgo PSI IV-V, grupo de peor pronóstico.

Tabla 22. Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de las variables del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-486	0,25607	0,05909	1,10958	0,06861
miR-182	0,17341	0,05231	0,57481	0,00416
miR-342	3,12698	0,70405	7,8882	0,13395
miR-223	2,55320	0,93932	6,93996	0,06617
miR-297	8,09126	1,50621	11,6124	0,01479
,Edad	1,02899	0,99638	1,06266	0,08194
Asma	0,08359	0,01909	0,36593	0,00098
Urea	1,02860	1,00353	1,05431	0,02509
PCR	0,95396	0,91971	0,98948	0,01152
Lactato	1,47440	0,85809	2,53337	0,15977

Dado que el Odds ratio de las variables miR-182, Asma y Urea es inferior a 1, estarían actuando como variables protectoras. O lo que es lo mismo, los valores bajos estarían significativamente relacionados con la clasificación en el grupo de riesgo PSI IV-V. Por el contrario, tanto el miR-297 como la Urea, la expresión elevada estaría significativamente relacionada con la clasificación en el grupo de riesgo PSI IV-V, grupo de peor pronóstico.

4.2.2.3. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para desarrollo de sepsis

Si bien al analizar la posible influencia de los microRNAs y las variables clínicas seleccionadas sobre la evolución tuvieron que omitirse algunas de las variables para que el algoritmo pudiera obtener un modelo claro y óptimo, para el estudio de la sepsis (al igual que para el de la clasificación

PSI IV-V) no fue necesaria la omisión de ninguna de las variables. De tal modo que el modelo de análisis propuesto fue los siguientes:

Influencia de...	... sobre:
miR486 + miR182 + miR150 + miR342 + miR223 + miR499a, miR122 + miR15a + mir574 + miR297 + Edad + Sexo, Tabaquismo + Alcohol + EPOC + Asma + Arritmia + Disnea + Urea + PCR + Lactato + Fracaso Renal Agudo + Insuficiencia respiratoria	DESARROLLO DE SEPSIS GRAVE

Figura 31. Variables clínicas y microRNAs vs. desarrollo de sepsis grave

Así pues, el mejor modelo de predicción para el desarrollo de sepsis grave fue el que combinaba las variables: **miR-486, miR-499a,**

Tabaquismo, Urea, PCR, Lactato y Fracaso renal agudo.

Tabla 23. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de sepsis grave en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.

	Estimate	std. Error	p-valor
miR-486	-1,931186	0,76784	0,01187
miR-499a	1,70812	0,61704	0,00564
Tabaquismo	1,13075	0,655995	0,08664
Urea	0,01637	0,01065	0,12442
PCR	0,01265	0,02083	0,54374
Lactato	0,63991	0,19989	0,00137
Fracaso renal agudo	1,69723	0,67922	0,01246

Y de este modelo, como se deduce de la tabla anterior, todas las variables resultarían estadísticamente significativas para la predicción del desarrollo de sepsis excepto el tabaquismo, la Urea y la PCR.

Recurriendo a la representación gráfica mediante plots de las variables anteriores en función de sus Odds ratios y sus intervalos de confianza, con el fin de ver cómo influyen sobre la variable dependiente, se obtiene el gráfico que se muestra a continuación.

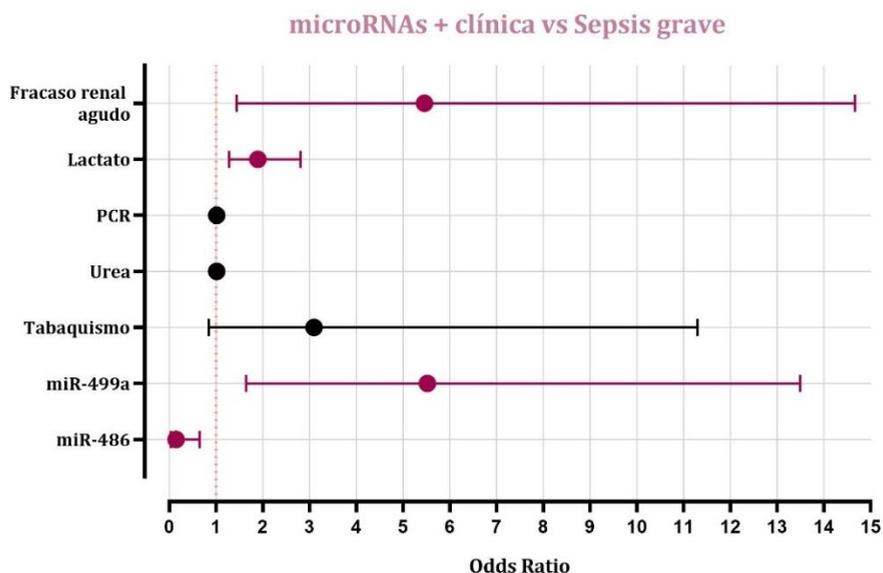


Figura 32. Gráfico que recoge los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas del desarrollo de sepsis grave representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza

Tabla 24. Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de las variables del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-486	0,14487	0,03261	0,65252	0,01187
miR-499a	5,51856	1,64665	18,49482	0,00564
Tabaquismo	3,09798	0,84982	11,29342	0,08664
Urea	1,01650	0,99549	1,037949	0,12442
PCR	1,01272	0,97221	1,05493	0,54374
Lactato	1,89631	1,28162	2,8058	0,00137
Fracaso renal agudo	5,45878	1,44192	14,6657	0,01246

Como bien puede apreciarse, el miR-486 desempeñaría un papel protector, mientras que el miR-499a, el Lactato y el Fracaso renal agudo serían factores de riesgo, incrementando la probabilidad de desarrollar sepsis grave a mayor expresión o al estar presente la comorbilidad (en el caso del fracaso renal agudo).

En el apartado 4.2.1.3., en el que se analizó el papel pronóstico de los

microRNAs para las variables seleccionadas, sin tener en cuenta las variables clínicas, ya aparecieron el miR-486 y el miR-499a como estadísticamente significativos. El hecho de que al forzar un análisis con muchas más variables sigan saliendo ambos, sin ser enmascarados por otras variables que bien podrían tener más peso *a priori*, no hace sino apoyar la robustez y la fiabilidad de estos microRNAs y del modelo. Como ya se ha comentado, mientras que la expresión del miR-486 indicaría una baja probabilidad de que el paciente desarrolle una sepsis grave, la sobreexpresión del miR-499a, advertiría una mayor probabilidad de que el paciente desarrollara dicha complicación.

4.2.2.4. Modelo predictivo de microRNAs + clínica para desarrollo de hipoxemia

Finalmente, y del mismo modo que se ha comentado para el análisis de la evolución, al proceder al análisis de las variables del estudio frente a la variable “Hipoxemia”, el algoritmo no fue capaz de dar un modelo óptimo debido a la multitud de interacciones. Es por ello por lo que se decidió omitir de dicho análisis las variables “Disnea” e “Insuficiencia respiratoria”, ambas variables estrechamente asociadas a la hipoxemia, siendo la primera un síntoma que a menudo se asocia a esta complicación y la segunda el resultado de la hipoxemia. De manera que quedara de la siguiente manera:

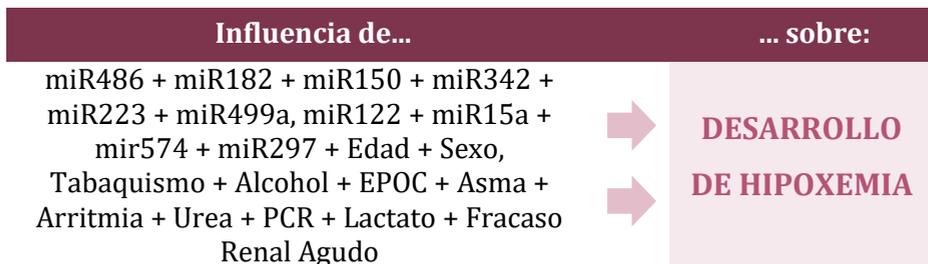


Figura 33. Variables clínicas y microRNAs vs. desarrollo de hipoxemia

De este modo, el modelo óptimo de predicción para el desarrollo de hipoxemia fue el compuesto por las variables **miR-122, miR-574, miR-297, Tabaquismo, PCR y Lactato**.

Tabla 25. Regresión logística del modelo óptimo para la predicción del desarrollo de hipoxemia en función de la expresión o no de los microRNA y las variables clínicas seleccionadas.

	Estimate	std. Error	p-valor
miR-122	0,87156	0,52517	0,09700
miR-574	-0,83885	0,41876	0,04523
miR-297	1,16774	0,46240	0,01156
Tabaquismo	0,97645	0,54317	0,07222
PCR	0,01024	0,01312	0,43535
Lactato	0,38594	0,16492	0,01927

No obstante, como en los anteriores apartados, el criterio de selección AIC aplicado en las regresiones logísticas no contempla la significatividad de los componentes del modelo, por lo que, si atendemos a dicho parámetro, tal y como se refleja en la tabla anterior, tan sólo serían significativos el mir-574, el miR-297 y el Lactato.

Representando gráficamente los resultados anteriores, en función de los Odds ratios de las variables, así como de sus intervalos de confianza, obtenemos los resultados siguientes:

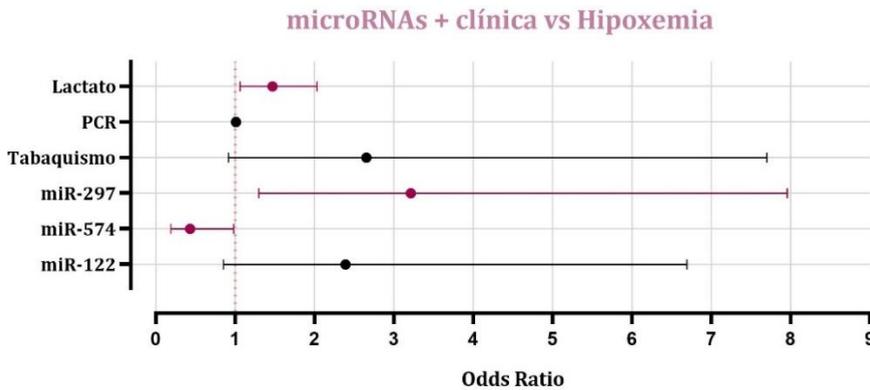


Figura 34. Gráfico que recoge de los resultados del modelo óptimo para la predicción mediante microRNAs y variables clínicas del desarrollo de hipoxemia, representados en función de los Odds ratio y sus intervalos de confianza

Tabla 26. Odds ratio, Intervalo de confianza y p-valor de las variables del modelo óptimo.

	Odds Ratio	2,5%	97,5%	p-valor
miR-122	2,39063	0,85406	6,69172	0,09700
miR-574	0,43233	0,19027	0,98234	0,04523
miR-297	3,21473	1,29881	7,95689	0,01156
Tabaquismo	2,65502	0,91564	7,6986	0,07222
PCR	1,01028	0,98464	1,03661	0,43535
Lactato	1,47100	1,06471	2,03233	0,01927

De este modo, mientras que el miR-574 sería un factor protector, al estar su expresión relacionada de manera significativa con la no hipoxemia, sucedería lo contrario con el miR-297 y el Lactato. En ambos casos, se trataría de factores de riesgo, estando significativamente relacionadas con el desarrollo de la hipoxemia en la NAC.

Al igual que sucedía en el caso de la sepsis, ambos microRNAs (miR-574 y miR-297) resultaron significativos en el modelo inicial, desarrollado en el apartado 4.2.1.4., en el que no se tenían en cuenta las variables clínicas. De nuevo, esto no hace sino reforzar el hecho de que estos microRNAs son buenos predictores del desarrollo de la hipoxemia.

4.2.2.5. Síntesis de los modelos obtenidos tras el análisis cualitativo y la clínica

Una vez vistos los apartados anteriores, puede afirmarse que la robustez de los modelos obtenidos será mayor cuanto mayor número de variables tenga en cuenta. Como se ha comentado, para el caso del desarrollo de sepsis y de hipoxemia, los mismos microRNAs cuya expresión o “no expresión” resultó ser significativa sin tener en cuenta las variables clínicas, lo fueron al tenerlas. Por otro lado, para la predicción del grupo de riesgo PSI IV-V, así como de la evolución desfavorable, los modelos óptimos

obtenidos al tener en cuenta las variables clínicas no tuvieron en cuenta alguno de los microRNAs que anteriormente sí que incorporaban. Como se ha indicado en líneas anteriores, esto es debido a que, al incrementar las variables a tener en cuenta, puede suceder que alguna de ellas tenga más peso a la hora de predecir que ciertos microRNAs que, a priori (y sin tener en cuenta la clínica), parecían tener gran peso.

No obstante, para ilustrar todo lo anterior de manera muy simple y clara, se adjunta a continuación una figura en la que se resumen los resultados tras el análisis cualitativo de los microRNAs y la clínica:

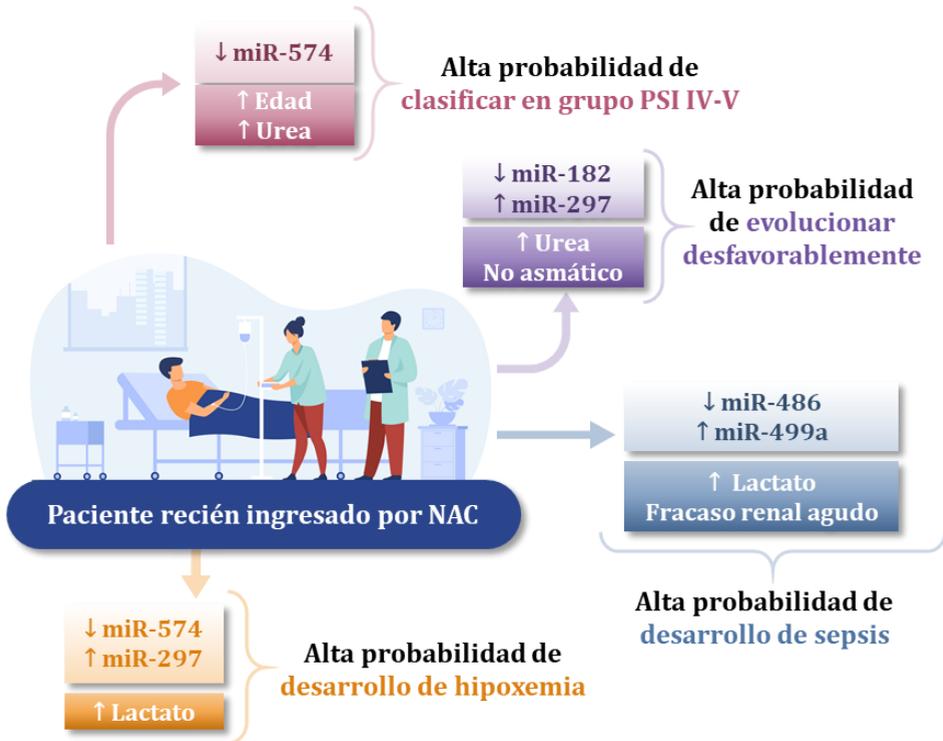


Figura 35. Resumen de los resultados hasta el momento. Se muestra un paciente hipotético al que, tras estudiar la expresión o no de los microRNAs indicados, así como teniendo en cuenta una serie de parámetros clínicos, se le podría dar un tratamiento más dirigido en función a las complicaciones que tenga más probabilidades de sufrir.

4.3. Análisis cuantitativo de la expresión de los microRNAs

En el apartado anterior se llevó a cabo el análisis cualitativo de los microRNAs frente a las variables dependientes seleccionadas en este estudio, teniendo en cuenta de este modo la expresión o no del microRNA y analizando las posibles relaciones de este hecho.

En los siguientes apartados se llevará a cabo el análisis de los datos obtenidos esta vez teniendo en cuenta el valor de expresión de cada paciente, para cada uno de los microRNAs seleccionados, frente a las variables dependientes vistas anteriormente, es decir, la escala de gravedad, la evolución, el desarrollo de sepsis o la hipoxemia. Dado que los grupos muestrales no siguen una distribución de datos normales, el test seleccionado para llevar a cabo el análisis cuantitativo mencionado fue la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes y no paramétricas.

4.3.1. MicroRNAs vs. escala de gravedad

Del mismo modo que se hizo de manera cualitativa, comparando la expresión o no de microRNAs, tal y como se ha explicado anteriormente, el siguiente análisis fue comparar los valores numéricos de la expresión de cada microRNA con las diferentes variables de estudio. En concreto, en el presente subapartado se estudiará la existencia de relaciones significativas entre estos valores numéricos y su clasificación en una u otra escala de gravedad, teniendo en cuenta los datos de los pacientes participantes.

Para ello se utilizó la prueba U de Mann Whitney, cuyo valor de significación estadística se encuentra adjunto en las figuras que se

muestran en las páginas siguientes, considerándose significatividad siempre que el p-valor sea inferior a 0.05.

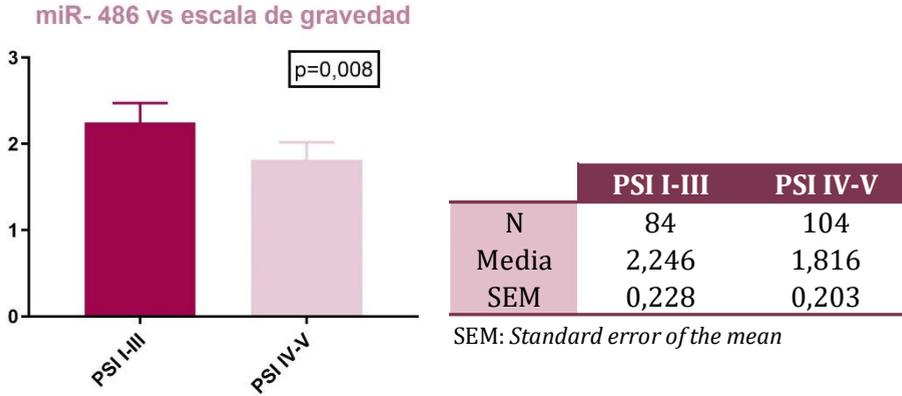


Figura 36. Expresión del miR-486 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

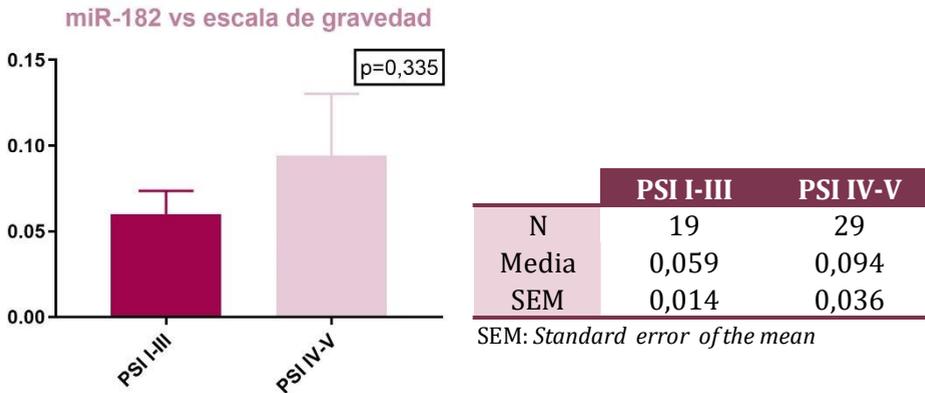


Figura 37. Expresión del miR-182 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

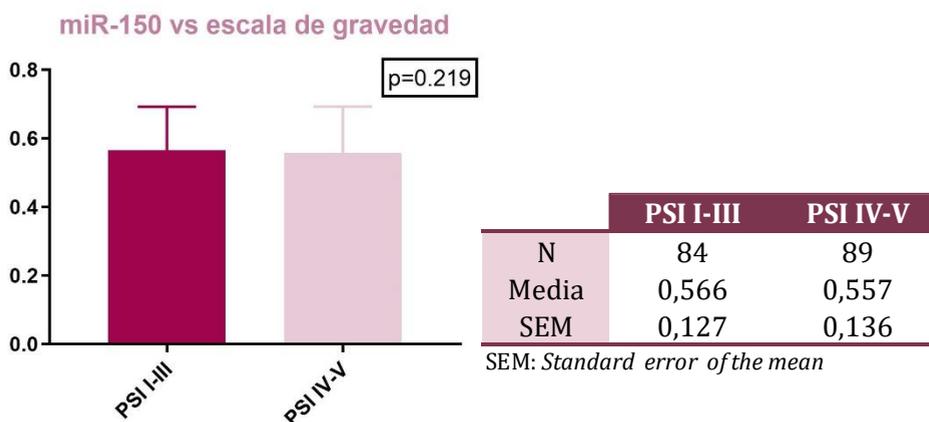


Figura 38. Expresión del miR-150 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

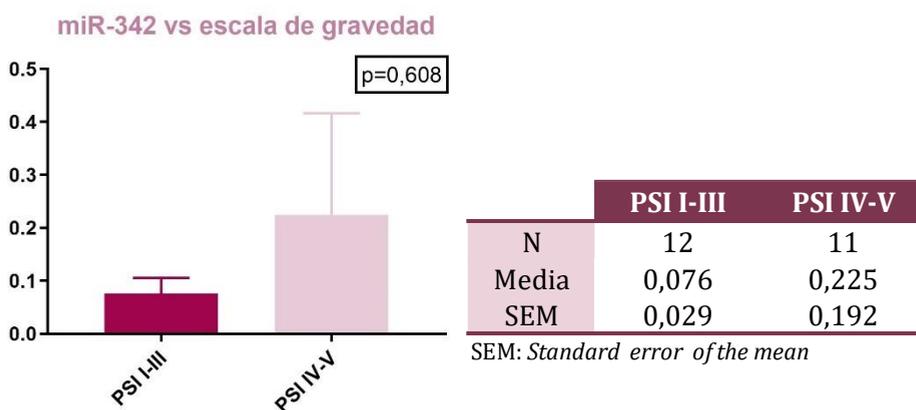


Figura 39. Expresión del miR-342 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

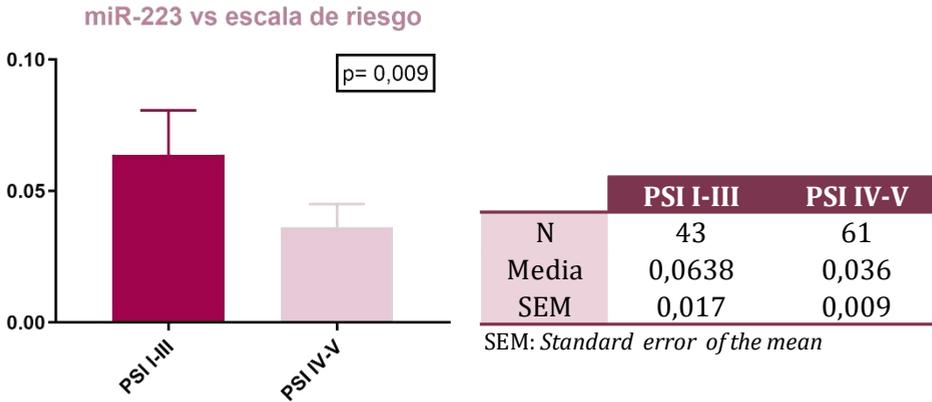


Figura 40. Expresión del miR-223 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

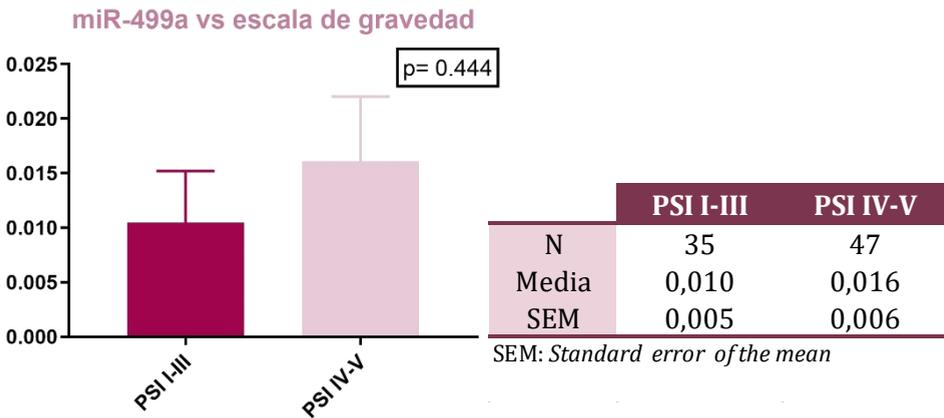


Figura 41. Expresión del miR-499a frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

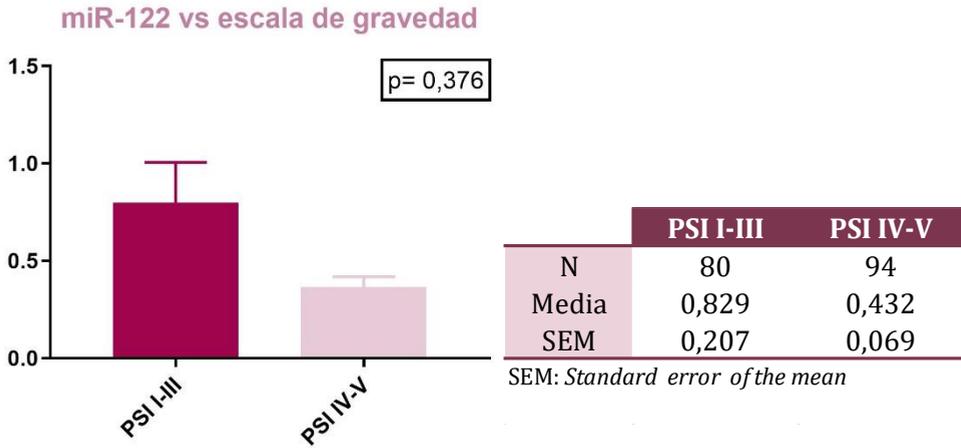


Figura 42. Expresión del miR-122 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

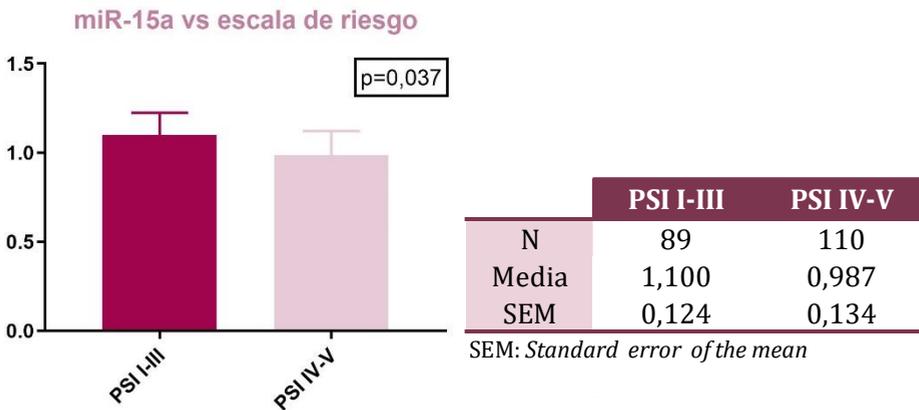


Figura 43. Expresión del miR-15a frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

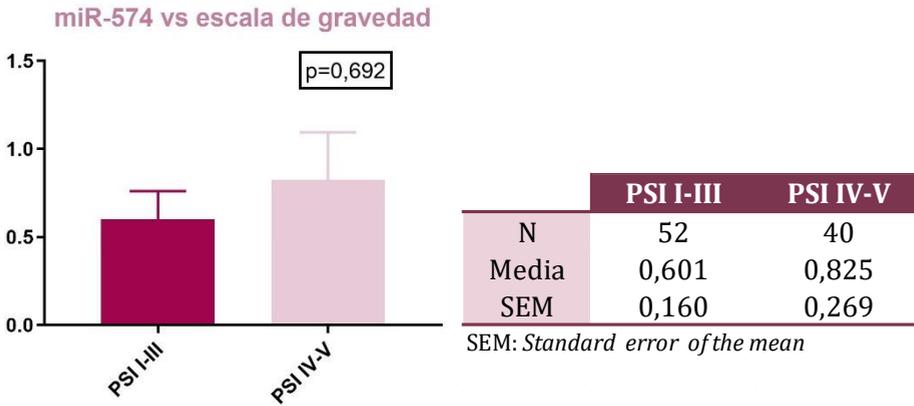


Figura 44. Expresión del miR-574 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

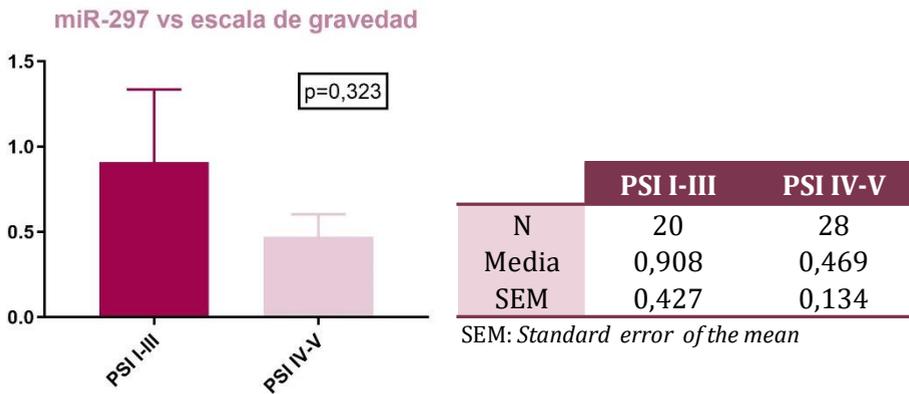


Figura 45. Expresión del miR-291 frente a la variable escala de riesgo (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

Como puede apreciarse al observar las figuras anteriores, tres de los microRNAs estudiados mostraron un p-valor inferior a 0,05, por lo que mostraron una relación estadísticamente significativa a la hora de clasificar a los pacientes en un grupo de riesgo u otro. Estos microRNAs fueron el miR-486 (Figura 36), el miR-223 (Figura 40) y el miR-15a (Figura 43). Si se observan las figuras anteriores, en los tres casos el aumento de la expresión de estos tres microRNAs estaría relacionado de manera significativa con la clasificación en el grupo de riesgo más leve (PSI I-III), mientras que la disminución clasificaría significativamente a los casos *a priori* más graves, y por tanto en el grupo de riesgo PSI IV-V.

Con el fin de determinar el valor pronóstico de los tres microRNAs que dieron resultados significativos, el siguiente paso fue realizar un estudio con curvas ROC. En estas curvas se representa la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad) para distintos puntos de corte, y se mide el área bajo la curva (*AUC*), de manera que según este valor el test es considerado malo (si *AUC* [0,5-0,6]), regular (si *AUC* [0,6-0,75[), bueno (si *AUC* [0,75-0,9[), muy bueno (si *AUC* [0,9-0,97[) o excelente (si *AUC* [0,97-1[). A continuación, se muestran las curvas ROC de los microRNAs significativos.

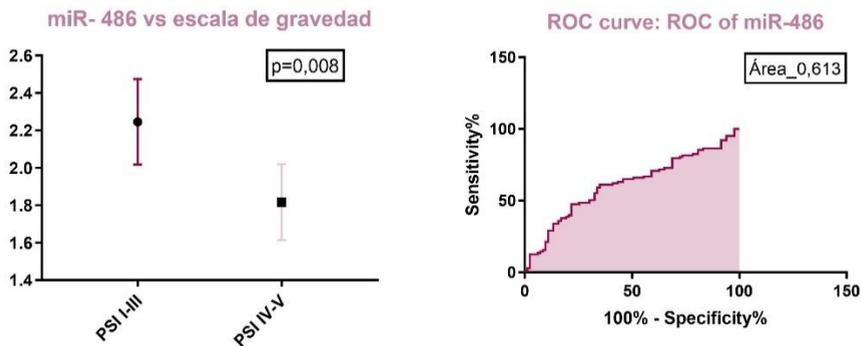


Figura 46. Representación de la expresión de miR-486 frente a la variable “escala de riesgo” en función de la media y la SEM (izquierda), y curva ROC de esta (derecha).

Como se aprecia en la Figura 46, parece existir una relación estadísticamente significativa entre niveles de expresión bajos del miR-486 y la clasificación de los pacientes en el grupo de mayor riesgo (PSI IV-V). Si se observa el área bajo la curva de este microRNA, es de 0,613, lo que supone que existe un 61,3% de probabilidad de predecir o clasificar en el grupo de riesgo correcto. Teniendo en cuenta los valores consenso indicados anteriormente se trataría de un test regular.

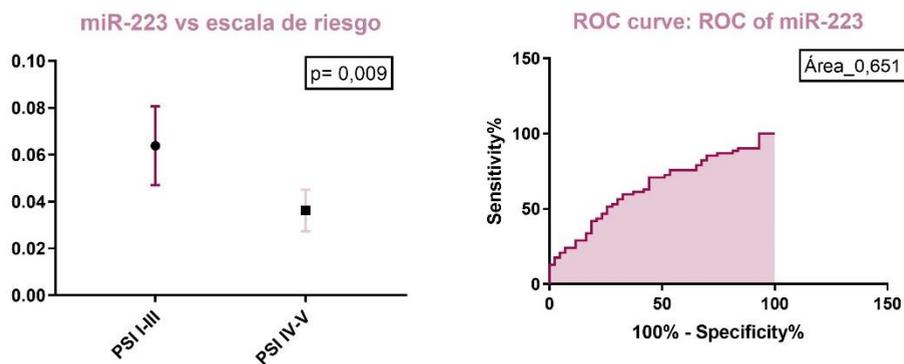


Figura 47. Representación de la expresión de miR-223 frente a la variable “escala de riesgo” en función de la media y la SEM (izquierda), y curva ROC de esta (derecha).

En el caso de miR-223, la relación entre la expresión y la clasificación en un grupo de riesgo u otro es la misma que en el caso anterior: niveles inferiores de expresión estarían relacionados significativamente con la clasificación en el grupo de riesgo IV-V. En este caso, el valor del área bajo la curva fue de 0,651, lo que supondría un 65,1% de probabilidad de acierto a la hora de clasificar en un grupo de riesgo u otro. Del mismo modo que el miR-486, se trata de un test regular, si bien de mayor predicción que este, pues el porcentaje es ligeramente más elevado.

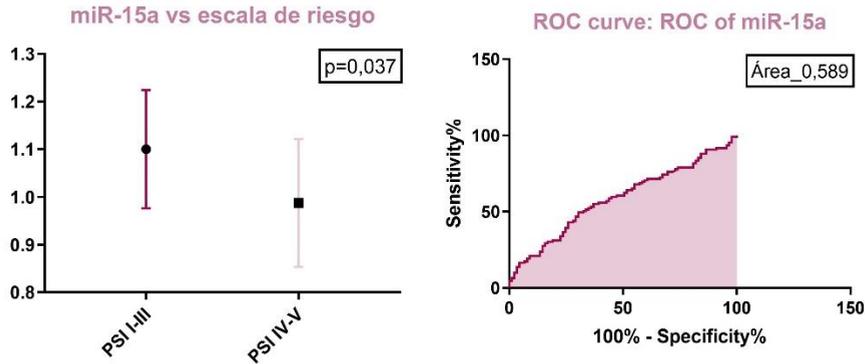


Figura 48. Representación de la expresión de miR-15a frente a la variable “escala de riesgo” en función de la media y la SEM (izquierda), y curva ROC de esta (derecha).

Por último, de nuevo para el miR-15a la relación entre expresión/grupo de riesgo sería la misma que para el caso anterior: menores niveles de expresión se relacionarían con el grupo de mayor riesgo, si bien las desviaciones estándar de la media en este caso son mayores en ambos grupos. Si se observa el área bajo la curva de miR-15a, el valor resultante es de 0,589, o lo que es lo mismo, una capacidad predictiva del 58,9% de los casos. Se trataría del resultado más bajo en comparación con los anteriores, y por tanto de menor capacidad de predicción. Además, teniendo en cuenta el que el valor obtenido es inferior a 0,6, se trata de un test considerado malo.

4.3.2. MicroRNAs vs. evolución

Del mismo modo que en el apartado anterior, el siguiente análisis de la expresión de los microRNAs fue frente a la variable evolución, entendiendo como desfavorable aquellos pacientes que en su ingreso sufrieron complicaciones o muerte. La hipótesis nula planteada fue que la distribución de los valores de expresión de los microRNAs seleccionados era la misma entre las dos categorías de estudio (evolución favorable y

evolución desfavorable), siendo esta rechazada para los p-valores inferiores al 0,05. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

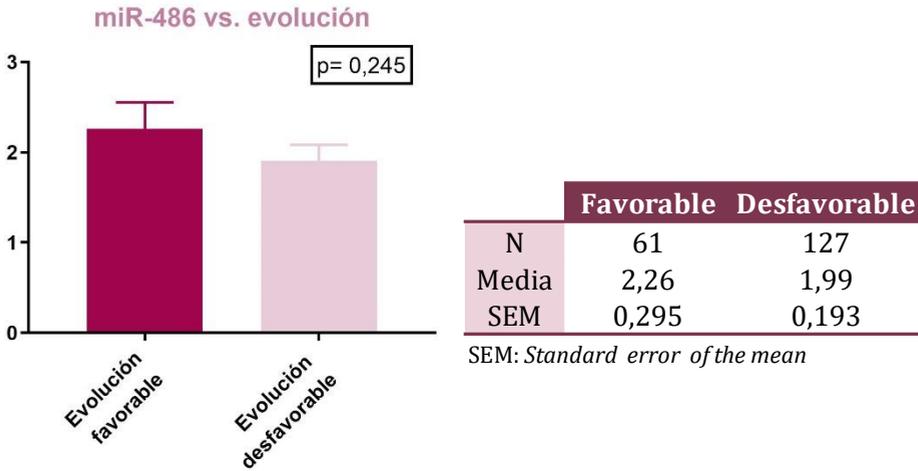


Figura 49. Expresión del miR-486 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

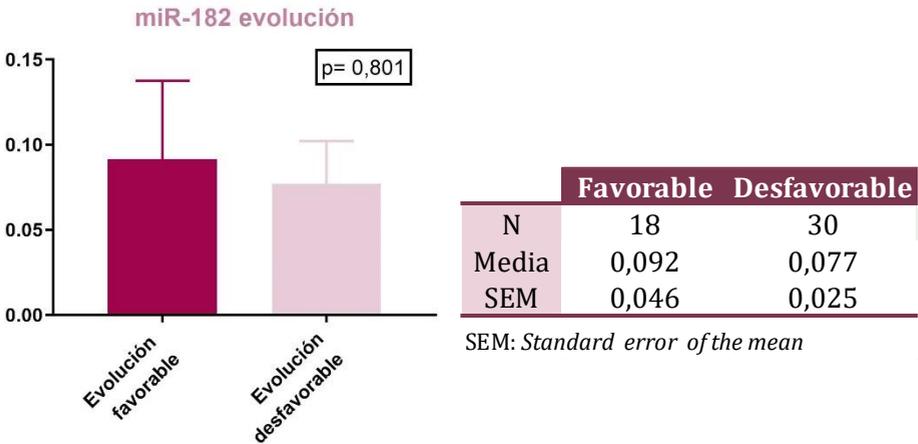


Figura 50. Expresión del miR-182 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

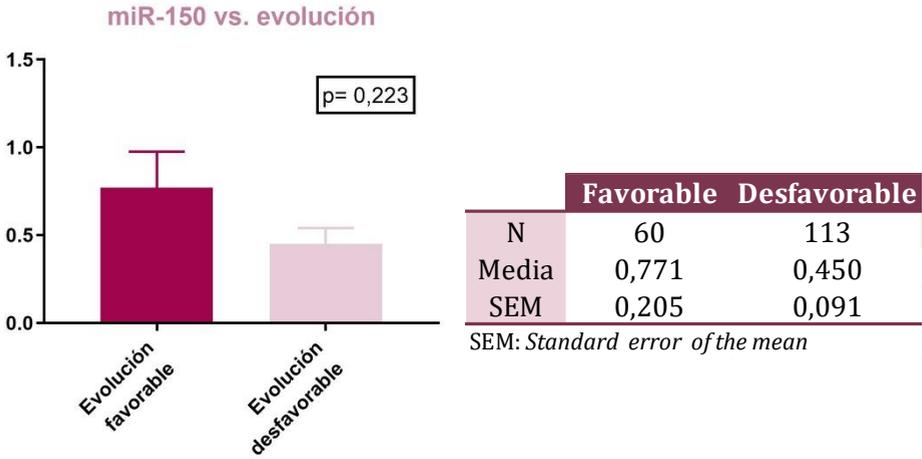


Figura 51. Expresión del miR-150 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la *n* muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

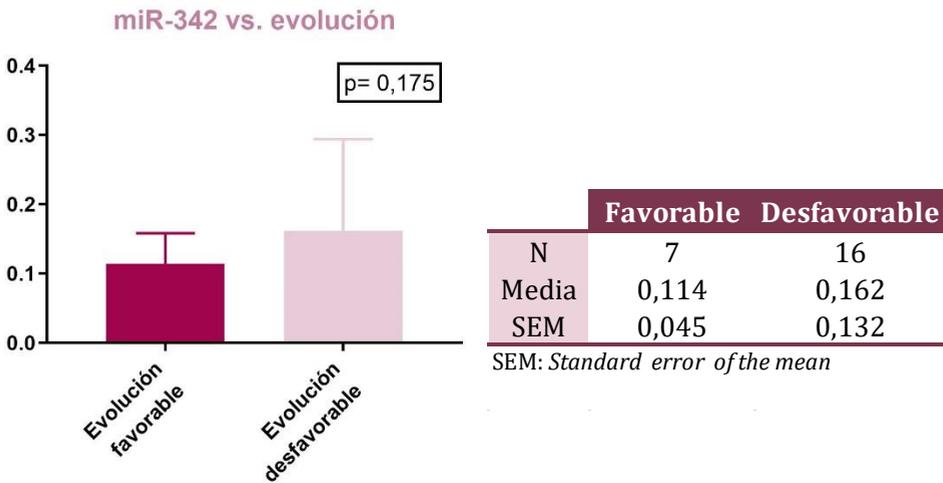


Figura 52. Expresión del miR-342 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la *n* muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

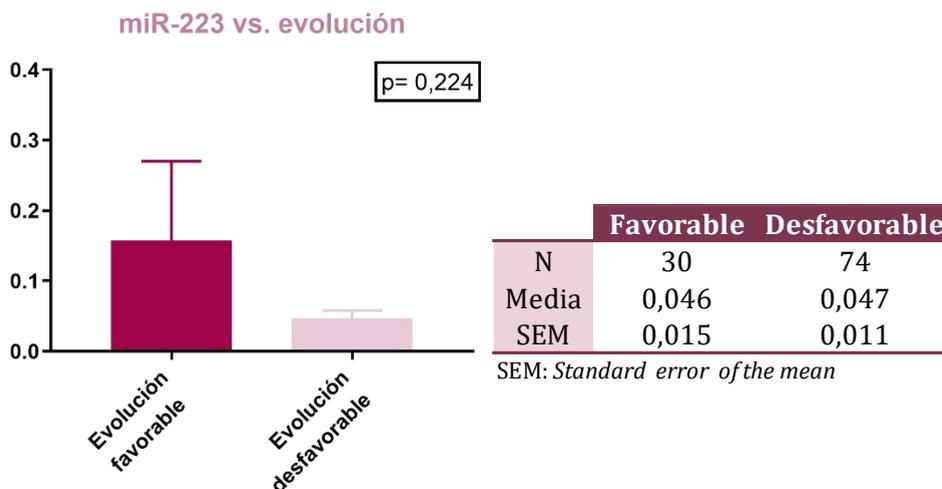


Figura 53. Expresión del miR-223 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

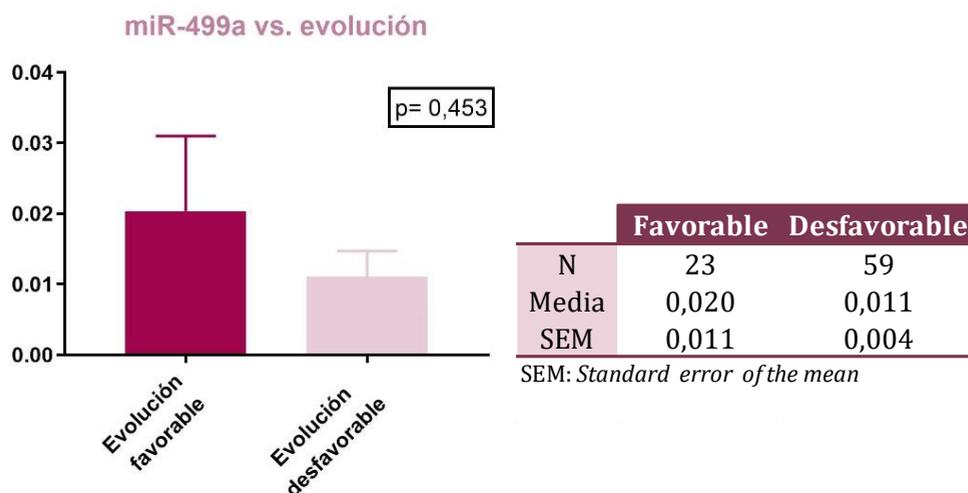


Figura 54. Expresión del miR-499a frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

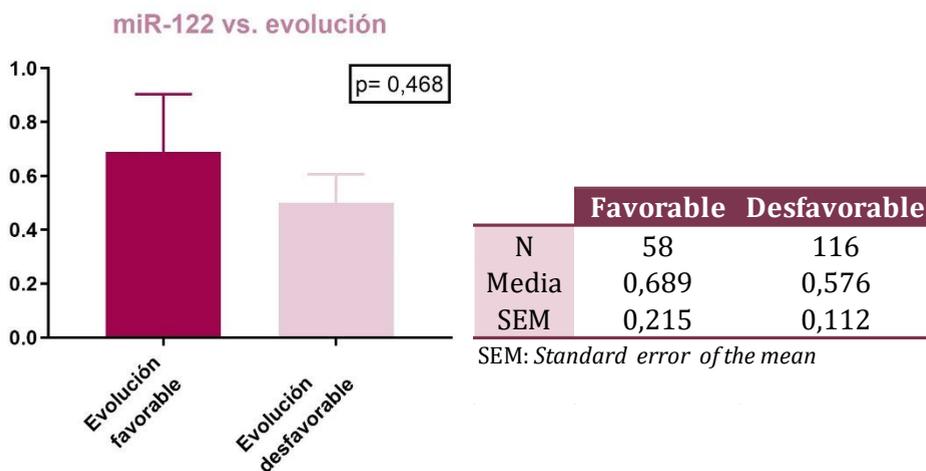


Figura 55. Expresión del miR-122 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

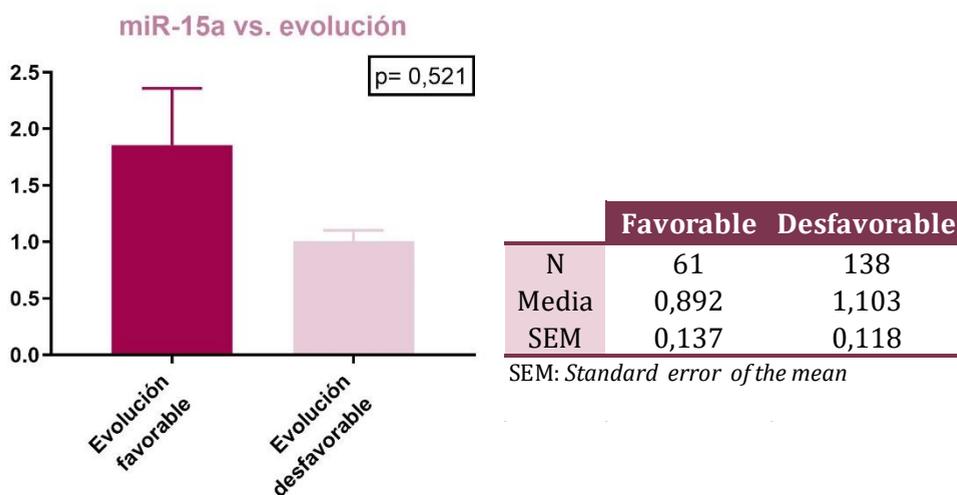


Figura 56. Expresión del miR-15a frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

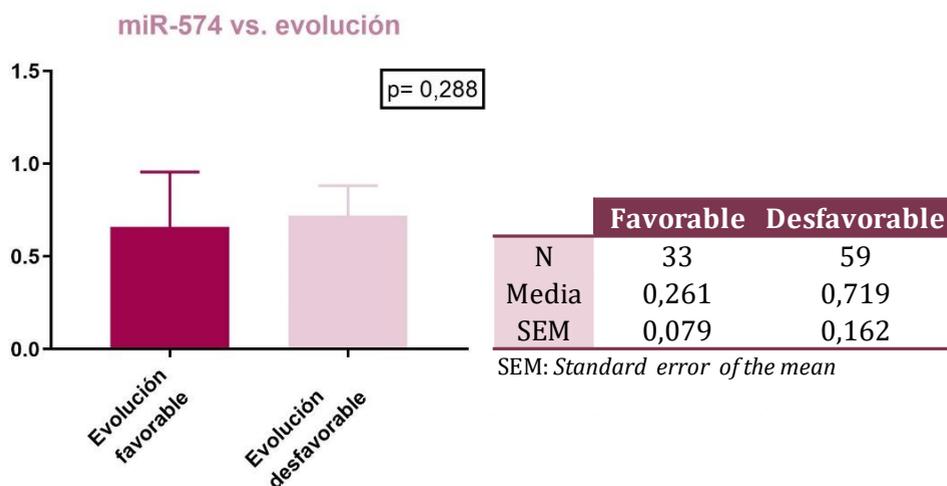


Figura 57. Expresión del miR-574 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la *n* muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

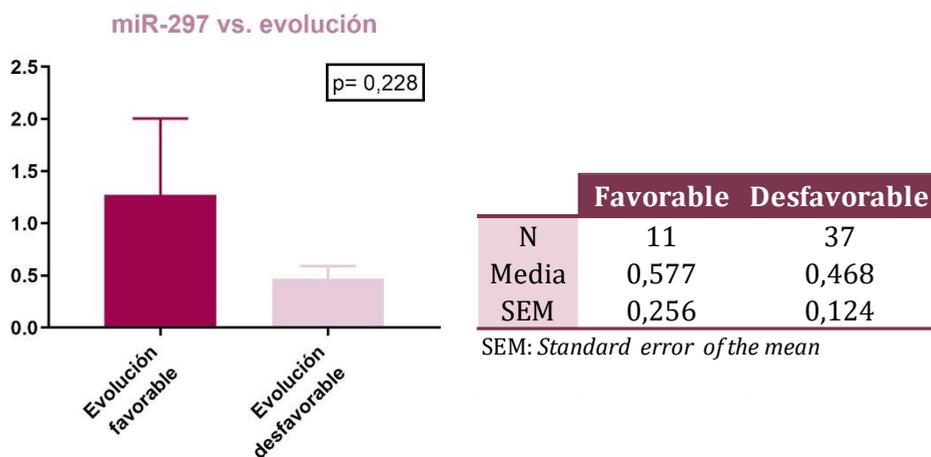


Figura 58. Expresión del miR-297 frente a la variable evolución (izquierda) y tabla de la *n* muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

Como puede observarse en las figuras anteriores, para ninguno de los microRNAs seleccionados en el estudio se obtiene un p-valor significativo que permita rechazar la hipótesis nula planteada y, de este modo, afirmar la relación entre sus niveles de expresión y su capacidad para pronosticar la evolución del paciente.

4.3.3. MicroRNAs vs. sepsis grave

El siguiente análisis llevado a cabo fue el de los niveles de expresión de los microRNAs del estudio, clasificados en función del desarrollo de sepsis grave, o no. Del mismo modo que en los apartados anteriores, la hipótesis nula fue que tanto para los pacientes que desarrollaron sepsis grave como para los que no, el valor de expresión de los microRNAs era el mismo. De este modo, para aquellos microRNAs cuyo p-valor fue inferior a 0,05 según la prueba U de Mann Whitney, la hipótesis nula sería rechazada. Los resultados obtenidos se recopilan a lo largo de las siguientes páginas.

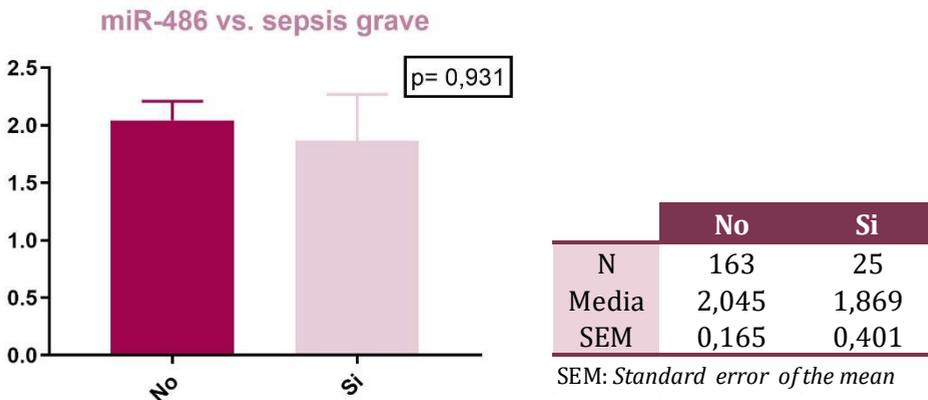


Figura 59. Expresión del miR-486 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

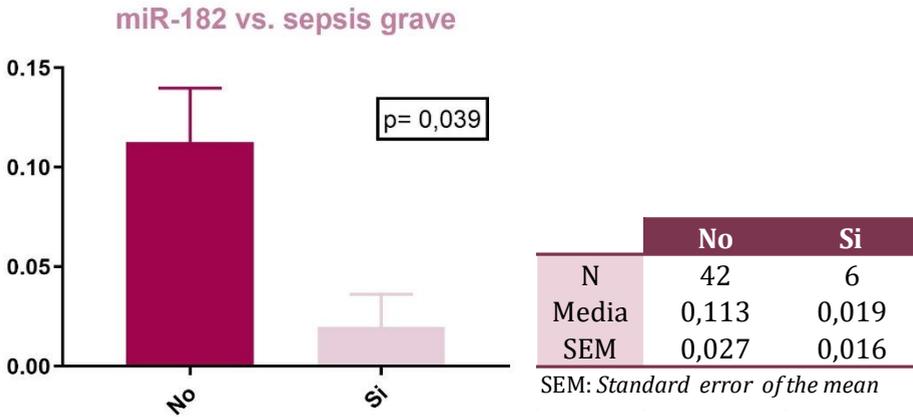


Figura 60. Expresión del miR-182 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

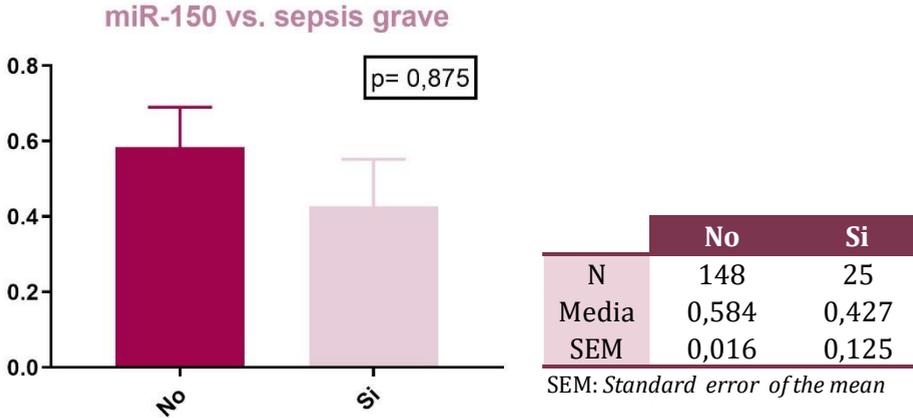


Figura 61. Expresión del miR-150 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

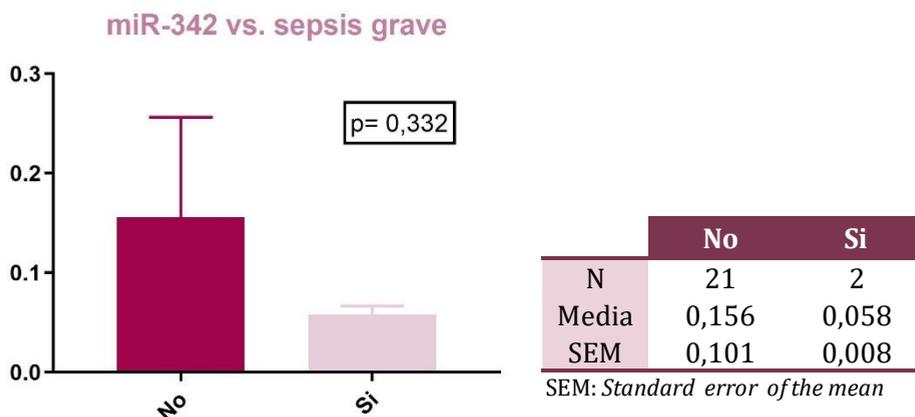


Figura 62. Expresión del miR-342 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

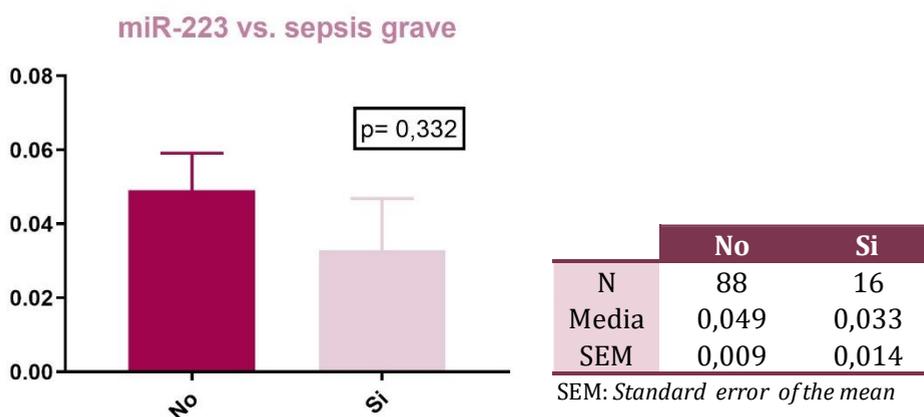


Figura 63. Expresión del miR-223 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

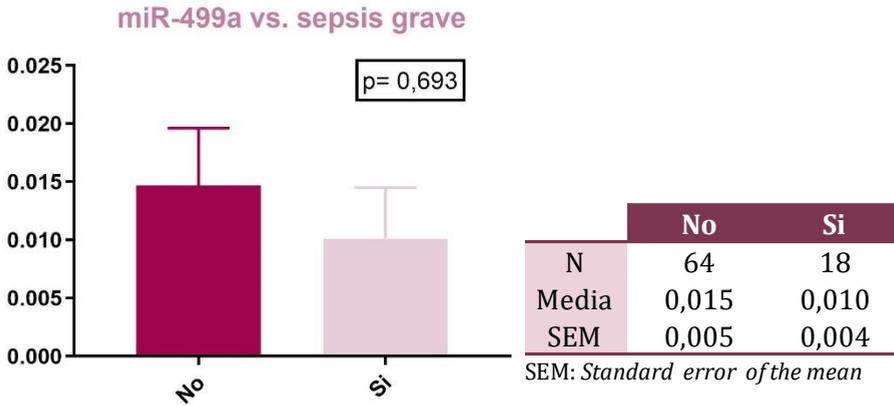


Figura 64. Expresión del miR-499a frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

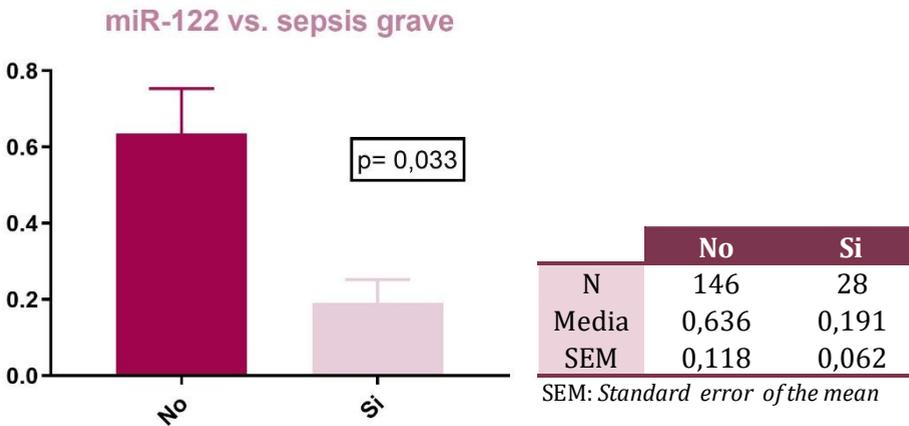


Figura 65. Expresión del miR-122 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

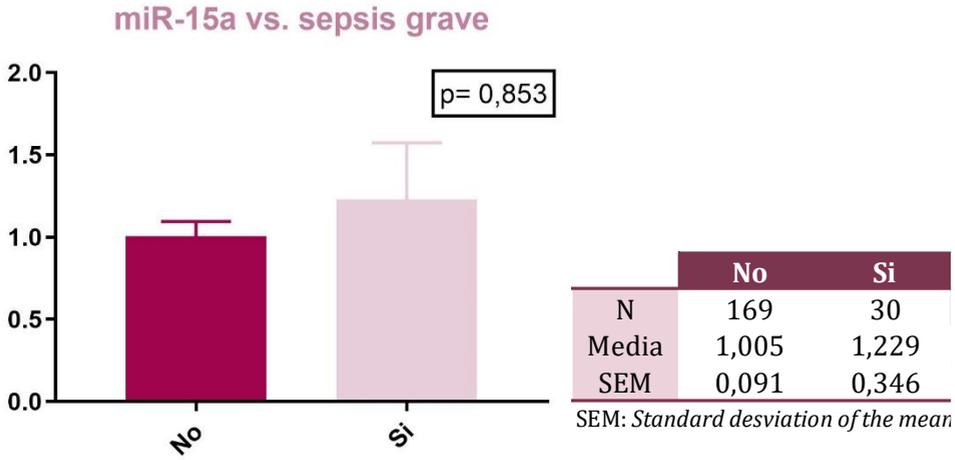


Figura 66. Expresión del miR-15a frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

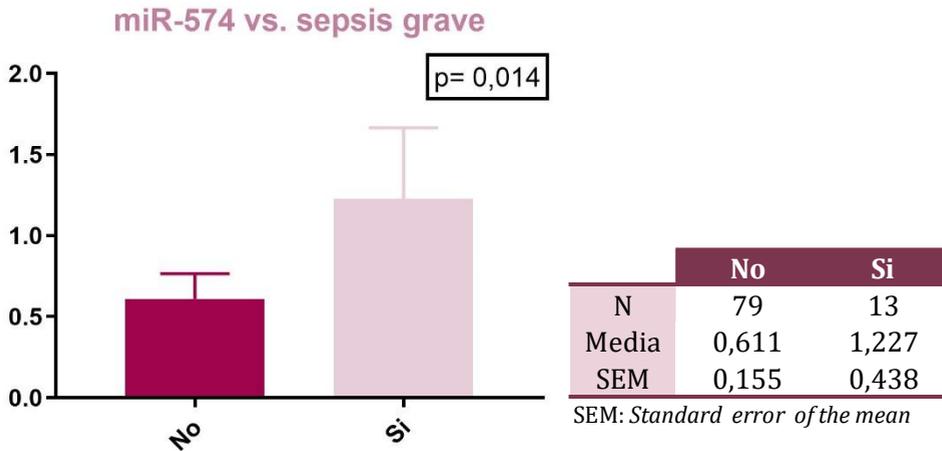


Figura 67. Expresión del miR-574 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

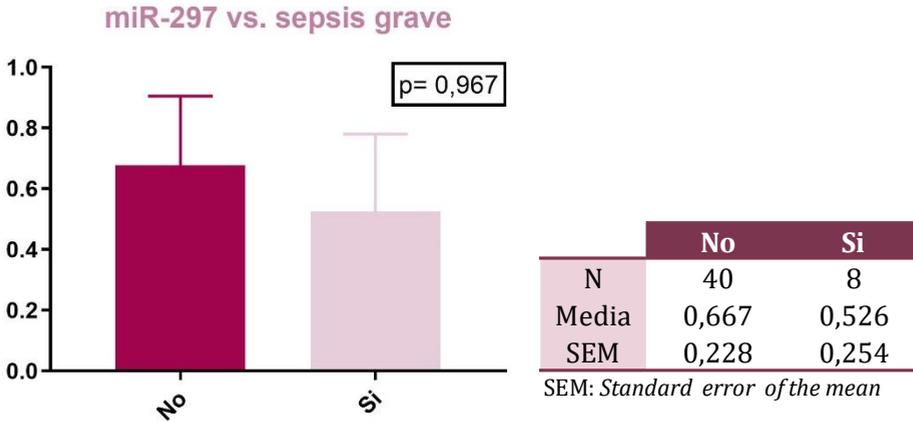


Figura 68. Expresión del miR-297 frente a la variable sepsis grave (izquierda) y tabla de la *n* muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

Tal y como puede apreciarse al observar las figuras anteriores, en las que se ha analizado la distribución de los niveles de expresión de los microRNAs seleccionados entre las dos categorías asignadas (sepsis grave “NO” y sepsis grave “SI”), hay tres pruebas cuyo p-valor es inferior a 0,05. Es el caso del miR-182 (Figura 60), el miR-122 (Figura 65) y el miR-574 (Figura 67), cuyos resultados permitirían rechazar la hipótesis nula (es decir, que la expresión del microRNA es la misma para ambas categorías asignadas), siendo por tanto significativos a la hora de predecir la sepsis en los pacientes con NAC.

Del mismo modo que se procedió en el caso de los microRNAs que resultaron significativos a la hora de clasificar para una u otra escala de gravedad, con el fin de determinar el poder de predicción de miR-182, miR-122 y de miR-574, se llevaron a cabo las curvas ROC de los mismos.

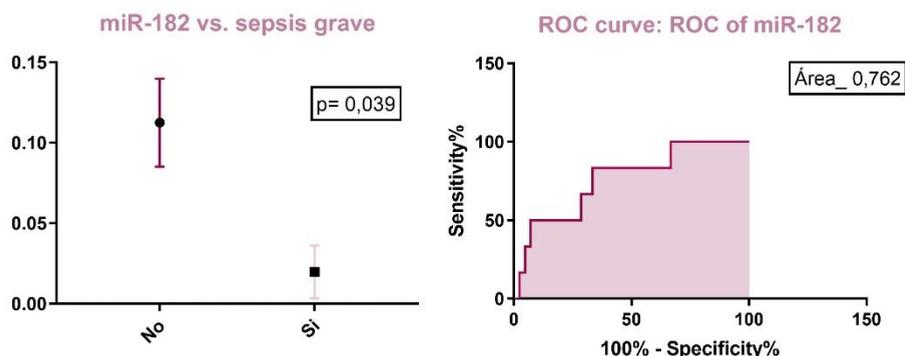


Figura 69. Representación de la expresión de miR-182 frente a la variable “sepsis grave” en función de la media y la SEM (izquierda), y curva ROC de esta (derecha).

En la figura superior se muestran los niveles de expresión del miR-182 en función de si los pacientes desarrollaron sepsis o no. Se aprecia cómo los niveles de expresión más elevados estarían relacionados significativamente con casos sin sepsis, mientras que los inferiores se asociarían al desarrollo de sepsis. En cuanto al valor predictivo de este microRNA, y observando para determinarlo la curva ROC adyacente, el área descrita bajo la curva tendría un valor de 0,762. Dado que este dato es superior a 0,75, podría afirmarse que el miR-182 es un buen predictor de la sepsis en pacientes con NAC.

Otro de los microRNAs que describió una relación significativa entre sus niveles de expresión y el desarrollo de sepsis fue el miR-122. En este caso, tal y como se observa en la figura que se muestra en las siguientes líneas, también se asociaría la baja expresión a la sepsis, tal y como ocurría en el caso del miR-182. No obstante, la curva ROC de este microRNA define un área bajo la curva de 0,627, lo que equivaldría a una capacidad predictiva del 62,7%. Teniendo en cuenta el valor asignado al test en función de dicha área, en este caso el miR-122 sería considerado como un test regular, al estar ésta entre 0,65 y 0,75.

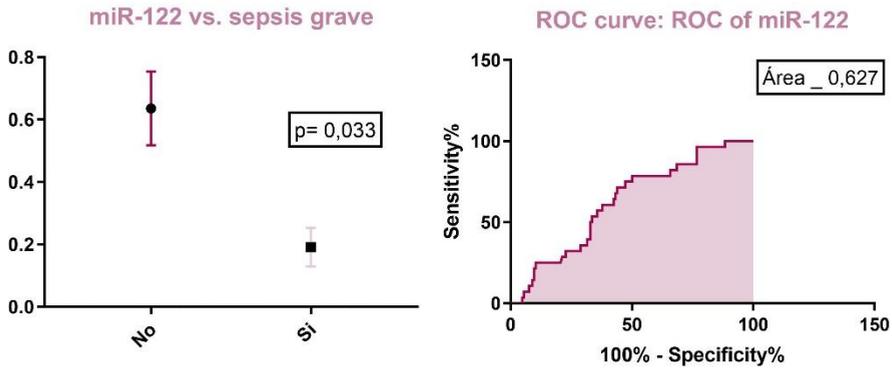


Figura 70. Representación de la expresión de miR-122 frente a la variable “sepsis grave” en función de la media y la SEM (izquierda), y curva ROC de esta (derecha).

Por último, en cuanto al miR-574, cuya curva ROC se muestra en la Figura 71, el área bajo la curva fue de 0,713, o lo que es lo mismo, un 71,3% de probabilidad de acertar a la hora de predecir si el paciente con NAC desarrollará sepsis grave o no. Si bien el test también sería catalogado como regular (al ser el área inferior a 0,76), el miR-574 tendría un valor de predicción superior 9 puntos superior al del miR-122.

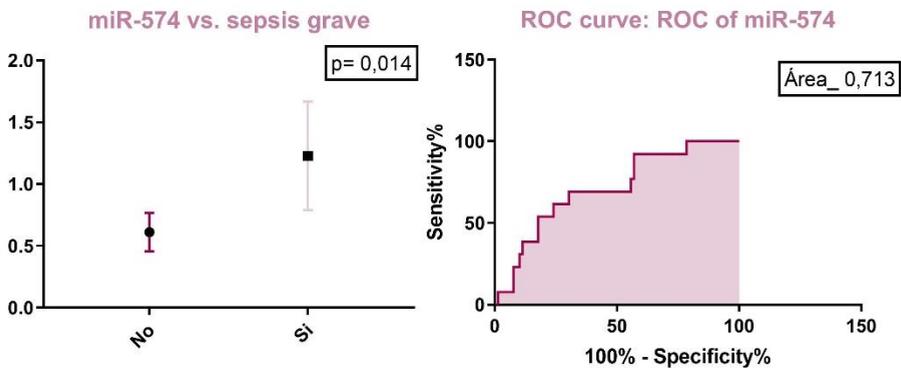


Figura 71. Representación de la expresión de miR-574 frente a la variable “sepsis grave” en función de la media y la SEM (izquierda), y curva ROC de esta (derecha).

4.3.4. MicroRNAs vs. hipoxemia

La última de las cuatro variables principales del estudio fue la hipoxemia. Del mismo modo que se procedió en los apartados anteriores, la hipótesis nula planteada fue, en este caso, que la distribución de los valores de expresión de los microRNAs seleccionados fue la misma entre las categorías asignadas ($PaO_2/FiO_2 > 250$ o $PaO_2/FiO_2 < 250$).

La prueba estadística utilizada fue la U de Mann Whitney, ya que como se comentó, los datos no seguían una distribución normal, y tan sólo los p-valores resultantes de esta prueba inferiores a 0,05 se tomaron como estadísticamente significativos, permitiendo rechazar la hipótesis nula.

Los resultados entre los niveles de expresión de los microRNAs del estudio y su distribución para la variable hipoxemia se muestran en las siguientes figuras.

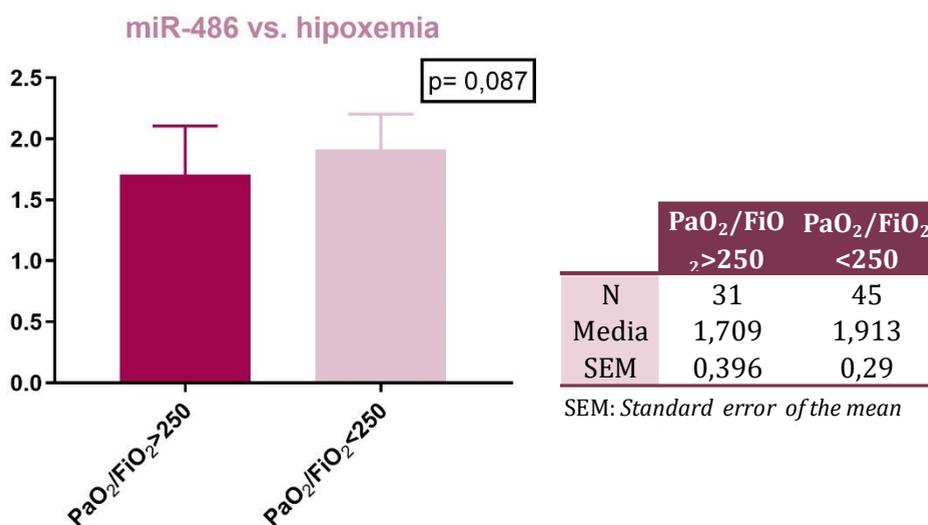


Figura 72. Expresión del miR-486 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

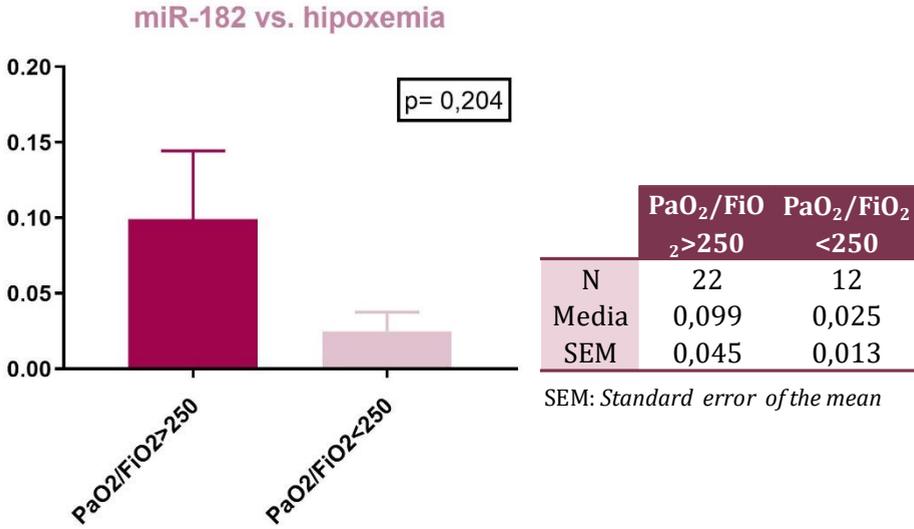


Figura 73. Expresión del miR-182 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

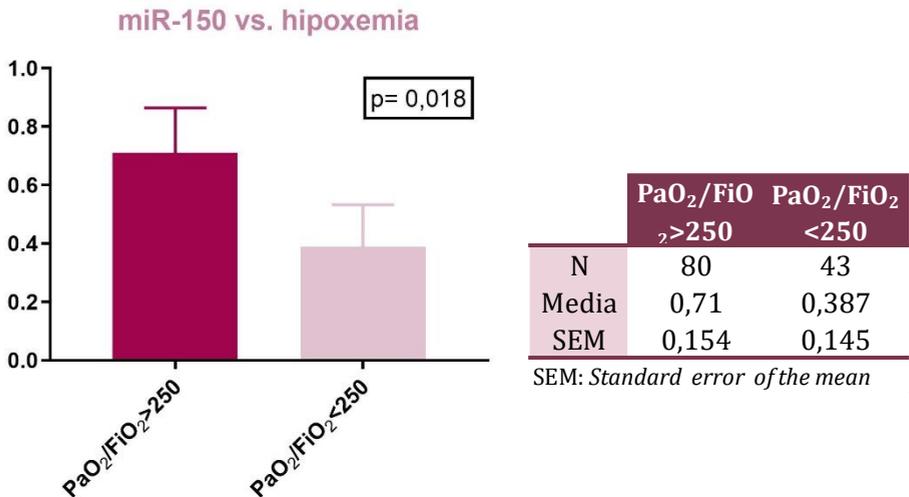


Figura 74. Expresión del miR-150 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

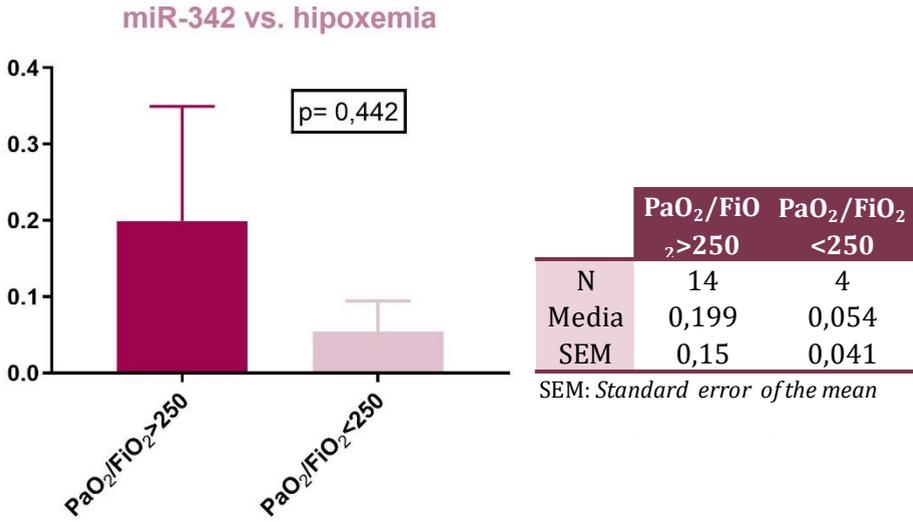


Figura 75. Expresión del miR-342 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

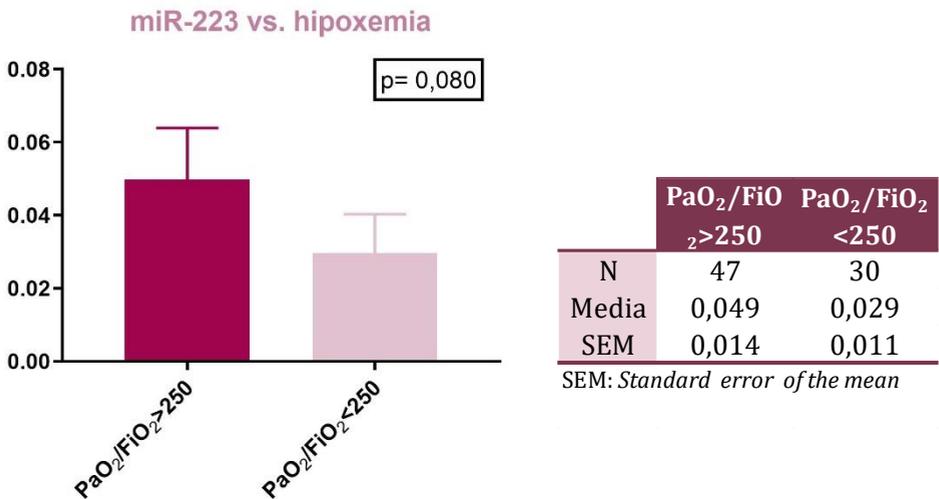


Figura 76. Expresión del miR-223 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

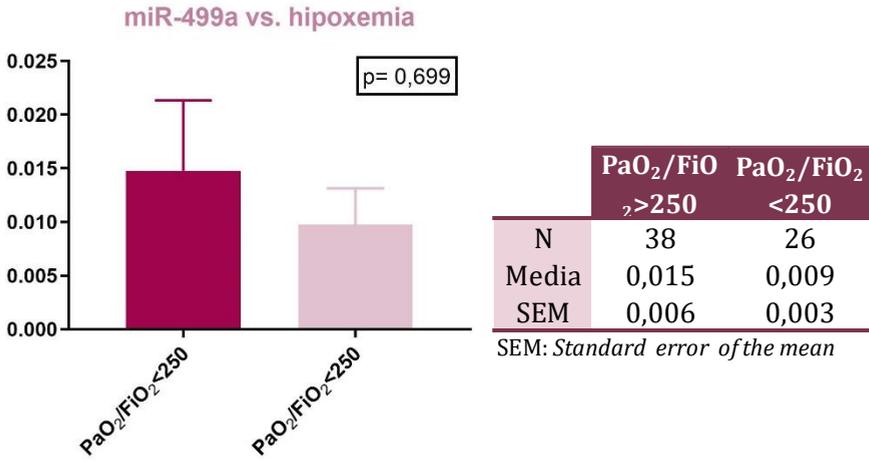


Figura 77. Expresión del miR-499a frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

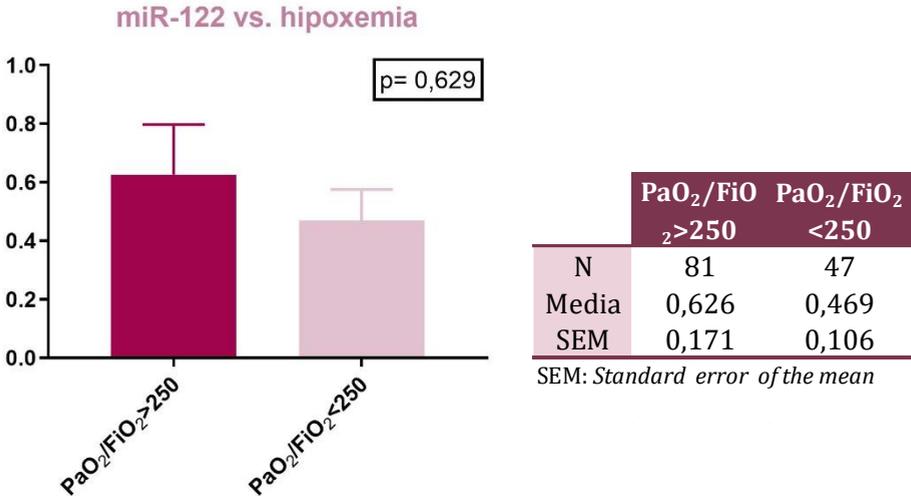


Figura 78. Expresión del miR-122 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

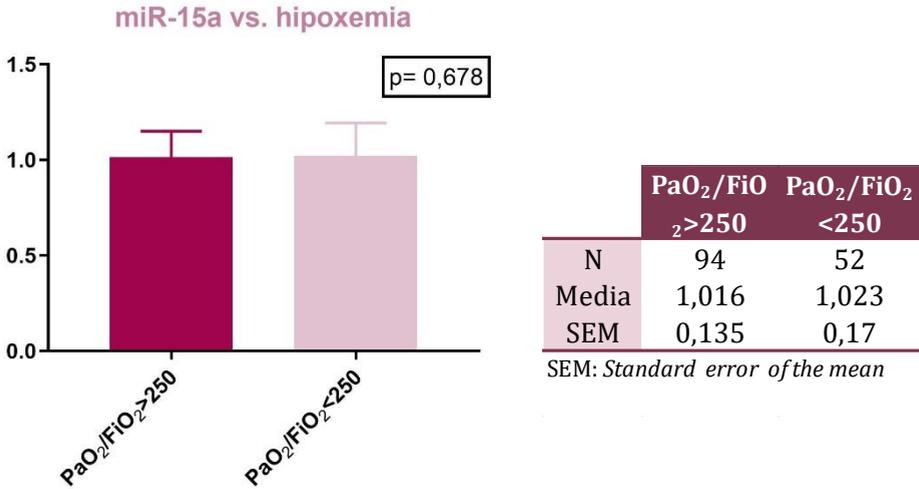


Figura 79. Expresión del miR-15a frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

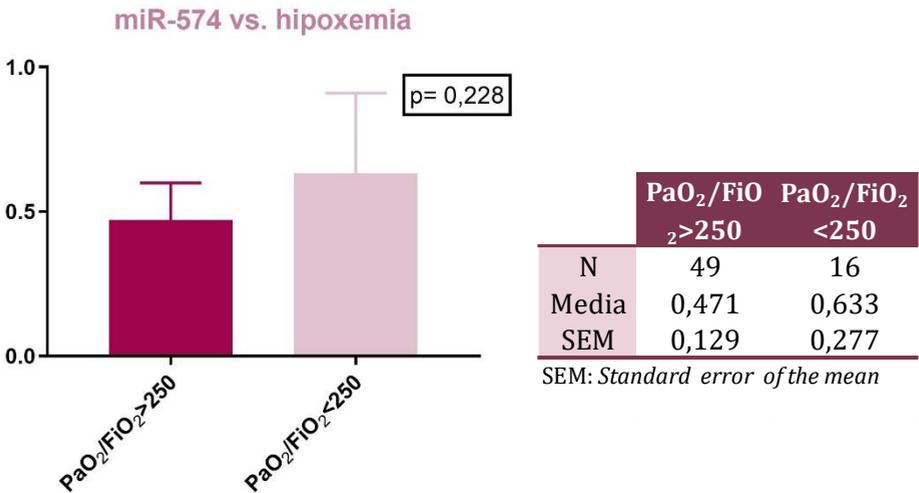


Figura 80. Expresión del miR-574 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la n muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

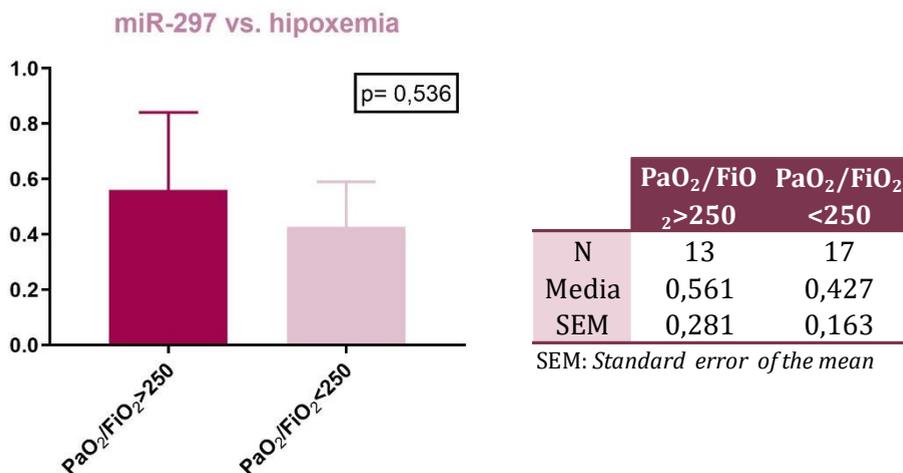


Figura 81. Expresión del miR-297 frente a la variable hipoxemia (izquierda) y tabla de la *n* muestral, la media y de la desviación estándar de la media del valor de cada microRNA en cada grupo de riesgo (derecha). La prueba estadística utilizada cuyo valor de significación se muestra en el gráfico fue la U de Mann-Whitney para muestras independientes.

Tras observar las figuras anteriores, se aprecia que el p-valor del miR-150 frente a la hipoxemia es inferior a 0,05, lo que permite rechazar la hipótesis nula y confirmar la existencia de una relación significativa entre los niveles de este microRNA y la variable objetivo de este apartado. Concretamente, la distribución representada en la Figura 74 demostraría la existencia de una relación estadísticamente significativa entre la disminución de la expresión de miR-150 y el desarrollo de hipoxemia. Siguiendo el mismo procedimiento que en los apartados anteriores, para estimar el valor predictivo de los microRNAs significativos para las variables de estudio, en este caso la hipoxemia, se llevó a cabo el análisis de las curvas ROC, cuyo resultado se muestra en la Figura 82. Analizando esta figura, se aprecia que la hipoxemia estaría asociada de manera significativa con niveles bajos de expresión de miR-150. Teniendo en cuenta la curva ROC de este análisis, el área bajo la curva definida sería de 0,629, es decir, un 62,9% de capacidad predictiva, lo que definiría a miR-

150 como un microRNA con valor predictivo regular en cuanto al desarrollo de hipoxemia de los pacientes con NAC.

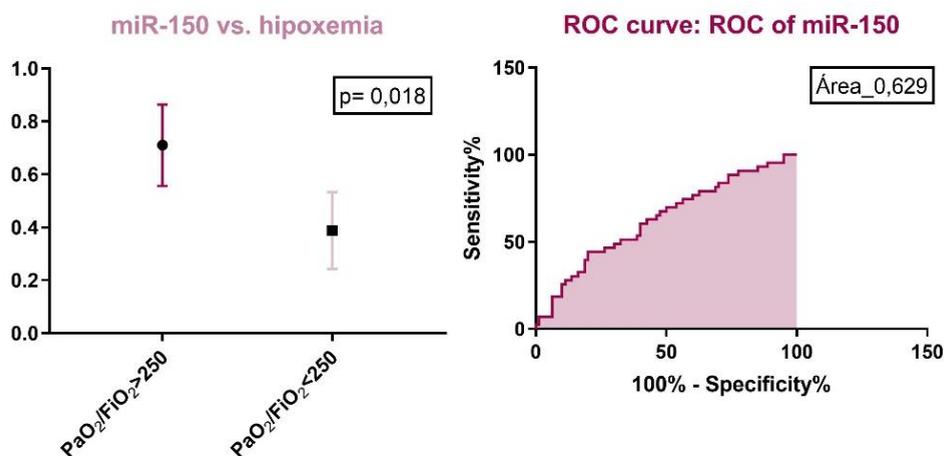


Figura 82. Representación de la expresión de miR-150 frente a la variable "hipoxemia" en función de la media y la SEM (izquierda), y curva ROC de esta (derecha).

4.2.5. Síntesis de los resultados obtenidos tras el análisis cuantitativo de los resultados

Como se ha visto a lo largo de los apartados anteriores, para la mayoría de las variables estudiadas se ha encontrado alguna relación estadísticamente significativa entre la misma, y el valor numérico de expresión de cada uno de los pacientes del estudio.

En algunos de los casos han sido más de una las relaciones encontradas, si bien como también se ha visto, mediante las curvas ROC se ha podido establecer la mayor sensibilidad de predicción de cada una de dichas relaciones.

Con el fin de ilustrar los resultados obtenidos de lo que se ha denominado **estudio cualitativo**, bajo las líneas siguientes se adjunta la

Figura 83, en la que pueden apreciarse los microRNAs cuyo mayor o menor valor de expresión estaría significativamente relacionado con alguna de las variables de estudio.

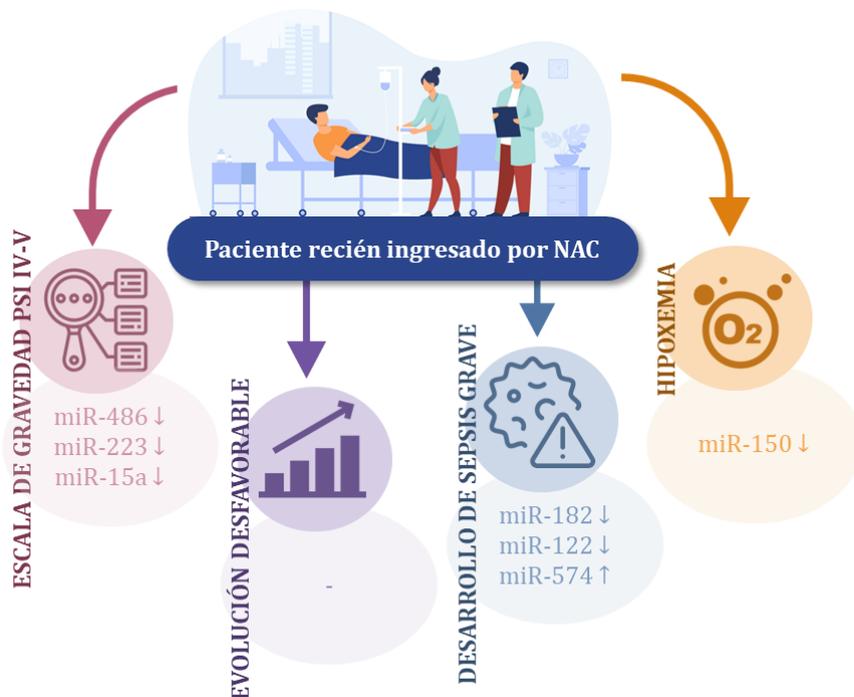


Figura 83. Resumen de los resultados a partir de los valores de expresión de los microRNAs. Se muestra un paciente hipotético al que, tras estudiar la expresión de los microRNAs indicados sin tener en cuenta más parámetros clínicos, se le podría dar un tratamiento más dirigido en función a las complicaciones que tenga más probabilidades de sufrir.

Como se deduce de la imagen anterior, y como ya se ha comentado en su apartado correspondiente, los grupos de pacientes cuya puntuación en la **escala de gravedad PSI** los clasificó dentro del grupo PSI IV-V (de mayor riesgo), presentaban valores de expresión significativamente inferiores a los que clasificaron en el grupo PSI I-III, para los microRNAs miR-486, miR-223 y miR-15a.

El estudio de la **evolución desfavorable** a partir de los datos de expresión de los microRNAs, por el contrario, no ha permitido obtener

ninguna relación significativa directa a través de este análisis, por lo que no permitiría enriquecer los resultados de los análisis cualitativos.

No sucede lo mismo en el caso del estudio de la variable sepsis ni de la hipoxemia. En ambos casos se han encontrado relaciones significativas entre los valores numéricos de expresión de los pacientes pertenecientes a un grupo u otro. Para la **sepsis**, los pacientes que a lo largo de su estancia hospitalaria la desarrollaron, presentarían unos valores significativamente inferiores a los que no lo hicieron de los microRNAs miR-182 y miR-122, mientras que el miR-574 estaría, por el contrario, sobreexpresado. Por otro lado, en los pacientes que desarrollaron **hipoxemia**, sería el miR-150 el que estaría infraexpresado significativamente, frente al valor que muestran los pacientes que no desarrollaron dicha complicación.

4.4. Compilación de los resultados (cualitativo + cuantitativo + clínica)

Tal y como se ha realizado en los apartados anteriores para simplificar la comprensión de los resultados a los que se ha llegado tras los diferentes análisis de los datos con los que se ha contado para la realización del presente trabajo, se ha elaborado la Figura 84, en la que se resume todo lo obtenido tras tratamiento de estos datos.

En dicha figura quedaría resumido lo que sería el perfil de un paciente tipo que tendría mayor probabilidad a desarrollar alguna de las variables de estudio, como podría ser la **evolución**, el **desarrollo de sepsis** o la **hipoxemia**, teniendo en cuenta los resultados que se han obtenido durante la realización de este trabajo.

Es importante entender los resultados de los diferentes análisis como información que se complementa y se enriquece, y que permitiría afinar más el perfil de un paciente diagnosticados con NAC durante las primeras horas de ingreso, con el fin de anticiparse a las posibles complicaciones a las que estaría predispuesto según su perfil de microRNAs.

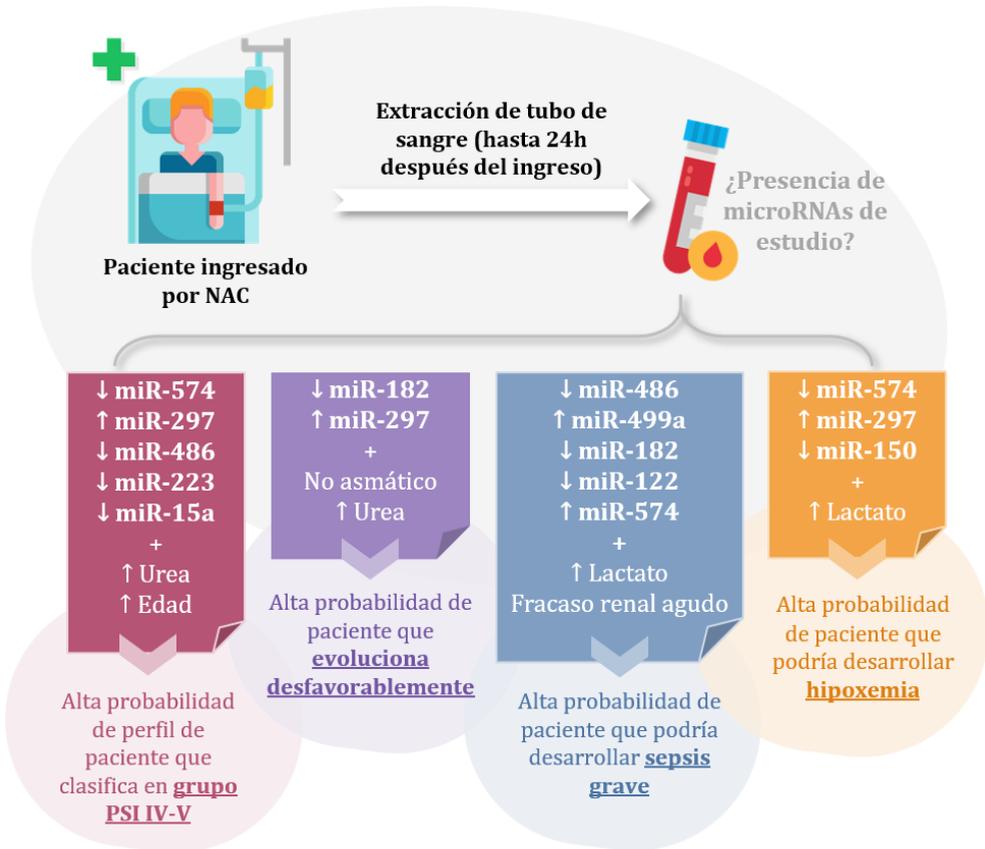


Figura 84. Resultados finales tras combinar la información obtenida tanto de los análisis cuantitativos, como de los modelos cualitativos resultantes de analizar las variables frente a los microRNAs y los datos clínicos seleccionados.

5.

Discusión

discusión

5.1. Necesidad de nuevos biomarcadores: ¿Qué aportan los microRNAs?

Nuestro trabajo demuestra que el uso de biomarcadores basados en la determinación de la expresión de distintos microRNAs puede predecir complicaciones graves en la neumonía comunitaria. El término “Biomarcador”, como ya se ha indicado, hace referencia a los diferentes tipos de **indicadores objetivos de salud y enfermedad**.

A lo largo de la historia, y en función de los avances científico-tecnológicos, este tipo de indicadores han ido mejorando, siendo cada vez más precisos y fiables. Atrás quedaron lo que podrían considerarse los primeros biomarcadores de la antigüedad, representados fundamentalmente por signos médicos, como el pulso, así como por la apariencia o el sabor de determinados fluidos, como en el caso de la orina para el diagnóstico de la diabetes.

El descubrimiento de nuevos biomarcadores, más modernos y precisos supone, por tanto, un paso más hacia lo que se denomina como “medicina personalizada”. Ahora bien, no todo es válido y el biomarcador ideal debe ajustarse a 4 criterios fundamentales:

- ❖ Ser de **fácil acceso**, y por tanto obtenerse a través de procedimientos no invasivos;
- ❖ Ser **específico** de la patología investigada;
- ❖ Ser **sensible**, lo que implica detectar su presencia incluso antes de que se manifiesten los síntomas clínicos, o en su defecto de manera muy rápida tras las primeras manifestaciones;
- ❖ Fácilmente **reproducibles**;

Generalmente se ha considerado que las proteínas eran las únicas biomoléculas que cumplirían estos requisitos, y por tanto susceptibles de ser biomarcadores. Dentro de los biomarcadores proteicos medibles en sangre más conocidos estarían la troponina, para el diagnóstico de infarto de miocardio, las aminotransferasas ALT y AST para el diagnóstico de enfermedades hepáticas, o el PSA para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata. En el caso de la patología que nos ocupa, la NAC, los más destacados serían, como ya se ha indicado anteriormente, la proteína C reactiva y la procalcitonina, si bien son muchos los que siguen investigándose, tales como el Lactato, el Dímero-D, la protendotelina-1 o la copeptina. No obstante, ninguno de los anteriores es ideal, pues si bien la **pCr** parece tener un buen valor a la hora de establecer el pronóstico de la enfermedad, se sabe que sus valores dependen de la edad, el sexo y la raza, lo que requiere el ajuste y la interpretación para cada paciente, además de poder dar falsos negativos en los inicios de la NAC, al tratarse de una proteína de cinética lenta. Del mismo modo, la **PCT** parece clave en la orientación etiológica de un paciente con NAC, y también se considera un marcador sensible para la gravedad de las NAC de origen bacteriano, pero se trata de un método poco accesible por el momento especialmente en comparación con la pCr, siendo, más caro y lento que esta. Y, además, aún está por determinar su utilidad real en neumonías precoces. Del mismo modo sucede con el resto de los biomarcadores nombrados anteriormente, pues ninguno está exento de limitaciones, y requieren de más estudios e investigaciones para poder ser usados en la clínica en el futuro.

La búsqueda de nuevos biomarcadores de naturaleza proteica más específicos parece ser una ardua tarea, pues resulta un proceso muy costoso y largo en el tiempo, como consecuencia de la baja cantidad de proteínas clínicamente significativas, así como de la complejidad de su

estructura. Por ello, en la búsqueda de nuevos y más precisos biomarcadores, recientemente han cobrado gran importancia las moléculas de ácidos nucleicos, especialmente las de RNA. Si bien al principio se descartaba que éstas pudieran ser utilizadas como biomarcadores en muestras de sangre, debido a los altos niveles de RNAsas presentes en la misma, a día de hoy se sabe que su presencia puede **detectarse fácilmente** en fluidos corporales como el suero o el plasma, e incluso en la orina, al tener una gran estabilidad en dichos fluidos (163,164). De este modo, el primer requisito de todo biomarcador estaría cumplido, pues su obtención y detección pasaría por procedimientos mínimamente invasivos y habituales en la práctica clínica.

Por otro lado, los microRNAs tienen una alta especificidad por el tipo de tejido o célula de procedencia, además de ser sensibles al progreso de la enfermedad. Es conocido el papel regulador de la expresión génica que desempeñan estas biomoléculas, por lo que es lógico que una alteración en la expresión de las mismas esté directamente relacionada con el desarrollo de multitud de patologías. De este modo, el estudio de los microRNAs en una enfermedad podría llevar a establecer una serie de patrones característicos de dicha patología de manera temprana, posibilitando su diagnóstico precoz, así como la prescripción de un tratamiento personalizado para cada paciente. Todo ello no sólo contribuiría a mejorar el pronóstico de los enfermos, sino que además permitiría reducir de manera sustancial el coste de los cuidados médicos. De nuevo, el segundo y tercer requisito que debería cumplir un biomarcador ideal quedaría cubierto.

Una ventaja añadida del uso de estas biomoléculas circulantes como biomarcadores, frente a los proteicos, es que **el desarrollo de nuevos ensayos requiere menos tiempo y es más económico**, dado que la

producción de nuevos anticuerpos, necesarios para los biomarcadores proteicos, es muy costosa.

Además, buena parte del potencial que tienen los biomarcadores basados en los microRNAs es que, no sólo hacen posible el diagnóstico preciso y precoz, sino que facilitan **el tratamiento guiado y la respuesta al tratamiento**, pudiendo obtener una imagen de la progresión de la enfermedad. Es esta característica la que los hace especialmente atractivos e importantes en el cáncer, al tratarse de una enfermedad totalmente heterogénea. De hecho, ya se ha demostrado su potencialidad en el diagnóstico del cáncer de mama (165).

Quizás el requisito más controvertido para alzarse como uno de los biomarcadores óptimos es el referente a la reproducibilidad, pues la investigación de los microRNAs como biomarcadores se encuentra en sus primeras etapas. Si bien hasta el momento los hallazgos carecen generalmente de reproducibilidad, habiéndose comunicado discordancias entre diferentes equipos que han analizado los mismos tumores (166), la solución pasa por el **desarrollo de protocolos estandarizados**, tanto para las primeras etapas del proceso, en las que se encontrarían la obtención, el transporte y el almacenamiento de muestras, como para el análisis de datos y métodos utilizados.

Por todo ello, son los microRNAs los grandes protagonistas de este trabajo, al considerar todas las ventajas que su uso como biomarcador puede aportar sobre los biomarcadores proteicos que hoy en día se conocen para la NAC.

5.2. Relación entre los microRNAs del estudio y las variables

Dado que el descubrimiento de los microRNAs y su potencial uso como biomarcadores es muy reciente, son pocos los estudios con los que poder contrastar los resultados obtenidos en este trabajo. Prácticamente todas las investigaciones llevadas a cabo con estos biomarcadores van dirigidas al diagnóstico y pronóstico de diferentes tipos de cáncer y, en nuestro conocimiento, son muy pocos los estudios enfocados al uso de los microRNAs como biomarcadores en neumonía, en concreto 3 de los que tengamos constancia hasta la fecha. El primero de ellos, publicado en febrero de 2019, se llevó a cabo con muestras de niños con neumonía causada por adenovirus y 4 microRNAs exosomales séricos (167). Si bien se obtuvieron resultados que planteaban el posible uso como biomarcadores de diagnóstico para la neumonía asociada a la infección por adenovirus en niños, tiene una gran limitación, y es el pequeño tamaño muestral en el que se llevó a cabo: tan sólo 30 individuos con este tipo de neumonía, frente 29 controles sanos. Otro de los estudios en esta área fue publicado en marzo de 2019 por Zhang y colaboradores (168), y se centró en el uso de microRNAs como marcadores para la sepsis secundaria en neumonía. Tan sólo se estudiaron 2 microRNAs, el miR-7110 y el miR-223-3p, y si bien ambos abocaron resultados prometedores, cuenta con la misma limitación que el estudio anterior, y es el reducido tamaño muestral. El último de los estudios de que tenemos conocimiento es el liderado por Galván-Román y colaboradores, publicado en Octubre de 2020, cuyo tamaño muestral es bastante superior a los anteriores, pues se analizaron un total de 153 pacientes (169). En su investigación analizaron la

expresión de 2 microRNAs, miR-146a y miR-16-5p, teniendo como principal variable de estudio la mortalidad a los 30 días. Si bien el tamaño muestral es considerablemente superior a los anteriores estudios, aunque inferior al nuestro, sigue habiendo un hándicap en este campo, y con el que también contamos en este estudio, y es la escasa literatura científica existente sobre la utilidad de estos biomarcadores como pronóstico en la NAC.

No obstante, dentro de la poca cantidad de estudios que hay publicados al respecto, sí que hay algunos trabajos dirigidos a estudiar los microRNAs circulantes para el diagnóstico de patologías infecciosas en general, dentro de las cuales encontraríamos la **sepsis**. Esta patología es una de las más complicaciones más peligrosas y mortales que puede desarrollar un paciente con NAC. En conjunto con lo hay descrito por diferentes investigadores, esta complicación parece estar asociada con una infraexpresión significativa de los microRNAs **miR-342** (170), **miR-15a**, **miR-122**(171), **miR-193b**, miR-483, **miR-297**, miR-181b (172) y miR-4661 (173). Mientras que otros autores han observado una sobreexpresión de los microRNAs **miR-486**, **miR-182** (170), miR-4772, **miR-574** (174) y miR-133a (175). Como puede observarse, en negrita aparecen destacados los microRNAs que han sido estudiados a lo largo de esta investigación, de los cuales tanto el miR122 como el miR-547 han demostrado estar infraexpresado y sobreexpresado respectivamente en los pacientes que desarrollaron sepsis, resultados congruentes con los obtenidos por otros investigadores.

En el caso del **miR-574**, ha demostrado ser de utilidad en la detección del cáncer de pulmón, estando significativamente aumentado en muestras de pacientes con cáncer de pulmón de células en estadio temprano (176). También se ha descrito su implicación en procesos biológicos de respuesta

al estrés (177). Sin embargo es en 2012 cuando Wang y colaboradores (174) establecen la relación entre este microRNA y la sepsis, al observar una mayor expresión de dicho biomarcador en pacientes con sepsis frente a controles, así como una expresión significativamente superior entre fallecidos por sepsis y supervivientes a ella, lo que demuestra la visión de progresión de la enfermedad que aportan los microRNAs frente a otros biomarcadores, de la que se hablaba en el apartado anterior. En nuestro conocimiento, no existen más trabajos que establezcan la relación entre el miR-574 y la sepsis salvo el comentado anteriormente y los resultados que hemos obtenido, lo que no es sorprendente dado que, como se ha comentado, la mayoría de los estudios sobre microRNAs van dirigidos al cáncer.

En cuanto al **miR-122**, su expresión en nuestro estudio ha resultado significativamente inferior en pacientes que desarrollaron sepsis, del mismo modo que se ha descrito en otros estudios. Se trata de un marcador específico del hígado, de modo que sus niveles en suero suelen estar asociados a lesiones hepáticas, normalmente producidas por fármacos. No obstante, en 2014 los investigadores Wang, Deng y colaboradores, correlacionaron los niveles significativamente inferiores de este microRNA con los trastornos de la coagulación que padecen los pacientes con sepsis, así como con los niveles séricos de antitrombina III.

Del resto de microRNAs descritos para la sepsis en otras investigaciones, los resultados que hemos obtenido no dan evidencias que puedan confirmar su papel en la sepsis. No obstante, todos los microRNAs anteriores fueron resultado de investigaciones dedicadas en exclusiva al estudio de la sepsis, bien comparando su expresión entre pacientes con sepsis frente a controles sanos, o bien entre pacientes supervivientes y fallecidos por sepsis.

En nuestro caso, el estudio llevado a cabo pretendía la obtención de una firma más amplia de la NAC, no exclusiva de la sepsis. El hecho de que algunos microRNAs descritos no se hayan podido confirmar en nuestro estudio puede deberse precisamente a que, como se tratará en el apartado de limitaciones, de los 223 pacientes tan sólo 32 desarrollaron sepsis durante su estancia en el hospital. Sería interesante aumentar en un futuro la muestra de esta variable para tener grupos más equilibrados entre los que realizar comparaciones

A pesar de ello, tanto el **miR-122** como el **miR-574** demuestran tener un papel importante para la predicción del desarrollo de dicha complicación en las primeras horas del ingreso hospitalario de un paciente con NAC, lo que nos parece prometedor de cara a poder anticiparnos al desarrollo esta peligrosa complicación y mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Si bien los resultados de este trabajo no permiten confirmarlo, existe un estudio en el que se describió la sobreexpresión del **miR-150** en alguna etapa en particular de la sepsis (170), si bien cuenta con la principal limitación de los estudios publicados al respecto: un tamaño muestral limitado, de tan solo 23 pacientes con sepsis. Además, en tan poca muestra abarcaba el estudio de sepsis de diferentes orígenes (5 intraabdominal, 4 por neumonía, 3 por infección del tracto respiratorio inferior, 3 por infección del torrente sanguíneo, 2 por sepsis biliar y 6 por causas desconocidas). No obstante, teniendo en cuenta los resultados que hemos obtenido, la variable con la que sí parece estar relacionada su expresión es la **hipoxemia**, estando infraexpresado en los pacientes que presentaron esta complicación. Tras consultar los trabajos existentes que pudieran avalar nuestro resultado, encontramos un estudio llevado a cabo por Jian-Lin Ma y colaboradores (178), en el que investigaron el papel de dicho

microRNA en la apoptosis inducida por hipoxia en cardiomiocitos humanos. Los autores observaron que la hipoxia inducía la apoptosis de los cardiomiocitos, y que, en estos, la expresión del miR-150 se reducía notablemente. Del mismo modo, la sobreexpresión forzada de este microRNA conseguía inhibir la muerte celular de los cardiomiocitos inducida por la hipoxia, al regular la expresión de la proteína GRP94 (Proteína-94 Regulada por Glucosa, glicoproteína muy abundante del retículo endoplasmático).

Resulta lógico pensar que, en pacientes con hipoxemia, es decir, PaO₂ en sangre arterial inferior a 80mmHg, se pueda llegar a producir hipoxia, es decir, el déficit de oxígeno a nivel de tejido. Si bien la presencia de una no es sinónimo de la otra, teniendo en cuenta los resultados que hemos obtenido para el miR-150, es muy probable que en muchos de los pacientes se haya dado esta situación. Esto nos parece muy interesante y prometedor, pues explicaría como, a partir de la muestra de sangre de un paciente en sus primeras horas de ingreso, puede observarse ya una reducción significativa de dicho microRNA antes de desarrollar hipoxemia.

Otro de los microRNAs que en nuestro estudio hemos detectado que se asocia significativamente con la hipoxemia es el **miR-574**. Anteriormente hemos relacionado su aumento con el desarrollo de sepsis, pero nuestros resultados vincularían su infraexpresión a la **hipoxemia**, así como a la clasificación en el grupo de riesgo IV-V de **la escala de gravedad PSI**, el de pronóstico más complicado. De este microRNA todas las publicaciones que hemos encontrado, salvo en el estudio en el que se le relacionó con la sepsis, van dirigidas a su relación con el cáncer, de pulmón (179) o de cuello de útero (180) entre otros. También se ha relacionado la infraexpresión de este microRNA con la disminución de la diferenciación de miofibroblastos, sugiriendo nuevas posibilidades terapéuticas para la

fibrosis cardíaca (181). Sin embargo, no hay nada descrito que relacione la infraexpresión de miR-574 con la hipoxemia ni con el pronóstico que cabría esperar en ninguna enfermedad infecciosa, por lo que sería necesario seguir investigando para confirmar la validez de nuestros resultados al respecto.

Siguiendo con la variable de la **escala de gravedad**, además del ya comentado miR-574, también parecen tener un importante papel a la hora de dividir a los pacientes de NAC por su pronóstico los microRNAs **miR-486, miR-223 y miR-15a**, los tres significativamente regulados a la baja en los pacientes que clasificaron en el grupo de mayor riesgo.

El **miR-486**, es conocido y descrito principalmente por su papel en el campo de la oncología, habiéndose descrito su infraexpresión en muchos de los cánceres humanos, tanto benignos como malignos. En concreto, este microRNA parece tener un gran potencial en el diagnóstico de los cánceres de pulmón, tal y como concluyeron los investigadores Marwa y sus colegas en 2018. Su relación con diferentes tipos de cáncer no es casual, y tiene mucho que ver con la localización en el genoma de este microRNA, pues se ubica en el cromosoma 8p11.21, una de las regiones genómicas que mayor número de genes supresores de tumores contiene (182). No obstante, en la mayoría de los estudios consultados no sólo se relaciona este microRNA con la presencia de algún tipo de tumor, sino que los niveles más bajos de expresión de miR-486 coincidirían con los casos de peor pronóstico. Si bien en nuestro trabajo la patología a estudiar es la NAC, y no ningún tumor, también hemos encontrado que su infraexpresión resulta ser significativa para los pacientes que, según la escala PSI, serían los que más riesgo tendrían de desarrollar complicaciones por sus características clínicas, es decir, los clasificados en el grupo IV-V, es decir, pacientes más frágiles y graves.

En cuanto al **miR-223**, hay descritos varios estudios de este microRNA enfocados a diferentes enfermedades, muchas de las cuales tienen que ver con procesos inflamatorios. También se ha demostrado previamente que este microRNA se dirige a muchos genes implicados en la señalización de la respuesta inmune innata. Uno de todos estos trabajos, tras estudiar su implicación en la enfermedad inflamatoria intestinal, llegó a la conclusión de que ésta estaba limitada por la expresión de miR-223 a través de la restricción de una proteína llamada Nlrp3, que forma parte de un complejo conocido como inflamasoma. Sus resultados permitieron concluir a los autores que la sobreexpresión de este microRNA atenuaba la colitis en ratones (183).

Otro estudio llevado a cabo con este microRNA para determinar su papel en la regulación de la proliferación celular y de la función de los granulocitos llegó a resultados similares a los anteriores. Comprobó que en ratones donde habían inhibido la producción de miR-223 presentaban granulocitos hipermaduros, hipersensibles a los estímulos activadores y mostraban mayor actividad fungicida. Como consecuencia de esta hiperactividad neutrofilica, los ratones mutantes desarrollaron patologías pulmonares inflamatorias, así como destrucción tisular exagerada tras la exposición a endotoxinas. Esto respaldaría la función y la implicación de este microRNA sobre la producción de granulocitos y la respuesta inflamatoria (184).

En ambos casos, las mayores expresiones de este microRNA se asociaron a evoluciones más favorables, estando su infraexpresión relacionada con la destrucción tisular o procesos de mayor gravedad. Si bien en nuestro estudio no se ha obtenido una relación estadísticamente significativa entre su expresión y la variable “evolución”, sí se puede apreciar una clara tendencia a la infraexpresión del miR-223 en los

pacientes que evolucionaron de manera desfavorable. Lo que sí se ha podido correlacionar de manera significativa es la expresión de este microRNA con los pacientes que, a priori, y tras la puntuación obtenida al tener en cuenta los parámetros de la escala de riesgo PSI, se clasificaban en el grupo de mayor riesgo, lo cual nos parece muy interesante.

Por otro lado, el último de los microRNAs que, según nuestro estudio, nos permite establecer una relación estadísticamente significativa con la escala de gravedad PSI es el **miR-15a**. Se trata de un microRNA bastante estudiado por su papel como supresor de tumores, en muchos tipos de cáncer. Esto es debido a que una de sus principales dianas es la ciclina E1 (CCNE1), encargada de la regulación del ciclo celular y de promover la proliferación y progresión celular. Teniendo en cuenta esto, son muchas las investigaciones que asocian la regulación negativa de dicho microRNA, es decir, su infraexpresión, con los peores pronósticos de muchas enfermedades.

Así pues, se ha comprobado que en pacientes con cáncer de pecho triple negativo, las bajas expresiones de miR-15a coinciden con los peores pronósticos de dicha enfermedad (185). Mismos resultados que los obtenidos al estudiar el papel de este microRNA en el pronóstico de la leucemia linfocítica crónica (186).

No obstante, además de en el campo de la oncología, también se ha estudiado la implicación de este microRNA con la respuesta inmunitaria y la inflamación. Uno de estos trabajos consistió en estudiar el papel de la expresión de este microRNA con la enfermedad renal crónica atribuida a la hipertensión, enfermedad que parece estar vinculada a la respuesta inmune innata y la inflamación. El objetivo de dicho estudio fue la identificación de microRNAs diferencialmente expresados en sangre frente

a individuos sanos, con el resultado de que, uno de estos microRNAs fue el miR-15a. Los autores concluyeron que este microRNA estaba regulado significativamente a la baja en los pacientes, frente a los individuos sanos, descubriendo el papel que la expresión de miR-15a tiene sobre la inducción de los linfocitos T CD4 (187). Y, de nuevo, resultados similares obtuvieron los investigadores Chenyi y colaboradores en 2018, al estudiar el papel de diferentes microRNAs con la respuesta inflamatoria de las células epiteliales bronquiales del pulmón humano. También estos investigadores asociaron la expresión del miR-15a con la mayor activación de los mecanismos de respuesta de las células inflamatorias. En especial, la producción de células T y macrófagos, lo que se tradujo en el aumento de las interleucinas IL-6 y IL-8, encargadas de estimular la respuesta inflamatoria a la infección. De este modo, los pacientes en los que el microRNA estaba infraexpresado fueron los que peor pronóstico presentaron (188).

Si bien en este estudio no hemos podido demostrar una significación entre este microRNA y la evolución desfavorable de los pacientes, sí que se observa la tendencia indicada, pues la expresión de este microRNA en los pacientes que evolucionaron desfavorablemente es ligeramente inferior. Con la variable que sí hemos podido establecer la correlación significativa es con el grupo de riesgo en el que clasificarían los pacientes teniendo en cuenta los criterios de la escala PSI. Coincidiendo, así, los pacientes con mayor riesgo de sufrir complicaciones con los pacientes que menores valores de expresión presentaron para el miR-15a.

Finalmente, en cuanto a la variable **evolución**, si bien nuestros resultados reflejan cierta tendencia que coincide con la bibliografía tanto para miR-223 como miR-15a, ambos biomarcadores que parecen tener un papel importante en la evolución que cabría esperar de los pacientes, no

hemos podido demostrar su significatividad. Sin embargo, sí que hemos obtenido una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión del miR-297 y la evolución desfavorable de los pacientes con NAC. Este resultado parece confirmar los resultados alcanzados en un estudio muy reciente llevado a cabo por los investigadores Yun y colaboradores (189). Sus investigaciones estuvieron centradas en establecer la asociación de este microRNA con la inflamación pulmonar, en este caso inducida por nanopartículas de óxido de aluminio (Al_2O_3 NPs). Según sus observaciones, todo parece indicar que la sobreexpresión de este microRNA activa la vía Notch, lo que tiene un papel clave en el desarrollo de la inflamación pulmonar. Como cabría esperar, demostraron que en ratones con antagomiR-297, y por tanto con este microRNA inhibido, se podía rescatar la inflamación del pulmón.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, su sobreexpresión coincide con los casos con peor evolución de NAC, lo que está en consonancia con lo descrito por los investigadores anteriores, publicado a principios de este mismo año. Si bien sería necesario estudiar los mecanismos moleculares que se pondrían en juego en estos pacientes, todo parece indicar que se trata de casos en los que la sobreexpresión de miR-297, entre otros factores, ha podido provocar una mayor inflamación pulmonar, trayendo consigo una serie de complicaciones asociadas que hayan podido derivar en lo que entendemos como una evolución desfavorable del paciente.

Si bien según los resultados que hemos obtenido, la sobreexpresión de este microRNA también resultaba significativa para predecir la hipoxemia, no hemos podido encontrar trabajos en esta línea que nos permitan afirmar con rotundidad su implicación en dicha variable, por lo que sería necesario continuar investigando al respecto y analizar su relación con mecanismos biológicos y vías involucradas en la hipoxemia.

Finalmente, además de los microRNAs, en los modelos llevados a cabo también se incluyeron una serie de **variables clínicas**, algunas de las cuales resultaron tener un papel relevante para la predicción de nuestras variables de estudio, al ser combinadas con determinados microRNAs.

Como no podría ser de otra manera, ya que la propia escala PSI concibe esta variable y le da un peso relevante, es precisamente la **edad** una de las variables clínicas que, sumada a valores altos de urea, y a los microRNAs anteriormente mencionados, serviría para predecir el **grupo de riesgo** de un paciente con NAC, clasificándolo en el PSI IV-V. Así pues, a mayor edad, mayor probabilidad de sufrir complicaciones. Si bien es lógico pensar que la edad influye en la evolución desfavorable a medida que aumenta, no nos ha salido significativa, aunque consideramos que ampliando la muestra se vería reflejada la influencia de la edad en dicha variable.

No obstante, uno de los parámetros clínicos que, según nuestro estudio, es un buen predictor tanto del **grupo de riesgo** como de la **evolución** es la **urea**, estando aumentada de manera significativa en los casos de peor pronóstico y de evolución desfavorable. Tiene lógica, pues el aumento de la urea sugiere fallo renal o deshidratación, lo que en el contexto de la NAC comúnmente se ha asociado con mayor mortalidad (190). De hecho, la relación entre los niveles elevados de urea en sangre y la mayor mortalidad o evolución de los pacientes con NAC hace años que fue reportada y forma parte tanto de las escalas pronósticas PSI como de CURB-65 (191).

Otra de las variables clínicas que estaría relacionada de manera significativa con la **evolución** de los pacientes de nuestro estudio ha sido el **asma**. Lo curioso es que, al contrario de lo que *a priori* podríamos pensar, parece que el asma está relacionada con la evolución favorable. Sin embargo, resulta aún más curioso que se han obtenido resultados

similares, donde el asma parece tener un papel “protector” en el estudio del SARS-CoV-2, es decir, la actual pandemia de COVID-19 (192,193). Si bien en teoría los pacientes asmáticos deberían tener mayor susceptibilidad y gravedad durante la infección por NAC o COVID-19 debido a una deficiente respuesta inmune antiviral, así como a la tendencia a la exacerbación provocada por virus respiratorios comunes, la realidad parece sugerir lo contrario. Si bien la interacción asma-COVID-19 merece seguir siendo estudiada, una de las hipótesis es que, en los asmáticos, la acumulación de eosinófilos, así como de citocinas de tipo 2 podría tener efectos protectores contra el COVID-19, y probablemente a juzgar con nuestros resultados, también contra la NAC. Así pues, otra de las hipótesis planteadas es que los tratamientos convencionales para el asma, donde se incluyen principalmente los corticoesteroides inhalados, reduzcan el riesgo a sufrir una infección grave por el virus al aliviar la inflamación y mejorar la defensa antiviral. No obstante, como hemos apuntado, nos parece una interesante vía de investigación de cara al futuro de cara al desarrollo de tratamientos futuros, tanto del COVID-19 como, por supuesto, de la NAC. También se trata de pacientes más educados en cuidados de la salud en general, pues suelen evitar el tabaco, y tienden a vacunarse más contra la gripe y el neumococo.

Cambiando de variable de estudio, para el desarrollo de **sepsis grave** obtuvimos un modelo que, en combinación con los microRNAs ya comentados, así como valores elevados de lactato y fracaso renal agudo, permitían la predicción de la sepsis. En el caso de esta última variable clínica, el **fracaso renal agudo**, son diversos los estudios que respaldan su asociación con la sepsis. Si bien no se conoce completamente el mecanismo fisiopatológico implicado, parece que la cascada inflamatoria nociva causada por la sepsis contribuiría al fracaso renal. No obstante, todo parece

indicar que se trataría de una relación bidireccional, es decir: si bien la sepsis es una de las principales causas del fracaso renal agudo, los pacientes con fracaso renal agudo tendrían más riesgo de desarrollar sepsis (194,195). De nuevo, los resultados obtenidos van en consonancia con lo descrito hasta la fecha, siendo el fracaso renal agudo una buena herramienta que, junto el resto de las variables del modelo permitiría la predicción de la sepsis y con ello la anticipación de los cuidados y tratamientos pertinentes.

Otra de las variables clínicas que nos han resultado significativas en nuestros modelos para la predicción de la **sepsis** y de la **hipoxemia**, es el **lactato**, estando significativamente elevado en los pacientes con sepsis grave e hipoxemia. El papel del lactato para la predicción, tanto de la sepsis, como de la hipoxemia, ha sido ya descrito por algunos autores. De hecho y como se comentó en la introducción de este documento, se trata de uno de los biomarcadores de mayor interés e importancia para la predicción de la hipoperfusión, muchas veces inducida por la sepsis. Uno de los mecanismos implicados en la hiperlactatemia sérica en pacientes con sepsis es la disminución de su utilización, la estimulación de su producción por mediadores inflamatorios y el aumento de la glucólisis (196). Al contrario, la disminución el lactato en el tiempo ha demostrado estar asociada con el buen pronóstico, sugiriendo su depuración como un posible tratamiento para estos pacientes (63). Este biomarcador, junto con el fracaso renal agudo y los microRNAs del modelo resultante para la predicción de la sepsis facilitarían el diagnóstico temprano de la sepsis, posibilitando su tratamiento inmediato, lo cual es esencial para aumentar la probabilidad de supervivencia de esta complicación bastante común en la NAC. Por otro lado, este metabolito se ha descrito también como un biomarcador de la hipoxia tisular (52), la cual puede deberse a la

hipoxemia. Esto lleva a pensar que, tal y como nuestros resultados indican, el lactato también pueda ser un buen biomarcador para la predicción de la hipoxemia en pacientes con NAC, especialmente el resto de los integrantes del modelo de predicción mencionado para esta variable, es decir los microRNAs descritos anteriormente.

5.3. Consecuencias en la práctica clínica de los resultados obtenidos

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían marcar un punto de inflexión en lo que se refiere a la detección precoz de las principales complicaciones en la NAC. Una de las mayores y más peligrosas complicaciones de estos pacientes es el desarrollo de sepsis, producida cuando la infección se propaga por la sangre, así como la insuficiencia respiratoria. Motivo por el cual, el hecho de poder anticipar los movimientos a la aparición de estas complicaciones además de poder proporcionar un apoyo y monitoreo más intensivo para estos pacientes supondría sin duda en la mejora en su calidad de vida.

Así pues, el traslado de nuestros resultados a la práctica diaria no supondría una alteración muy grande en los hospitales o servicios de urgencias, pues bastaría con la extracción de una muestra de sangre en el momento del ingreso, y comprobar la expresión de los microRNAs que han resultado significativos para cada complicación. Para ello se requiere el uso de tecnologías disponibles en la mayoría de los hospitales, como es un termociclador, así como una serie de kits comerciales económicos al alcance de todos los centros hospitalarios. De este modo, en un periodo de 3 horas obtendría el perfil del paciente y se podría anticipar el mejor

tratamiento para cada caso, lo que, sin lugar a duda, se traduciría en la mejora de su tratamiento, y por tanto en su pronóstico.

Estamos convencidos de que el cribaje de los pacientes en función del perfil de expresión de los microRNAs, teniendo en cuenta los modelos que hemos determinado, en combinación con las variables clínicas que hemos visto anteriormente, **supondría una forma rápida y económica de mejorar e incluso salvar vidas de pacientes con este tipo de infección pulmonar permitiendo una anticipación a complicaciones graves de la neumonía.**

5.4. Limitaciones del estudio

Como en todo trabajo de investigación, hay que hacer balance ser autocríticos, y ser conscientes de algunas de las limitaciones de nuestro estudio.

La primera de las limitaciones es que, aunque el tamaño muestral del estudio fue grande, incluyendo 223 pacientes, no todas las variables de estudio estaban igual de representadas. La variable escala de riesgo PSI es la que mayor equilibrio de pacientes tuvo entre sus dos categorías, no habiendo sobrerrepresentación de ninguna: de los 223 pacientes, 123 (es decir el 55,15%) fueron del **grupo PSI IV-V**, mientras que 100 (44,84%) fueron del grupo PSI I-III. De manera similar sucedió con la variable **evolución**, si bien este caso sí se aprecia una ligera sobrerrepresentación de los casos desfavorables pues de los 223 pacientes, 152 (68,16%) evolucionaron desfavorablemente frente a 72 (31,84%) que evolucionaron sin complicaciones. Esta sobrerrepresentación de casos es más llamativa en la **hipoxemia**, presentada por un total de 57 pacientes (el 25,56%) frente a 166 que no desarrollaron esta complicación (es decir, el 74,44%).

Y se agudiza especialmente para la variable **sepsis**, complicación desarrollada por 32 de los 223 pacientes del estudio (lo que supone el 13,91% del total), frente a 191 (85,65%) que no desarrollaron sepsis. Evidentemente, esta desigualdad entre las variables es debida a que la extracción de sangre de los pacientes tiene lugar en las primeras 24 horas tras su ingreso hospitalario, por lo que los pacientes aún no han desarrollado dichas complicaciones.

Si bien hemos obtenido modelos significativos para la predicción de todas las variables, sería interesante ampliar la muestra de estas dos últimas incorporando más pacientes de NAC que desarrollen alguna de estas dos patologías, con el fin de que se confirmen los resultados obtenidos en nuestro estudio, y otros, como el miR-182 cambiaran en la dirección a la que apunta la bibliografía en su papel de predicción de la sepsis.

Otra de las limitaciones que bien podría servir como línea de investigación futura, es que en nuestro estudio no hemos tenido en cuenta la medicación suministrada a los pacientes. Por ello consideramos que sería interesante plantear una hipótesis futura acerca de la posible influencia de los fármacos suministrados sobre la expresión de los microRNAs.

De igual manera que reflexionamos para el tratamiento suministrado, otra posible variable que no hemos tenido en cuenta en este trabajo ha sido la etiología de la NAC en los casos que se pudo determinar. Como ya comentamos al inicio del documento, no siempre es posible establecer un diagnóstico etiológico de las neumonías que llegan al hospital. Concretamente en nuestro trabajo, de los 223 pacientes totales tan sólo se obtuvo la etiología de 79 casos, lo que supone que tan solo en el 35,42% de

los casos se pudo determinar el agente etiológico. Como era de esperar, el agente etiológico más frecuente fue el *Streptococcus pneumoniae*, causante de 46 de los 79 casos que pudieron determinarse (es decir, un 58,23% de las NAC de las que se obtuvo etiología), seguido de *Mycoplasma pneumoniae* (en 7 de los 79 casos) y de *Legionella spp* (también en 7 de los 49 casos). Si bien no era un objetivo de este trabajo, cabría preguntarse si la etiología de la NAC podría modificar la expresión de los microRNAs, lo que sería una buena línea de investigación futura. No obstante, dado que el diagnóstico etiológico de la NAC no suele superar el 60% de los casos, y son muchos los agentes que pueden causar neumonía, como ya hemos visto, se trataría de un estudio largo y tedioso con el fin de obtener una buena representación de la mayoría de los agentes causantes.

5.5. Fortalezas del estudio

Finalmente, también nos gustaría resaltar, además de las limitaciones, las fortalezas de nuestro estudio. Si bien no se trata de un apartado que suela ser incluido en los estudios, hemos creído conveniente destacar los aspectos positivos y más destacados de la investigación llevada a cabo.

Uno de estos aspectos que consideramos importante a destacar es el **elevado número de muestra** de NAC incluidas, sin duda muy superior a los estudios anteriormente publicados al respecto. Si bien para el análisis de la expresión de algunos microRNAs para el estudio de algunas de las complicaciones (como el miR-182 y la sepsis), quedaría pendiente seguir aumentando la muestra, en la gran mayoría consideramos que nuestros resultados están abalados por un buen número de muestra.

Por otro lado, también consideramos interesantes los **resultados obtenidos para la sepsis y la hipoxemia**, dos de las complicaciones más

graves, y concretas, que pueden desarrollar los pacientes con NAC. Nuestros resultados aportan una buena e interesante caracterización de estas complicaciones mediante microRNAs, que puede ser de gran utilidad en la mejora del pronóstico de estos pacientes.

También consideramos clave el hecho de obtener la **muestra en las primeras 24 horas** del ingreso del paciente con NAC. De este modo, los resultados obtenidos reflejan el perfil de los microRNAs de los pacientes en sus primeras horas de enfermedad, pudiendo deducir de los mismos cual será la evolución y con ello adelantarnos al tratamiento de estos pacientes.

Otro de los aspectos interesantes es que en este trabajo hemos incluido un **gran panel de microRNAs** analizados, mayor que los estudios similares llevados a cabo hasta el momento, donde la gran mayoría analizan el papel de 3 o 4 microRNAs. Además de contar con un **gran número de variables** clínicas, comorbilidades y de evolución analizadas. Para poder aprovechar al máximo todas las variables y los datos con los que hemos contado con el fin de comprobar todas las asociaciones posibles, el estudio estadístico llevado a cabo fue complejo, si bien consideramos que con él hemos conseguido aportar bastante información de la que, hasta el momento, no se tenía constancia para la enfermedad de estudio.

6.

Conclusiones

conclusiones

1. Los datos de nuestro estudio demuestran que es posible establecer una relación entre complicaciones específicas de la neumonía y un sustrato molecular basado en la determinación de microRNAs.
2. Los microRNAs pueden utilizarse como biomarcadores para el pronóstico de la Neumonía Adquirida en la Comunidad, pero, aunque todos los resultados obtenidos son prometedores, es necesaria su validación con una muestra más grande para alguna de las variables de estudio, como la sepsis.
3. El miR-122 disminuye su expresión en pacientes con sepsis. Si bien se trata de un microRNA principalmente hepático, también se le ha relacionado con los trastornos de la coagulación que padecen los pacientes con sepsis, así como con los niveles séricos de antitrombina III.
4. El miR-574 aumenta su expresión en pacientes con sepsis, si bien aún se desconocen los mecanismos implicados. Mientras que disminuye significativamente su expresión en pacientes clasificados en el grupo de riesgo IV-V y en los que desarrollaron hipoxemia, aunque tampoco hemos encontrado estudios que expliquen nuestros resultados, pues su investigación está orientada especialmente a la detección de determinados tipos de cáncer.
5. El miR-150 está reducido en pacientes con hipoxemia, como ya se ha descrito por otros autores en cardiomiocitos, si bien los mecanismos que influirían en la NAC habría que investigarlos.
6. La sobreexpresión de miR-297 parece tener un papel clave en el desarrollo de la inflamación pulmonar y por tanto en el pronóstico, por lo que sería un buen biomarcador de la evolución de la NAC y,

según nuestros resultados, también de la hipoxia, si bien no se ha descrito aún su relación.

7. Los miR-233, miR-15a y miR-486 están reducidos en pacientes que según la escala de gravedad PSI pertenecerían al grupo de mayor riesgo (IV-V). El miR-223 está relacionado con la regulación de genes implicados en la respuesta inmune innata y en la proliferación celular. La infraexpresión de miR-486 se ha relacionado con los peores pronósticos de diferentes enfermedades, especialmente de cáncer. El miR-15a está relacionado con la respuesta inmunitaria y la inflamación, al inducir la producción de células T y de macrófagos.
8. El miR-182 aparece infraexpresado en los pacientes con sepsis de nuestro estudio, contradiciendo la información publicada de este microRNA al respecto. Sería necesario ampliar la muestra de pacientes con sepsis para poder validar los resultados.
9. El aumento de la urea y la edad en los pacientes, junto con la expresión de los microRNAs anteriormente citados, resulta significativo para la predicción del grupo de riesgo PSI IV-V. La urea es indicador de fallo renal o deshidratación, que puede ser crítica en la NAC. Es por ello por lo que su aumento es también un parámetro significativo para la predicción de la evolución desfavorable.
10. El asma parece “proteger” el desarrollo de complicaciones, probablemente debido a los cuidados y los tratamientos de quienes la padecen.
11. El fracaso renal agudo y el aumento de lactato serían, junto con los microRNAs del modelo, buenos predictores para la sepsis. La primera variable parece predisponer al desarrollo de esta

complicación, mientras que el lactato ya ha sido anteriormente descrito como buen predictor de sepsis como de hipoxemia, variable para la que este biomarcador también ha resultado significativo en este estudio.

7.

Referencias

referencias

1. Grupo de trabajo "Neumonías" de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica. Protocolo del tratamiento de las neumonías en la infancia Protocolo del tratamiento de las neumonías en la infancia. *An Esp Pediatr.* 1999;50(2):189-95.
2. Machado F. Neumonía adquirida en la comunidad. *Canar Pediátrica.* 2014;33(2).
3. Blanquer J, Aspa J, Anzueto A, Ferrer M, Gallego M, Rajas O, et al. Normativa SEPAR: Neumonía nosocomial. *Arch Bronconeumol.* 2011;47(10):510-20.
4. Dorca J, Bello S, Blanquer J, De Celis R, Molinos L, Torres A, et al. Diagnóstico y tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. *Arch Bronconeumol.* 1997;33(5):240-6.
5. Blanquer J, Sanz F. Neumonía adquirida en la comunidad. *Arch Bronconeumol.* 2010;
6. Almirall J, Bolibar I, Vidal J, Sauca G, Coll P, Niklasson B, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. *Eur Respir J.* 2000;15(4):757-63.
7. Woodhead M, Welch CA, Harrison DA, Bellingan G, Ayres JG. Community-acquired pneumonia on the intensive care unit: Secondary analysis of 17,869 cases in the ICNARC Case Mix Programme Database. *Crit Care.* 2006;10(SUPPL. 2):S1.
8. Almirall J, Morato I, Riera F, Verdaguer A, Priu R, Coll P, et al. Incidence of community-acquired pneumonia and Chlamydia pneumoniae infection: a prospective multicentre study. *Eur Respir J.* 1993;6(1):14-8.
9. Ochoa-Gondar O, Vila-Córcoles A, de Diego C, Arija V, Maxenchs M, Grive M, et al. The burden of community-acquired pneumonia in the elderly: the Spanish EVAN-65 Study. *BMC Public Health.* 2008 Dec

- 27;8(1):222.
10. Vila-Córcoles A, Ochoa-Gondar O, Rodríguez-Blanco T, Raga- Luria X, Gómez-Bertomeu F. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. *Respir Med.* 2009;103:309–16.
 11. Rodríguez LAG, Ruigómez A, Wallander M-A, Johansson S. Acid-suppressive drugs and community-acquired pneumonia. *Epidemiology.* 2009 Nov;20(6):800–6.
 12. Gibson GJ, Loddenkemper R, Lundbäck B, Sibille Y. Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur Respir J.* 2013;42(3):559–63.
 13. Schnoor M, Hedicke J, Dalhoff K, Raspe H, Schäfer T, CAPNETZ study group. Approaches to estimate the population-based incidence of community acquired pneumonia. *J Infect.* 2007 Sep;55(3):233–9.
 14. Welte T, Köhnlein T. Global and Local Epidemiology of Community-Acquired Pneumonia: The Experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009 Apr 18;30(02):127–35.
 15. Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, Kallinen S, Karkola K, Korppi M, et al. Incidence of community-acquired pneumonia in the population of four municipalities in Eastern Finland. *Am J Epidemiol.* 1993 May 1;137(9):977–88.
 16. Chacón García A, Ruigómez A, García Rodríguez LA. Incidencia de neumonía adquirida en la comunidad en la cohorte poblacional de la base de datos en atención primaria (BIFAP). *Atención Primaria.* 2010 Nov 1;42(11):543–51.
 17. Foy H, Cooney M, Maletzky A, Grayston J. Incidence and etiology of pneumonia, croup and bronchiolitis in preschool children belonging to a prepaid medical care group over a four-year period. *Am J*

- Epidemiol. 1973;97(2):80-92.
18. Murphy TF, Henderson FW, Clyde Jr. WA, Collier AM, Denny FW. Pneumonia: an eleven-year study in a pediatric practice. *Am J Epidemiol.* 1981;113(1):12-21.
 19. Véjar L, Casterán JC, Navarrete P, Sánchez S, LeCerf P, Castillo C. [Risk factors for home deaths due to pneumonia among low socioeconomic level Chilean children, Santiago de Chile (1994)]. *Rev Med Chil.* 2000;128(6):627-32.
 20. Banajeh SM. Outcome for children under 5 years hospitalized with severe acute lower respiratory tract infections in Yemen: A 5 year experience. *J Trop Pediatr.* 1998;44(6):343-6.
 21. Álvarez-Sala J, Serrano R. Neumonía en el anciano. *Med Clin (Barc).* 2006;117:454-6.
 22. Jackson ML, Neuzil KM, Thompson WW, Shay DK, Yu O, Hanson CA, et al. The Burden of Community-Acquired Pneumonia in Seniors: Results of a Population-Based Study. *Clin Infect Dis.* 2004;39(11):1642-50.
 23. Strausbaugh LJ. Emerging health care-associated infections in the geriatric population. *Emerg Infect Dis.* 7(2):268-71.
 24. Donowitz GR, Cox HL. Bacterial Community-Acquired Pneumonia in Older Patients. *Clin Geriatr Med.* 2007 Aug;23(3):515-34.
 25. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax.* 2012;67(1):71-9.
 26. Torres A, Barberán J, Falguera M, Menéndez R, Molina J, Olaechea P, et al. Guía multidisciplinar para la valoración pronóstica, diagnóstico y tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. *Med Clin*

- (Barc). 2013 Mar 2;140(5):e1-19.
27. Trotter CL, Stuart JM, George R, Miller E. Increasing hospital admissions for pneumonia, England. *Emerg Infect Dis.* 2008 May;14(5):727-33.
 28. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, et al. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax.* 2009 Dec 1;64(12):1062-9.
 29. Menéndez R, Torres A, Aspa J, Capelastegui A, Prat C, Rodríguez de Castro F. Neumonía adquirida en la comunidad. Nueva normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). *Arch Bronconeumol.* 2010 Oct 1;46(10):543-58.
 30. Almirall J, Serra-Prat M, Bolívar I, Balasso V. Risk Factors for Community-Acquired Pneumonia in Adults: A Systematic Review of Observational Studies. *Respiration.* 2017;94(3):299-311.
 31. Falguera M, Carratalà J, Ruiz-González A, García-Vidal C, Isabel G, Dorca J, et al. Risk factors and outcome of community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacilli. *Respirology.* 2009 Jan;14(1):105-11.
 32. Kallen A, Brunkard J, Moore Z, Budge P, Arnold K, Fosheim G. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. *Ann Emerg Med.* 2009;53:358-65.
 33. Von Baum H, Welte T, Marre R, Suttorp N, Lück C, Ewig S. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia revisited within the German Competence Network for Community-acquired pneumonia (CAPNETZ). *BMC Infect Dis.* 2009 Dec 13;9(1):62.
 34. Falguera M, Ramírez MF. Neumonía adquirida en la comunidad. *Rev*

- Clínica Española. 2015 Nov 1;215(8):458–67.
35. Musher DM, Thorner AR. Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med*. 2015 Jan 15;372(3):292–4.
 36. Davis JS, McMillan M, Swaminathan A, Kelly JA, Piera KE, Baird RW, et al. A 16-year prospective study of community-onset bacteremic *Acinetobacter pneumonia*: low mortality with appropriate initial empirical antibiotic protocols. *Chest*. 2014 Oct;146(4):1038–45.
 37. Izumikawa K, Izumikawa K, Takazono T, Kosai K, Morinaga Y, Nakamura S, et al. Clinical features, risk factors and treatment of fulminant *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*: a review of the Japanese literature. *J Infect Chemother*. 2014 Mar 1;20(3):181–5.
 38. Viasus D, Di Yacovo S, Garcia-Vidal C, Verdaguer R, Manresa F, Dorca J, et al. Community-Acquired *Legionella pneumophila Pneumonia*. *Medicine (Baltimore)*. 2013 Jan;92(1):51–60.
 39. Viasus D, Marinescu C, Villoslada A, Cordero E, Gálvez-Acebal J, Fariñas MC, et al. Community-acquired pneumonia during the first post-pandemic influenza season: A prospective, multicentre cohort study. *J Infect*. 2013 Sep;67(3):185–93.
 40. Kim JE, Kim UJ, Kim HK, Cho SK, An JH, Kang S-J, et al. Predictors of Viral Pneumonia in Patients with Community-Acquired Pneumonia. Chalmers JD, editor. *PLoS One*. 2014 Dec 22;9(12):e114710.
 41. Cilloniz C, Ewig S, Polverino E, Marcos MA, Esquinas C, Gabarrus A, et al. Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity. *Thorax*. 2011 Apr 1;66(4):340–6.
 42. Lobo LJ, Reed KD, Wunderink RG. Expanded clinical presentation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus pneumonia*. *Chest*. 2010;138(1):130–6.

43. Julián-Jiménez A, González-Castillo J, Candel González FJ. ¿Cuándo, dónde y cómo ingresar al paciente con neumonía adquirida en la comunidad? *Rev Clínica Española*. 2013 Mar 1;213(2):99–107.
44. O'Brien WT., Rohw DA., Lattin GE., Thornton JA., Dutton JP., Ebert-Long DL. DM, O'Brien Sr. WT, Rohweder DA, Lattin Jr. GE, Thornton JA, Dutton JP, et al. Clinical Indicators of Radiographic Findings in Patients With Suspected Community-Acquired Pneumonia: Who Needs a Chest X-Ray? *J Am Coll Radiol*. 2006;3(9):703–6.
45. Farr BM, Kaiser DL, Harrison BDW, Connolly CK, Andrews BE, Bartlett CLR, et al. Prediction of microbial aetiology at admission to hospital for pneumonia from the presenting clinical features. *Thorax*. 1989 Dec 1;44(12):1031–5.
46. Moine P, Vercken JB, Chevret S, Chastang C, Gajdos P, Schlemmer B, et al. Severe community-acquired pneumonia: Etiology, epidemiology, and prognosis factors. *Chest*. 1994 May 1;105(5):1487–95.
47. Sopena N, Sabrià-Leal M, Pedro-Botet ML, Padilla E, Dominguez J, Morera J, et al. Comparative study of the clinical presentation of legionella pneumonia and other community-acquired pneumonias. *Chest*. 1998 May 1;113(5):1195–200.
48. Fernández-Sabé N, Rosón B, Carratalà J, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Clinical diagnosis of Legionella pneumonia revisited: evaluation of the Community-Based Pneumonia Incidence Study Group scoring system. *Clin Infect Dis*. 2003 Aug 15;37(4):483–9.
49. Caron F, Meurice JC, Ingrand P, Bourgoin A, Masson P, Roblot P, et al. Acute Q fever pneumonia: a review of 80 hospitalized patients. *Chest*. 1998 Sep;114(3):808–13.
50. Julián-Jiménez A, Candel-González FJ, González J, Castillo D. Utilidad

- de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias Usefulness of inflammation and infection biomarkers in the Emergency Department. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(3):177-90.
51. Schuetz P, Christ-Crain M, Thomann R, Falconnier C, Wolbers M, Widmer I, et al. Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: The ProHOSP randomized controlled trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2009 Sep 9;302(10):1059-66.
 52. Julián-Jiménez A, González del Castillo J, Candel FJ. Utilidad y valor pronóstico de los biomarcadores en los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad en los servicios de urgencias. Vol. 148, *Medicina Clinica.* Elsevier Doyma; 2017. p. 501-10.
 53. Menendez R, Cavalcanti M, Reyes S, Mensa J, Martinez R, Marcos MA, et al. Markers of treatment failure in hospitalised community acquired pneumonia. *Thorax.* 2008 May 1;63(5):447-52.
 54. Ruiz-González A, Utrillo L, Bielsa S, Falguera M, Porcel JM. The Diagnostic Value of Serum C-Reactive Protein for Identifying Pneumonia in Hospitalized Patients with Acute Respiratory Symptoms. *J Biomarkers.* 2016 Aug 16;2016:1-5.
 55. Nouvenne A, Ticinesi A, Folesani G, Cerundolo N, Prati B, Morelli I, et al. The association of serum procalcitonin and high-sensitivity C-reactive protein with pneumonia in elderly multimorbid patients with respiratory symptoms: Retrospective cohort study. *BMC Geriatr.* 2016 Jan 15;16(1):16.
 56. Bielsa S, Valencia H, Ruiz-González A, Esquerda A, Porcel JM. Serum C-reactive protein as an adjunct for identifying complicated parapneumonic effusions. *Lung.* 2014 Aug 10;192(4):577-81.

57. Menéndez R, Sahuquillo-Arce J, Reyes S, Chest RM-, 2012 U. Cytokine Activation Patterns and Biomarkers Are Influenced by Microorganisms in Community-Acquired. *journal.chestnet.org*. 2012;1537-45.
58. España PP, Capelastegui A, Bilbao A, Diez R, Izquierdo F, Lopez De Goicoetxea MJ, et al. Utility of two biomarkers for directing care among patients with non-severe community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Dec 5;31(12):3397-405.
59. Julián-Jiménez A, Timón Zapata J, Laserna Mendieta EJ, Parejo Miguez R, Flores Chacartegui M, Gallardo Schall P. Capacidad de la procalcitonina para predecir bacteriemia en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad. *Med Clin (Barc)*. 2014;142(7):285-92.
60. Alba GA, Truong QA, Gaggin HK, Gandhi PU, De Berardinis B, Magrini L, et al. Diagnostic and Prognostic Utility of Procalcitonin in Patients Presenting to the Emergency Department with Dyspnea. *Am J Med*. 2016;129(1):96-104.
61. Schuetz P, Christ-Crain M, Thomann R, Falconnier C, Wolbers M, Widmer I, et al. Effect of Procalcitonin-Based Guidelines vs Standard Guidelines on Antibiotic Use in Lower Respiratory Tract Infections. *JAMA*. 2009 Sep 9;302(10):1059.
62. Viasus D, Del Rio-Pertuz G, Simonetti AF, Garcia-Vidal C, Acosta-Reyes J, Garavito A, et al. Biomarkers for predicting short-term mortality in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. Vol. 72, *Journal of Infection*. 2016. p. 273-82.
63. Julián-Jiménez A, Marquez Alonso J, Fernández Elías E, Flores-Chacartegui M. Capacidad del lactato y la procalcitonina para predecir bacteriemia y mortalidad en urgencias. *Med Clin*. 2014;143(7):331-1.

64. Schuetz P, Stolz D, Mueller B, Morgenthaler NG, Struck J, Mueller C, et al. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect Dis.* 2008;8:1–9.
65. Roca AP, Riesco Riesco S, Benito Gutiérrez M, García Aparicio J. Utilidad del dímero D como marcador analítico en urgencias pediátricas. *Emergencias.* 2009;28–31.
66. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15.
67. Carrillo-Esper R, De La Torre-León T. Copeptina. Un novedoso e interesante biomarcador pronóstico. *Med Interna Mex.* 2013;29(4):380–7.
68. Christ-Crain M, Opal SM. Clinical review: The role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. *Crit Care.* 2010;14(1):203.
69. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Leuppi J, Miedinger D, Bingisser R, et al. Copeptin, C-Reactive Protein, and Procalcitonin as Prognostic Biomarkers in Acute Exacerbation of COPD. *Chest.* 2007 Apr;131(4):1058–67.
70. Usuda D, Sangen R, Hashimoto Y, Muranaka E, Iinuma Y, Kanda T. Validation of a B-type natriuretic peptide as a prognostic marker in pneumonia patients: A prospective cohort study. *BMJ Open.* 2016 Feb 23;6(2):e010440.
71. Gordo-Remartínez S, Calderón-Moreno M, Fernández-Herranz J, Castuera-Gil A, Gallego-Alonso-Colmenares M, Puertas-López C, et al. Usefulness of midregional proadrenomedullin to predict poor outcome in patients with community acquired pneumonia. *PLoS One.* 2015;10(6):e0125212.

72. Bello S, Lasierra AB, Mincholé E, Fandos S, Ruiz MA, Vera E, et al. Prognostic power of proadrenomedullin in community-acquired pneumonia is independent of aetiology. *Eur Respir J*. 2012;39(5):1144–55.
73. Levin KP, Hanusa BH, Rotondi A, Singer DE, Coley CM, Marrie TJ, et al. Arterial Blood Gas and Pulse Oximetry in Initial Management of Patients with Community-acquired Pneumonia.
74. Sanz F, Restrepo MI, Fernández E, Briones ML, Blanquer R, Mortensen EM, et al. Is it possible to predict which patients with mild pneumonias will develop hypoxemia? *Respir Med*. 2009 Dec;103(12):1871–7.
75. Sanz F, Restrepo MI, Fernandez E, Mortensen EM, Aguar MC, Cervera A, et al. Hypoxemia Adds to the CURB-65 Pneumonia Severity Score in Hospitalized Patients With Mild Pneumonia. *Respir Care*. 2011 May 1;56(5):612–8.
76. Boersma WG, Daniels JMA, Löwenberg A, Boeve WJ, van de Jagt EJ. Reliability of radiographic findings and the relation to etiologic agents in community-acquired pneumonia. *Respir Med*. 2006;100(5):926–32.
77. Garin N, Marti C, Scheffler M, Stirnemann J, Prendki V. Computed tomography scan contribution to the diagnosis of community-acquired pneumonia. *Curr Opin*. 2019;
78. Berlet T. Thoracic ultrasound for the diagnosis of pneumonia in adults: a meta-analysis. *Respir Res*. 2015 Jul 25;16(1):89.
79. D’Amato M, Rea G, Carnevale V, Grimaldi MA, Saponara AR, Rosenthal E, et al. Assessment of thoracic ultrasound in complementary diagnosis and in follow up of community-acquired pneumonia (cap). *BMC Med Imaging*. 2017;17(1):52.

80. Grupo de Estudio de la Neumonía Adquirida en la Comunidad. Normativas para el diagnóstico y el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Arch Bronconeumol. 2005;41(5):272-89.
81. Anevlavis S, Petroglou N, Tzavaras A, Maltezos E, Pneumatikos I, Froudarakis M, et al. A prospective study of the diagnostic utility of sputum Gram stain in pneumonia. J Infect. 2009;59(2):83-9.
82. Falguera M, Trujillano J, Caro S, Menéndez R, Carratalà J, Ruiz-González A, et al. A Prediction Rule for Estimating the Risk of Bacteremia in Patients with Community-Acquired Pneumonia. Clin Infect Dis. 2009 Aug 1;49(3):409-16.
83. Girón Ortega JA, Pérez Galera S, Girón González JA. Diagnostic and therapeutic protocol for community-acquired pneumonia. Med. 2018;12(53):3162-7.
84. Claas ECJ, Graffelman WA, van den Eeden WCJFM, van den Broek PJ, Templeton KE, Scheltinga SA. Improved Diagnosis of the Etiology of Community-Acquired Pneumonia with Real-Time Polymerase Chain Reaction. Clin Infect Dis. 2005;41(3):345-51.
85. Tang JW-T, Tan A, Ong V, Lee HK, Siow WT, Lee CK, et al. The Use of Polymerase Chain Reaction Amplification for the Detection of Viruses and Bacteria in Severe Community-Acquired Pneumonia. Respiration. 2016;92(5):286-94.
86. Bartlett JG. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis. 2011 May 1;52(SUPPL. 4):S296-304.
87. Fine M, Auble T, Yealy D, Hanusa B, Weissfeld L, Singer D, et al. Prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. N Engl J Med. 1997;336:243-50.
88. British Thoracic Society Research Committee. Community-acquired

- pneumonia in adults in British hospitals in 1982-1983: a survey of aetiology, mortality, prognostic factors and outcome. The British Thoracic Society and the Public Health Laboratory Service. *Q J Med.* 1987 Mar;62(239):195-220.
89. Lim WS, Baudouin S, George R, Hill A, Jamieson C, Le Jeune I, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: Update 2009. Vol. 64, *Thorax.* BMJ Publishing Group; 2009. p. iii1-55.
90. Menéndez R, Martínez R, Reyes S, Mensa J, Filella X, Marcos MA, et al. Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in community-acquired pneumonia. *Thorax.* 2009;64(7):587-91.
91. Deng JC, Standiford TJ. The Systemic Response to Lung Infection. *Clin Chest Med.* 2005 Mar;26(1):1-9.
92. Nelson S. Novel nonantibiotic therapies for pneumonia: cytokines and host defense. *Chest.* 2001 Feb;119(2 Suppl):419S-425S.
93. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol.* 2014;51(4):759-74.
94. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
95. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855-62.
96. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquienelli AE, Bettlinger JC, Rougyle AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):901-6.

97. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000 Apr;5(4):659–69.
98. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86–9.
99. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(90001):109D – 111.
100. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(SUPPL. 1):D154-8.
101. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Vol. 116, *Cell*. 2004. p. 281–97.
102. Kim S, Hwang DW, Lee DS. A study of microRNAs in silico and in vivo: Bioimaging of microRNA biogenesis and regulation. Vol. 276, *FEBS Journal*. 2009. p. 2165–74.
103. Jevsinek Skok D, Godnic I, Zorc M, Horvat S, Dovc P, Kovac M, et al. Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species. *Anim Genet*. 2013 Dec 1;44(6):669–77.
104. Cipolla GA. A non-canonical landscape of the microRNA system. *Front Genet*. 2014;5(SEP):1–6.
105. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
106. Daugaard I, Hansen TB. Biogenesis and Function of Ago-Associated

- RNAs. Vol. 33, Trends in Genetics. Elsevier Current Trends; 2017. p. 208–19.
107. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(10):4626–40.
108. Curtis HJ, Sibley CR, Wood MJA. Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. Vol. 3, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2012. p. 617–32.
109. Piatek MJ, Werner A. Endogenous siRNAs: regulators of internal affairs. *Biochem Soc Trans.* 2014 Aug;42(4):1174–9.
110. Yang J-S, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(34):15163–8.
111. Yang J-S, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(34):15163–8.
112. Babiarez JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blalock R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 2008;22(20):2773–85.
113. Chong MMW, Zhang G, Cheloufi S, Neubert TA, Hannon GJ, Littman DR. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes Dev.* 2010;24(17):1951–60.
114. Sibley CR, Seow Y, Saayman S, Dijkstra KK, El Andaloussi S, Weinberg MS, et al. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan;40(1):438–

- 48.
115. Flynt AS, Greimann JC, Chung W-J, Lima CD, Lai EC. MicroRNA Biogenesis via Splicing and Exosome-Mediated Trimming in *Drosophila*. *Mol Cell*. 2010 Jun 25;38(6):900–7.
116. Okamura K, Lai EC. Endogenous small interfering RNAs in animals. Vol. 9, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. p. 673–8.
117. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*. 2008 May 22;453(7194):539–43.
118. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. MiRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. Vol. 31, *Trends in Genetics*. 2015. p. 613–26.
119. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2007. p. 209–20.
120. Scott MS, Ono M. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie*. 2011;93(11):1987–92.
121. Bogerd HP, Karnowski HW, Cai X, Shin J, Pohlers M, Cullen BR. A Mammalian Herpesvirus Uses Noncanonical Expression and Processing Mechanisms to Generate Viral MicroRNAs. *Mol Cell*. 2010 Jan 15;37(1):135–42.
122. Hansen TB, Venø MT, Jensen TI, Schaefer A, Damgaard CK, Kjems J. Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun*. 2016;7.
123. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence

- microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(D1):D68–73.
124. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005 May 3;37(5):495–500.
125. Elton TS, Martin MM, Sansom SE, Belevych AE, Györke S, Terentyev D. miRNAs got rhythm. Vol. 88, *Life Sciences*. Pergamon; 2011. p. 373–83.
126. Olson EN. MicroRNAs as Therapeutic Targets and Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Sci Transl Med.* 2014 Jun 4;6(239):239ps3-239ps3.
127. Hébert SS, De Strooper B. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* 2009 Apr;32(4):199–206.
128. Tan L, Yu JT, Tan L. Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2015 Oct 1;51(3):1249–62.
129. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):350–5.
130. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215–33.
131. Seok H, Ham J, Jang E-S, Chi and SW. MicroRNA Target Recognition: Insights from Transcriptome-Wide Non-Canonical Interactions. *Mol Cells.* 2016 May 31;39(5):375–81.
132. Shin C, Nam J-W, Farh KK-H, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. Expanding the MicroRNA Targeting Code: Functional Sites with Centered Pairing. *Mol Cell.* 2010 Jun;38(6):789–802.

133. Moore MJ, Scheel TKH, Luna JM, Park CY, Fak JJ, Nishiuchi E, et al. MiRNA-target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nat Commun.* 2015 Dec 25;6(1):8864.
134. Iwakawa Hoki, Tomari Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. Vol. 25, *Trends in Cell Biology.* 2015. p. 651–65.
135. Ryan B, Joilin G, Williams JM. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci.* 2015 Feb 23;8:4.
136. Jin HY, Xiao C. MicroRNA mechanisms of action: What have we learned from mice? Vol. 6, *Frontiers in Genetics.* 2015. p. 328.
137. miRbase:Sequence [Internet]. [cited 2018 Nov 27]. Available from: <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>
138. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem.* 2008 Mar 1;54(3):482–90.
139. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008 Jun;141(5):672–5.
140. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: Discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5473–7.
141. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder

- cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2010 Nov;28(6):655–61.
142. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010 Nov;56(11):1733–41.
143. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun 7;9(6):654–9.
144. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Mar 22;108(12):5003–8.
145. Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T, Takeshita F. The Impact of Extracellular Vesicle-Encapsulated Circulating MicroRNAs in Lung Cancer Research. Vol. 2014, BioMed Research International. Hindawi; 2014. p. 486413.
146. Tomankova T, Petrek M, Kriegova E. Involvement of microRNAs in physiological and pathological processes in the lung. Vol. 11, *Respiratory Research.* 2010. p. 159.
147. Banerjee A, Schambach F, Dejong CS, Hammond SM, Reiner SL. MicroRNA-155 inhibits IFN- γ signaling in CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 2010 Oct 28;40(1):225–31.
148. Gonzalez Plaza JJ. Current roles of microRNAs in infectious diseases – advancing into healthcare. *Croat J Infect.* 2016;36(1):5–15.
149. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, et al. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* (80-). 2004 Apr 30;304(5671):734–6.

150. Furuse Y, Finethy R, Saka HA, Xet-Mull AM, Sisk DM, Smith KLJ, et al. Search for MicroRNAs Expressed by Intracellular Bacterial Pathogens in Infected Mammalian Cells. Rudel T, editor. *PLoS One*. 2014 Sep 3;9(9):e106434.
151. Verschoor CP, Dorrington MG, Novakowski KE, Kaiser J, Radford K, Nair P, et al. MicroRNA-155 is required for clearance of *Streptococcus pneumoniae* from the nasopharynx. *Infect Immun*. 2014;82(11):4824–33.
152. Abd-El-Fattah AA, Sadik NAH, Shaker OG, Aboulftouh ML. Differential MicroRNAs Expression in Serum of Patients with Lung Cancer, Pulmonary Tuberculosis, and Pneumonia. *Cell Biochem Biophys*. 2013 Dec 5;67(3):875–84.
153. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as biomarkers for sepsis. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. p. 78.
154. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One*. 2009;4(10).
155. Wang H, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: A prospective observational study. Moormann AM, editor. *PLoS One*. 2012 Jun 15;7(6):e38885.
156. Pogribny IP. MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. *Exp Biol Med*. 2018 Feb 15;243(3):283–90.
157. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):25–30.
158. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for

- Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA [Internet]. 2016 Feb 23 [cited 2019 Sep 3];315(8):801. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.0287>
159. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. JAMA. 2016 Feb 23;315(8):762.
 160. Ambion (Life Technologies). mir Vana TM miRNA Isolation Kit protocol. 2011;
 161. Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). TaqMan [®] Fast Advanced Master Mix USER GUIDE For two-step RT-PCR in gene expression experiments or quantitative analysis. Cat Numbers. 2010;4444556(4444964).
 162. Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). TaqMan Advanced miRNA Assays USER GUIDE. 2016;
 163. Kamm RC, Smith AG. Ribonuclease activity in human plasma. Clin Biochem. 1972;5:198–200.
 164. Xi Y, Nakajima GO, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. RNA. 2007;13:1668–74.
 165. Xiong DD, Lv J, Wei KL, Feng ZB, Chen JT, Liu KC, et al. A nine-miRNA signature as a potential diagnostic marker for breast carcinoma: An integrated study of 1,110 cases. Oncol Rep. 2017 Jun 1;37(6):3297–304.
 166. Zhang J, Zhao H, Gao Y, Zhang W. Secretory miRNAs as novel cancer biomarkers. Vol. 1826, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. Elsevier; 2012. p. 32–43.

167. Huang F, Bai J, Zhang J, Yang D, Fan H, Huang L, et al. Identification of potential diagnostic biomarkers for pneumonia caused by adenovirus infection in children by screening serum exosomal microRNAs. *Mol Med Rep.* 2019 May 1;49(5):4306–14.
168. Zhang W, Jia J, Liu Z, Si D, Ma L, Zhang G. Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0. *BMC Pulm Med.* 2019 May 14;19(1):93.
169. Galván-Román JM, Lancho-Sánchez Á, Luquero-Bueno S, Vega-Piris L, Curbelo J, Manzaneque-Pradales M, et al. Usefulness of circulating microRNAs miR-146a and miR-16-5p as prognostic biomarkers in community-acquired pneumonia. *PLoS One.* 2020 Oct 1;15(10 October).
170. Ma Y, Vilanova D, Atalar K, Delfour O, Edgeworth J. Genome-Wide Sequencing of Cellular microRNAs Identifies a Combinatorial Expression Signature Diagnostic of Sepsis. *PLoS One.* 2013;8(10):75918.
171. Wang J, Yu M, Yu G, Bian J, Deng X, Wan X, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 26;394(1):184–8.
172. Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, et al. MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest.* 2012;122(6):1973–90.
173. Li Y, Dalli J, Chiang N, Baron RM, Quintana C, Serhan CN. Plasticity of Leukocytic Exudates in Resolving Acute Inflammation Is Regulated by MicroRNA and Proresolving Mediators. 2013;
174. Wang H, Meng K, Chen WJ, Feng D, Jia Y, Xie L. Serum miR-574-5p: A prognostic predictor of sepsis patients. *Shock.* 2012;37(3):263–7.
175. Tacke F, Roderburg C, Benz F, Cardenas DV, Luedde M, Hippe H-J, et

- al. Levels of Circulating miR-133a Are Elevated in Sepsis and Predict Mortality in Critically Ill Patients. *Crit Care Med.* 2014;42(5):1096–104.
176. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ. MiR-1254 and miR-574-5p: Serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):482–8.
177. Borgan E, Navon R, Vollan HKM, Schlichting E, Sauer T, Yakhini Z, et al. Ischemia caused by time to freezing induces systematic microRNA and mRNA responses in cancer tissue. *Mol Oncol.* 2011;5(6):564–76.
178. Ma J, Guo W, Chen X. Overexpressing microRNA-150 attenuates hypoxia-induced human cardiomyocyte cell apoptosis by targeting glucose-regulated protein-94. *Mol Med Rep.* 2018 Jan 5;17(3):4181–6.
179. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ. MiR-1254 and miR-574-5p: Serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):482–8.
180. Tong R, Zhang J, Wang C, Li Q, Wang L, Ju M. Inhibition of miR-574-5p suppresses cell growth and metastasis and enhances chemosensitivity by targeting RNA binding protein QKI in cervical cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(6):951–66.
181. Cui J, Qi S, Liao R, Su D, Wang Y, Xue S. MiR-574–5p promotes the differentiation of human cardiac fibroblasts via regulating ARID3A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;521(2):427–33.
182. Li Y, Liang L, Zhang C. Isothermally Sensitive Detection of Serum Circulating miRNAs for Lung Cancer Diagnosis. *Anal Chem.* 2013 Dec 3;85(23):11174–9.
183. Kanneganti T-D. Inflammatory Bowel Disease and the NLRP3

- Inflammasome. *N Engl J Med.* 2017;377(7):694–6.
184. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008;451(7182):1125–9.
185. Liu Y, Zhang Y, Li Q, Li J, Ma X, Xing J, et al. MiRNAs Predict the Prognosis of Patients with Triple Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. Coleman WB, editor. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170088.
186. Braga TV, Evangelista FCG, Gomes LC, Araújo SS da S, Carvalho M das G, Sabino A de P. Evaluation of MiR-15a and MiR-16-1 as prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. Vol. 92, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* Elsevier Masson SAS; 2017. p. 864–9.
187. Nandakumar P, Tin A, Grove ML, Ma J, Boerwinkle E, Coresh J, et al. MicroRNAs in the miR-17 and miR-15 families are downregulated in chronic kidney disease with hypertension. *PLoS One.* 2017;12(8).
188. Yu C, Xiang Q, Zhang H. Xianyu decoction attenuates the inflammatory response of human lung bronchial epithelial cell. *Biomed Pharmacother.* 2018;102:1092–8.
189. Yun J, Yang H, Li X, Sun H, Xu J, Meng Q, et al. Up-regulation of miR-297 mediates aluminum oxide nanoparticle-induced lung inflammation through activation of Notch pathway. *Environ Pollut.* 2020 Apr 1;259.
190. Luna CM, Famiglietti A, Absi R, Videla AJ, Nogueira FJ, Fuenzalida AD, et al. Community-acquired pneumonia: Etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina. *Chest.* 2000;118(5):1344–54.
191. Farr BM, Sloman AJ, Fisch MJ. Predicting death in patients hospitalized for community-acquired pneumonia. *Ann Intern Med.* 1991 Sep 15;115(6):428–36.

192. Muñoz X, Pilia F, Ojanguren I, Romero-Mesones C, Cruz M-J. Is asthma a risk factor for COVID-19? Are phenotypes important? *ERJ Open Res.* 2020 Nov 12;00216–2020.
193. Liu S, Zhi Y, Ying S. COVID-19 and Asthma: Reflection During the Pandemic. Vol. 59, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology.* Springer; 2020. p. 78–88.
194. Regueira T, Andresen M, Mercado M, Downey P. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda durante la sepsis. Vol. 35, *Medicina Intensiva. Med Intensiva;* 2011. p. 424–32.
195. Mårtensson J, Bellomo R. Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. Vol. 31, *Critical Care Clinics.* W.B. Saunders; 2015. p. 649–60.
196. Levy B. Lactate and shock state: The metabolic view. Vol. 12, *Current Opinion in Critical Care.* *Curr Opin Crit Care;* 2006. p. 315–21.

8.

**Trabajos
derivados**

8.1. Comunicaciones científicas

- ❖ TORRES M., SANZ F., DASÍ F., GIMENO F., VICENTE S., LOZADA J., BOIX M.J., AIBAR A., FERNÁNDEZ E. *Valor pronóstico de los microRNAs circulantes en la neumonía comunitaria*. XXIV Congreso de la Sociedad Valenciana de Neumología celebrado en Valencia. Marzo de 2017.
- ❖ SANZ F., DASÍ F., GIMENO F., VICENTE S., TORRES M., LOZADA J., BOIX M.J., MOMPÓ M.J., AIBAR A., FERNÁNDEZ E. *Valor pronóstico de los microRNAs circulantes en la neumonía comunitaria*. 50º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) celebrado en Madrid. Junio de 2017.
- ❖ SANZ F., DASÍ F., GIMENO F., VICENTE S., TORRES M., LOZADA J., BOIX M.J., MOMPÓ M.J., AIBAR A., FERNÁNDEZ E. *Prognostic value of circulating microRNAs in Community-Acquired Pneumonia*. American Thoracic Society 2017 conference celebrado en Washington DC. Mayo de 2017.
- ❖ SANZ F., VICENTE S., BRIONES M., MARTÍNEZ M., LOZADA J., FERNÁNDEZ E., AIBAR A., FERRER S., DASÍ F. *Circulating microRNAs can identify endotypes of community-acquired pneumonia*. European Respiratory Journal 2019 celebrado en Madrid. Septiembre de 2018
- ❖ SANZ F., VICENTE S., BRIONES M., LOZADA J., LAHOSA C., AIBAR A., FERNÁNDEZ E., DASÍ F. *Upregulated microRNAs 342 and 15a mediate host-pathogen interaction in pneumococcal*

Community-Acquired Pneumonia. America Thoracic Society
2020 virtual conference. Agosto de 2020.

8.2. Proyectos de investigación financiados

- ❖ AYUDA A LA INVESTIGACIÓN DE LA SOCIEDAD VALENCIANA DE NEUMOLOGÍA/FUNDACIÓN DE NEUMOLOGÍA DE LA COMUIDAD VALENCIA. Título: *“Perfil de microRNAs y desenlaces desfavorables en la neumonía comunitaria hospitalizada causada por Streptococcus pneumoniae”*. Investigador principal: Francisco Sanz Herrero. 2016-2017.

9.

Anexos

anexos

Anexo I. Cuaderno de recogida de datos y variables a analizar

Datos generales

Código paciente

Nº Hª Clínica Sexo M F

Fecha de nacimiento Edad años

Fecha diagnóstico de NAC

Ingreso: Sí No Fecha alta en hospital

Ingreso en UCI: Sí No Fecha ingreso UCI

Fecha alta UCI

Residencia habitual

- Domicilio propio
- Domicilio desconocido
- Domicilio institucional

Health care pneumonia

Hospitalización durante ≥ 2 días en los últimos 90 días

Domicilio institucional (residencia u hospital larga estancia)

Ha recibido tratamiento en los últimos 30 días:

- Tratamiento ATB intravenoso
- Quimioterapia
- Cura de Heridas
- Atención hospitalaria habitual o hemodiálisis

Hábitos tóxicos

Tabaco	Alcohol	Drogas
No fumador <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Exfumador <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>
Fumador <input type="checkbox"/>	_____ g/día	
_____ paquetes/año		

Comorbilidades

	Sí	No	Desconocido
EPOC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FEV ₁ postBD _____ (ml;%) ó Grado _____			
Corticoides inhalados	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Asma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neumonías previas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Insuficiencia cardíaca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neumonitis obstructiva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabetes Mellitus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Insuficiencia renal:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HD <input type="checkbox"/> Diálisis peritoneal continua ambulatoria <input type="checkbox"/>			
Neoplasia pulmonar:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Remisión completa <input type="checkbox"/>			
Tto QT actual <input type="checkbox"/>		Fecha último ciclo _____	
Tto paliativo no IS <input type="checkbox"/>			

	Sí	No	Desconocido
Neoplasia hematológica:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tipo: _____			
Neoplasia sólida extrapulmonar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hepatopatía crónica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cirrosis <input type="checkbox"/> Child-Plugh: _____			
Enfermedad cerebrovascular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tratamiento corticoideo (6 meses)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tratamiento inmunosupresor:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Motivo: _____			
Fármacos y dosis: _____			
VIH +	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Trastorno deglución	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ingresos previos (3 meses)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Índice de comorbilidad de Charlson

Infarto de miocardio	1
Insuficiencia cardíaca	1
Enf. Vascolar periférica	1
Enf. Vascolar cerebral	1
Demencia	1
Enf. Pulmonar crónica	1
Enf. Tejido conectivo	1
Úlcera péptica	1
Hepatopatía leve	1
Diabetes Mellitus	1
Hemiplejia	2
DM con afectación orgánica	2

I. renal moderada o grave (Cr > 2mg/dl)	2
Cáncer, leucemia, linfoma	2
Child B ó C	3
Tumor sólido metastático	6
SIDA	6

Puntuación total: _____

Sintomatología

	Sí	No		
Disnea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Expectoración	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Purulenta <input type="checkbox"/>	Hemoptisis <input type="checkbox"/>
Punta de costado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Escalofríos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Fiebre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Artromialgias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Vómitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Diarrea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Cefalea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Síndrome confusional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Días de evolución de síntomas			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	

Semiología

Presión arterial <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> mmHg	T ^a <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> °C
Frecuencia cardíaca <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> lpm	Frecuencia respiratoria <input type="text"/> <input type="text"/> rpm

SaO₂ (pulsioxi): %

Tiempo que tarda en registrarse pulsiox. min

Herpes labial

Soplo tubárico

Crepitantes

Cianosis

Sibilancias

Semiología derrame pleural

Alteración nivel de conciencia:

Confusión

Somnolencia

Obnubilación

Estupor

Coma

Analítica al ingreso

Leucocitos / mm³

PMN %

Hemoglobina g/dl

Hematocrito %

Plaquetas /mm³

Fibrinógeno %

Dímero D

Índice de Quick %

PCR

PCT mg/dl

Glucosa mg/dl

Urea mg/dl

BUN mg/dl

Creatina mg/dl

Sodio mEq/L Potasio mEq/L Prot. Totales g/L

Albúmina g/L GOT (AST) U/L GPT (ALT) U/L

LDH UI Bilirrubina total mg/dl Pro-BNP

Troponina

pH

pO₂ mmHg

pCO₂ mmHg

FiO₂

Bicarbonato mOsm/L

pO₂/FiO₂

Análítica evolutiva al 3^{er} día

PCR

PCT

Troponina

Análítica evolutiva al 5^o día

PCR

PCT

Troponina

Radiología torácica al ingreso

Tipo de condensación:

Alveolar

Bilateral

Intersticial

Cavitación

Bronconeumonía

Derrame pleural

Multilobar

Día: _____ Puntuación SOFA: _____

Diagnóstico etiológico

	Positivo	Negativo	No realizado
Hemocultivos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antigenuria Legionella	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antigenuria neumococo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Broncoaspirado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Catéter telescopado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

LBA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cultivo líquido pleural	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ag neumococo L. pleural	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PCR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Serología	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Germen cultivado: _____

Serología: Germen 1 _____; Germen 2 _____;
 Germen 3 _____

Si hemocultivos positivos, valorar resistencia antibiótica

	Sensible	Intermedio	Resistente	CMI
Penicilina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input style="width: 100%;" type="text"/>
Macrólidos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input style="width: 100%;" type="text"/>
Quinolonas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input style="width: 100%;" type="text"/>
Cefotaxima	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input style="width: 100%;" type="text"/>

Tratamiento antibiótico

Antibiótico previo a urgencias

Días de tratamiento

Intervalo de inicio de síntomas- comienzo del tratamiento (días)

Antibióticos (códigos) ,

Antibiótico inicial: ¿Dónde? Urgencias Sala hospitalización

Tiempo que tarda en realizarse hemocultivos: h min

Tiempo que tarda en iniciarse ATB: h min

Antibióticos (códigos) ,

Antibiótico en los últimos 3 meses: Si No Desconocido

Antibióticos (códigos) ,

Complicaciones

Ingreso en UCI <input type="checkbox"/>	Ventilación mecánica <input type="checkbox"/>	VNI <input type="checkbox"/>
CPAP <input type="checkbox"/>	Shock <input type="checkbox"/>	CID <input type="checkbox"/>
Bacteremia <input type="checkbox"/>	Fracaso renal agudo <input type="checkbox"/>	SDRA <input type="checkbox"/>
Empiema <input type="checkbox"/>	Derrame pleural <input type="checkbox"/>	IRA <input type="checkbox"/>
Sepsis <input type="checkbox"/>	Sepsis grave <input type="checkbox"/>	

Estratificación de gravedad

ESCALA DE FINE (PSI)

<i>Parámetros</i>	<i>Puntos</i>
EDAD	
Hombre	Años
Mujer	Años - 10
RESIDENCIA EN ASILO	+10
ENFERMEDAD COEXISTENTE	
Neoplasia	+30
Enfermedad hepática	+20
Insuficiencia cardíaca congestiva	+10
Enfermedad cerebro-vascular	+10
Enfermedad renal	+10
DATOS DE EXPLORACIÓN FÍSICA	
Estado mental alterado	+20
Frecuencia respiratoria ≥ 30 /min	+20
TA sistólica < 90 mmHg	+20
Temperatura $< 35^{\circ}\text{C}$ o $> 40^{\circ}\text{C}$	+15
Pulso ≥ 125 /min	+10

DATOS RADIOLÓGICOS Y DE LABORATORIO	
pH arterial < 7.35	
BUN ≥ 30 mg/dl (11 mmol/l)	+30
Sodio < 130 mmol/l	+20
Glucosa ≥ 250 mg/dl (14 mmol/l)	+20
Hematocrito < 30%	+10
pO ₂ < 60 mmHg	+10
Derrame pleural	+10

CLASE I y II: ≤ 70 puntos
 CLASE III: 71-90 puntos
 CLASE IV: 91-130 puntos
 CLASE V: > 130 puntos

Puntuación PSI _____

Clase de riesgo _____

CURB-65

<i>Parámetros</i>	<i>Puntos</i>
· Edad > 65 años	1
· Confusión	1
· Urea > 7 mmol/L o 42 mg/dl	1
· Frecuencia respiratoria > 30	1
· Presión arterial sistólica < 90 ó presión arterial diastólica < 60	1

Puntuación CURB-65: _____

Tratamiento

Pauta antibiótica:

Cambio antibiótico: Fecha de cambio:

Motivos: Desescalamiento No adherencia a guías

Aumento espectro Intolerancia

Fracaso clínico

Nueva pauta ATB:

Días totales de tratamiento:

Alcance Estabilidad clínica

Estabilidad clínica:

- $T^a \leq 37.8^{\circ}\text{C}$
- $\text{FC} \leq 100 \text{ lpm}$
- $\text{FR} \leq 34 \text{ rpm}$
- $\text{TAS} \geq 90 \text{ mmHg}$
- $\text{SaO}_2 \geq 90\%$ ó $\text{PaO}_2 \geq 60 \text{ mmHG}$
- Tolerancia ingesta oral
- Ausencia de confusión mental

Estabilidad clínica a las 72h de ingreso: Sí No

Días de cambio a tto oral: ° Día

Curación: Fecha de alta definitiva:

Éxito: Fecha de éxito:

Causa del éxito:

Relacionado con la neumonía

No relacionado con la neumonía

Evolución a los 30 días

	Sí	No	Desconocido
Persistencia radiológica:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Persistencia clínica:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vuelta a actividades habituales:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

En caso afirmativo: ¿A qué día desde el diagnóstico? _____

Reingreso:

Relacionado con la neumonía:

No relacionado con la neumonía:

Éxito:

Evolución a los 90 días

	Sí	No	Desconocido
Curación	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Éxito	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Códigos antibióticos

- | | |
|---|--------------------------------------|
| 01 Aminoglucósidos | 10 Metronidazol |
| 02 Amoxi-clavulánico | 11 Piperacilina-tazobactam |
| 03 Cefalosporinas 1ª generación | 12 Teicoplanina |
| 04 Cefalosporinas 2ª generación | 13 Tetraciclinas |
| 05 Cefalosporinas 3ª generación | 14 Timetroprim-sulfametoxazol |
| 06 Clindamicina | 15 Linezolid |
| 07 Macrólidos (eritro/claritro/azitromicina) | 16 Tigeciclina |
| 08 Imipenem | 17 Vancomicina |
| 09 Quinolonas 3ª y 4ª generación | |

Anexo II. Información de los microRNAs incluidos en el estudio

<i>microRNAs</i>	Secuencia	Referencia
<i>miR-486-5p</i>	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	478128_mir
<i>miR-182-5p</i>	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	477935_mir
<i>miR-150-5p</i>	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	477918_mir
<i>miR-342-5p</i>	AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGA	478044_mir
<i>miR-223-5p</i>	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	477984_mir
<i>miR-499a-5p</i>	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	478139_mir
<i>miR-122-5p</i>	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	477855_mir
<i>miR-193b-5p</i>	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA	478742_mir
<i>miR-15-a-5p</i>	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	477858_mir
<i>miR-574-5p</i>	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGU	479357_mir
<i>miR-297-5p</i>	AUGUAUGUGUGCAUGUGCAUG	478791_mir

<i>microRNAs normalizadores</i>	Secuencia	Referencia
<i>miR-191-5p</i>	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	477952_mir
<i>miR-103a-3p</i>	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	478253_mir
<i>miR-let7a-5p</i>	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	478575_mir
<i>miR-16-5p</i>	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	477860_mir

Anexo III. Hoja de información al paciente y consentimiento del proyecto de investigación

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE. CASOS.

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado **“Perfil de microRNAs y desenlaces desfavorables en la neumonía comunitaria hospitalizada causada por *Streptococcus pneumoniae*”** que está siendo realizado por la **Dr. Francisco Sanz Herrero** del Servicio de Neumología del Consorci Hospital General Universitari de Valencia y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético y de Investigación Clínica del Consorci Hospital General Universitari de Valencia.

Antecedentes

Existen estudios que demuestran que esas moléculas genéticas llamadas microRNAs pueden tener un papel en el diagnóstico y pronóstico de las complicaciones graves de una infección. Esto permitiría un rápido diagnóstico de las complicaciones para establecer las medidas de tratamiento más adecuadas.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El objetivo de este estudio es averiguar si la detección de microRNAs en una muestra de sangre de un paciente ingresado por neumonía por neumococo puede predecir el desarrollo de complicaciones en relación a dicha enfermedad.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio ya que se encuentra hospitalizado por una neumonía causada por una bacteria llamada neumococo (*Streptococcus pneumoniae*) y aprovechando la extracción de sangre para la realización de análisis como parte del manejo hospitalizado de su enfermedad, se reservará una pequeña cantidad para efectuar las determinaciones de microRNA.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre mediante una punción venosa.**

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

La extracción de sangre, que se efectuará en ayunas en las dependencias del Consorci Hospital General Universitari de València. El riesgo previsible de su participación únicamente será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción, sin ser diferentes de cualquier análisis de sangre habitual.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Mediante este estudio se pretende avanzar en el diagnóstico precoz de las complicaciones que se relacionan con la neumonía causada por neumococo (insuficiencia respiratoria, sepsis, derrame pleural) mediante un sencillo análisis de sangre para determinar unas moléculas denominadas microRNAs. Con estos datos, los investigadores podríamos demostrar que es posible diagnosticar de manera precoz a aquellos pacientes enfermos de neumonía que pueden complicarse y ello permitiría adelantarse al tratamiento de esas complicaciones mejorando el pronóstico y supervivencia de este tipo de neumonía.

Si usted decide participar en el estudio, deberá firmar este consentimiento, en el que se establece que acepta voluntariamente participar y que ha leído y entendido la información proporcionada.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el **Dr. Francisco Sanz Herrero** en el teléfono **96 313 18 00 (ext. 437316)**.

Confidencialidad

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarían datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de **sangre**. Estas muestras serán siempre utilizadas con fines científicos y únicamente para la realización de este proyecto de investigación, garantizando el total anonimato.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO DEL ESTUDIO

Perfil de microRNAs y desenlaces desfavorables en la neumonía comunitaria hospitalizada causada por Streptococcus pneumoniae

Yo, _____

He leído la hoja de información del estudio que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

Doy mi consentimiento, tras haber sido informado por el médico Dr/Dra _____ a que los datos que se recojan de mi historia clínica sean utilizados para este proyecto de investigación.

Mediante este acto usted es consiente el uso de sus muestras en relación con este proyecto de investigación.

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio:

- 1.- Cuando quiera.
- 2.- Sin tener que dar explicaciones.
- 3.- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Y presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.

Asimismo, se me ha informado de que no se realizará en el manejo de mi enfermedad ningún tipo de procedimiento terapéutico diferente al normalmente empleado.

Fecha:

Firma: