

---

MEMORIA  
proyecto de tesis  
doctoral

---

Título: Capacidad  
pronóstica de los  
microRNAs  
circulantes en la  
neumonía adquirida  
en la comunidad

---

Autor: José María Galván Román

---

Director: Francisco Javier Aspa Marco

---



## **Tesis doctoral para alcanzar el grado de Doctor en Medicina**

Año 2021

Programa de Doctorado: RD 99/2011

641 - Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía  
Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

Datos del doctorando

**José María Galván Román**

Médico Adjunto de Medicina Interna en Hospital Universitario de La Princesa,  
Madrid, España.

Investigador predoctoral en Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital  
Universitario de La Princesa (IIS-IP).

Correo electrónico: jm.galvanroman@gmail.com

Datos del director

**Francisco Javier Aspa Marco**

Jefe de Sección de Neumología en Hospital Universitario de La Princesa.

Director de Unidades de Apoyo en Instituto de Investigación Sanitaria del  
Hospital Universitario de La Princesa (IIS-IP).

Líder de grupo de investigación en IIS-IP.

Profesor Asociado de Medicina en Universidad Autónoma de Madrid.

Correo electrónico: jasper@separ.es

Esta obra está bajo una Licencia Creative  
Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



*A a mi esposa, compañera y amiga, Ana; y a mis hijos, Marcos y Pablo.*

*Nada merece la pena sin vosotros cerca;  
sin vosotros cerca, nunca lo hubiera conseguido.*

¿Y por las noches que harás?  
- las paso descosiendo, aquí hay un arco por tensar.

*Buscando una luna - Agila  
Extremoduro. 1996*

[...] The Architect:  
Now everybody! Renew your Doozer vow.  
Will you make your promise new?  
All: Yes we really will.  
Build your buildings strong and true?  
Yes we really will.  
Are we joyful partners here?  
Yes we really are.  
With a world that we revere?  
Yes we really are,  
Yes we are, yes we are  
Yes we really really are [...]

*Dozzer's vow - Fraggle Rock  
Episode 208 - 1984*

## **Agradecimientos**

*Me gustaría recordar con estas palabras todo el amor que mi familia me ha dedicado, las horas que me han regalado, y la cultura que me han transmitido. Si he logrado ser médico, internista, y ahora doctor es solo con su ayuda, gracias a su estímulo y su generosidad.*

*Doy las gracias a Aitana, a Hortensia y al resto del laboratorio de Inmunología por acogerme, enseñarme desde lo más básico hasta lo más complicado, y por introducirme en todas las técnicas necesarias para medir microRNAs.*

*Quiero agradecer la ayuda de mis compañeros del grupo de investigación, con los que he crecido como investigador: Sergio, Mara, Marcos, Gloria y todos los demás. En especial quiero reconocer la ayuda de Ángel Lancho; sin él no hubiera sido posible terminar los experimentos. Ha sido y es un gran compañero y amigo.*

*También me gustaría dar las gracias a Manolo y a Lorena, del Instituto Princesa. Sin su ayuda metodológica y estadística, y sin sus acertados comentarios esta tesis sería mucho peor.*

*No me quiero olvidar de mis compañeros de Medicina Interna en La Princesa, especialmente Jose Curbelo, Fernando Moldenhauer y Emilia Roy. Es maravilloso haber compartido este tióvivo que es la investigación con vosotros, con alegrías y decepciones. Espero seguir compartiéndolo en el futuro.*

*Por último, quiero recordar en este trabajo a mi director de tesis, Javier Aspa. Desde que nos conocimos, ha sido un compañero, un aliado, y un confidente. Apostó por mí cuando nadie lo hacía, y sigue protegiéndome y ayudándome ahora, sin fisuras. Gracias, amigo y mentor, muchas gracias.*



## Índice

<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>39</b>
<b>Objetivos</b>	<b>40</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>41</b>
<b>Resultados</b>	<b>66</b>
<b>Discusión</b>	<b>88</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>101</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>102</b>
<b>Anexos</b>	<b>123</b>

## Resumen

Los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) desarrollan una respuesta inflamatoria sistémica que se relaciona con la mortalidad. Los microRNAs (miRNAs) participan en la inflamación como moduladores de la respuesta inmune, pero su patrón de expresión y su papel como biomarcadores en la NAC no ha sido completamente caracterizado.

### **OBJETIVO principal**

Determinar la utilidad de los miRNAs circulantes como biomarcadores pronósticos en pacientes hospitalizados por NAC.

### **OBJETIVOS específicos**

- (1) Caracterizar el perfil de expresión de una selección de miRNAs circulantes al ingreso en pacientes hospitalizados por NAC.
- (2) Determinar la capacidad predictiva de los miRNAs circulantes como marcadores pronósticos de mortalidad intraingreso, a 30 días y a un año.
- (3) Estudiar la asociación de la expresión de los miRNAs circulantes con el desarrollo de ictus o infarto agudo de miocardio durante el primer año tras el ingreso por NAC.
- (4) Buscar asociación entre los miRNAs circulantes y la causa etiológica de la NAC.
- (5) Comparar la capacidad pronóstica de los miRNAs circulantes con la de escalas clínicas pronósticas habituales en NAC, CURB-65 y *Pneumonia severity index*.

### **MÉTODOS**

Estudio observacional prospectivo sobre una cohorte de 153 pacientes ingresados por NAC. A todos los pacientes se les realizó una extracción de sangre el primer día del ingreso. Se purificó RNA de pequeño tamaño a partir de plasma mediante protocolo basado en columnas (Exiqon). Se evaluó la calidad del proceso (QC control) y 117 muestras pasaron la prueba. Se testó un panel de 752 miRNAs humanos con el fin de determinar un patrón preliminar de expresión diferencial de miRNAs entre pacientes con NAC de diferente evolución y se eligieron 25 miRNAs candidatos, procedentes del estudio exploratorio y de la literatura científica. La expresión de miRNAs se analizó mediante RT-PCR. La cantidad relativa de cada miRNA se calculó con  $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{UniSp2}$  y los datos finales se calcularon mediante la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ .

Se recogieron diversas variables clínicas durante el ingreso. Las variables dependientes principales fueron mortalidad intraingreso, en los primeros 30 días y a 1 año de seguimiento, además de la aparición de eventos cardiovasculares mayores (IAM o ictus) al año de seguimiento. Se estudió la asociación entre mortalidad y niveles de miRNAs circulantes mediante análisis uni y multivariante, con la construcción de un modelo de regresión logística. Se comparó el modelo propuesto con escalas clínicas pronósticas ya establecidas, mediante elaboración de curvas ROC y comparación de áreas bajo la curva (AUC). El programa estadístico utilizado fue STATA v15.

## RESULTADOS

Se incluyeron 117 pacientes con una media de edad de 74,7 años [DE 15,9], predominantemente hombres (59%). Su PSI medio fue de 100,9 [DE 34,6] y la media del índice de Charlson modificado fue de 2,9 [DE 3,0]. *Streptococcus pneumoniae* fue responsable de 15 NACs (12,8%); hasta 12 pacientes murieron en los 30 días de seguimiento (10,3%). De los 25 miRNAs analizados, solo 10 tuvieron resultados completos (miR107, miR17-5p, miR21, miR144-3p, miR16-5p, miR486, miR20a, miR34a-3p, miR106b-5p, miR146a). MiR17-5p era significativamente menor en pacientes con NAC neumocócica ( $p=0,025$ ), mientras que *miR-146a* y *miR-16-5p*, mostraron asociación estadística con la mortalidad a 30 días ( $p<0,001$  y  $p=0,010$ , respectivamente), de forma que valores elevados de ambos se asociaron con mayor supervivencia. No se encontró colinealidad entre los miRNAs seleccionados ni interacciones significativas entre variables de interés. La asociación con mortalidad se mantuvo para el *miR-16-5p* ( $p=0,021$ ) en el análisis multivariante ajustado por edad, sexo y antecedente de broncoaspiración. Se elaboró una curva ROC del modelo estimado final y se comparó la capacidad predictiva para mortalidad a 30 días con la de otras escalas pronósticas conocidas. Se encontró una excelente AUC del modelo multivariante ajustado (AUC=0,954), mejor que las de las escalas pronósticas PSI (AUC=0,799) y CURB-65 (AUC=0,722). No se encontró asociación entre los niveles de miRNAs circulantes y eventos cardiovasculares mayores; tampoco con mortalidad intraingreso o al año de seguimiento.

## CONCLUSIONES

Niveles elevados de miR-146a-5p y miR-16-5p al ingreso por NAC se asocian con una menor mortalidad a los 30 días de seguimiento. Estos dos miRNAs podrían ser utilizados como biomarcadores de buena evolución en sujetos hospitalizados por NAC.

## Abreviaturas

AGO	<i>Argonaute protein</i> (proteína Argonauta)
AIT	Accidente isquémico transitorio
AUC	<i>Area under the curve</i> (área bajo la curva)
AR	Artritis reumatoide
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i> (nitrógeno ureico en sangre)
CCR	Cáncer colorectal
CPK	Creatina-fosfocinasa
Ct	<i>Cycle threshold</i> (ciclo umbral)
CURB-65	<i>Confussion - Urea - Respiratory rate - Blood pressure - 65 years</i> (Confusión – Urea – Frecuencia respiratoria – Presión arterial – 65 años)
CVD	<i>Cardiovascular disease</i> (enfermedad cardiovascular)
DE	Desviación estándar
DM	Diabetes Mellitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECV	Evento cardiovascular
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERC	Enfermedad renal crónica
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
ETEV	Enfermedad tromboembólica venosa
EVs	<i>Extracellular vesicles</i> (vesículas extracelulares)
FC	Frecuencia cardiaca
FiO <sub>2</sub>	Fracción inspirada de oxígeno
GAB	Gasometría arterial basal
GOT	Aspartato aminotransferasa
GPT	Alanina aminotransferasa
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidad)
HTA	Hipertensión arterial

IAM	Infarto agudo de miocardio
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
INR	Índice internacional normalizado
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baja densidad)
LPS	Lipopolisacárido
MACE	<i>Major Adverse Cardiovascular Events</i> (evento cardiovascular mayor)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinasas activadas por mitógenos)
miRNA	microRNA
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensajero)
MSC	<i>Mesenchymal stem-cell</i> (célula madre mesenquimal)
NAC	Neumonía adquirida en la comunidad
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i> (redes de neutrófilos extracelulares)
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i> (actor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
NPS	Nódulo pulmonar solitario
NT-proBNP	<i>N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide</i> (prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral)
OR	Odd ratio
PaCO <sub>2</sub>	Presión del dióxido de carbono en sangre arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PaO <sub>2</sub>	Presión del oxígeno en sangre arterial
PAS	Presión arterial sistólica
P-bodies	<i>Processing bodies</i> (cuerpos de procesamiento)
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
proADM	Proadrenomedulina
PSI	<i>Pneumonia severity index</i>
QC	<i>Quality control</i> (control de calidad)

RCV	Riesgo cardiovascular
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (complejo de silenciamiento inducido por RNA)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i> (característica operativa del receptor)
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)
Rx	Radiografía
SCA	Síndrome coronario agudo
SEPAR	Sociedad española de neumología y cirugía torácica
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i> (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica)
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> (señal de traducción y activador de transcripción 3)
TC	Tomografía computerizada
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (receptores tipo Toll)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (factor de necrosis tumoral)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (factor de crecimiento vascular endotelial)
VSMC	<i>Vascular smooth-muscle cell</i> (célula de músculo liso vacular)
$\bar{X}$	Media aritmética

## Introducción

Los dogmas en la ciencia pueden estar equivocados. El método hipotético-deductivo permite cambiar los paradigmas de otras épocas, sustituyéndolos por nuevas teorías que describen mejor la realidad que nos rodea [1]. Durante años se pensó que la función central de la información genética contenida en el DNA nuclear era generar RNA mensajero que tras procesamiento en el ribosoma codificara la formación de proteínas [2]. Del mismo modo, se pensaba que la modulación de la traducción solo podía ser llevada a cabo por proteínas, presentes dentro de la célula [3].

En 1993 Victor Ambros y su equipo, investigando sobre la familia de nematodos *Caenorhabditis elegans* encontró que el nivel de transcrito del gen *lin14* estaba directamente relacionado con el desarrollo evolutivo de estos animales: el paso del estadio larvario L1 al L2 no se producía correctamente cuando la proteína LIN14 no estaba suficientemente presente. También observaron que el gen *lin4* regulaba la expresión de LIN14. La sorpresa llegó cuando analizaron el RNA producto de *lin4*: era de pequeño tamaño, no codificaba una proteína, y tenía una secuencia genética complementaria a *lin14* en al menos dos porciones [4]. Además, otra cosa sorprendente fue comprobar que los niveles intracelulares del mRNA de *lin14* eran constantes, por lo que el pequeño RNA encontrado debía ejercer una función reguladora sobre la traducción proteica. Poco después se constató que no era la única molécula con esas características: el gen *let-7* también codificaba una molécula de RNA sin capacidad de ser traducida a proteína, pero con función reguladora sobre varios genes implicados en la maduración larvaria, de nuevo mediante unión complementaria antiparalela con el mRNA transcrito de esos genes [5]. Este nuevo tipo de RNA se clasificó como *small non-coding RNA*, recibiendo tiempo después el nombre de microRNA o simplemente miRNA [6].

Se llevaron a cabo más estudios, encontrando que estas moléculas eran muy abundantes como reguladores de traducción [7], ubicuas en múltiples tejidos y fluidos biológicos (revisado en [8]), y conservadas a lo largo de la evolución animal [9]. Tras la asignación inicial de nombres según posible relación funcional, se decidió reordenar su nomenclatura con números arábigos sucesivos [10].

Actualmente, se conocen más de 1800 precursores y más de 2500 microRNAs maduros en el ser humano, con funciones de regulación muy diversas [11]. Su papel en un gran número de procesos biológicos es fundamental, y no existen dudas de que este tipo de molécula de RNA regula decisivamente la traducción proteica.

*A lo largo de la presente introducción nos gustaría explicar qué son y cómo se generan los microRNAs, qué funciones desempeñan y cómo participan en los procesos inflamatorios generales, concretamente en las enfermedades infecciosas.*

*Posteriormente, situaremos la neumonía adquirida en la comunidad (NAC) como problema de salud de primer orden, su importancia atendiendo a su morbimortalidad, su relación con la aparición de eventos cardiovasculares y los esfuerzos hechos hasta el momento para encontrar los mejores biomarcadores pronósticos.*

*Por último, hablaremos sobre cómo la determinación de miRNAs en líquidos biológicos ha sido utilizada con fines diagnósticos y pronósticos, y propondremos su uso como biomarcadores pronósticos en la neumonía comunitaria.*

## **Mecanismo de producción de miRNAs**

La biogénesis de los miRNAs ha sido caracterizada por varios autores en la década pasada (Figura 1) [12]. La vía canónica describe que inicialmente se forma un precursor de RNA llamado miRNA primario (pri-miRNA), con una cabeza 5' y una cola 3' tipo polyA), transcrito por la RNA polimerasa tipo II a partir de su locus genómico correspondiente [13]. Este pri-miRNA adquiere su característica forma de horquilla debido a la correspondencia de alrededor de 33 pares de bases en la zona de unión del lazo [13].

En este punto tiene lugar el primer procesamiento, todavía dentro del núcleo, en el que intervienen la enzima RNAsa III (Drosha) y dos proteínas de acompañamiento (DGCR8) [14]. El pri-miRNA pierde cabeza y cola, manteniendo su forma de lazo y la hibridación entre ambos extremos [15], y sale al citoplasma como pre-miRNA transportado por la proteína exportina 5 [16].

Ya en el citoplasma, se produce el segundo procesamiento: en el pre-miRNA actúa la enzima Dicer que elimina el lazo, formándose un molécula de RNA de doble cadena de alrededor de 22 pares de bases, que puede considerarse como un miRNA maduro [17]. Tras este proceso, una de las dos cadenas se une a una proteína citoplasmática, fundamentalmente la llamada Argonauta (AGO), y juntas forman el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que es capaz de reconocer secuencias concretas en la región UTR 3' de determinados RNA mensajeros a los que se dirija ese miRNA en particular [12]. La unión antiparalela –imperfecta– del miRNA maduro integrado en el complejo RISC con su RNA mensajero diana modula la traducción de este último



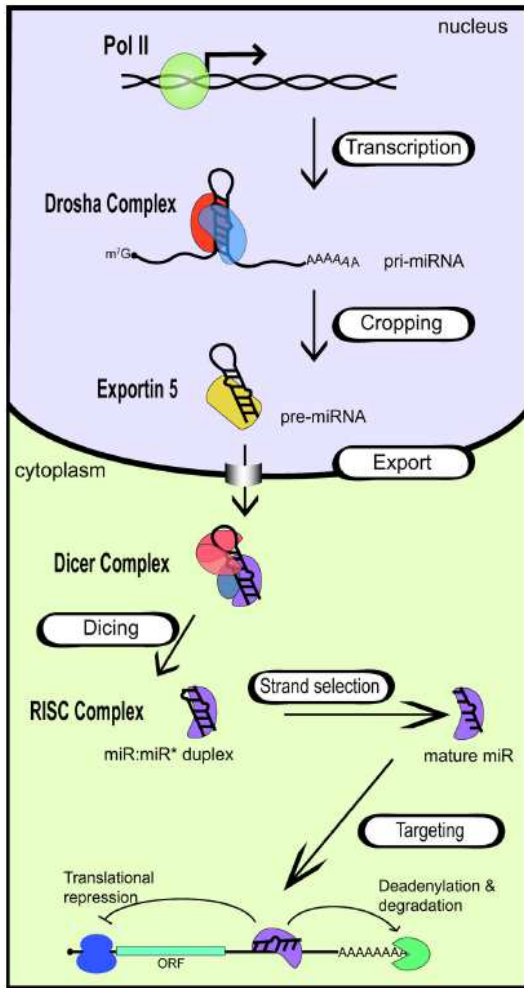


Figura 1: Biosíntesis de los miRNAs

mediante inhibición directa de del propio proceso de traducción o mediante facilitación de su degradación [18,19]. En una minoría de los casos, el proceso de biogénesis sigue una vía independiente de Drosha y/o de Dicer, como es, por ejemplo, en la generación del miRNA-451 maduro (independiente de Dicer) [20], o en el caso de las familia let-7, que requiere un procesamiento extra con una enzima uridiltransferasa en su etapa pre-miRNA [12].

### Interacción miRNA-mRNA

La forma en la que un miRNAs modula la traducción de su mRNA diana depende de la composición del complejo RISC donde se integre [19].

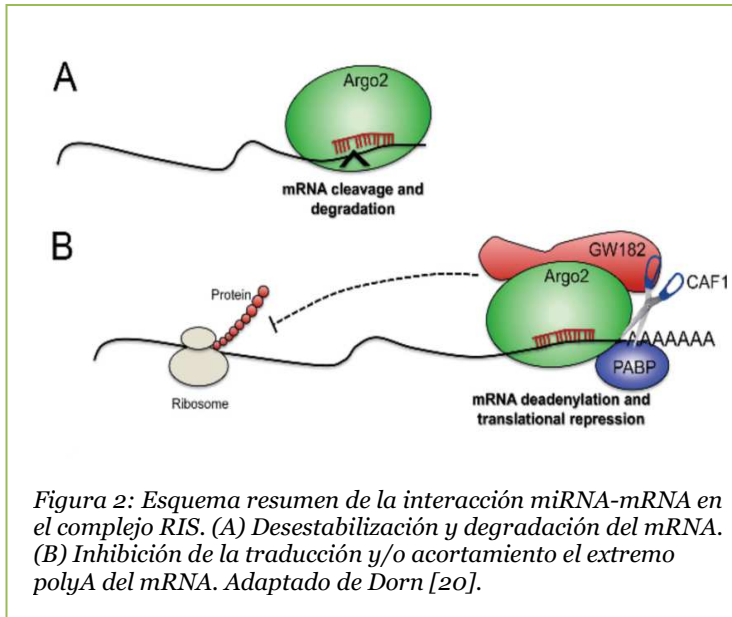
Cuando la unión complementaria miRNA-mRNA tiene lugar en el complejo RISC solo compuesto por la proteína AGO y el

miRNA, el mRNA es destruido: AGO es capaz de estabilizar la unión de los extremos 3'-UTR (desde los nucleótidos 2 al 8, la llamada *seed region*), y de inducir la ruptura y degradación del RNA mensajero de forma irreversible [21]. Las proteínas Argonautas se caracterizan por tener una potente actividad endonucleolítica y están presentes en la mayoría de seres vivos con variaciones, siendo la principal en mamíferos la Argonauta 2 (AGO2) [19].

En cambio, cuando la unión miRNA-mRNA se produce en el complejo RISC al que se integran proteínas glicina-triptófano de 182 kDa (GW182, también denominado TRNC6 en mamíferos), el resultado es que el mRNA puede sufrir un acortamiento de su extremo polyA, facilitándose por tanto su posterior degradación prematura, y/o puede inhibirse su traducción ribosomal [19].

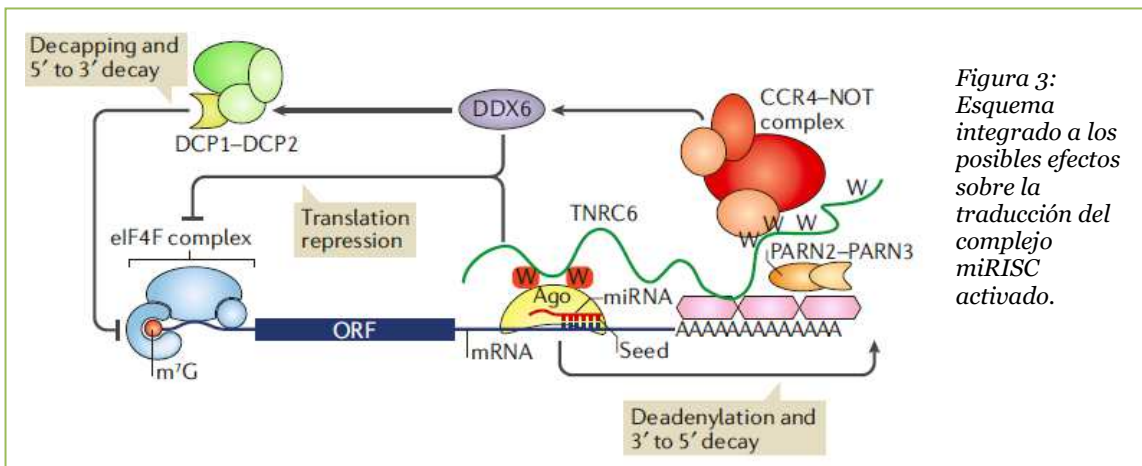
El proceso de acortamiento del extremo polyA en 3', decapitación y desintegración del RNA mensajero (*deadenylation, decapping and decay*) requiere de un complejo de acortamiento (CCR4-CAF1-NOT), de una enzima de decapitación (DCP2 y otras

proteínas activadoras), y de la acción destructora de la exonucleasa XRN1, todo ello activado por un complejo RISC integrado por GW182 (Figura 2) [22,23].



El mecanismo de inhibición de la traducción del mRNA no se conocía bien hasta fechas recientes [19], aunque actualmente se cree que el bloqueo del inicio de la traducción proteica es la principal acción moduladora de los miRNAs [24]. Los mRNAs tiene una estructura 7-metilguanósina (m7GpppN) en su cabeza 5' que tiene la función de dar

estabilidad al mRNA y de promover su traducción [25]. Ese motivo m7GpppN es reconocido por el factor iniciador de traducción IF4E1 favoreciendo la traducción [26]. En cambio, su homólogo IF4E2 también reconoce m7GpppN pero no favorece el inicio del proceso de traducción. IF4E2 es mucho menos abundante que IF4E1, por lo que no suele modular la traducción. Recientes estudios han demostrado que el complejo RISC a través de GW182 recluta IF4Es para inhibir la traducción de su mRNA diana (Figura 3) [27].



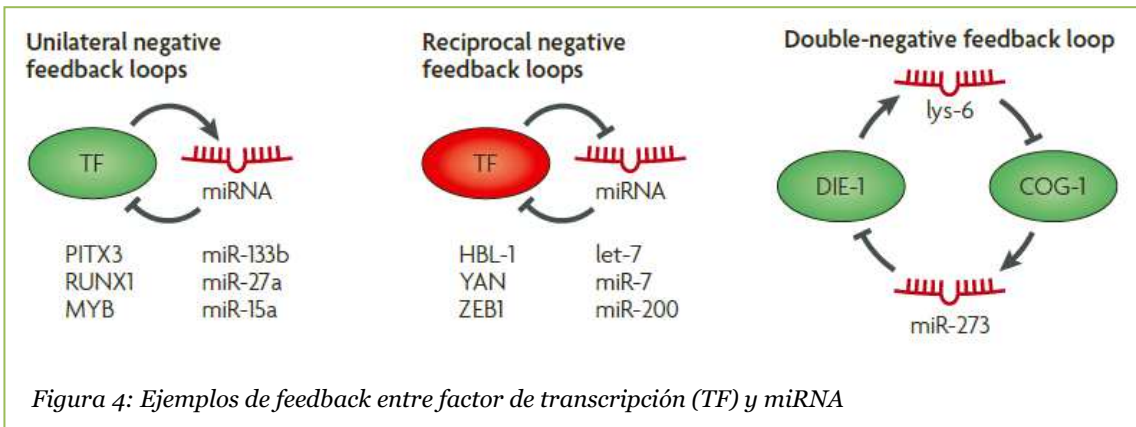
Los mRNAs cuya traducción ha sido inhibida o que han sufrido algún proceso de decapitación se acumulan en áreas concretas del citoplasma llamadas cuerpos de procesamiento (*processing bodies, P-bodies*) [28]. Estas estructuras, ricas en enzimas de degradación, contienen abundantes mRNAs que en determinadas situaciones –si no han sido degradados– pueden pasar a ser traducidos [29]. Debido a la alta

concentración de mRNAs, el número y tamaño de los *P-bodies* se ha relacionado con la actividad traductora celular [30].

### Regulación de la transcripción de los genes productores de miRNAs

Los genes que codifican miRNAs están localizados en diversas zonas del genoma, tanto en exones como en intrones [31]. Estos genes presentan una regulación similar a los genes codificadores de proteínas, modulándose de forma precisa entre los diferentes tejidos y en los diferentes momentos de desarrollo evolutivo [19].

El principal punto de control de la biosíntesis de los miRNAs se produce a nivel de la transcripción. Al igual que los genes codificadores de proteínas, estos genes tienen promotores génicos que presentan regiones de alta concentración de pares de citosina-fosfato-guanina (islas CpGs), cajas TATA, elementos de reconocimiento del Factor de Transcripción IIB (TFIIB) y/o modificaciones de histonas, lo que los hace igualmente susceptibles a factores de transcripción nuclear de todo tipo [31]. La regulación de los factores de transcripción sobre los miRNAs puede ser negativa o positiva, dependiente del tejido y del momento de desarrollo en el que intervengan (Figura 4).



A modo de ejemplo, el factor de transcripción MYC –cuya activación persistente aparece frecuentemente en los cánceres humanos [32]– es capaz de activar la transcripción del grupo de miRNAs miR-17-92 con efecto prooncogénico en células linfomatosas [33], mientras que al mismo tiempo es capaz de inhibir la transcripción de otros miRNAs como el miR-15a, con efecto supresor de tumores [34]. Además, los miRNAs intervienen junto a sus factores de transcripción en redes de autorregulación tipo *feedback* positivo, *feedback* negativos o doble *feedback*, con el resultado de una expresión estable o bien cíclica, tanto del factor de transcripción como del miRNA [19]. Pero la regulación de los miRNAs no solo se produce durante la transcripción, sino que tiene lugar a lo largo de todo el proceso de biosíntesis. Se ha demostrado que la familia

let-7, uno de los grupos de miRNAs más estudiados, es modulada de forma selectiva por múltiples mecanismos que incluyen el bloqueo de Drosha, el bloqueo de Dicer, o el bloqueo de la uridiltransferasa durante la etapa de pre-let-7 [31]. Otro de los puntos de regulación tiene lugar en el momento en el que sólo una de las dos cadenas de RNA se incorpora al complejo RISC, afectando decisivamente a su complementariedad de bases y a la selección de mRNAs diana a los que va dirigido. De forma general, existe una cadena dominante (miRNA) y otra complementaria (miRNA\*) y esa relación se mantiene estable, aunque puede variar entre diferentes tejidos y según otros factores adicionales, como es la secuencia de nucleótidos 5' terminal [35].

Por otro lado, existe además otro proceso postranscripcional de edición del miRNA en su etapa de pri-miRNA y pre-miRNA, mediante conversión de adenosinas en inosinas [36]. Este proceso es capaz de modificar la complementariedad de bases y las propiedades estructurales de los miRNAs no maduros, lo que puede afectar a la capacidad de exportación de los pre-miRNAs, induciendo su degradación precoz [19], o bien conformar un miRNA maduro distinto, con capacidad de interferencia sobre otros mRNA diferentes [36].

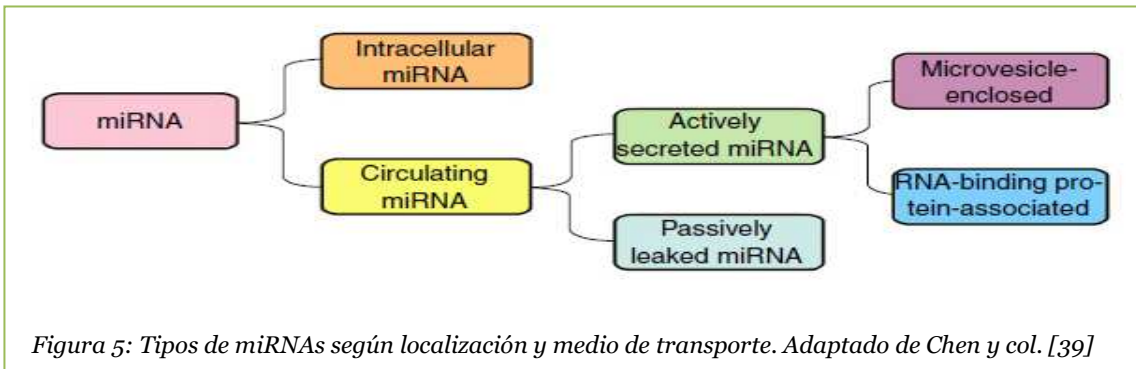
Por último, alteraciones cuantitativas o funcionales de la proteína transportadora AGO o de la proteína GW182, pueden modular también el proceso de biosíntesis [19].

### **Comunicación intercelular a través de miRNAs circulantes**

Tal y como hemos expuesto previamente, las primeras descripciones del mecanismo de acción de los miRNAs proponían que los miRNAs presentes en una determinada célula eran sintetizados con el fin de regular la traducción de mRNAs diana generados en la misma célula. Esta visión empezó a cambiar en 2007 gracias a los trabajos del equipo de Lötvall, donde se constataba que exosomas procedentes de mastocitos de médula ósea contenían grandes cantidades de miRNAs –y de mRNAs– que podían ser transferidos a otros mastocitos, siendo funcionales en su nueva localización [37].

En el momento actual se postula que los miRNAs pueden ser secretados al medio extracelular incluidos en diferentes tipos de vesículas extracelulares (*extracellular vesicles, EVs*), siendo vehiculadas por esas mismas vesículas (en el caso de los exosomas) o mediante proteínas de transporte de RNA; de esta forma, pueden viajar e integrarse en otras células receptoras, actuando en su destino como verdaderos miRNAs endógenos, regulando múltiples genes diana [38]. En definitiva, el proceso de intercambio de miRNAs entre células constituye un potente mecanismo de comunicación intercelular.

No todas las EVs son iguales, y los llamados exosomas son solo un tipo de ellas. Según la nomenclatura más aceptada, las EVs pueden ser clasificadas según su tamaño, densidad y origen en tres tipos: (1) ectosomas, microvesículas o vesículas de vertido (*shedding vesicles*), formados directamente al ser secretados a través de la membrana plasmática, (2) exosomas, procedentes por endocitosis de la membrana ya formada y cargados de contenido en el citoplasma antes de volver a ser secretados, y (3) cuerpos apoptóticos [39,40] (Figura 5 y 6).



Para algunos autores, el término microvesícula sería casi sinónimo de EV, englobando tanto exosomas como ectosomas [38]. Aparte de miRNAs, las EVs contienen lípidos, proteínas y otras clases de ácidos nucleicos procedentes de la célula de origen y se han visto implicados en una gran cantidad de procesos fisiológicos [39].

Además de incluidos en exosomas, los miRNAs circulantes pueden ser transportados libremente por determinadas proteínas como la misma AGO2 [41], la nucleofosmina 1 (NPM1) [42] o incluso en algunos miRNAs, lipoproteínas de alta densidad (HDL) [43]. Su liberación al medio extracelular tendría lugar mediante ectosomas o tras ruptura de cuerpo apoptóticos [41].

La determinación de altas concentraciones de miRNAs dentro de microvesículas llevó a la conclusión de que la mayoría de miRNAs detectados en líquidos biológicos se encontraban dentro de exosomas [44]. Sin embargo, otros estudios postulan que la mayoría de los miRNAs detectables a nivel extracelular (al menos en plasma y en sobrenadante de cultivo celular) se localizan fuera de microvesículas, asociados a proteínas AGO [45].

Los mecanismos por los que se seleccionan las moléculas que forman parte de las EVs –entre ellas los miRNAs– no están completamente esclarecidos, pero estudios proteómicos y de secuenciación masiva muestran que su contenido no es aleatorio [46]. Se ha descrito que la *proteína nuclear heterogénea ribonucleoproteína A2B1* (hnRNPA2B1) es capaz de unirse a exosomas, reconociendo determinadas secuencias específicas de algunos miRNAs, lo que permite modular su carga dentro de esos exosomas [47]. Todo ello iría a favor de considerar la acción de los miRNAs exosomales como un tipo de comunicación intercelular asimilable a la regulación hormonal [48].



En cambio, los niveles de miRNAs circulantes asociados a AGO parecen ser secundarios a la actividad fisiológica celular y depender en gran medida de las vesículas de apoptosis, puesto que hasta el momento no se han encontrado mecanismos de secreción activa en las membranas celulares [49]. Sin embargo, aún no hay consenso suficiente para considerar estos miRNAs como no selectivos.

Habría que añadir, que pese a la abundancia de RNAsas en el medio extracelular, los miRNAs que son secretados se mantienen estables sin ser degradados gracias su inclusión dentro de exosomas o bien a su unión a proteínas transportadoras [38,41].

Actualmente hay evidencia de la presencia de miRNAs extracelulares en la mayor parte de los fluidos biológicos, como son el suero, el plasma, la saliva, la orina y la leche materna [38].

A modo de resumen general, según se observa en la Figura 6 tomada de la revisión de 2012 de Chen y colaboradores, se muestra el proceso de biosíntesis de miRNAs, la formación del complejo RISC en la propia célula, los mecanismos de secreción celular y por último la integración de los miRNAs exógenos en las células de destino [38].

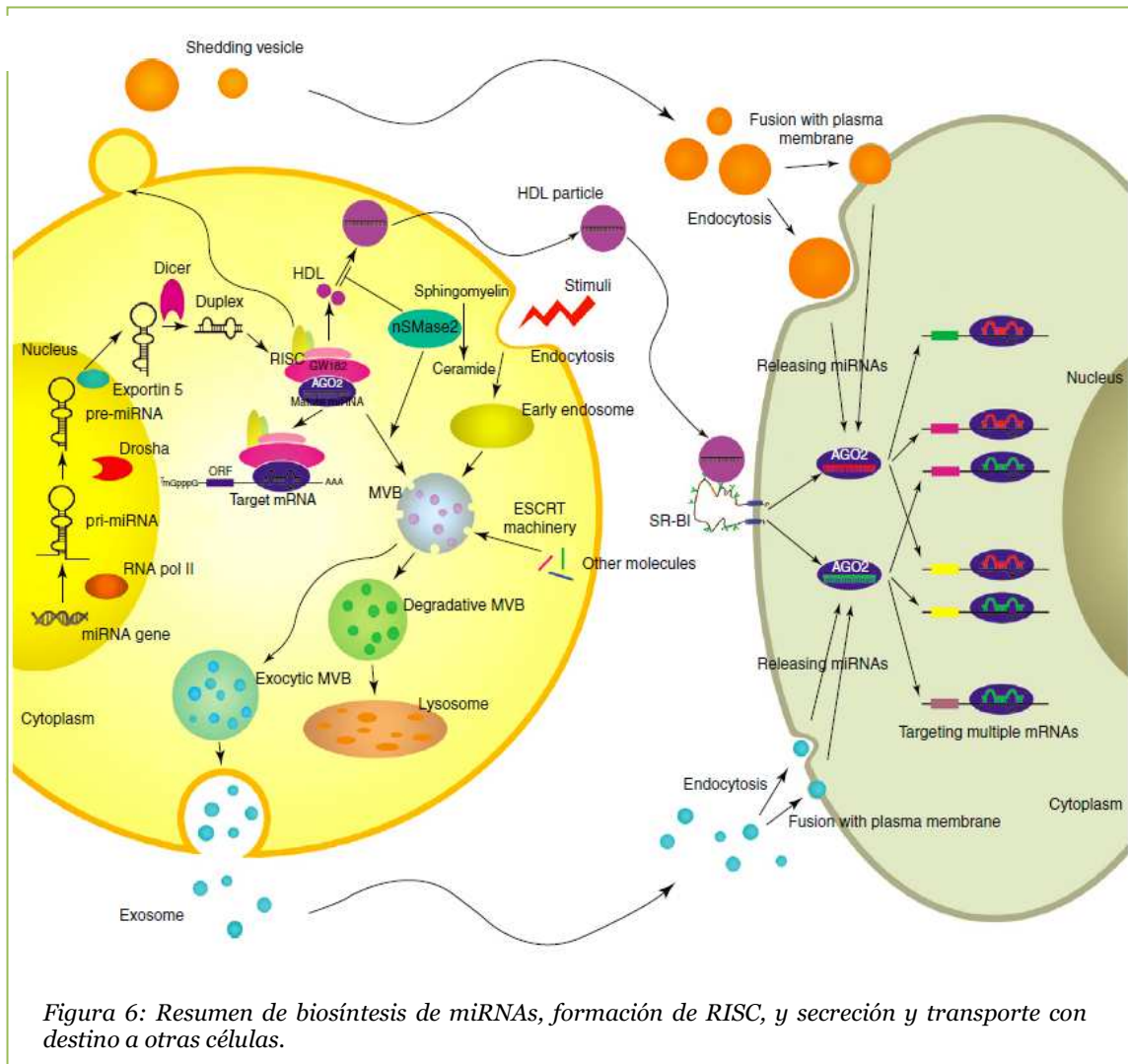


Figura 6: Resumen de biosíntesis de miRNAs, formación de RISC, y secreción y transporte con destino a otras células.

## Funciones biológicas de los miRNAs

La principal misión de los miRNAs es ejercer una represión postranscripcional de genes codificadores de proteínas mediante interacción miRNA-mRNA, por lo que se les ha llegado a calificar de *Micromanagers of Protein Output* [21]. Gracias a esta capacidad de control postranscripcional intervienen en un gran número de procesos biológicos

*Figura 7: MiRNAs involucrados en la regulación funcional de la inmunidad innata. Adaptado de Kingsley y Bhat [50].*

MicroRNA	Cell type	Target
MiR-451	Neutrophils	P38 MAPk
MiR-221& MiR-281	Neutrophils	MIP2
MiR-223	Neutrophils	Mef2C
MiR-466i	Neutrophils	AP-1, NF- $\kappa$ $\beta$ 1
MiR-146a	Monocytes	PTGS-2
MiR-582-5p	Monocytes	FOXO1
MiR-34a	Macrophages	SIRT-1
Let7a	Macrophages	E2F
MiR-155	Macrophages	Caspase 3
MiR-328	Macrophages	—
MiR 15a/16	Macrophages	PU.1, TRAF
MiR-17/20a/106a	Macrophages	SIRP $\alpha$
MiR-20a-5p	Macrophages	JNK2
MiR-223	Macrophages	FOXO3
MiR-873	Macrophages	—
MiR-125a	Macrophages	UVRAG
MiR-328	Macrophages	—
MiR-155	Macrophage	CSF-1R, Bcl-6
MiR-30a	Macrophages	—
MiR-142-5p	Macrophages	TGF- $\beta$ 2
MiR-146	Macrophages	IRAK-1, TGF $\beta$ R2
MiR-142-3p	Macrophages	TGF $\beta$ -r1
MiR-1	Macrophages	CLTC-1
MiR-21	Macrophages	PTEN, PDCD4
MiR-155	Dendritic cells	Arginine-2
MiR-146a	Dendritic cells	NF- $\kappa$ $\beta$
MiR-155	Dendritic cells	SHIP-1
MiR-155	Dendritic cells	ENTPD
MiR-106b	Dendritic cells	EGR-2
MiR-22	Dendritic cells	P38
MiR-23b	Dendritic cells	Notch-1/NF- $\kappa$ $\beta$
MiR-148	Dendritic cells	CaMKII $\alpha$
MiR-152		
MiR-10b	NK cells	MICB
MiR-155	NK cells	—
MiR-378 & MiR-30e	NK cells	Granzyme B, perforin
MiR-1245	NK cells	NKG2D

Algunas de las funciones en las que se ha demostrado la participación de los miRNAs son la regulación de los procesos de desarrollo embrionario, de muerte celular, de proliferación celular, de hematopoyesis y de neurodesarrollo [50]; también se les ha involucrado en la organogénesis del sistema osteomuscular y cardiaco, y en la regulación del metabolismo del colesterol, en la liberación pancreática de insulina o incluso en el control de la presión arterial mediante su influencia en el sistema renina-angiotensina-aldosterona [51]. Pero quizá una de las funciones más importantes es su papel en la regulación de los procesos inmunológicos, incluyendo la respuesta inmune innata y adaptativa, los procesos de desarrollo y diferenciación de células inmunitarias y su participación en la prevención de fenómenos autoinmunes [52].

### Implicación de los miRNAs en el control del proceso inflamatorio agudo

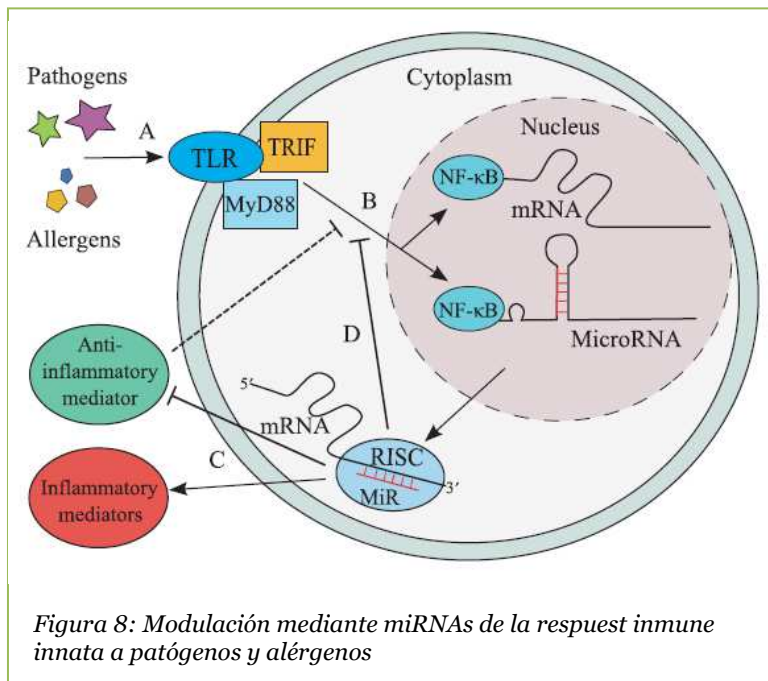
Para la formación de una respuesta inmune eficaz, que evite los fenómenos autoinmunes o las reacciones inflamatorias excesivas, se necesita controlar de una forma precisa todos los procesos evolutivos celulares, como son la diferenciación, la maduración e incluso la activación celular. Los

miRNAs pueden influir en el desarrollo y la función de las células inmunes mediante el bloqueo de la traducción de proteínas clave como pueden ser algunos factores de

transcripción o algunas moléculas intermedias de las cascadas de señalización de los receptores celulares [39].

Algunos miRNAs han sido identificados como parte fundamental en la modulación de la respuesta inmune ante una infección bacteriana grave, tanto en modelos animales como en humanos (Figura 7). Esta modulación se ejerce inicialmente mediante el control de la activación y reclutamiento de neutrófilos, y la señal de quimiotaxis que da salida al proceso inflamatorio [53]. A este nivel actúa el miR-451, cuyo aumento dentro de los neutrófilos impide su migración hacia los focos de inflamación como consecuencia del bloqueo de la vía p38 MAPKinasa [54]. El miR-466i tiene diferentes funciones según donde se sobreexpresa; así, el miR-466i en los neutrófilos promueve el inicio de la respuesta inflamatoria, mientras que en los macrófagos, a través del aumento de resolvinas y maresinas, promueve la resolución de la inflamación [55]. También el miR-146 se ha identificado como modulador de la respuesta inmune, mediante su efecto inhibitorio de las citoquinas proinflamatorias IL-8, CCL-20 y TNF- $\alpha$ , y por tanto, reduciendo el reclutamiento de neutrófilos en un modelo cutáneo [56].

Además de con la quimiotaxis, los miRNAs se han relacionado con la activación de la inmunidad innata (Figura 8). Así, el defecto de miR-223 parece potenciar la eficacia de



la fagocitosis de los neutrófilos mediante una mayor generación de ROS, aunque este efecto produciría también una mayor respuesta inflamatoria local y una exagerada destrucción tisular consecuencia de la agresión [57]; similar efecto se ha observado con el mir-142-3p, imprescindible para mantener el desarrollo y

maduración de los neutrófilos dentro de la normalidad [58]. Por otro lado, miR-1959 sería el encargado de regular la expresión de algunos péptidos antimicrobianos tales como  $\alpha$ -defensinas y catelicidinas, capaces de aumentar la permeabilidad bacteriana y destruir de esta forma a los patógenos [59]. Por último, al menos un microRNA presenta una relación de *feedback* negativo con la vía de activación TLR4 -->NF $\kappa$ B en neutrófilos: el miR-9 [60].

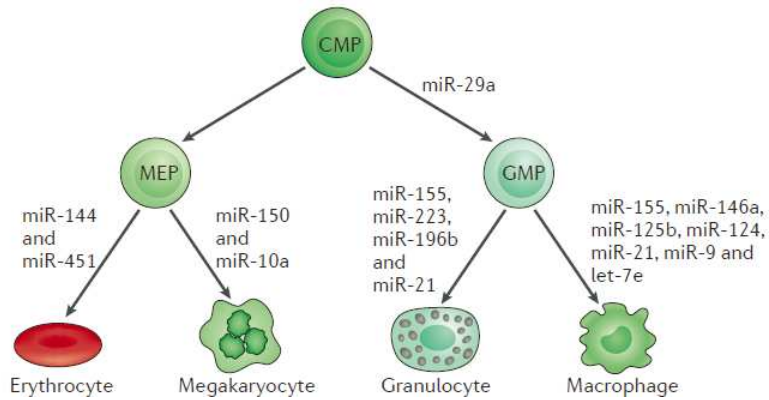


Una vez iniciada la inflamación, lo siguiente en aparecer es el reclutamiento de monocitos circulantes que acuden al foco de la infección donde se diferencian a macrófagos, o a células presentadoras de antígeno [53]. La diferenciación a macrófagos proinflamatorios requiere de la participación de varios factores de transcripción tales como CEBP/ $\beta$ , RUNX-1 o ATF2, a su vez regulados por varios miRNAs: miR-21, el miR-155, el miR-424, y el miR-17-92 [61]. De nuevo, uno de los puntos de regulación más importantes tiene lugar en la cascada de señalización intracelular dependiente de los receptores Toll-like (TLR). Los primeros estudios básicos que intentaron la activación de TLR en macrófagos con LPS demostraron que un gran número de miRNAs (miR-21, -25, -27b, -100, 140, -142-3p, -181c, 187, -194, -214, -223 y -224) modificaban sus niveles de una forma rápida e intensa [62]. Sin embargo, los dos mayores reguladores del desarrollo y función de los macrófagos son el miR-155 y el miR-146a [63] (Figura 9). Por un lado, miR-155 es inducido por el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B a través de la proteína activadora 1 (AP-1), en respuesta a un gran número de estímulos vía la cascada del TLR [64]. La inducción del miR-155 conlleva una amplificación de la respuesta inflamatoria, al ser capaz de inhibir supresores de la cascada TLR-->NF- $\kappa$ B (SOCS1 y SHIP1), y por tanto dejando vía libre a la sobreproducción de NF- $\kappa$ B (y con él, la mayor parte de las citoquinas inflamatorias)[65]. En cambio miR-146a, también inducido por NF- $\kappa$ B, tiene un efecto modulador negativo sobre la inflamación, al ser capaz de bloquear TRAF6 e IRAK1, moléculas intermedias de la vía TLR- NF- $\kappa$ B (Figura 9) [66].

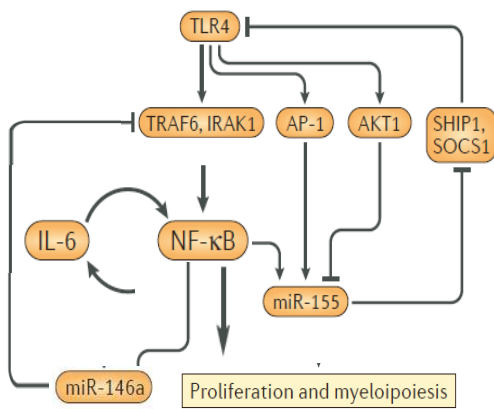
Además de estos dos, otros miRNAs se han relacionado con el control de los macrófagos. Se ha observado recientemente que el miR-127, inducible también por la vía del TLR, se relaciona con un aumento de citoquinas proinflamatorias en los macrófagos –en un modelo pulmonar– mientras que su bloqueo conlleva a la polarización hacia M2, de perfil antiinflamatorio [67].

Para concluir: en los últimos años se han hecho avances muy importantes en la comprensión de los sistemas de control de la inmunidad innata mediante miRNAs, tanto a nivel celular como molecular [63]. Además, se han hecho numerosos estudios sobre miRNAs en sangre periférica –libres o en exosomas– con el objetivo de alcanzar un diagnóstico precoz tanto de procesos neoplásicos [68], enfermedades cardiovasculares [69], como de enfermedades autoinmunes[70]. Vista la importancia de estas moléculas en el control de la inflamación aguda y su potencial como biomarcadores, se abre el camino para utilizar los microRNAs circulantes como marcadores diagnósticos y pronósticos en procesos infecciosos, tales como la neumonía adquirida en la comunidad (NAC).

Figura 9: Regulación de la inmunidad innata por miRNAs. Adaptado de Mehta y Baltimore



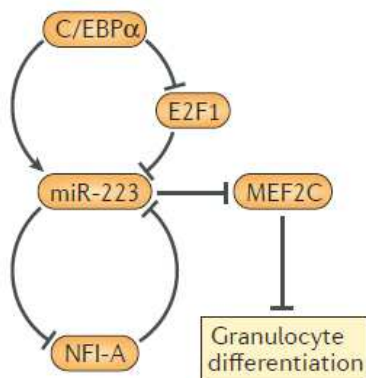
Se muestran de forma resumida, miRNAs relacionados en la proliferación y desarrollo de algunas células del sistema inmune innato.



El miR-155 y el miR-146a son piezas clave de la regulación del factor de señalización nuclear NF-κβ a partir de la activación del Toll-like receptor vía TRAF6.

miR-146a actuaría como un factor represor –a través del bloqueo de TRAF6– mientras que miR-155 actuaría como un factor activador, reprimiendo SOCS1, liberando así la inhibición que esa molécula ejerce sobre TLR.

Este mecanismo, entre otros posibles, explicaría el efecto antiinflamatorio observado de miR-146 y el proinflamatorio de miR-155 [71].



El miR-223 se comporta como un factor proinflamatorio: es capaz de reprimir el myocyte-specific enhancer factor 2C (MEF2C), a su vez factor inhibidor de la diferenciación de granulocitos.

Varios factores nucleares ejercen su efecto sobre este miRNA, entre los que destacan C/EBPa (potenciador) y NFI-A (inhibidor).

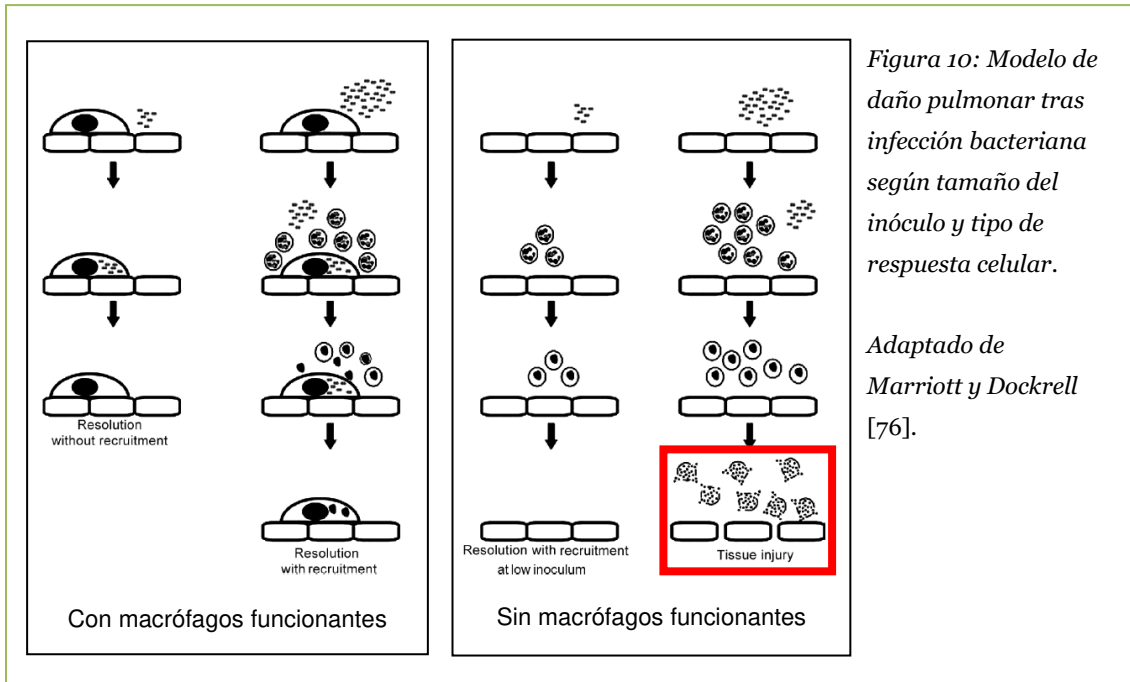
## **Neumonía adquirida en la comunidad (NAC): modelo de inflamación aguda**

Según cita de D. Pedro Laín Entralgo, la primera mención a la neumonía como enfermedad aguda probablemente se la debemos a Hipócrates: "*En el conjunto de las enfermedades internas, una diferencia descuella sobre todas las demás: la que existe entre las «agudas» (oxéa nousēmata) y las «crónicas» (polykhronía nousēmata). Aquéllas -«pleuresía, peripneumonía, frenitis, letargo, causón y las que dependen de ellas y en que la fiebre es continua» son las más funestas, las que exigen mayor discreción en el tratamiento y las que hacen más difícil e inseguro el juicio pronóstico (II, 232)*" [72]. Por otro lado, la primera descripción de la enfermedad como resultado de la relación entre el huésped y el patógeno la podemos encontrar en 1887 en la *Patología General* de Klebs, donde se describe con agudeza que "*Es la lucha entre la célula y la bacteria la que constituye la enfermedad infecciosa*" [73].

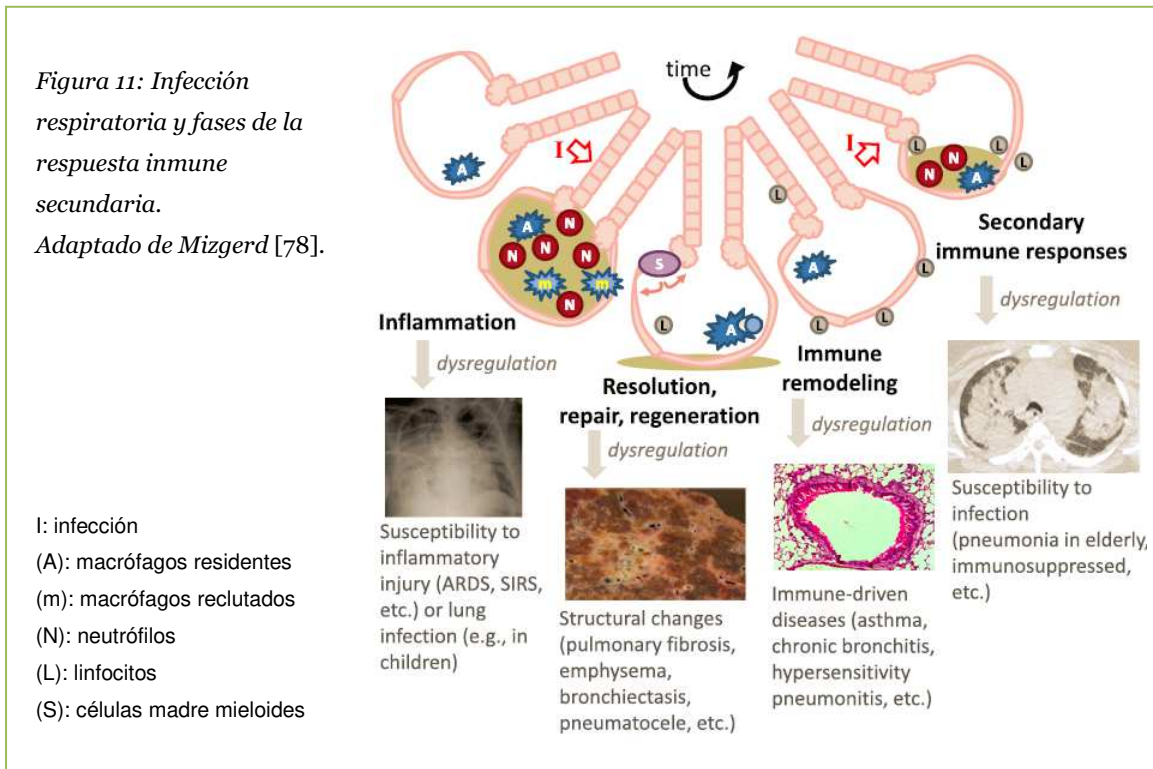
En nuestros días, la neumonía adquirida en la comunidad se define por la presencia de dos elementos imprescindibles: signos y síntomas de afectación del tracto respiratorio inferior de inicio reciente y la aparición de un infiltrado radiológico nuevo [74,75]. Por tanto, la misma definición contempla de forma implícita las dos características más importantes de esta enfermedad: se trata de una infección de curso rápido que condiciona una respuesta aguda en el paciente.

En el momento actual, y gracias a la investigación básica, se sabe que esa respuesta inmune que aparece en la infección broncoalveolar es un proceso inflamatorio agudo coordinado que integra a todos los componentes celulares y humorales [76,77].

Normalmente, la constante llegada al árbol broncoalveolar de pequeñas cantidades de microorganismos durante la respiración es controlada por el sistema mucociliar y por los macrófagos residentes en el epitelio alveolar [78]. Sin embargo, la llegada de patógenos de especial virulencia o en grandes cantidades necesita de otras medidas: desde hace años es conocido que la respuesta celular innata a cargo de los macrófagos migrados a la mucosa respiratoria y de los neutrófilos reclutados durante la inflamación aguda son claves para el control efectivo de la infección [76,79]. Esta reacción inflamatoria conlleva la liberación desde la circulación sanguínea de moléculas de complemento, anticuerpos circulantes y proteínas de fase aguda que facilitan el control de la infección, pero que producen también un daño pulmonar agudo [78] (Figura 10). Por tanto, para acabar con el *estado morbos* no basta con una respuesta inicial rápida e intensa; es necesario una correcta resolución de la inflamación una vez que el patógeno ha sido eliminado, pues de lo contrario la cascada inflamatoria puede producir un daño irreversible en la arquitectura y función pulmonar [76].



El daño agudo tisular secundario a la inflamación pulmonar tiende a desaparecer durante el periodo de convalecencia. Sin embargo, en algunos pacientes la inflamación no se resuelve por completo y pueden aparecer alteraciones estructurales irreversibles a nivel pulmonar como fibrosis, enfisema y bronquiectasias, e incluso otras inmunomediadas, como el asma, que afectan a su pronóstico vital y funcional [78] (Figura 11).



Dicho lo anterior, y basándonos en el esquema previo, se podrían diferenciar 4 fases de respuesta inmunitaria en la NAC [78]:

- (1) Inflamación aguda
- (2) Resolución de la inflamación aguda
- (3) Impronta sobre respuestas inmunes futuras
- (4) Inflamación residual no resuelta

*(1) Inflamación aguda.*

El reconocimiento precoz de microorganismos por el endotelio pulmonar –células endoteliales y macrófagos residentes– condiciona un cambio en el transcriptoma local, resultando en la producción y liberación de múltiples mediadores inflamatorios: citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, sustancias antimicrobianas, opsoninas, enzimas/inhibidores de enzimas, moléculas de adhesión y otros factores [80]. Algunas de estas moléculas tienen acción directa antimicrobiana, mientras que otras potencian el reclutamiento de células inmunes, en un primer momento macrófagos y neutrófilos circulantes [76,79]. El efecto antimicrobiano de los macrófagos ha sido comprobado en varios estudios en los que el bloqueo de estas células de forma genética o farmacológica deterioraba de forma decisiva la capacidad defensiva del huésped [81]. Los neutrófilos, por su parte, son especialmente importantes en el control inicial de la infección pulmonar. Su acción sobre los microorganismos es triple: son fagocitos facultativos, destruyendo los patógenos en su citoplasma; son capaces de degranularse, liberando al medio gran cantidad de moléculas tóxicas, como la mieloperoxidasa (MPO); por último, son capaces de proyectar su DNA nuclear asociado a histonas y otras moléculas para formar una red donde queden atrapados los microorganismos (*neutrophil extracellular traps, NETs*), con gran efecto microbicida [82]. Además, estudios en animales de experimentación y en modelos de inmunodepresión humana (congénita o tras fármacos), han demostrado que la neutropenia y las alteraciones funcionales de los neutrófilos son factores de alto riesgo de aparición de neumonía grave [83,84].

A nivel molecular, tanto células endoteliales, como macrófagos y neutrófilos activados inician una cascada de señalización intracelular que acaba en la transcripción de múltiples mediadores locales. En todos ellos, el principal factor de transcripción involucrado es el factor NF- $\kappa$ B, que actúa como el verdadero regulador de la respuesta inmune innata pulmonar [78]. Su activación promueve en las células defensivas la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), entre otros, que liberados potencian tanto el reclutamiento de más neutrófilos como el

resto de acciones defensivas contra el patógeno. Esta acción se ve reforzada por la respuesta hepática sistémica, con liberación a la circulación de reactantes de fase aguda que potencian la inflamación pulmonar durante la NAC [85]. Defectos en moléculas intermedias en la cascada de activación de NF- $\kappa$ B (MyD88, TRAF6 o IRAK4), impiden la correcta activación nuclear de NF- $\kappa$ B, facilitando la aparición de infecciones bacterianas graves [86]. Además como se ha comentado anteriormente, el miR-146 y el miR-155 serían reguladores de la inflamación, a través del control sobre cascada de activación de NF- $\kappa$ B [63].

Por último, habría que mencionar la contribución de la inmunidad adaptativa al control efectivo de la neumonía. En el epitelio respiratorio se encuentran linfocitos T CD4+ de memoria, que si han tenido contacto previo con el patógeno son capaces de inducir la lisis de las células infectadas [87], así como de acelerar y amplificar la cascada inflamatoria innata mediante la secreción de citoquinas propias [88]. También se encuentran linfocitos Th17, que una vez activados por IL-23, producen gran cantidad de IL-17, clave en la defensa local contra bacterias extracelulares y hongos, debido a su capacidad de reclutamiento de neutrófilos [89].

## (2) Resolución de la inflamación aguda.

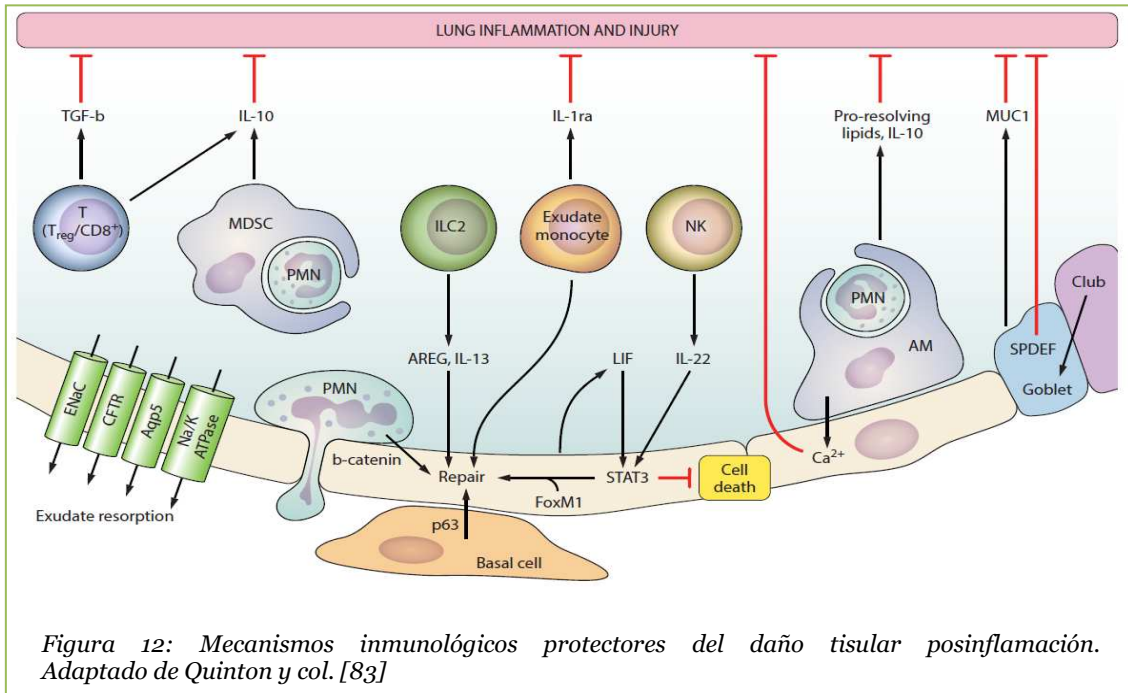
Los cambios tisulares que ocurren durante una neumonía severa son extraordinarios, pero el pulmón es habitualmente capaz de detener la inflamación y recobrar su histología normal [78] (Figura 12). La resolución de la inflamación aguda requiere de la eliminación del pus. Por un lado, la eliminación de las células inflamatorias apoptóticas a cargo de los macrófagos residentes mediante eferocitosis, rompe la retroalimentación del proceso inflamatorio [90]; por otro lado, el reconocimiento de células inflamatorias apoptóticas por los macrófagos conlleva un cambio en la liberación de citoquinas –de proinflamatorias a antiinflamatorias, fundamentalmente interleuquina-10 y TGF- $\beta$ – deteniendo la cascada inflamatoria [91,92].

Desde la inmunidad adaptativa, la acción de los linfocitos T reguladores (Tregs), atraídos al lugar de la infección desde el principio de la inflamación, es capaz de acelerar la resolución de la neumonía mediante la liberación de TGF- $\beta$  [93].

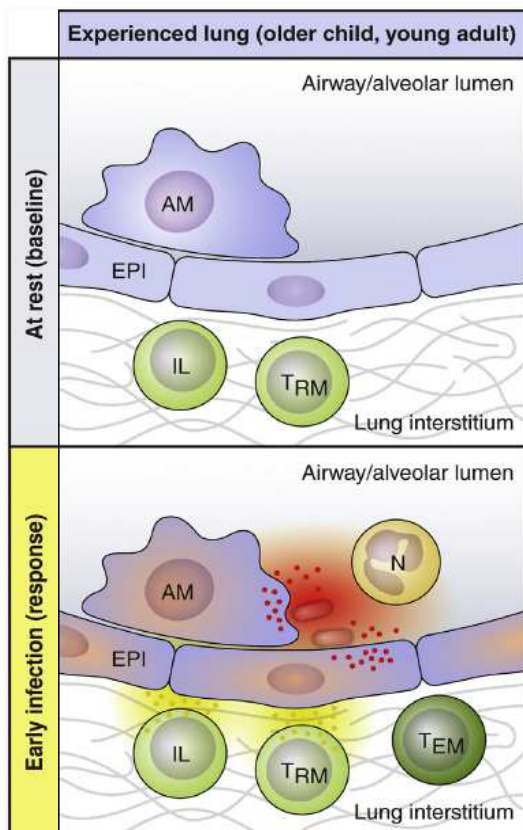
A nivel molecular, del mismo modo que la activación de NF- $\kappa$ B era fundamental para desencadenar la respuesta inflamatoria, la activación del *signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)* es fundamental para superarla. Así, STAT3 induce la expresión de genes responsables de la migración celular, de la proliferación epitelial y de la prevención de la muerte celular a nivel de la pared alveolar [78]. Es conocido que la IL-6 y la citoquina relacionada *leukemia inhibitory factor (LIF)*, abundantes



durante la NAC, además de pro-inflamatorios son potentes estímulos de activación de STAT3, contribuyendo con el tiempo a la reparación tisular [94].



(3) Impronta sobre futuras respuestas inmunes.



*Figura 13: Adaptación inmunitaria del pulmón tras una neumonía. Adaptado de Mizgerd [73].*

La resolución de la cascada inflamatoria en el pulmón conlleva una paralización del daño tisular, pero también conlleva cambios permanentes de la inmunidad local, sobre todo en la adaptativa, aunque no solo en ésta [78]. A nivel celular, comienzan a residir en el epitelio algunas células inmunitarias que no estaban en un principio, tales como células NK, linfocitos  $\gamma\delta$ , linfocitos innatos (IL) o linfocitos T memoria residentes (TRM), que están preparados para una respuesta precoz en caso de reinfección [95] (Figura 13).

Por otro lado, las células epiteliales y los macrófagos residentes se reprograman metabólicamente y epigenéticamente de forma que, ante un nuevo estímulo, los mediadores inflamatorios que producen son más efectivos en el reclutamiento de

neutrófilos y de linfocitos T de memoria (TEM) [95,96]. En cualquier caso estos cambios adaptativos no empiezan a ser efectivos hasta pasados unos días desde el episodio neumónico. Durante esos primeros momentos, la inmunidad adaptativa se muestra "aturdida": el riesgo de desarrollar una segunda neumonía aumenta debido a una mayor tolerancia temporal a antígenos de macrófagos y células presentadoras de antígeno, lo que conlleva una disfunción de la activación de los linfocitos T, un proceso que recibe el nombre de *inmunosupresión inducida por sepsis* [97]. Afortunadamente, esta inmunosupresión es transitoria.

#### (4) *Inflamación residual no resuelta.*

En algunas ocasiones, el proceso de transición desde la inflamación aguda hacia un epitelio "entrenado" en reposo no sucede con rapidez. En estos casos, se mantiene una inflamación de bajo nivel que puede conllevar a una mayor inmunosenescencia y a la disbiosis bronquial, perpetuando el círculo vicioso inflamatorio y dañando los mecanismos de defensa broncoalveolar del huésped [95]. Un ejemplo de este mecanismo sería el de la neumonía bacteriana secundaria tras una infección viral, característicamente por el virus de la gripe. En este caso, el aumento de interferón (IFN) I y II secundario al proceso vírico impide el correcto reclutamiento de neutrófilos y la actividad macrófaga local en un primer momento, permitiendo la replicación bacteriana y favoreciendo el desarrollo del proceso neumónico posterior [98].

En cualquier caso, los mecanismos fisiopatogénicos exactos no son bien conocidos, aunque actualmente se cree que la inflamación residual –tanto local como sistémica– es responsable de la mayoría de complicaciones a medio y largo plazo observadas en el seguimiento de la NAC (cognitivas, funcionales, infecciosas y cardiovasculares) [82].

Desde un abordaje clínico descriptivo, algunos autores han medido algunas citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) durante los primeros días tras una NAC, encontrando niveles muy altos al ingreso, disminución rápida durante los primeros días, pero persistencia de niveles elevados en el tiempo, más allá de la resolución clínica [99]. Otros estudios en esa línea han comprobado que la persistencia de niveles elevados de la IL-6 en el momento del alta hospitalaria –lo que traduce una inflamación subaguda no resuelta– se relacionan con mayor riesgo de muerte diferida, fundamentalmente por nuevas infecciones graves y por eventos cardiovasculares [100,101].

Esta idea de inflamación sistémica no resuelta tras una NAC como promotor de potenciales complicaciones a corto y largo plazo, ha sido también parte inspiradora de este proyecto de tesis.



*Una vez explicada la fisiología y la regulación inmune de la NAC, queda situarla como problema de salud dentro de la atención sanitaria actual.*

## **Impacto sociosanitario de la NAC en nuestros días**

La neumonía adquirida en la comunidad es una infección frecuente y grave. Según los últimos datos actualizados de 2015, las infecciones del tracto respiratorio inferior (*low respiratory tract infections, LRI*) –en el que se incluyen bronquiolitis y neumonías– suponen la quinta causa de muerte global (de 249 posibles) y la primera causa de muerte infecciosa en el mundo [102]. Se estima que estas infecciones son responsables de 2,74 millones de fallecimientos cada año (IC 95% 2,5 - 2,86) [103].

Además de tener un gran impacto sobre la mortalidad, sufrir una NAC afecta a la calidad de vida posterior al episodio. Se ha estimado una reducción del 16% en calidad de vida (según escala Euroqol EQ-5D-3L) y una disminución del 13% en la medida de QALYs (*quality-adjusted life years*, Años de Vida Ajustados por Calidad) en el año posterior al alta de los pacientes ingresados por NAC, respecto a una población comparable que no había sufrido una neumonía [104]. Se ha descrito que una estancia hospitalaria más prolongada se correlaciona con una mayor reducción en la calidad de vida, y que los mayores de 85 años tienen muy pocas posibilidades de recuperar su estado previo basal [105]. Habría que añadir que, de forma llamativa, el deterioro en la calidad de vida que no se recupera antes de los 2 meses desde el alta, no mejora durante los siguientes 10 meses de seguimiento [104].

Desde un punto de vista económico, algunos estudios en EEUU sobre población laboral activa han demostrado que aquellos pacientes que sufrían una NAC tenían un gasto sanitario anual más de 5 veces mayor que los que no la sufrían (20 961 vs. 3783 dólares americanos (US\$), respectivamente) [106]. Un estudio reciente en Japón ha calculado que en pacientes mayores de 65 años, el coste directo de una NAC atendida de forma ambulatoria es de 346 US\$, mientras que el coste para pacientes ingresados asciende a 4851 US\$ [107]. Ya en Europa, se ha estimado que el coste directo por hospitalización de un adulto de cualquier edad que requiere ingreso por NAC oscila entre los 1586 euros de Italia y los 1201 euros de Alemania [108]. Por otro lado, los gastos indirectos en días de trabajo perdidos ascienden en toda Europa a 3600 millones de euros cada año, comparable, por ejemplo, al presupuesto de la candidatura olímpica Paris 2024 [108].

En relación con la etiología, la neumonía causada por *Streptococcus pneumoniae* –principal agente etiológico de la neumonía comunitaria– produce el 55,4% de todas las muertes por LRI en todos los rangos de edad, lo que supone un total de 1,51

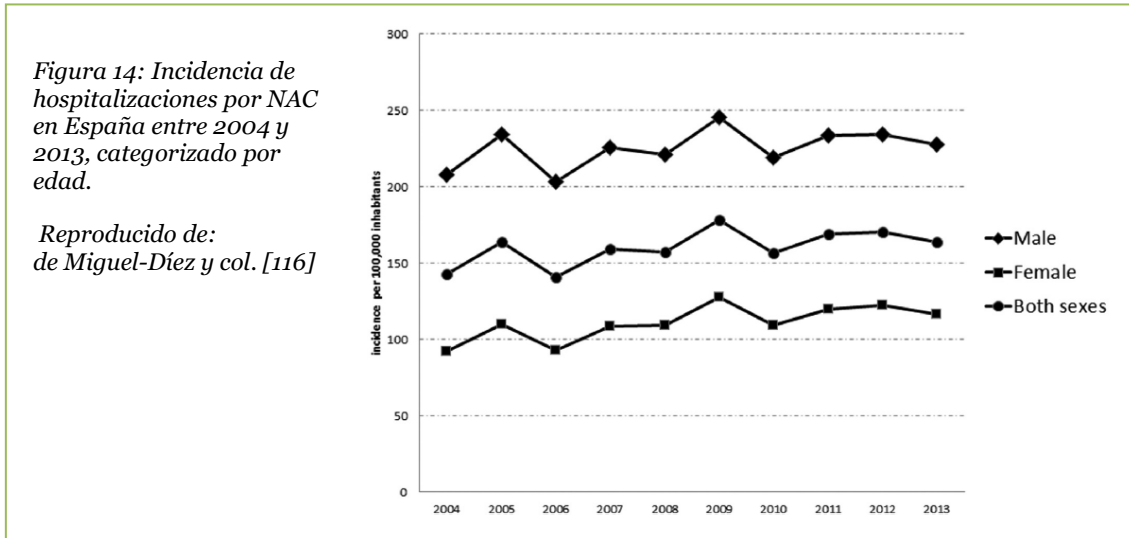
millones de fallecimientos por esta causa cada año en el mundo (IC 95% 0,85 - 2,18) [103].

Según la opinión de muchos expertos, la importancia clínica y el gasto económico de la atención de la NAC es enorme y se espera que aumente en el futuro, espoleada en muchos casos por la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a antimicrobianos y por el envejecimiento de la población mundial. Según esos mismos autores, es necesario potenciar el campo diagnóstico –entre otras muchas medidas– para intentar atenuar esta patología [109].

### **Situación de la NAC en España**

En España, los datos de morbimortalidad son similares al del resto de países desarrollados, aunque con matices. La NAC en España conlleva una alta mortalidad tanto durante el ingreso como en el seguimiento posterior a corto y largo plazo. Según datos del Conjunto Mínimo Básico de Datos de Hospitalización del SNS (CMBD) de 2016 (último año disponible) el 8,5% de los pacientes hospitalizados por *neumonía* –de cualquier tipo– fallecieron durante su ingreso (8474 fallecimientos de un total de 98 672 hospitalizaciones), porcentaje solo por detrás de los ingresos por *accidente cerebrovascular* o por *insuficiencia cardíaca congestiva* [110]. En uno de los más amplios y recientes estudios específicamente sobre neumonías adquiridas en la comunidad hospitalizadas en España, se comunicó una tasa de mortalidad del 4,4% a 30 días y del 5,6% a 90 días desde el momento del ingreso [111]. En otro estudio reciente, con datos desglosados hasta 2015, la mortalidad durante el ingreso se situó algo más alta, en el 6,4%, y la mortalidad a los 30 días fue del 7,5% [112]. Analizando la mortalidad a más largo plazo los resultados continúan esta tendencia; en otro estudio unicéntrico con más de 2300 pacientes se informó de una tasa de mortalidad al año del 10,6%, una vez excluidos los pacientes con mortalidad precoz intraingreso [113]. Todos estos resultados son similares a los disponibles en nuestro centro correspondientes a 2012, con una mortalidad durante el ingreso en torno al 4,3%, a los 30 días del 5,7% y a los 90 días del 12% [114]; y similares también a los correspondientes a 2015 que se presentan en la sección de *Resultados* de esta memoria de tesis doctoral.

Además de ser una importante causa de mortalidad, la NAC supone una importante carga para el sistema sanitario. Analizando los datos desglosados del mayor estudio epidemiológico sobre NAC en adultos en nuestro país, la incidencia de hospitalizaciones entre los años 2004 y 2013 aumentó de 142,4 a 163,9 casos por 100 000 habitantes-año [115] (Figura 14).



Dicho aumento se produjo por igual entre hombres y mujeres. *Streptococcus pneumoniae* fue el patógeno más veces identificado como responsable de la neumonía, aunque su aislamiento fue paulatinamente disminuyendo en el periodo estudiado desde un 16,9% en 2004 hasta solo un 8,5% en 2013. Pese a las mejoras tecnológicas y de recursos sanitarios, la estancia media se mantuvo estable en los 7 días de ingreso, mientras que la mortalidad intraingreso solo disminuyó discretamente desde el 13,3% en 2004 hasta el 12,8% en 2013 [115].

Respecto a los costes directos de la atención a estos pacientes, los últimos estudios disponibles en España (con datos poco actualizados de 2004), sitúan los costes de la hospitalización en 1553 euros, mientras que la atención ambulatoria estaría en los 196 euros [116], costes comparables con otros países europeos [108].

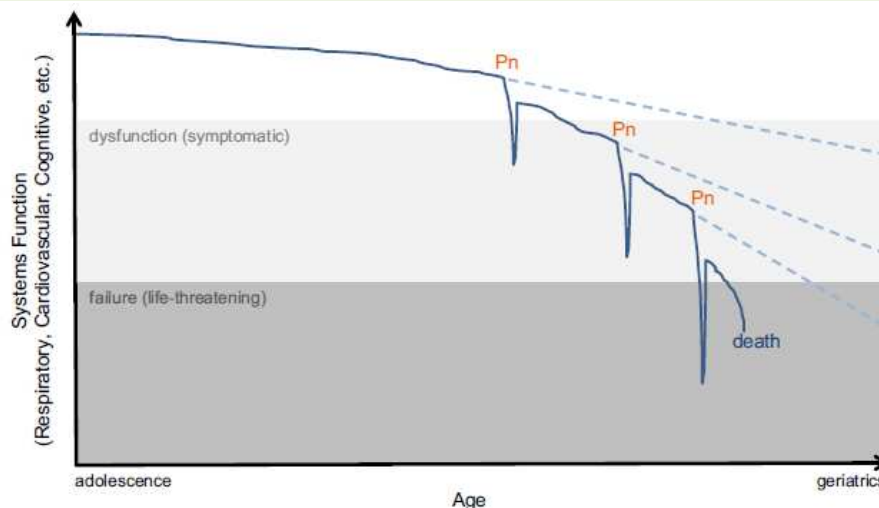
### **Mortalidad a largo plazo tras un ingreso por neumonía**

Desde que en 1892 Sir William Osler dijera aquello de "*pneumonia is the old man's friend*" [117], la atención sanitaria de la NAC ha experimentado muchas mejoras, aunque continúa siendo una enfermedad especialmente grave entre aquellos pacientes más mayores y con más comorbilidades [118]. Así por poner un ejemplo, en una extensa cohorte canadiense de pacientes hospitalizados por NAC se observó que hasta el 29% de los pacientes cumplían criterios de pluripatología, y que esta condición aumentaba un 20% su riesgo absoluto de muerte durante el ingreso, respecto a los pacientes no pluripatológicos con NAC de similar gravedad según escalas habituales [119]. Esta relación entre edad y fragilidad con mortalidad durante el episodio ha quedado demostrada en un sinfín de trabajos y revisiones [118,120–122].

Sin embargo, más recientemente la atención ha girado hacia el pronóstico a largo plazo. Desde hace años y cada vez con más evidencia se afirma que sufrir una NAC aumenta el riesgo de muerte a largo plazo –a 1 año, a 3 años e incluso a 5 años desde el ingreso– respecto a personas iguales en todo que no habían sufrido una neumonía [123–125]. La razón de este exceso de riesgo no ha sido hasta el momento completamente explicada, pero se cree que podría ser algún factor desconocido, independientemente de la edad y del grado de comorbilidades iniciales [126,127]. Para Bruns *y col.* la causa del exceso de mortalidad estaría relacionada fundamentalmente con la aparición de un exceso de neoplasias, con complicaciones de una EPOC preexistente y con el desarrollo de eventos cardiovasculares letales [128]; esas mismas causas serían las encontradas por Holter en su cohorte noruega [129]. Johnstone *y col.* lo relacionaron con la gravedad inicial del proceso neumónico medida por PSI [130]. Corrales-Medina y su equipo también estudiaron la causa de esta mortalidad diferida, llegando a la conclusión de que se debía a un aumento de eventos cardiovasculares [131], siendo la aparición de insuficiencia cardíaca congestiva un factor especialmente relevante [132]. Más recientemente, Myint *y col.* determinaron que la mortalidad a largo plazo (hasta un año de seguimiento) se debía a causas cardiovasculares, y que la mortalidad a más largo plazo se relacionaba mayormente con causas respiratorias [133]. Para Eurich *y col.* la clave estaba en el aumento de visitas a Urgencias e ingresos que experimentaban sus pacientes durante los siguientes 10 años desde la NAC, lo que era causa –o consecuencia– de una mayor fragilidad [134]. Mortensen y su equipo encontraron un aumento de neoplasias de pulmón avanzadas en los pacientes previamente ingresados por NAC [135]. La propuesta de Quinton en su extensa revisión sobre fisiología de la neumonía era que la NAC actuaba como modulador de la trayectoria vital de los pacientes, aumentando el riesgo de muerte a corto plazo, pero también acelerando el declive vital constitutivo de todo ser humano, en caso de superar la infección aguda [82] (Figura 15).

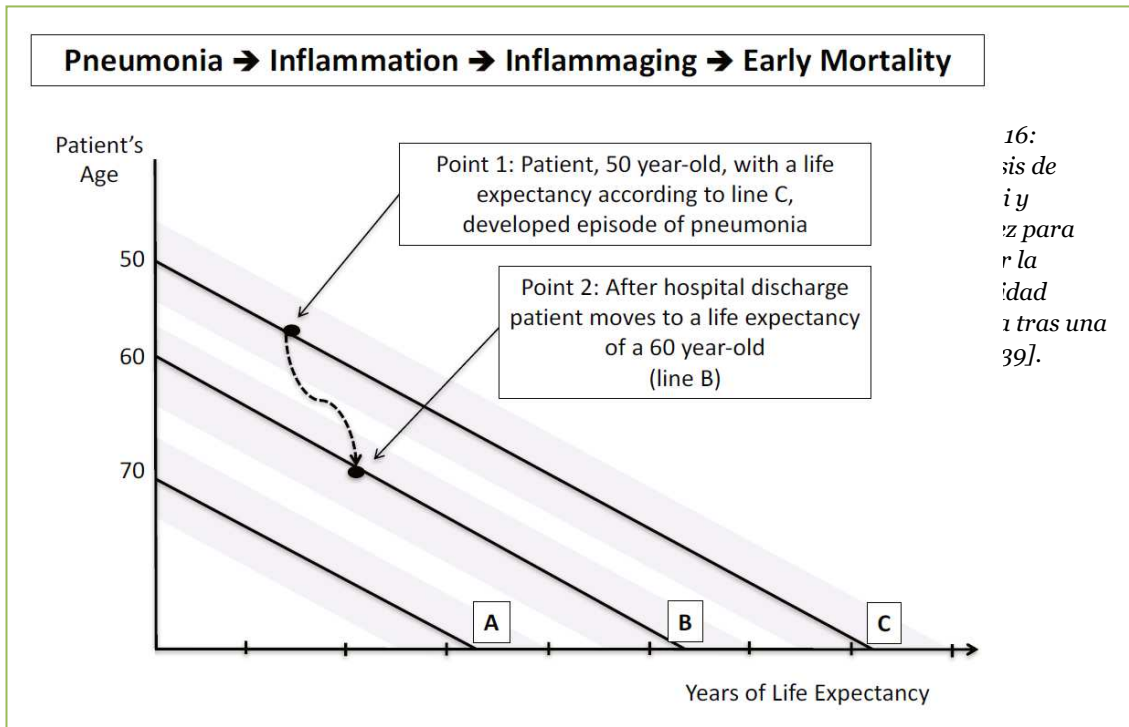
Figura 15: NA como modulador de trayectoria vital.

Adaptado de Quinton *y col.* [83]



Yende en varios de sus trabajos sobre neumonía y sepsis propuso que la inflamación residual –medida por citoquinas proinflamatorias– era responsable del exceso de mortalidad a largo plazo [136,137].

Por último, varios autores sugieren que la alta tasa de mortalidad a largo plazo en pacientes con NAC podría ser debida a una respuesta inflamatoria persistente después del alta hospitalaria o incluso a enfermedades cardiovasculares que no eran previamente conocidas, surgidas después del episodio [138] (Figura 16).



Parece que todas estas explicaciones tienen en común dos cosas: la importancia de la reacción inflamatoria secundaria a la NAC y la relación más o menos directa con el desarrollo de eventos cardiovasculares letales. Esta relación ha sido la base de nuestras investigaciones y origen del presente proyecto de tesis doctoral.

En el siguiente punto, se desarrolla más ampliamente esta idea.

### **Inflamación y aparición de eventos cardiovasculares en la NAC**

La relación entre la inflamación y la desestabilización de la enfermedad cardiovascular a través del desencadenamiento de la ruptura de la placa de ateroma ha sido muy estudiada, principalmente en Cardiología, como factor de riesgo de cardiopatía isquémica (“*inflammation factors*” versus “*injury factors*”) [139]; también en otras especialidades con modelos de inflamación crónica, como por ejemplo Reumatología,

donde se había constatado epidemiológicamente un aumento de eventos cardiovasculares en los paciente con control subóptimo [140].

El desarrollo de eventos cardiovasculares en el seno de una neumonía ha sido descrito desde hace años, sobre todo la aparición de episodios de cardiopatía isquémica aguda durante la etapa inicial de la hospitalización por la infección, momento de mayor estrés respiratorio [141]. Esta relación se ha atribuido tradicionalmente a la hipoxemia aguda y a la mayor demanda de oxígeno por el miocardio en el contexto de la respuesta inflamatoria sistémica. Las propuestas hechas para su prevención han sido la mejora de la atención sanitaria y el inicio terapéutico precoz [142]. En otros estudios se ha descrito una mayor incidencia de descompensaciones de insuficiencia cardiaca en la evolución a medio plazo [143], incluso un peor pronóstico, con mayor número de reingresos y mayor mortalidad secundaria [143,144]. Una vez más, los mecanismos invocados han sido los relacionados con la mayor demanda de oxígeno y la insuficiencia respiratoria a esas demandas, pero también la aparición de arritmias malignas, la hipertensión pulmonar transitoria y por primera vez, la disfunción endotelial coronaria y los fenómenos isquémicos acompañantes [145,146]. Partiendo de esa predisposición a la cardiopatía isquémica, varios estudios describieron la aparición de eventos cardiovasculares no solo precoces sino también a largo plazo, encontrando una mayor prevalencia de eventos isquémicos mayores al año de seguimiento o incluso más tarde tras una NAC [130,137,147].

En este sentido cabe añadir que la importancia de los eventos cardiovasculares concurrentes a una NAC ha sido reconocida con el desarrollo de nuevas escalas pronósticas en las que se ha incluido las complicaciones cardiovasculares [148,149].

*Revisadas las bases biológicas de los miRNAs y su importancia en el proceso inflamatorio agudo que tiene lugar durante una neumonía, la importancia de la NAC en nuestra sociedad, sus complicaciones y pronóstico, queda profundizar en los métodos de predicción a través del análisis de los biomarcadores disponibles y futuros.*



## Tras la búsqueda del mejor biomarcador pronóstico para la NAC

Hasta el momento, las aplicaciones de los biomarcadores comúnmente utilizados en la NAC han sido múltiples, entre las que se incluyen ayudar al diagnóstico del proceso y al diagnóstico etiológico, estratificar el riesgo de complicaciones y asistir en el triaje de

Common biomarkers used in the diagnosis, management, and treatment of community and/or hospital-acquired pneumonia
<i>Severity scoring systems for severe community-acquired pneumonia</i>
British Thoracic Society (BTS) guideline
CURB-65
CUROX-80
Pneumonia Severity Index (PSI)
IDSA/ATS major and minor criteria to define SCAP
Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS)
<i>Selected blood biomarkers</i>
Procalcitonin
C-reactive protein
White blood cell count
Lactate
Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM)
Pro-adrenomedullin (Pro-ADM)
B-natriuretic peptide (BNP)
Troponin I
Thrombocytopenia

Figura 17: Biomarcadores más comúnmente utilizados en NAC. Adaptado de Sungurlu y col. [150].

Urgencias, ayudar a decidir el inicio, el fin y la duración del tratamiento antibiótico e incluso determinar el pronóstico a corto, medio y largo plazo [150] (Figura 17).

Probablemente las primeras iniciativas de utilización de marcadores con capacidad pronóstica en la NAC procedieron del equipo de investigación norteamericano de Fine [151] y del grupo británico de Lim [152]. Ambos grupos desarrollaron a finales de la década de los 90 escalas predictivas elaboradas con variables clínicas y analíticas obtenidas al ingreso –*Pneumonia Severity Index*, PSI y CURB65, respectivamente– que permitían calcular la mortalidad por el episodio y facilitaban la asignación de recursos sanitarios en función de su riesgo [153].

La escala PSI se obtuvo de datos de más de 14 000 pacientes con NAC y fue validada

posteriormente en otra cohorte con pacientes ambulatorios e ingresados de más de 40 000 sujetos [150]. Recoge 20 variables diferentes y clasifica a los pacientes en 5 clases, según estimación progresiva de mortalidad por episodio. Su capacidad pronóstica es buena, pero la inclusión de tantas variables hace que su cálculo no sea sencillo en la práctica clínica diaria. En cambio CURB65 solo consta de 5 variables (4 si excluimos la "U" de nitrógeno ureico en sangre, BUN), pero no es tan sensible como la escala de Fine. En cualquier caso, en la mayoría de los estudios ambas escalas presentan parámetros de sensibilidad y especificidad que no superan el 80% para predicción de mortalidad [150].

Posteriormente se desarrollaron otras escalas clínicas que intentaban mantener la facilidad de cálculo con un buen poder predictivo. Se podría decir que el mejor de estos intentos es la escala española SCAP: a través de 8 variables calculadas en Urgencias (*pH y presión parcial de oxígeno en gasometría arterial, presión arterial sistólica, frecuencia cardiaca, confusión, BUN, edad y extensión radiológica*) esta escala estima

qué pacientes desarrollarán una NAC grave (*NAC que evoluciona a muerte intraingreso, ventilación mecánica y/o shock séptico*), con un AUC de 0,92 (superior a PSI y CURB65) [154]. Pese a su relativa sencillez y capacidad pronóstica, ha sido poco utilizada a nivel internacional.

Otras escalas probadas y con utilidad relativa han sido la de la BTS, precursora de CURB65 (con las variables hipotensión, taquicardia y aumento de BUN) o la escala de la IDSA/ATS, más orientada a la clasificación de pacientes subsidiarios de Cuidados Intensivos (con las variables *necesidad de intubación orotraqueal (IOT), necesidad de aminas vasoactivas, taquicardia, PaFiO2 baja, infiltrado multilobar, confusión, BUN elevado, leucopenia, trombocitopenia, hipotermia o hipotensión refractaria*) [150].

Con la mejor comprensión de la fisiopatología de la NAC y la simplificación de los procesos de medida en el laboratorio pronto aparecieron estudios donde se identificaban moléculas circulantes que se relacionaban con diferentes aspectos de la infección. Estas moléculas, algunas incluso determinadas en analíticas rutinarias, varían sus niveles en función de la gravedad, de la etiología o del pronóstico de la NAC, por lo que muchas de ellas se utilizan comúnmente en la práctica clínica diaria. Estas moléculas reciben el nombre de biomarcadores.

Los biomarcadores más utilizados en la NAC en los últimos años se representan en la Figura 18 [155]; muchos de ellos son muy conocidos en la práctica diaria, como la proteína C-reactiva (PCR), la procalcitonina (PCT) o la proadrenomedulina (proADM). Cabe señalar que algunos biomarcadores de inflamación sistémica [156] (especialmente la PCR, los niveles de neutrófilos en sangre y los niveles de interleuquina-6), puedan explicar de forma más precisa el exceso de riesgo cardiovascular que se observa en los pacientes que han sufrido una neumonía [136,148].

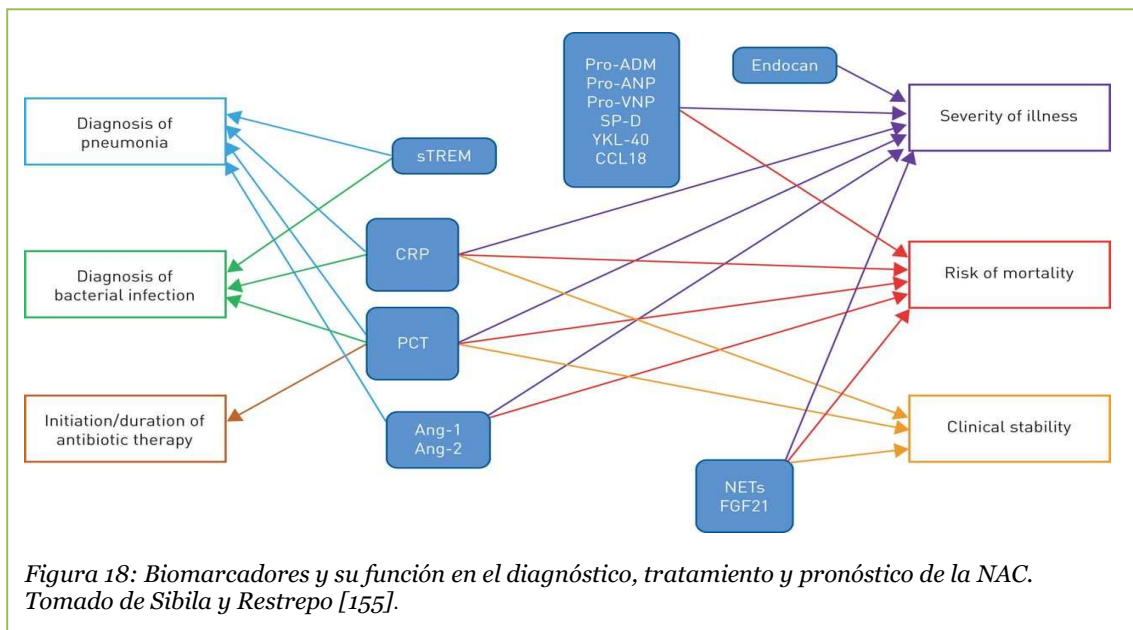


Figura 18: Biomarcadores y su función en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la NAC. Tomado de Sibila y Restrepo [155].



El grupo de investigación del que formo parte lleva años trabajando en la búsqueda de nuevos biomarcadores en la NAC, con importantes resultados en el campo del pronóstico. De hecho, la presente tesis doctoral podría incluirse en esta área de interés, la búsqueda de biomarcadores inflamatorios como predictores de mortalidad y de aparición de eventos cardiovasculares en pacientes ingresados por NAC.

Algunos de los principales resultados del grupo son que el recuento de algunas poblaciones leucocitarias circulantes como el porcentaje de neutrófilos (*neutrophil count percentage*, NCP), o el cociente entre neutrófilos y linfocitos (*neutrophil/lymphocyte ratio*, NLR) en la analítica extraída al ingreso pueden servir como marcadores de mortalidad a corto, medio y largo plazo (1, 3 y 12 meses respectivamente) [157].

Más aún, estos mismos marcadores medidos a los 3-5 días desde el ingreso tienen una capacidad pronóstica para mortalidad a 30 días ( $AUC_{NCP} = 0,83$ ;  $AUC_{NLR} = 0,76$ ) comparable a marcadores tan contrastados como CURB65 ( $AUC = 0,72$ ) o PCR ( $AUC = 0,70$ ) [157]. En este mismo artículo se resumen los trabajos recientes más relevantes sobre biomarcadores y capacidad pronóstica, utilizando como comparadores el área bajo la curva, y enfrentándolos a PSI y CURB65, lo que aporta un conocimiento más completo del tema (Figura 19).

Authors	Year	Outcome variable	Prognosis biomarkers proposed	AUC	AUC PSI	AUC CURB65
Christ-Crain <i>et al.</i> [20]	2006	Treatment failure, even death	proADM	0.73	0.73	
Huang <i>et al.</i> [12]	2009	30-day overall mortality	proADM	0.76	0.83	0.80
Kruger <i>et al.</i> [14]	2010	28-day overall mortality	proADM	0.85		0.73 *
Albrich <i>et al.</i> [27]	2011	30-day overall mortality in respiratory infection	proADM	0.79		0.73
Kolditz <i>et al.</i> [13]	2012	30-day mortality or ICU admission	Copeptin	0.81	0.75	0.57 *
Jager <i>et al.</i> [17]	2012	In-hospital mortality	NLR	0.70		
Courtais <i>et al.</i> [29]	2013	30-day overall mortality	proADM	0.80	0.71	
España <i>et al.</i> [28]	2015	30-day pneumonia-related complications	proADM	0.84	0.83	0.79
Bello <i>et al.</i> [30]	2015	30-day overall mortality	proADM	0.82	0.85	0.82
Curbelo <i>et al.</i> (current study)	2016	30-day overall mortality, in admission blood test	proADM	0.89	0.76	0.72
NCP			0.83			
NLR			0.76			

AUC: area-under-curve; proADM: proadrenomedullin; NLR: Neutrophil/Lymphocyte Ratio; NCP: Neutrophil Count Percentage; PSI: Pneumonia Severity Index; ICU: Intensive Care Unit;  
\* CRB65 (urea not included)

*Figura 19: Relación de estudios sobre biomarcadores y escalas clínicas pronósticas en NAC. Procedente de Curbelo y col. [157].*

Además, recientemente hemos validado el poder pronóstico de NCP y NLR en una cohorte retrospectiva diferente, ajustado por edad, sexo, comorbilidades y gravedad de la neumonía [114].

Por otro lado, el análisis en profundidad de las citoquinas inflamatorias circulantes durante la NAC mostró que la IL-6 en ascenso o persistentemente alta entre el ingreso y

la evolución precoz (3-5 días desde el ingreso) se asocia con la aparición de eventos cardiovasculares mayores (ictus o infarto de miocardio) o muerte a los 30 y 90 días de seguimiento tras el alta, y puede ser utilizada como biomarcador. Llamativamente, esta asociación se mantiene en el análisis multivariante, independientemente de edad, sexo, comorbilidad, gravedad de la neumonía e incluso riesgo cardiovascular basal medido por índice SCORE para países de bajo riesgo [158].

Como se puede concluir, la búsqueda constante de nuevos biomarcadores en los últimos años es debida a que ninguno es perfecto. Se ha tratado de utilizar marcadores probados en otras circunstancias con resultados subóptimos, que no ayudan al clínico a tomar decisiones terapéuticas diferentes. Los pacientes que son hospitalizados por NAC continúan falleciendo más en el siguiente año al ingreso, a pesar de la disponibilidad de mejores biomarcadores, esta tendencia no ha disminuido. Cada vez se conoce más de la fisiopatología de la neumonía, pero los investigadores se han dirigido mayoritariamente a la infección aguda, dejando en un segundo plano la fase de convalecencia.

Por ello, es necesario el estudio de los mediadores moleculares que condicionan la respuesta inflamatoria de la NAC que sean de ayuda para identificar precozmente a los pacientes con más riesgo de sufrir complicaciones, es decir, que puedan usarse con plenas garantías como biomarcadores de uso clínico.

## Hipótesis

La mortalidad durante el episodio de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) no se ha modificado en las últimas décadas.

Los pacientes que requieren ser hospitalizados por NAC presentan un incremento de la mortalidad esperable al año de seguimiento, en comparación con pacientes similares sin neumonía.

La base fisiopatológica que explicaría la mortalidad durante el episodio de NAC y el exceso de mortalidad a largo plazo sería una desregulación en la respuesta inflamatoria. Una respuesta inflamatoria mantenida, puede condicionar la aparición de eventos cardiovasculares, lo que podría explicar el exceso de mortalidad a largo plazo de los pacientes ingresados por un episodio de NAC.

La expresión de microRNAs durante un episodio de NAC modula la respuesta inflamatoria.

Alteraciones de los niveles de microRNAs circulantes relacionados con una inflamación sostenida actúan como mediadores clave de los procesos aterogénicos y se relacionan con la evolución en los pacientes con NAC.

Diferentes patrones de expresión de microRNAs se relacionan con la mortalidad durante el episodio de NAC.

El estudio y caracterización de la expresión de microRNAs durante el proceso agudo de presentación de la NAC posibilitará mejorar la estimación pronóstica de los pacientes hospitalizados por NAC, y es una vía abierta a la intervención terapéutica preventiva.

## Objetivos

### **Objetivo principal**

Determinar la capacidad como marcadores pronósticos –mortalidad intraingreso, a 30 días y a un año– de una selección de microRNAs circulantes en pacientes ingresados por neumonía adquirida en la comunidad.

### **Objetivos secundarios**

- Caracterizar el perfil de expresión de miRNAs circulantes al ingreso en pacientes hospitalizados por NAC.
- Estudiar la asociación de una selección de miRNAs circulantes con el desarrollo de ictus o infarto agudo de miocardio durante el primer año tras el ingreso por NAC.
- Relacionar la causa etiológica con un patrón de miRNAs circulantes al ingreso en pacientes hospitalizados por NAC.
- Comparar la capacidad pronóstica de esos miRNAs circulantes con la de escalas clínicas pronósticas habituales en NAC, CURB-65 y *Pneumonia severity index*.

## Material y métodos

### **Diseño del estudio.**

Estudio observacional longitudinal, sobre una cohorte prospectiva de pacientes con diagnóstico de Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC), ingresados al menos 24 horas entre octubre de 2013 y julio de 2015 en el Hospital Universitario de La Princesa, hospital terciario de referencia para 300 000 habitantes en el noreste de Madrid.

### **Criterios de inclusión y exclusión.**

Se consideraron candidatos para ser incluidos en el estudio a todos aquellos pacientes mayores de 18 años diagnosticados de NAC en el servicio de Urgencias, cuyo diagnóstico principal al ingreso fuera dicho motivo. Aquellos pacientes cuya gravedad preveía su fallecimiento en las primeras 24 horas, fueron desestimados. Los pacientes ingresados durante el fin de semana, cuya primera analítica en planta de hospitalización fuera 24 horas después de su llegada a Urgencias e inicio del tratamiento, también fueron excluidos. Los pacientes con infección VIH no controlada o con otra enfermedad crónica inflamatoria activa (por ejemplo, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, durante un brote), o bien con cualquier causa de inmunodepresión grave conocida (por ejemplo, neoplasias hematológicas) no fueron incluidos, al considerar que su estado inmunológico basal podría estar alterado.

Tres pacientes fallecieron en las primeras 72 horas de hospitalización, y fueron excluidos del análisis final.

### **Definiciones.**

El diagnóstico de NAC se estableció por la presencia de síntomas de infección del tracto respiratorio inferior junto a la aparición de un infiltrado nuevo en la radiografía de tórax y ausencia de diagnóstico alternativo durante el seguimiento, según definición diagnóstica habitual [74]. La decisión de hospitalización fue tomada por personal médico de acuerdo a las recomendaciones de las guías ATS/IDSA en vigor en ese momento [75].

*Mortalidad.* La clasificación de causas atribuibles de mortalidad se hizo por consenso, agrupando las causas posibles en seis tipos principales: (1) Relacionada con el proceso

infeccioso agudo, (2) Relacionada con evento cardiovascular, (3) Relacionada con neoplasia concomitante, (4) Relacionada con otra comorbilidad previa diferente a las señaladas, (5) Accidente o suicidio, (6) Otras causas diferentes a las anteriores. Los casos de muerte súbita, teniendo en cuenta que la principal causa estimada es la aparición de eventos cardiovasculares mayores (IAM, ictus y TEP principalmente [159]), fueron considerados como de etiología cardiovascular.

*Enfermedad cardiovascular.* La definición de evento cardiovascular fue la actualmente aceptada por la comunidad científica, incluyendo los siguientes diagnósticos: (1) Infarto agudo de miocardio, (2) Angina inestable, (3) Descompensación grave (con hospitalización) de insuficiencia cardiaca, o primer episodio, (4) Ictus (isquémico o hemorrágico), (5) Accidente isquémico transitorio (AIT), (6) Tromboembolismo pulmonar (TEP), (7) Trombosis venosa profunda (TVP), (8) Arritmia cardiaca, empeoramiento clínico que requiere atención urgente o nueva aparición, (9) Patología aórtica aguda (disección, rotura de aneurisma, o necesidad de intervención quirúrgica urgente), y (10) Isquemia arterial aguda distal.

Sin embargo, la definición de evento cardiovascular mayor es más controvertida. Para tratar de unificar resultados, múltiples estudios han utilizado variables combinadas que incluyen sólo los eventos graves de diagnóstico inequívoco [160]. En nuestro estudio, utilizamos la variable combinada MACE (*Major Adverse Cardiovascular Events*), descrita como aparición de ictus isquémico o infarto agudo de miocardio dentro del año de seguimiento. Esta definición es similar a la utilizada en otros estudios actuales de alto impacto [161,162].

Del mismo modo, para calcular el riesgo cardiovascular basal se ha empleado el Índice SCORE para países de bajo riesgo, para todos los pacientes menores de 65 años, siguiendo la última guía de prevención de Enfermedad Cardiovascular de la Sociedad Europea de Cardiología (Guías CVD de la ESC de 2016) [163]. Siguiendo esta misma guía, se ha corregido el riesgo estimado según determinados antecedentes de riesgo, asignando a los pacientes un riesgo de base "alto" o "muy alto", según correspondía (por ejemplo, el antecedente de enfermedad renal crónica identificaba al paciente al menos como de "alto riesgo", independientemente del cálculo por edad, tabaquismo y factores de riesgo cardiovascular clásicos). Una de las limitaciones del índice SCORE es el limitado rango de edad que abarca, poco ajustado a la edad media de nuestra cohorte de pacientes con NAC. Por ello, para los pacientes mayores de 65 años se ha utilizado la corrección de SCORE para pacientes mayores (*SCORE Older People*, O.P.), según se propone en el artículo de Cooney *y col.* [164].

*Comorbilidad y estado basal.* Para valorar la carga de comorbilidad existen múltiples índices, validados en diferentes cohortes clínicas. En nuestro estudio se ha utilizado el

*Índice de Comorbilidad de Charlson modificado*, según ponderación propuesta por Bordón y col., validada en una cohorte de pacientes con NAC en 2010 [165]. La vida basal del paciente previa al ingreso se ha calculado según el *Índice de Barthel*, conocida escala de valoración funcional, también validada para pacientes con NAC [166].

Muchas de estas definiciones y el compendio de variables utilizadas en este trabajo están recogidas en el artículo sobre metodología publicado por nuestro grupo de investigación en el año 2014 [167].

## **Variables del estudio**

El factor de estudio, variable independiente principal, lo forman los distintos microRNAs que analizamos en este trabajo, y que serán comentados posteriormente.

Las variables dependientes de respuesta de este estudio son (1) la mortalidad por cualquier causa durante los primeros 30 días tras el ingreso por NAC, (2) la mortalidad durante el primer año, y (3) la aparición de un evento MACE en ese mismo periodo.

La lista del resto de variables independientes y/o confusoras es la siguiente:

- (1) Variables sociodemográficas: edad, sexo, raza, lugar de residencia (domicilio en institución de cuidados o en propio domicilio).
- (2) Variables clínicas y presencia de comorbilidades: tabaquismo (índice paquete/año y situación actual), consumo de alcohol (gramos de alcohol/semana), hipertensión arterial (HTA), dislipemia, diabetes mellitus, obesidad (IMC >30 Kg/m<sup>2</sup>), enfermedad arterial periférica (sintomática o asintomática, índice tobillo-brazo > 1,3 o < 0,9), enfermedad cerebrovascular previa (ictus establecido o accidente isquémico transitorio - AIT), enfermedad renal crónica (estimación del filtrado glomerular < 60 ml/min y/o albuminuria >30 mg/g), hepatopatía crónica, enfermedad neoplásica activa (tanto hematológica como de órgano sólido), cardiopatía isquémica, tromboembolismo pulmonar (TEP) o trombosis venosa profunda (TVP) previos, neumonía previa, fibrilación auricular y/o historia de insuficiencia cardiaca. Ingresos previos en UCI. Cálculo de la carga de comorbilidad a través del índice de Barthel. Medicación habitual, situación vacunal (antecedente de vacunación para el virus de la gripe en el último año y/o vacunación para el neumococo en los últimos 10 años).
- (3) Características del proceso infeccioso: índices de gravedad de la NAC, escala CURB65, escala CRB65, criterios de gravedad IDSA-ATS y escala PSI, cumplimiento de

los criterios de sepsis y/o shock séptico, presencia de afectación multilobar, derrame pleural y/o empiema, antecedente de tratamiento antibiótico previo.

(4) Parámetros en analítica rutinaria al ingreso: recuento leucocitario, niveles de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, urea, creatinina, iones.

(5) Marcadores moleculares experimentales en sangre periférica: procalcitonina (PCT), proteína C reactiva (PCR), proadrenomedulina (proADM).

(6) Resultados microbiológicos: hemocultivos positivos, antigenurias positivas, resultados de muestras respiratorias.

## Seguimiento

Los pacientes fueron invitados a acudir a una visita de seguimiento al mes de la finalización del proceso infeccioso, aunque la mayor parte no asistieron, debido a que muchos de ellos estaban institucionalizados o tenían problemas de movilidad. La situación vital y la aparición de complicaciones cardiovasculares se determinaron a partir de los informes médicos generados en el H.U. La Princesa en el año posterior a la neumonía, a partir de visitas rutinarias de seguimiento por especialistas de referencia y a partir de visitas urgentes. Además, se consultó la historia clínica en Atención Primaria a través del sistema de información *Horus* de la Comunidad de Madrid, previa identificación. Los pacientes cuya información clínica era incompleta fueron contactados telefónicamente 15 meses después del proceso neumónico, preguntando específicamente por la aparición de complicaciones cardiovasculares. Dos pacientes no pudieron ser contactados telefónicamente ni se consiguió información suficiente a través de la historia clínica hospitalaria; se determinó que habían fallecido después del ingreso, a partir de información suministrada por el Instituto Nacional de Estadística.

## Recogida y procesamiento de muestras de sangre

De todos los pacientes incluidos en el estudio, se extrajo una muestra de sangre en las primeras 24 horas de ingreso.

Posteriormente se llevó a cabo un procesamiento inicial, separando plasma, suero y sangre total, ésta última utilizada para el análisis de las subpoblaciones linfocitarias. Al menos se conservaron 2 ml. de plasma y 2 ml. de suero de ambas determinaciones de todos los pacientes, alicuotadas en viales de 500  $\mu$ L cada uno. Todas las muestras se registraron en el Biobanco del H.U. de La Princesa y fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



## Flujo experimental

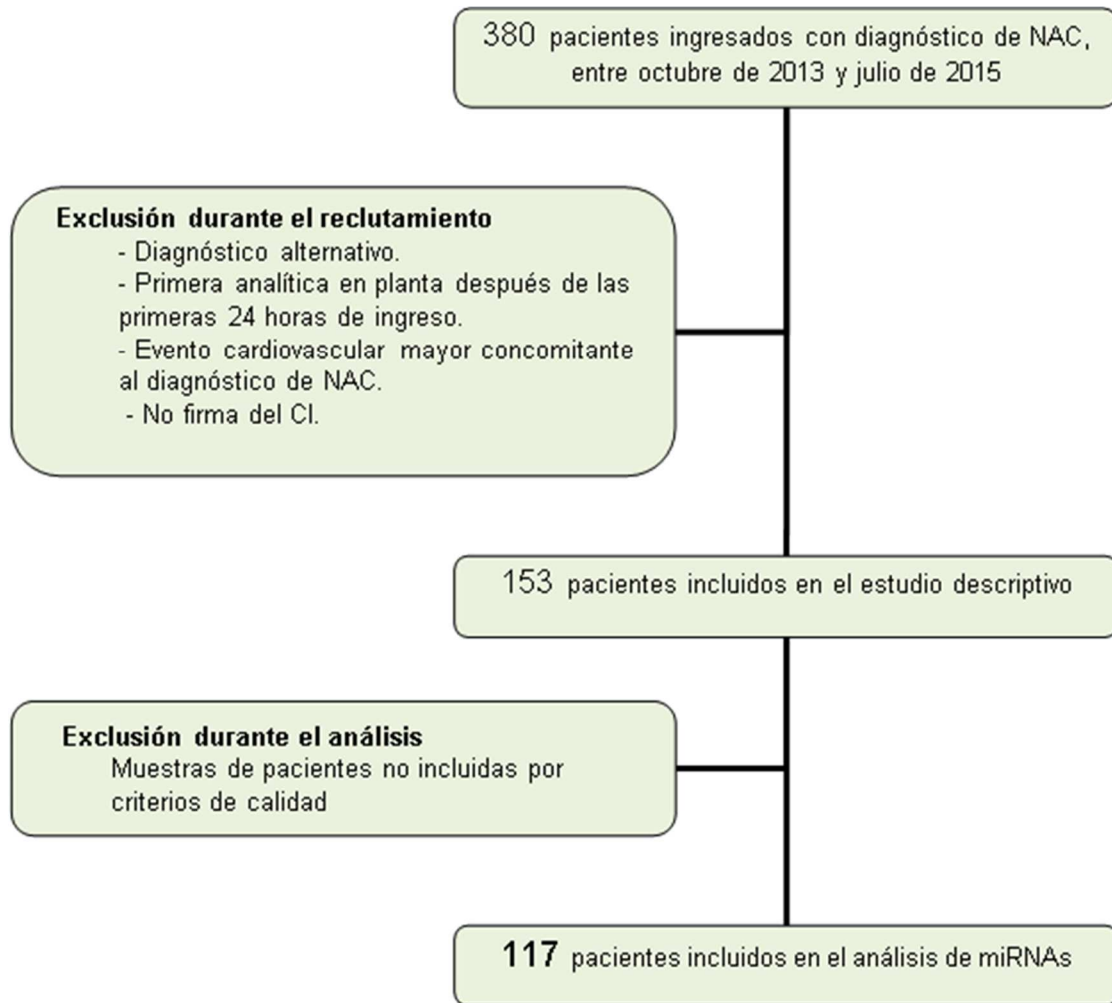


Diagrama 1: Flujo experimental

## MEDIDA DE microRNAs

### Elección del tipo de muestra biológica

Como se ha comentado en la introducción, los miRNAs pueden ser liberados al torrente sanguíneo libres asociados a ribonucleoproteínas o dentro de vesículas extracelulares, como por ejemplo exosomas. Sin embargo, aún se debate si las vesículas extracelulares contienen cantidades biológicamente significativas de miRNAs, y si son fuentes mejores para determinar biomarcadores que el plasma completo [168]. Un interesante artículo de Chevillet *y col.* demostró mediante un análisis estequiométrico que la mayoría de los exosomas individuales no tienen un número biológicamente

significativo de miRNAs, y por lo tanto, es poco probable que funcionen como vehículos para la comunicación célula a célula basada en miRNAs [169]. Otro trabajo del mismo grupo demostró que la mayoría de miRNAs circulantes son transportados por complejos de proteínas en lugar de por vesículas, y que los complejos circulantes de Ago2 son el mecanismo más importante de estabilidad de los miRNAs plasmáticos [41]. Además, aunque el diagnóstico mediante miRNAs con subcomponentes sanguíneos (por ejemplo, vesículas extracelulares) tiene gran potencial futuro, actualmente el conocimiento sobre la cantidad de miRNAs en vesículas es limitado y las demandas técnicas de aislar los miRNAs transmitidos por vesículas complicarían la implantación de este método en la atención clínica rutinaria [170].

Por otro lado, quedaba la duda de utilizar suero o plasma. En este sentido, algunos estudios comparativos en pacientes sanos recomiendan la utilización de plasma como tipo de muestra a elegir para medir miRNAs circulantes, debido a que se ha visto que se libera RNA durante la formación del coágulo al obtener el suero, lo que podría cambiar el repertorio de miRNAs circulantes reales [171]. Además, muchos de los trabajos más recientes sobre miRNAs en sepsis han usado plasma para su determinación [172,173].

Por tanto, para este trabajo se eligió plasma completo como muestra biológica a partir de la cual determinar miRNAs.

### **Extracción de RNA**

Existen diferentes métodos de extracción de RNA de pequeño tamaño, aunque cada método presenta ventajas e inconvenientes [174]. En nuestro caso, se utilizó el sistema de extracción con columnas semipermeables comercializado por Exiqon (miRCURY™ RNA Isolation Kits-Biofluids), siguiendo la recomendación de colaboradores de nuestro instituto de investigación (IIS-IP), con amplia experiencia en el uso de microRNAs en enfermedades autoinmunes [175]. Este sistema presentaba la ventaja de haber sido ampliamente utilizado con éxito por otros investigadores [176], y de tener una mayor sensibilidad en plasma, al detectar controles exógenos de extracción (*spike-in*) a menores ciclos de retrotranscripción respecto a otros kits comerciales [177].

De forma resumida, se usaron 250 µl. de plasma congelado y se depositaron en una columna con una membrana semipermeable; la adición de determinadas sustancias químicas y su posterior centrifugación conseguía ir decantando partes de la muestra indeseadas (proteínas, DNA y RNA no micro), dejando los RNAs de pequeño tamaño adheridos a la membrana. En el último paso, se eluyó el producto final con 80 µl. agua

destilada libre de RNAsas, consiguiendo superar la membrana, recogiendo el total de RNA de pequeño tamaño en un tubo tipo *ependorfl* limpio final.

### **Retrotranscripción y amplificación a cDNA**

Para el proceso de amplificación y retrotranscripción (RT) a *complementary DNA* (cDNA) se utiliza el kit comercial de Exiqon miRCURY RT kit. Tras diferentes pruebas preliminares, se decidió llevar a cabo la reacción a partir de 4 µl. de la muestra de RNA previamente extraída (*in-put*) por cada 10 µl. totales. Durante este proceso se añadió el *spike-in* UniSp6; se descartó añadir cel-miR-39-3, sí recomendado por el fabricante, al constatar en las pruebas iniciales la baja variabilidad en los niveles de UniSp6 entre diferentes tandas de retrotranscripción, y su buena capacidad discriminadora como control único de RT. Tras la amplificación, el cDNA resultante fue disuelto en proporción 1:40 en agua destilada libre de RNAsas.

### **Determinación de la expresión de miRNAs mediante rt-PCR**

Una vez obtenida la colección de cDNA procedente de los RNAs de pequeño tamaño de cada paciente, se procedió a determinar la expresión de miRNAs seleccionados mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt-PCR). Esta técnica se basa en un termociclador acoplado a un espectrofluorómetro en el que utilizando un agente intercalante fluorescente de hibridación bicatenaria (SYBR®Green) cuya fluorescencia, que aumenta proporcionalmente con el aumento en la cantidad de DNA, nos permite cuantificar en tiempo real el número de copias generadas en cada ciclo de amplificación. Para este proyecto utilizamos el aparato CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System de Bio-Rad (Roche), disponible en el Instituto de Investigación Sanitaria del H.U. de La Princesa.

El aumento de la fluorescencia que sobrepasa la fluorescencia basal (umbral o *threshold*) se considera como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo, y se puede calcular por la representación de la curva de fluorescencia. Las muestras con mayor concentración inicial de sustrato muestran un ciclo umbral más precoz, esto es un *cycle threshold* (Ct) más bajo; en cambio las muestras con menor concentración tienen un Ct mayor.

Dado que la consecución de un ciclo de retrontranscripción se corresponde con una duplicación del material genético, la diferencia entre ciclos en Cts se representa en una

escala exponencial en cuanto a concentración inicial. Por tanto, inicialmente se determinaron los Cts de los miRNAs seleccionados de todos los pacientes, siendo necesaria después una transformación lineal de los datos para facilitar su posterior normalización y análisis estadístico.

Los datos crudos de Cts son importantes, puesto que parte de los controles de calidad (tal como se recoge en el apartado próximo) se llevaron a cabo con estos resultados. Además, siguiendo las recomendaciones vigentes respecto a la calidad mínima de los datos [178], se han incluido los valores crudos de Cts de cada miRNA testado en este proyecto en un repositorio de acceso libre.

### **Transformación lineal y determinación de cantidades relativas de miRNAs**

La cantidad relativa de cada miRNA se estableció mediante el diferencial de Cts entre el punto umbral del miRNA y el punto umbral de UniSp2 para esa muestra [179]. Así, el término matemático utilizado fue:

$$\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{UniSp2}$$

Partiendo de ese cálculo, la fórmula de transformación lineal utilizada, según la derivada de  $2^{-\Delta Ct}$  propuesta por Livak y col. [180], y teniendo en cuenta una eficiencia de la reacción del 100%, fue:

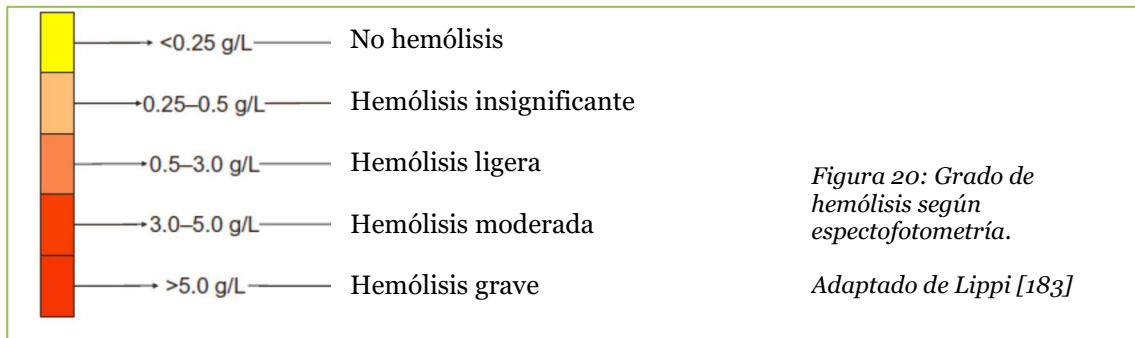
$$2^{-\Delta Ct}$$

Una vez llevada a cabo la transformación lineal, los valores resultantes representan el número de veces que la cantidad relativa de cada miRNA se duplicó respecto a UniSp2; en inglés, *fold changes* (FC). Esta forma de exposición de resultados es habitual en trabajos con miRNAs circulantes [181].

### **Control de calidad**

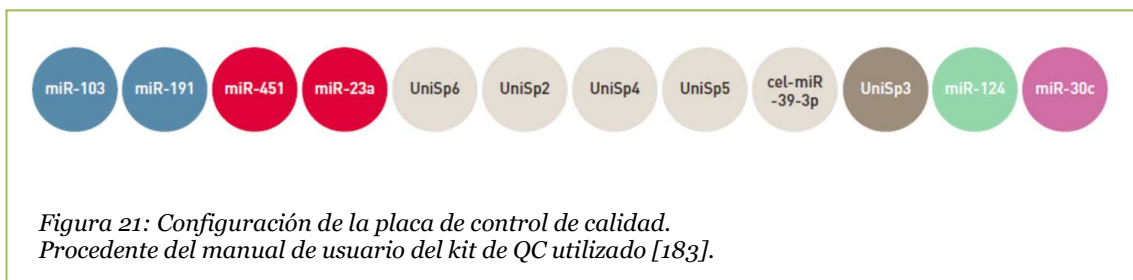
Todas las muestras fueron sometidas a varios controles de calidad.

El primer control, durante la selección de las alícuotas de plasma, fue excluir aquellas con hemólisis evidente (hemólisis ligera o mayor, según escala visual). Esta consideración es debida a la alta concentración de algunos miRNAs (miR-16 y miR-451) dentro de los glóbulos rojos, lo que puede condicionar la correcta medida de la concentración de miRNAs circulantes [182].



En todas las demás, se procedió a comprobación mediante espectrofotometría con NanoDrop® (Figura 20); aquellas que presentaban un pico de longitud de onda en 414 nm, característico de hemólisis, fueron excluidas.

El segundo control se llevó a cabo mediante realización de placas de control de calidad, también de la empresa Exiqon (miRCURY LNA Universal microRNA PCR, 32 Ready-to-use microRNA QC PCR Panels, supplied in one 384-well plate, referencia 203891), en la que mediante placas precargadas se evaluaban distintos miRNAs endógenos y sintéticos, añadidos durante el proceso de extracción y amplificación a cDNA.



De forma resumida, el miR-103, el miR-191, y el miR-30c son miRNAs relativamente estables en todas las muestras de plasma evaluadas, y el ciclo umbral (Ct) donde se observan se encuentra entre el 25 y el 30 en la población general; el miR-124 no se expresa en plasma (sí en suero), por lo que constituye un control negativo del experimento; el miR-451 es muy abundante dentro de los hematíes mientras que el miR-23a no lo es en absoluto, por lo que su diferencial se usa para determinar la presencia de hemólisis inadvertida respecto a técnicas previamente aplicadas [184].

Respecto a los UniSp, son miRNAs exógenos añadidos en diferentes momentos de la purificación y medida del RNA, que sirven para valorar la calidad de cada proceso por separado. En este sentido UniSp2, UniSp4 y UniSp5 son añadidos durante la extracción, y su diferencia de concentración es de 100 veces entre cada uno de ellos, de forma que UniSp2 es el más abundante y se espera que su Ct se encuentre en torno a

20, UniSp4 tenga un Ct en torno a 26 y UniSp5 tenga un Ct en torno a 32; UniSp6 y cel-miR-39-3p son añadidos durante la retrotranscripción a cDNA y su Ct esperado se encuentra en torno a 20-22; UniSp3 se encuentra directamente hibridado en la placa, se espera que su Ct sea de 20, y es marcador del proceso de RT-PCR de la propia placa de QC en sí misma [183].

Para evitar cualquier sesgo en el análisis de calidad se solicitó colaboración para analizar las placas de QC en un centro externo, la Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid, en Cantoblanco. La responsable de este proceso fue la Dra. Isabel Lavera, y el trabajo de laboratorio tuvo lugar en marzo de 2018. Recibidos los resultados de este control de calidad, se procedió al control de la validez de las muestras.

Primeramente, y de acuerdo con las recomendaciones del manual del usuario de Exiqon [183] se excluyeron aquellas muestras con indicios de hemólisis, esto es, aquellos cuya diferencia entre miR-23a y el miR-451 superaba los 7 ciclos.

A continuación se valoraron las diferencias de Cts de los spike-in entre muestras: aquellas muestras cuyo Ct de UniSp2 fuera 2,5 ciclos por encima o 2,5 ciclos por debajo de la mediana del conjunto de la muestra fueron excluidas; también fueron excluidas aquellas muestras cuyo valor Ct para UniSp4 fuera 2,5 ciclos por encima o 2,5 ciclos por debajo de la mediana del conjunto. Respecto a UniSp5, y dada su mayor dificultad de determinación en plasma, se decidió poner el límite en 2 desviaciones estándar (correspondiente a 38,86 Ct): aquellas muestras cuyo valor de Ct estaba por encima de este punto, fueron también excluidas.

Posteriormente se analizaron las diferencias entre spikes de extracción intramuestra; siguiendo el manual, aquellas muestras cuyos diferenciales (UniSp4 - UniSp2) y (UniSp5 - UniSp4) fueron mayores de 7 ciclos o menores de 5 ciclos, fueron excluidos. Finalmente se comprobó que la homogeneidad de la RT mediante la medida de UniSp6 entre muestras, excluyendo aquellas muestras por encima de 2,5 Cts o por debajo de 2,5 Cts de la mediana del conjunto.

El resultado de este control de calidad fue la exclusión de 36 pacientes con muestras de calidad insuficiente.

A continuación se detalla pormenorizadamente el número de muestras excluidas según criterio de calidad (Tabla 1).

*Tabla 1: Muestras excluidas según criterios de calidad*

Proceso analizado	Criterio	Muestras que no lo superan	Restantes
Hemólisis	(miR-451 - miR-23a) > 7 Cts	6	147
Extracción del RNA: diferencias entre muestras	UniSp2 < 2,5 Cts o > 2,5 Cts respecto a la mediana	14	133
Extracción del RNA: diferencias entre muestras	UniSp4 < 2,5 Cts o > 2,5 Cts respecto a la mediana	2	131
Extracción del RNA: diferencias entre muestras	UniSp5 > 38,86 Cts (2 DE) o no detectable	8	123
Extracción del RNA: diferencias dentro de cada muestra	Resta (UniSp4 - UniSp2) > 7 Cts o < 5 Cts.	5	118
Extracción del RNA: diferencias dentro de cada muestra	Resta (UniSp5 - UniSp4) > 10 Cts o < 5 Cts.	1	117
RT a cDNA: diferencias entre muestras	UniSp6 < 2,5 Cts o > 2,5 Cts respecto a la mediana	0	117

Para resumir, en la página siguiente se muestra un diagrama completo de los procesos de recolección de la muestra, extracción de RNA, retrotranscripción a cDNA, controles de calidad y selección de muestras óptimas, para finalmente proceder a la determinación de miRNAs mediante rt-PCR.

### **ELECCIÓN DE miRNAs CANDIDATOS y NORMALIZACIÓN**

Una vez optimizado el proceso de extracción de RNA y de determinación de miRNAs, y tras pasar todos los controles de calidad, estuvo todo dispuesto para la elección de miRNAs candidatos. De forma resumida, la estrategia seguida fue:

- Primero llevar a cabo un estudio exploratorio con pocos pacientes y un gran número de miRNAs, mediante microarrays.
- Estudio final con toda la cohorte de pacientes y unos pocos miRNAs candidatos potencialmente útiles, bien por criterios estadísticos (a partir del estudio exploratorio), bien por criterios científicos.



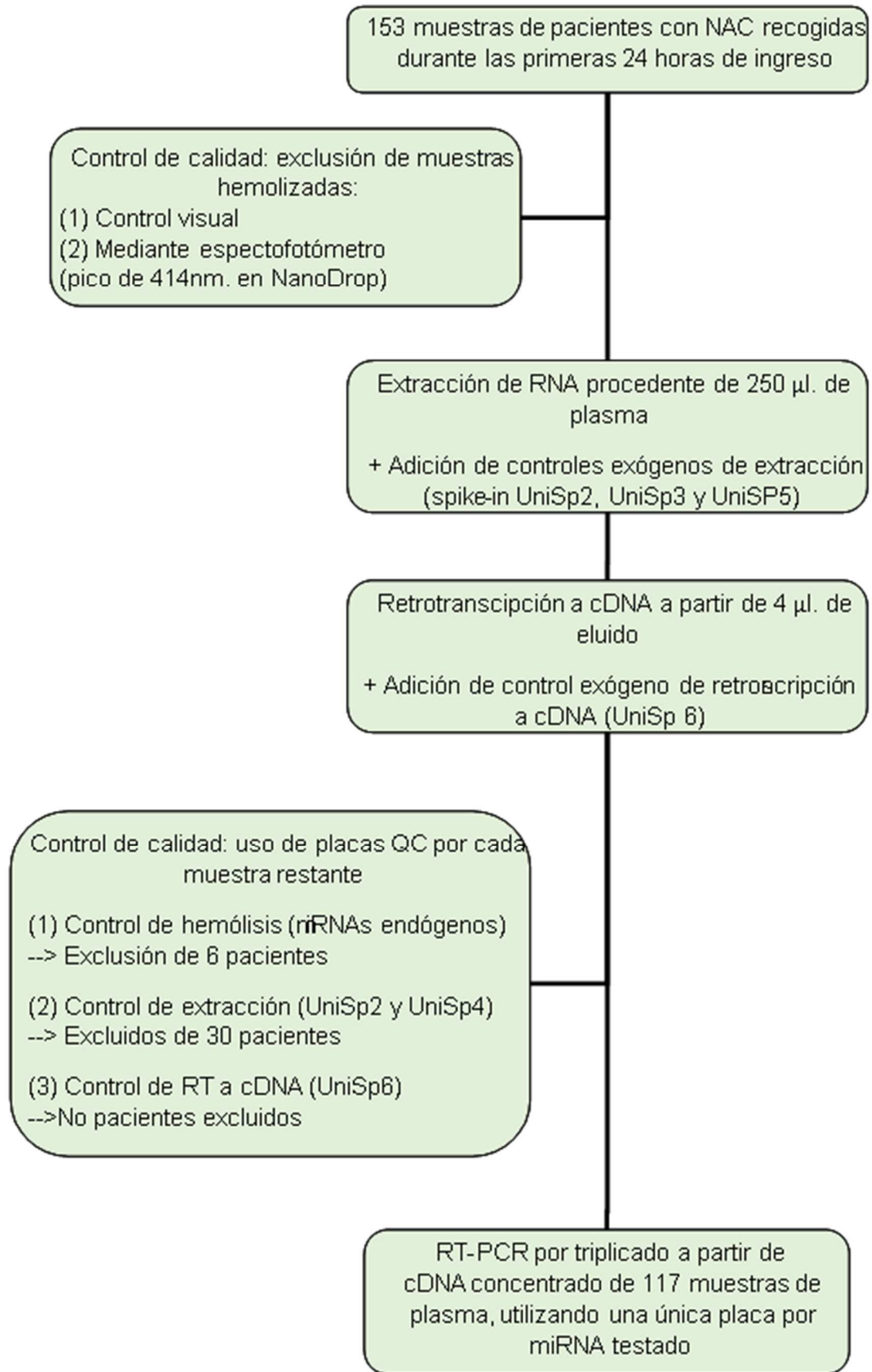


Diagrama 2: Flujo de procesamiento de los miRNAs, incluyendo recolección de la muestra, extracción de RNA, retrotranscripción a cDNA, controles de calidad y selección de muestras óptimas

## Normalización

Uno de los problemas para la medida de los microRNAs es su pequeño tamaño y su bajísima concentración relativa: los miRNA circulantes totales se encuentran en el rango femtomolar, y el plasma, el suero y otros biofluidos contienen solo unos pocos nanogramos por microgramo de RNA, lo que no permite establecer la cantidad inicial total de microRNA en la muestra [177]. Por tanto, las técnicas de control de calidad habituales en la extracción de RNA, como la electroforesis capilar, la fluorimetría y la espectrometría son inútiles. Además, se sabe que no todos los miRNAs detectados en biofluidos son miRNAs circulantes, dado que procesos como la hemólisis pueden contaminar la muestra [185]. Por último, existen inhibidores de la transcriptasa interna y enzimas ribonucleasas –RNAsas– que pueden permanecer en la muestra pese a los procesos de exclusión durante la extracción, y que pueden alterar la concentración original en miRNAs de la muestra [177,186].

Por ello, dada la imposibilidad de conocer la concentración inicial de miRNAs por muestra, las cantidades de entrada se estandarizan según el volumen inicial en lugar de la cantidad. Para ello, se comienza con el mismo volumen de biofluido en cada paso, utilizando el mismo volumen de RNA purificado para todas las muestras [187].

Además, es imprescindible aplicar un sistema de corrección para equiparar los resultados entre las diferentes muestras. Este sistema de corrección se denomina normalización, y existen muchos métodos válidos y reconocidos para llevarlo a cabo, aunque ninguno se ha constituido como *gold standard* [188] (Figura 22).

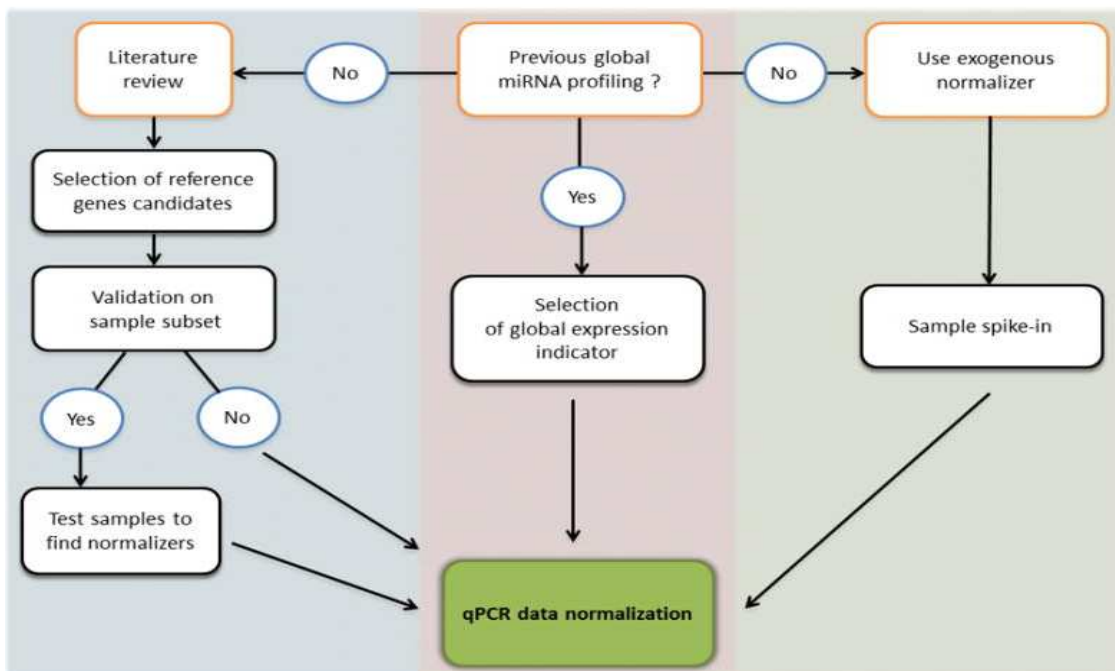


Figura 22: Diferentes modelos de normalización según Schwarzenbach y col. [189]

Tal y como recomienda la literatura actual, para el estudio exploratorio con unos pocos pacientes y un gran número de miRNAs candidatos el método utilizado ha sido el de la *Global Mean* modificado. Este método, descrito por D'haene *y col.* [189], consiste en tres pasos sucesivos:

- (1) descartar para el análisis posterior todos los valores de Ct por encima de un cierto umbral, por considerarlos "ruido",
- (2) linealizar en ese momento las cantidades relativas (*Relative Quantities*, RQs) según una escala logarítmica en base 2, esto es  $2^{-Ct \text{ miRNA individual}}$ ,
- (3) calcular un factor de normalización específico de muestra (*Normalization Factor*, NF), como la media geométrica de todos los RQs de todos los miRNAs de cada muestra individual,
- (4) convertir los RQs en RQ normalizados (NRQs) dividiendo los RQs por cada NF específico de muestra.

En nuestro caso, consideramos por encima de umbral a aquellos Cts de miRNAs por encima del promedio del *spike-in* menos abundante, el UniSp5, con un valor en torno a 38 ciclos, y la linealización a RQ tuvo en cuenta el *spike-in* exógeno UniSp2, de forma que:

$$RQ = 2^{-(Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ UniSp2})}$$

Todo este proceso se facilitó mucho al estar implementado dentro del software específico para análisis de RT-PCR, *Biogazelle's qbase PLUS software*, versión 2.0, disponible en nuestro laboratorio.

Una vez llevada a cabo la normalización, fueron los NQRs obtenidos mediante este proceso (*GM modificada*) los utilizados para llevar a cabo la comparación estadística preliminar con 8 muestras de pacientes, descrita en el siguiente apartado.

No obstante, la estrategia de normalización mediante GM no era la más conveniente para el análisis final de miRNAs, puesto que en este caso contábamos con 117 pacientes y una estimación logística de poder probar no más de 25 miRNAs como biomarcadores.

Por tanto, se hacía necesario la utilización de otra de las grandes estrategias de normalización descrita en la literatura, la de ajuste por *Targets of References* (TOR).

El modelo utilizado esta vez fue una versión modificada de lo propuesto por Marabita y *col.* [179]. Según estos autores, la mejor forma de normalizar es calcular un NF a partir de la media geométrica de un subgrupo de miRNAs endógenos que hayan demostrado especial estabilidad entre las diferentes muestras.

Para poder elegir estos miRNAs, se han desarrollado diferentes algoritmos implementados en aplicaciones informáticas, siendo probablemente los más conocidos *geNorm* [190] y *Normfinder* [191]; de hecho, *GeNorm* está actualmente incluido dentro del software *qbase plus*, antes mencionado.

*GeNorm* es un algoritmo que identifica los miRNAs de referencia más estables de una lista de candidatos cuantificados en un grupo de muestras mediante el cálculo del promedio de la comparación dos a dos de las desviaciones estándar de los RQs de los miRNAs entre muestras; a este promedio se le denomina puntuación de estabilidad (M), y cuanto más alto (más promedio de desviaciones), menos estable se considera el candidato. El algoritmo actúa eliminando el miRNA candidato con puntuación más alta, y repitiendo el proceso con el resto de candidatos, de forma que al final se obtiene un par de candidatos considerados como los más estables (o un grupo reducido de los mismos si el proceso no se agota).

*Normfinder* es un modelo basado en la variabilidad inter-miRNA y también intermuestra, sobre las varianzas de los RQs linealizados, que de forma combinada proporciona un valor de estabilidad (que representa la medida del error sistemático del miRNA candidato).

Otra medida posible de estabilidad es simplemente el cálculo de los coeficientes de variación (CVs) de cada miRNA, dividiendo desviación estándar de todos los RQs ya linealizados de un miRNA, entre su media aritmética en toda la muestra; de esta forma, cuanto menor sea su CV, mayor será su estabilidad.

Conociendo estos valores de estabilidad de cada método, Marabita propone que los mejores miRNAs para utilizar como TOR serían aquellos con promedio ponderado (*summarized stability score*, SSS) más bajo, más estables. Así, proponen esta fórmula:

$$SSS = \sqrt{(Score_{geNorm})^2 + (Score_{Normfinder})^2 + (Score_{CV})^2}$$

Basados en esta aproximación, y tras calcular los valores M por estos 3 métodos, nuestra propuesta de TOR fue encontrar un pequeño grupo de miRNAs que funcionara tan bien como la *GM modificada* para la primera prueba exploratoria con los

*microarrays*, y que además pudiera determinarse sin contratiempos en el conjunto de muestras de la cohorte total de pacientes. Esto significaba que el NF obtenido de la GM modificada debería ser equiparable al NF obtenido a partir de la selección de TOR.

Tras múltiples pruebas, se seleccionaron 4 candidatos: miR-23b-3p (muy estable según geNorm y Normfinder), mir-23a-3p (muy estable según geNorm), miR-25-3p (estable según geNorm y método CV) y miR-103-3p (estable según geNorm y Normfinder).

Tras ello, se confrontaron los NF de cada muestra según resultados de la *Global Mean* con la media geométrica de los RQs de los TOR seleccionados como estables, encontrando un buen índice de correlación R, mayor de 0,9 (Gráfico 1).

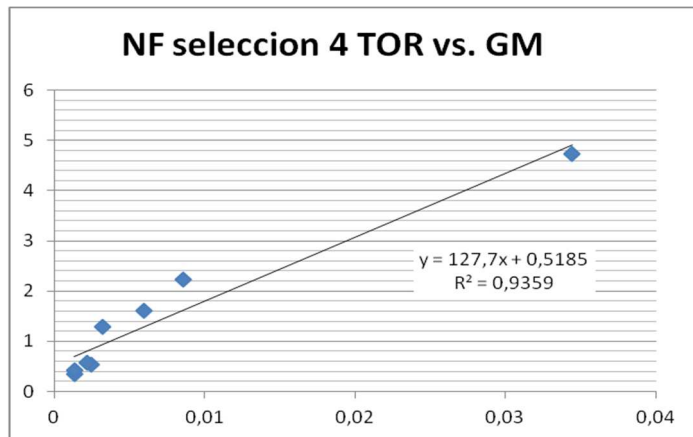


Gráfico 1: correlación del factor de normalización según media geométrica de los 4 miRNAs seleccionados respecto al factor de normalización obtenido por Global Mean

Confrontados esos NF de 4 TOR con los NF calculados según mejor aproximación de algoritmo geNorm, la correlación fue realmente buena,  $R > 0,99$  (Gráfico 2).

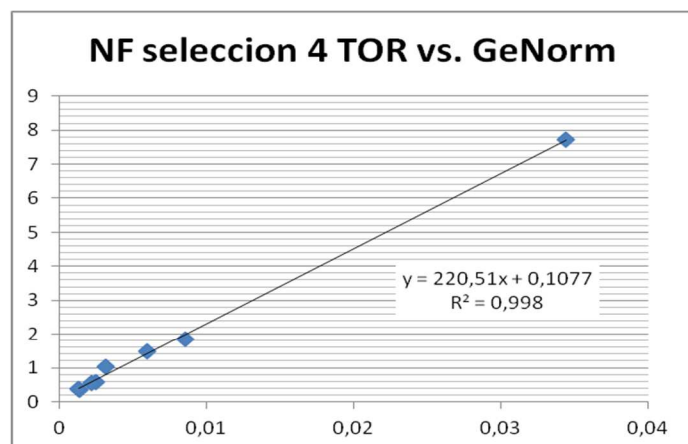


Gráfico 2: correlación del factor de normalización según media geométrica de los 4 miRNAs seleccionados respecto al factor de normalización obtenido según algoritmo GeNorm

Por tanto, se asumieron como estables estos miRNAs, para ser determinados en el conjunto de la muestra, no para ser probados como biomarcadores, sino con el objetivo exclusivo de ser utilizados como normalizadores endógenos en el análisis final.

Además, se incluyó un 5º candidato, el miR25-3p (muy estable según NormFinder), que finalmente no pudo ser utilizado en la normalización sobre la gran cohorte al no expresarse en un gran número de muestras de pacientes.

A continuación se muestra el diagrama 3, donde se resume del proceso global de normalización.

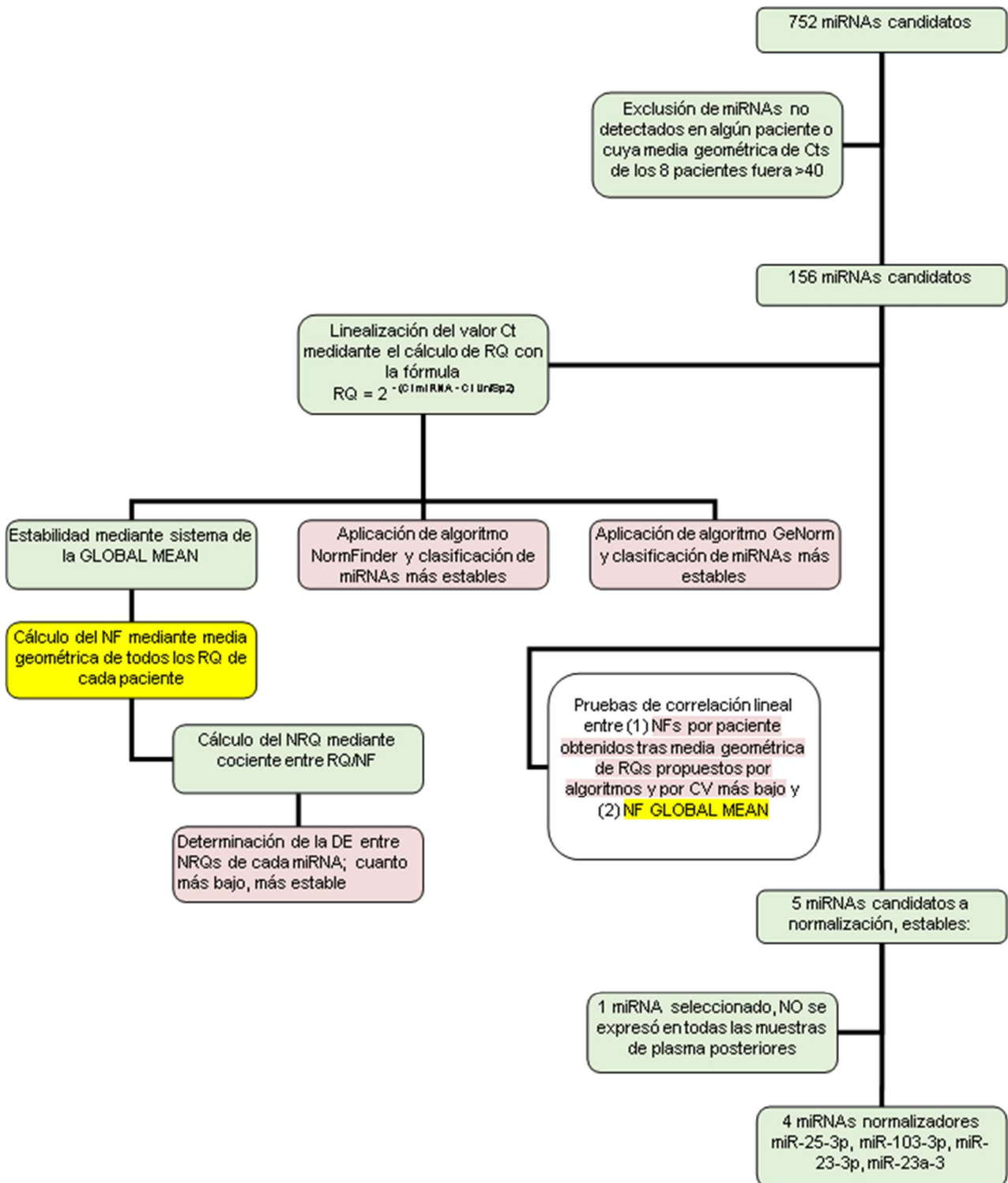


Diagrama 3: Resumen del proceso de normalización. En verde, cada uno de los procesos llevados a cabo y subtotales de pacientes no excluidos. En salmón, aplicación de algoritmos de normalización. En amarillo, cálculo del factor de normalización según global mean.



## Elección de miRNAs candidatos

Aparte de los seleccionados como normalizadores, la elección de miRNAs candidatos finales vino motivada por criterios científicos y estadísticos.

### ***Determinación de miRNAs con capacidad discriminativa en el análisis preliminar: búsqueda no condicionada***

El número de miRNAs circulantes identificados en humanos se ha ido incrementando en los últimos años: según trabajos recientes, se han detectado de forma estable más de 500 tipos diferentes, con más de 100 moléculas consideradas como buenas candidatas para ser usadas como biomarcadores, por su escasa variación entre medidas y por su estabilidad [192].

Por ello, nos pareció conveniente hacer una primera búsqueda de candidatos mediante placas presembradas con un gran número de *primers*, en una pequeña muestra representativa de toda nuestra cohorte. Para ello, utilizamos las placas de array de 384 pocillos de la marca Exiqon, *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Ready-to-Use Human Panel I V4 y Panel II V4*, capaces de testar hasta 712 miRNAs endógenos diferentes, más varios miRNAs exógenos (*spike-in* y otros) con el objetivo de poder llevar a cabo su propio control de calidad y normalización posterior.

Las muestras elegidas para esta prueba fueron 8, categorizadas por edad, sexo y gravedad de la NAC medida por CURB65, incluyendo 4 muestras de pacientes con aparición de las variables desenlace durante el seguimiento (2 fallecidos, 1 ictus y 1 IAM), y 4 muestras de pacientes que no tuvieron eventos durante el seguimiento.

Una vez elegidas las muestras, se compararon las principales variables clínicas y desenlace con las del resto de la muestra, no hallando diferencias estadísticamente significativas.

De los 712 miRNAs probados, solo 156 miRNAs fueron detectados con Cts <40 en las 8 muestras analizadas. Las 2 placas de microarrays contenían primers para UniSp2, por lo que se hizo una media geométrica de sus ciclos, utilizando ese valor para linealizar los resultados según fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  anteriormente descrita.

Los resultados de esos 156 miRNAs ya linealizados fueron normalizados según el método de la *Global Mean* (explicado anteriormente), más adecuado para situaciones en las que se miden un gran número miRNAs en pocos sujetos de estudio (proyectos preliminares con *microarrays*, como éste). Además, se normalizaron de forma complementaria con 4 *Targets of Referenec (TOR)*, propuestos como estables a partir de varios algoritmos, y futuros candidatos a normalizadores para la cohorte completa.

Los resultados normalizados de esos miRNAs fueron comparados, confrontando aquellas muestras de pacientes con eventos durante el seguimiento con muestras de pacientes sin eventos (4 vs. 4). Las cantidades relativas de miRNAs hsa-miR-141-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-874-3p y hsa-miR-1471 en plasma –normalizados según ambas estrategias (GM y 4 TOR)– resultaron ser estadísticamente diferentes entre ambos grupos (prueba de la T de Student). Estos 5 miRNAs obtenidos de este primer análisis estadístico fueron los seleccionados para el análisis final con el total de la muestra.

### **Búsqueda en la literatura de miRNAs relacionados con infección y complicaciones cardiovasculares: búsqueda condicionada**

Se llevó a cabo una búsqueda sistemática de toda la literatura relacionada a fecha 1 de enero de 2018, a través del buscador científico pubmed, dependiente del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) estadounidense.

Las palabras clave fueron miRNA y enfermedad cardiovascular, junto con los términos infección, neumonía, sepsis e inflamación. Dado que el proyecto es clínico, se decidió añadir el filtro de estudios en humanos; de todos los artículos hallados, se descartaron aquellos que no tenían una versión completa en inglés. También se descartaron artículos sobre protocolos y revisiones.

Por tanto, la búsqueda bajo estas condiciones fue la siguiente:

*mirna [MESH] AND cardiovascular disease [MESH] AND inflammation [MESH] AND "humans"[MeSH Terms] AND English[lang]*

*mirna [MESH] AND cardiovascular disease [MESH] AND infection [MeSH Terms] AND "humans"[MeSH Terms] AND English[lang]*

*mirna [MESH] AND cardiovascular disease [MESH] AND sepsis [MESH] AND "humans"[MeSH Terms] AND English[lang]*

*mirna [MESH] AND cardiovascular disease [MESH] AND pneumonia [MESH] AND "humans"[MeSH Terms] AND English[lang]*

Además, solo los estudios sobre plasma/suero o sobre cultivos leucocitarios fueron analizados. Los miRNAs que demostraban una asociación entre enfermedad cardiovascular (de cualquier tipo) e infección/inflamación/sepsis/neumonía fueron seleccionados como posibles candidatos.

A continuación (Tabla 2), se muestra un resumen con los resultados de las búsquedas:

Búsqueda miRNAs + enfermedad cardiovascular	+ inflamación		+ infección		+ sepsis		+ neumonía	
	164	16	10	10	5	1		
+ filtro humanos	123	10	5	5	3	1		
+ filtro inglés	120	9	4	4	3	1		
+ filtro sólo originales	65	5	3	3	3	1		
Publicaciones encontradas y miRNAs con resultados significativos	PLoS One. 2017 Nov 22;12(11):e0188530.	miR-195	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR	Int Immunopharmacol. 2017 Apr;45:6-12.	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR	Circulation. 2012 Nov;27:126(22):2601-11.	MODELO ANIMAL
	Diabetes. 2017 Aug;66(8):2266-2277.	let-7 family						
	Cell Physiol Biochem. 2017;41(4):1535-1571	miR-9						
	Mol Cell Biochem. 2017 Jul;431(1-2):123-131	miR-145-5p		miR-21	J Neuro Sci. 2016 Jul 15;366:235-239			
	Diabetes. 2017 Jun;66(6):1671-1682	miR-21						
	Int Immunopharmacol. 2017 Apr;45:6-12.	miR-135a			Liver Int. 2015 Apr;35(4):117-2-84	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR	
	Cell Physiol Biochem. 2016;40(6):1692-1705	miR-155			Liver Int. 2015 Apr;35(4):1172-84.	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR		
	Vascul Pharmacol. 2017 Jan;88:48-55	miR-126						
	Hum Gene Ther. 2016 Nov;27(11):926-935.	MODELO ANIMAL						
	J Transl Med. 2016 Jul 13;14(1):211	miR-145			J Clin Invest. 2012 Jun;122(6):1973-90	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR	INCLUIDO EN BÚSQUEDA ANTERIOR	
	FASEB J. 2016 Sep;30(9):3216-26.	miR-181b						
	Eur J Heart Fail. 2016 Dec;18(12):1442-1451	MIRNAs en TEJIDO		REVISIÓN	Forensic Sci Int. 2010 Dec 15;203(1-3):3-14.			
	Biomed Pharmacother. 2016 Jul;81:337-44	MODELO ANIMAL						

\* continúa en las páginas siguientes

<p>Publicaciones encontradas y miRNAs con resultados significativos</p>	<p>PLoS One. 2016 Jun 3;11(6):e0157085.</p>	<p><b>miR-27</b></p>
	<p>Int J Mol Sci. 2016 Mar; 17(3): 305.</p>	<p><b>miR-164a, 335</b></p>
	<p>Med Hypotheses. 2016 Mar;88:57-9.</p>	<p>PROTOCOLO</p>
	<p>Int J Mol Sci. 2016 Jan 12;17(1).</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>Cell Death Dis. 2015 Dec 31;6:e2033.</p>	<p><b>miR-199a</b></p>
	<p>Mol Med Rep. 2016 Feb;13(2):1618-26.</p>	<p>MODELO ANIMAL</p>
	<p>Cardiovasc Res. 2016 Feb 1;109(2):228-39</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>Med Sci Monit. 2015 Nov 14;21:3505-13.</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>J Am Coll Cardiol. 2015 Nov 17;66(20):2214-2226.</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>Cell Physiol Biochem. 2015;36(4):1371-81.</p>	<p><b>miR-155</b></p>
	<p>Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015 Sep;309(5).</p>	<p><b>miR-126</b></p>
	<p>J Cell Mol Med. 2015 Sep;19(9):2202-14.</p>	<p><b>miR-222</b></p>
	<p>Basic Res Cardiol. 2015 May;110(3):32.</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>Int J Mol Sci. 2015 Apr 2;16(4):7413-27</p>	<p><b>miR-21</b></p>
	<p>Biomed Res Int. 2015;2015:846501</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>J Am Soc Nephrol. 2015 Nov;26(11):2860-70</p>	<p><b>miR-634</b></p>
	<p>FASEB J. 2015 May;29(5):1859-68.</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>J Biol Chem. 2015 Feb 27;290(9):5328-40.</p>	<p><b>miR-147</b></p>
	<p>Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015 Jan;35(1):7-8</p>	<p>EDITORIAL</p>
	<p>Nat Commun. 2014 Oct 31;5:5214.</p>	<p><b>miR-24</b></p>
	<p>Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015 Jan;35(1):87-101.</p>	<p><b>miR-382-5p</b></p>
	<p>J Clin Neurosci. 2015 Feb;22(2):291-5.</p>	<p><b>miR-124, 9</b></p>
	<p>Liver Int. 2015 Apr;35(4):1172-84.</p>	<p><b>miR-122</b></p>
	<p>Thromb Haemost. 2014 Oct;112(4):781-8.</p>	<p><b>miR-146a</b></p>
	<p>J Am Soc Nephrol. 2014 Dec;25(12):2717-29.</p>	<p>MIRNAs en TEJIDO</p>
	<p>PLoS One. 2014 Apr 14;9(4):e94997.</p>	<p><b>miR-144-3p</b></p>
	<p>Expert Rev Cardiovasc Ther. 2014 Mar;12(3):311-21.</p>	<p>REVISIÓN</p>
	<p>Atherosclerosis. 2014 Apr;233(2):349-56.</p>	<p><b>miR-15a</b></p>
	<p>Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Apr;34(4):759-67</p>	<p>MODELO ANIMAL</p>
	<p>Nat Commun. 2013;4:3000.</p>	<p>MODELO ANIMAL</p>
<p>Circ Res. 2014 Jan 3;114(1):32-40.</p>	<p><b>miR-181b</b></p>	
<p>Circulation. 2013 Sep 24;128(13):1420-32.</p>	<p>MODELO ANIMAL</p>	

Publicaciones encontradas y miRNAs con resultados significativos	Pharmacol Res. 2013 Jun;72:69-82.	<b>miR-21, 181b, 663, 30c2, 155, 34a</b>
	Curr Opin Lipidol. 2013 Apr;24(2):187-8.	EDITORIAL
	Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Feb;33(2):168-9.	EDITORIAL
	PLoS One. 2012;7(11):e46551.	<b>miR-155</b>
	Mech Ageing Dev. 2012 Nov-Dec;133(11-12):675-85.	<b>miR-21</b>
	Clin Dev Immunol. 2012;2012:567586	<b>miR-34b/c</b>
	Age (Dordr). 2013 Aug;35(4):1157-72.	<b>miR-146a</b>
	J Clin Invest. 2012 Jun;122(6):1973-90	<b>miR-181b</b>
	Thromb Haemost. 2012 Apr;107(4):619-25.	MIRNAs en TEJIDO
	Sci Transl Med. 2012 Feb 22;4(122):122ra22.	MIRNAs en TEJIDO
	Aging (Albany NY). 2011 Dec;3(12):1178-91.	ANALISIS INFORMÁTICO
	Dis Markers. 2011;31(5):259-65.	MIRNAs en TEJIDO
	Cell Mol Immunol. 2011 Nov;8(6):486-95.	<b>miR-155, 21, 146a</b>
	Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jun 1;16:3133-45.	ANALISIS INFORMÁTICO
	Atherosclerosis. 2011 Apr;215(2):286-93.	MODELO ANIMAL
	Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Aug;30(8):1500-1	EDITORIAL
	Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jul 27;107(30):13450-5.	MODELO ANIMAL
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Aug;30(8):1562-8.	MIRNAs en TEJIDO	
Immunol Cell Biol. 2010 Jul;88(5):555-64.	<b>miR-146a</b>	

Tabla 2: Compendio de referencias bibliográficas sobre miRNAs y enfermedad cardiovascular, sepsis y/o neumonía

Finalmente, 25 miRNAs candidatos fueron los seleccionados para el análisis final:

- 5 destinados a ser utilizados como normalizadores.
- 5 seleccionados por criterios estadísticos, a partir del estudio exploratorio con microrarrays.
- 15 seleccionados a partir de una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre miRNAs, sepsis, inflamación y/o enfermedad cardiovascular, primando aquellos que aparecían en un mayor número de publicaciones o en revistas de más alto impacto.

A continuación, se muestra una tabla resumen (Tabla 3), de este proceso de selección de candidatos.

<b>Tabla 3: Selección de miRNAs candidatos</b>	
<i>Abordaje no condicionado</i>	Criterio utilizado
hsa-miR-141-3p	Estadísticamente significativos tras aplicación de dos métodos preliminares de normalización (método de la Global Mean y Genorm con 4 mejor TOR)
hsa-miR-107	
hsa-miR-17-5p	
hsa-miR-874-3p	
hsa-miR-1471	
<i>Abordaje condicionado</i>	Criterios utilizados
hsa-miR-21	miRNAs descritos en 2 o más artículos sobre inflamación y eventos cardiovasculares
hsa-miR-155	
hsa-miR-146a	
hsa-miR-181b	
hsa-miR-144-3p	Citado <i>pubmed</i> y significativo tras normalización GN
hsa-miR-483-5p	miRNAs descritos en 2 o más artículos sobre sepsis y mortalidad
hsa-miR-451a	
hsa-miR-16-5p	
hsa-miR-486-p	
hsa-miR-10b-5p	miRNA relacionado con riesgo cardiovascular
hsa-miR-20a	miRNAs citados en algún artículo como biomarcador y/o sepsis y/o infección, unido a relativa abundancia en plasma
hsa-miR-27a-5p	
hsa-miR-34a-3p	
hsa-miR-125b	
hsa-miR-106b-5p	
<i>Normalizadores propuestos</i>	Criterio
hsa-miR-421	GeNorm (3º) + Coeficiente de Variación (1º)
hsa-miR-103a-3p	GeNorm (9º) + NormFinder (6º)
hsa-miR-23b-3p	GeNorm selección (1º) + NormFinder (9º)
hsa-miR-23a-3p	GeNorm selección (2º)
hsa-miR-25-3p	NormFinder (1º)

### Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo de la cohorte de pacientes con NAC se calcularon media y desviación estándar (DE) para las variables cuantitativas homocedásticas, y mediana y



rango intercuartílico para las variables cuantitativas heterocedásticas; la exploración de la normalidad se realizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y el análisis de homocedasticidad de las muestras se llevó a cabo mediante el test de Levene. En el caso de las variables cualitativas se calculó proporción y n.

El análisis de la asociación de las distintas variables independientes cuantitativas con la incidencia acumulada de las variables dependiente principales se llevó a cabo mediante la prueba de la t de Student para varianzas iguales o desiguales, según fuera necesario, y para variables cualitativas el test de  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher. Para el análisis de correlación de los miRNAs candidatos se utilizó el test de Pearson (representado gráficamente mediante *heat-map*), y el test de correlación de Spearman.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis univariante y multivariante mediante la construcción de modelos de regresión logística (para mortalidad a 30 días), con el propósito de estudiar las posibles variables confusoras e intermedias. Todos los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos para las conclusiones, aunque se utilizó otro umbral ( $p \leq 0,10$ ) en los procesos de selección de variables, siguiendo el principio de parsimonia. La selección del modelo más parsimonioso se realizó con el Likelihood-Ratio test (LR test).

La capacidad predictiva del modelo estimado así como la comparación con las escalas ya establecidas se calculó mediante curvas ROC y posterior comparación entre áreas bajo la curva (AUC). Además, se llevó a cabo una comparación de modelos pronósticos mediante el índice de mejoría de la discriminación (*Integrated Discrimination Improvement, IDI*) y el índice de mejoría de la reclasificación (*Net Reclassification Improvement, NRI*) [193].

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante los programas Stata v15 y R v3.5.2, con la colaboración decisiva de la Unidad de Metodología del Instituto Princesa (IIS-IP).

## Principios éticos

A todos los pacientes y/o responsables legales se les explicó el estudio, se les entregó la hoja de información, y en todos los casos firmaron el consentimiento informado (CI). La participación en este estudio comenzó únicamente después de que el investigador hubo informado de la naturaleza del proyecto, de sus objetivos, riesgos, inconvenientes y beneficios, requisitos y obligaciones, confidencialidad y riesgos específicos contemplados en la legislación, con el fin de proteger su integridad. Ninguna prueba complementaria relacionada con este estudio se llevó a cabo antes de la firma del CI. Se facilitó a los pacientes una copia de la hoja de información así como del CI. En el caso

de incapacidad legal o manifiesta por criterios clínicos para la comprensión de la naturaleza del estudio y/o firma de ese consentimiento, se pidió autorización a la persona responsables al cargo, (habitualmente un familiar), que tuvieron que firmar asimismo el CI en su versión para representante legal.

En relación con la confidencialidad, se hizo un esfuerzo para proteger el anonimato de los pacientes que participaron en el proyecto. El investigador asignó a cada paciente un código alfanumérico correlativo de identificación destinado a proteger su identidad. Los datos quedaron registrados en un archivo, al que solo tuvieron acceso los investigadores.

Previamente al inicio del reclutamiento, el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de La Princesa (registro PI-823, de 2015) (aprobación incluida como Anexo 1). Este estudio se llevó a cabo respetando los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki (última modificación, Fortaleza 2013), las recomendaciones relativas a la Buena Práctica Clínica, y la legislación local y nacional vigentes. En todo momento se aseguró la confidencialidad de los datos de acuerdo con la LOPD 15/1999.

En relación con la conservación de las muestras, inicialmente fueron recogidas en una colección de muestras debidamente registrada en el Biobanco del Instituto de Investigación Princesa a nombre del Dr. Javier Aspa. Una vez finalizado el estudio, dado que inicialmente no estaba contemplado en el proyecto, se solicitó aprobación y fue aprobado por el Comité de Investigación y por el Comité de Ética de la Investigación su donación al Biobanco de dicho centro de forma desinteresada (C.0003431, aprobado el 24 de marzo de 2015). Actualmente, esas muestras debidamente anonimizadas pueden ser utilizadas por otros investigadores interesados.

### **Política de Datos Abiertos**

Siguiendo las recomendaciones internacionales de *Research Data Management (RDM)*, y cumpliendo la solicitud de la plataforma *Open Access* donde ha sido publicado este trabajo (*PLoS Journals*), todos los datos crudos generados durante el desarrollo de este proyecto están disponibles públicamente mediante licencia Creative Commons Atribución/Reconocimiento 4.0 (Licencia Pública Internacional – CC BY 4.0) en el repositorio gratuito Zenodo.org en la siguiente dirección:

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3930832>

## Resultados

### Descripción de las variables sociodemográficas y clínicas

Un total de 153 pacientes fueron reclutados. La edad media fue de 75,68 años, con una mayoría de hombres (58,2%), casi todos caucásicos (97,4%)

Pocos eran alcohólicos activos o exalcohólicos (8,5%), mientras que la mayoría tenían historia previa de tabaquismo (65,1%), con una prevalencia de EPOC elevada (31,4%). El factor de riesgo cardiovascular más frecuente fue la hipertensión arterial (58,17%), y la comorbilidad cardiovascular más frecuente fue la insuficiencia cardíaca congestiva (18,9%). El índice de Charlson modificado fue de 3,12 puntos (elevado) y el índice de SCORE-OP, para países de bajo riesgo también fue elevado (riesgo a 10 años del 7%).

Un poco más de un cuarto tomaban estatinas y antiagregantes y hasta un 17,6% tenían algún grado de demencia.

Se pueden consultar la lista completa de variables sociodemográficas y clínicas recogidas en la Tabla 4.

Tabla 4: Variables sociodemográficas y clínicas	TOTAL n=153	
	%	n
Edad (años) ( $\bar{X}$ / DE)	75,68	16,13
Sexo (varón)	58,17	89
Raza (caucásica)	97,39	149
<b>Hábitos de vida y vacunación</b>		
Enolismo (activo o pasado)	8,50	13
Tabaquismo (activo o pasado)	65,10	99
Tabaquismo IPA ( $\bar{X}$ / DE)	27,24	29,66
Vacunación neumococo	41,33	62
Vacunación gripe último año	62,00	93
<b>Antecedentes personales</b>		
HTA	58,17	89
DM	16,34	25
Hipercolesterolemia	32,68	50
Obesidad	42,48	65
AIT	4,58	7
Ictus	11,76	18
Cardiopatía isquémica	8,50	13
Insuficiencia cardíaca	18,95	29
ETEV	1,96	3
ERC	14,38	22
Hepatopatía crónica	3,27	5
EPOC	31,37	48
EPOC GOLD IV-V	7,89	9
Asma	5,23	8
Infección por VIH	5,88	9
Neoplasia sólida	9,15	14
Leucemia	0,65	1
Linfoma	1,96	3
I. de Charlson modificado ( $\bar{X}$ / DE)	3,12	2,94
I. SCORE de RCV ( $\bar{X}$ / DE)	7,00	4,69
<b>Tratamiento habitual</b>		
Broncodilatadores (cualquier tipo)	33,33	51
Corticoesteroides orales	3,97	6
Estatina	29,14	44
Antiagregante	26,14	40
<b>Situación funcional</b>		
Institucionalizado	7,84	12
Deterioro cognitivo	17,65	27
Desnutrición	11,11	17
Historia de broncoaspiración	8,50	13

I: Índice; IPA: Índice paquete-año; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; ERC: enfermedad renal crónica; ETEV: enfermedad tromboembólica venosa; RCV: riesgo cardiovascular

## Descripción de las principales variables dependientes

De acuerdo con los objetivos del proyecto, se analizaron posteriormente las diferentes variables dependientes; los resultados descriptivos se muestran a continuación:

<b>Tabla 5: Variables dependientes (n =153)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Aparición de ictus isquémico durante 1 año	2	1,3
Aparición de síndrome coronario agudo durante 1 año	6	3,9
Fallecimiento a los 30 días	13	8,5
Fallecimiento a 1 año	37	24,2
Etiología neumococo	17	11,1

## Descripción de miRNAs técnicamente analizables y análisis univariante

No todos los microRNAs seleccionados como candidatos fueron medibles con garantías en el conjunto de pacientes; de los 25 miRNAs candidatos, 11 fueron descartados para el análisis final al no ser suficientemente abundantes en alguno o varios pacientes.

Así, el miR-421, uno de los candidatos para ser utilizado como normalizador, fue descartado al expresarse en plasma con Ct < 38 ciclos en sólo 86 pacientes. Por la misma razón se excluyeron el miR-141-3p (válido en solo 60 muestras de pacientes), el miR-874-3p (102), el miR-1471 (109), el miR-155 (91), el miR-181b (95), el miR-483-5p (111), el miR-451a (110), el miR-10b-5p (105), el miR-27a-5p (105) y el miR-125b (válido en solo 114 muestras de pacientes).

Se hizo un último abordaje intentando analizar si la ausencia de alguno de estos miRNAs podría relacionarse con alguna variable resultado. Los resultados (no mostrados en este texto), no mostraron ninguna asociación, por lo que se abandonó esta línea de análisis.

Finalmente los miRNAs con datos válidos para el análisis fueron: miR-103a-3p, miR-23b-3p, miR-23a-3p y miR-25-3p como normalizadores, y los siguientes como candidatos a biomarcador:

hsa-miR-107	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-21	hsa-miR-144-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-miR- 486	hsa-miR-20a	hsa-miR-34a-3p
hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-146a	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-125b

## Representatividad de los pacientes seleccionados para análisis de miRNAs respecto a la cohorte completa

A los 153 pacientes reclutados se les extrajo una muestra de sangre y se inició el proceso de extracción de RNA de pequeño tamaño. Tras la finalización del proceso sólo 117 muestras fueron consideradas válidas para el análisis de miRNAs; las otras 36 no pasaron el control de calidad, tal y como se describe en *Material y Métodos*.

El grupo de 117 pacientes con muestras válidas no era diferente en su conjunto del grupo de 36 pacientes con muestras no válidas, y por tanto podemos afirmar que es representativo de la muestra y que se trata de una pérdida aleatoria. Para poder llegar a esta conclusión, se compararon las principales variables sociodemográficas y de resultado entre ambos grupos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de esta comparación se muestran a continuación (Tabla 6).

Tabla 6: Comparación de variables entre pacientes incluidos y pacientes excluidos según calidad de la muestra	TOTAL n=153		Exclusión por motivos técnicos				p-valor*
			PASAN CONTROL DE CALIDAD n=117		NO PASAN CONTROL DE CALIDAD n=36		
	%	n	%	n	%	n	
Edad ( $\bar{X}$ / DE)	75,68	16,13	74,68	15,93	78,94	16,54	0,167
Sexo (varón)	58,2	89	59,0	69	55,6	20	0,716
Enolismo (activo o pasado)	8,5	13	10,3	12	2,8	1	0,159
Tabaquismo (activo o pasado)	65,1	100	67,5	79	58,3	21	0,311
Deterioro cognitivo	17,7	27	16,2	19	22,2	8	0,410
I. de Charlson modificado ( $\bar{X}$ / DE)	3,12	2,94	2,91	2,99	3,81	2,68	0,112
I. SCORE-OP de RCV ( $\bar{X}$ / DE)	7,42	4,69	7,11	4,46	8,42	5,27	0,144
Escala de Fine (PSI) ( $\bar{X}$ / DE)	103,00	35,16	100,93	34,63	109,72	36,52	0,191
Escala CURB-65 ( $\bar{X}$ / DE)	2,78	1,09	2,69	1,10	3,08	1,00	0,059
Etiología <i>Strept. Pneumoniae</i>	11,1	17	12,8	15	5,6	2	0,225
Mortalidad a 30 días	11,8	18	9,4	11	19,4	7	0,102
Mortalidad a 1 año	24,2	37	23,9	28	25,0	9	0,896
MACE a 1 año	40,5	62	41,0	48	38,9	14	0,819
PSI: Pneumonia Severity Index; MACE: Major Adverse Cardiovascular Events							
Variables cuantitativas: media y DE ; Variables cualitativas % y n							
* Variables cualitativas: test chi-cuadrado. Variables cuantitativas: t-test para varianzas iguales.							

### Comparación de niveles de miRNAs según variables dependientes: mortalidad, eventos cardiovasculares y etiología.

Inicialmente buscamos la asociación entre miRNAs y mortalidad tanto a 30 días (Tabla 7) como a 1 año desde el ingreso (Tabla 8).

Tabla 7: asociación entre miRNAs y mortalidad a 30 días	Total (n=117)		Mortalidad a 30 días						p*
	media	DE	No (n=106)		Si (n=11)		Dif medias	IC95% Dif medias	
			media	DE	media	DE			
hsa-miR-107	0,17	0,08	0,17	0,08	0,19	0,09	-0,02	[-0,08-0,03]	0,343
hsa-miR-17-5p	0,67	0,23	0,69	0,22	0,56	0,27	0,13	[-0,01-0,27]	0,074
hsa-miR-21	3,00	1,42	2,97	1,45	3,26	1,05	-0,28	[-1,18-0,61]	0,529
hsa-miR-144-3p	4,08	3,98	4,04	4,06	4,46	3,17	-0,42	[-2,93-2,08]	0,740
<b>hsa-miR-16-5p</b>	50,19	40,26	51,74	41,76	35,23	14,91	16,52	[4,17-28,87]	<b>0,010</b>
hsa-miR-486	1,29	1,24	1,32	1,29	0,99	0,63	0,33	[-0,14-0,81]	0,159
hsa-miR-20a	0,65	0,29	0,67	0,28	0,52	0,38	0,15	[-0,03-0,33]	0,099
hsa-miR-34a-3p	0,02	0,03	0,01	0,03	0,03	0,05	-0,02	[-0,05-0,01]	0,223
hsa-miR-106b-5p	2,01	1,19	2,02	1,23	1,88	0,70	0,14	[-0,61-0,89]	0,709
<b>hsa-miR-146a</b>	1,02	1,78	1,10	1,85	0,23	0,14	0,86	[0,5-1,23]	<b>&lt;0,001</b>
hsa-miR-483-5p	0,02	0,04	0,01	0,04	0,04	0,08	-0,03	[-0,08-0,03]	0,285
hsa-miR-125b	0,03	0,06	0,03	0,04	0,07	0,17	-0,04	[-0,16-0,08]	0,453

\* t-test para varianzas iguales o desiguales, según fuera necesario

Tabla 8: asociación entre miRNAs y mortalidad a 1 año	Total (n=117)		Mortalidad a 1 año						p*
	media	DE	No (n=89)		Si (n=28)		Dif medias	IC95% Dif medias	
			media	DE	media	DE			
hsa-miR-107	0,17	0,08	0,17	0,01	0,17	0,08	0,00	[-0,04-0,03]	0,809
hsa-miR-17-5p	0,67	0,23	0,69	0,22	0,61	0,05	0,08	[-0,02-0,18]	0,097
hsa-miR-21	3,00	1,42	2,96	1,34	3,11	1,67	-0,15	[-0,76-0,46]	0,626
hsa-miR-144-3p	4,08	3,98	3,92	3,93	4,59	4,14	-0,67	[-2,37-1,04]	0,442
hsa-miR-16-5p	50,19	40,26	51,84	42,41	44,97	32,65	6,87	[-8,41-22,15]	0,372
hsa-miR-486	1,29	1,24	1,29	1,30	1,30	1,07	-0,01	[-0,55-0,52]	0,962
hsa-miR-20a	0,65	0,29	0,67	0,29	0,60	0,30	0,07	[-0,05-0,2]	0,261
hsa-miR-34a-3p	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,06	-0,02	[-0,04-0,01]	0,187
hsa-miR-106b-5p	2,01	1,19	2,01	1,27	2,01	0,91	-0,01	[-0,52-0,51]	0,984
hsa-miR-146a	1,02	1,78	1,13	1,95	0,66	1,01	0,47	[-0,29-1,23]	0,223
hsa-miR-483-5p	0,02	0,04	0,01	0,04	0,02	0,05	-0,01	[-0,03-0,01]	0,501
hsa-miR-125b	0,03	0,06	0,03	0,04	0,04	0,10	-0,01	[-0,04-0,01]	0,360

\* t-test para varianzas iguales o desiguales, según fuera necesario

A continuación se muestran los gráficos tipo *box-plot* de distribución del miR-16-5p (Gráfico 3) y del miR-146a (Gráfico 4) según mortalidad a 30 días de seguimiento.

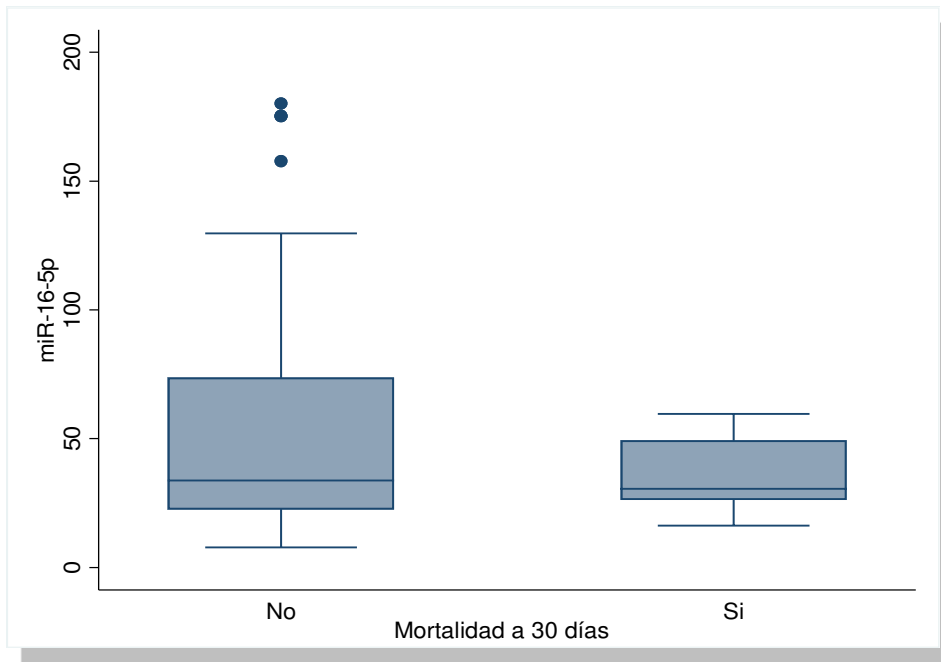


Gráfico 3: Niveles de miR-16-5p al ingreso en pacientes que fallecieron y que sobrevivieron

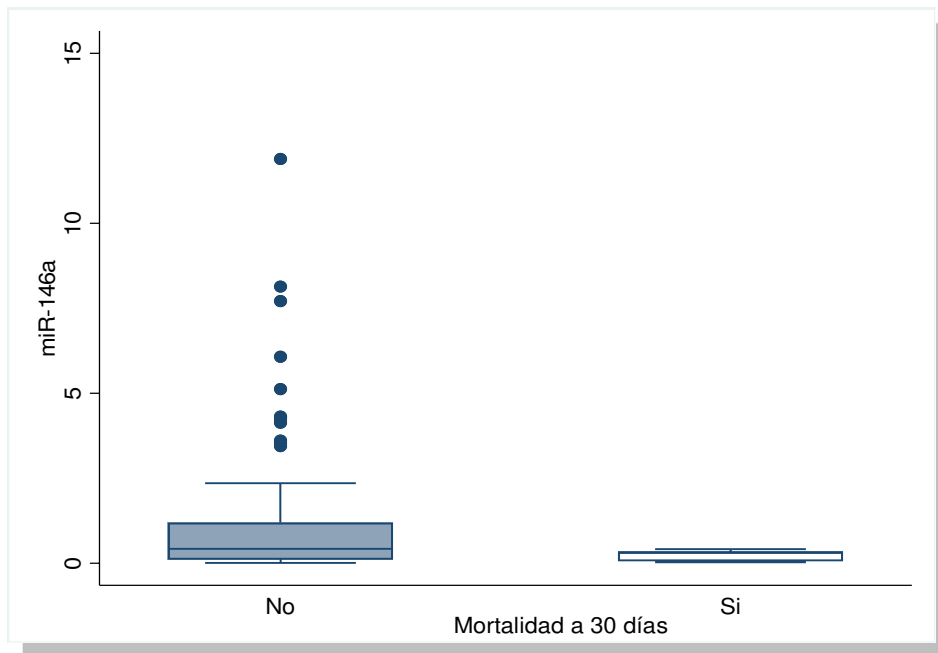


Gráfico 4: Niveles de miR-146a al ingreso en pacientes que fallecieron y que sobrevivieron

Es llamativo que para ambos miRNAs a partir de un nivel de expresión (miR-146a a partir de 0,41 FCs,  $p_{55}$ ; miR-16-5p a partir de 59,6 FCs,  $p_{73}$ ), todos los pacientes sobreviven en la evolución a los 30 días tras la NAC.



Para el análisis de relación entre miRNAs y eventos cardiovasculares mayores se decidió revisar la aparición de síndrome coronario agudo (SCA), que con 6 eventos, fue el único evento suficientemente frecuente como para intentar establecer relaciones de asociación (Tabla 9).

Tabla 9: asociación entre miRNAs y SCA a 1 año	Total (n=117)		Aparición de SCA a 1 año						p*
	media	DE	No (n=111)		Si (n=6)		Dif medias	IC95% Dif medias	
			media	DE	media	DE			
hsa-miR-107	0,17	0,08	0,17	0,08	0,15	0,10	0,02	[-0,09-0,05]	0,592
hsa-miR-17-5p	0,67	0,23	0,68	0,23	0,53	0,17	0,16	[-0,35-0,04]	0,110
hsa-miR-21	3,00	1,42	2,98	1,44	3,27	1,10	-0,29	[-0,89-1,47]	0,627
hsa-miR-144-3p	4,08	3,98	3,99	3,95	5,88	4,41	-1,89	[-1,4-5,19]	0,258
hsa-miR-16-5p	50,19	40,26	49,83	40,20	56,79	44,67	-6,96	[-26,59-40,51]	0,682
hsa-miR- 486	1,29	1,24	1,27	1,25	1,60	1,19	-0,33	[-0,7-1,36]	0,527
hsa-miR-20a	0,65	0,29	0,65	0,29	0,64	0,33	0,01	[-0,25-0,23]	0,914
hsa-miR-34a-3p	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,05	-0,02	[-0,01-0,05]	0,208
hsa-miR-106b-5p	2,01	1,19	1,99	1,16	2,44	1,74	-0,46	[-0,53-1,45]	0,359
hsa-miR-146a	1,02	1,78	1,01	1,81	1,10	1,31	-0,08	[-1,4-1,57]	0,912
hsa-miR-483-5p	0,02	0,04	0,01	0,04	0,06	0,11	-0,05	[-0,09-0,19]	0,401
hsa-miR-125b	0,03	0,06	0,02	0,04	0,11	0,21	-0,08	[-0,14-0,3]	0,381

\* t-test para varianzas iguales o desiguales, según fuera necesario

Por último, comparamos los niveles de miRNAs con la etiología por neumococo (Tabla 10, a continuación).

Tabla 10: asociación entre miRNAs y <i>S. pneumoniae</i>	Total (n=117)		Etiología de la NAC atribuida al neumococo						p*
	media	DE	No (n=102)		Si (n=115)		Dif medias	IC95% Dif medias	
			media	DE	media	DE			
hsa-miR-107	0,17	0,08	0,17	0,08	0,15	0,08	0,02	[-0,02-0,06]	0,367
<b>hsa-miR-17-5p</b>	0,67	0,23	0,69	0,23	0,55	0,21	0,14	[0,02-0,27]	<b>0,025</b>
hsa-miR-21	3,00	1,42	3,00	1,46	2,98	1,10	0,02	[-0,76-0,8]	0,956
hsa-miR-144-3p	4,08	3,98	4,23	4,09	3,06	3,05	1,17	[-1-3,35]	0,288
hsa-miR-16-5p	50,19	40,26	51,91	41,41	38,53	29,86	13,37	[-8,64-35,39]	0,231
hsa-miR- 486	1,29	1,24	1,32	1,27	1,07	1,06	0,26	[-0,43-0,94]	0,458
hsa-miR-20a	0,65	0,29	0,67	0,29	0,53	0,30	0,14	[-0,02-0,3]	0,085
hsa-miR-34a-3p	0,02	0,03	0,02	0,04	0,01	0,03	0,00	[-0,02-0,02]	0,785
hsa-miR-106b-5p	2,01	1,19	2,08	1,21	1,50	0,92	0,58	[-0,06-1,23]	0,077
hsa-miR-146a	1,02	1,78	1,09	1,87	0,52	0,86	0,56	[-0,41-1,54]	0,254
hsa-miR-483-5p	0,02	0,04	0,01	0,04	0,03	0,06	-0,02	[-0,05-0,02]	0,336
hsa-miR-125b	0,03	0,06	0,03	0,06	0,02	0,02	0,01	[-0,02-0,04]	0,605

\* t-test para varianzas iguales o desiguales, según fuera necesario

Como puede observarse, los principales resultados estadísticamente significativos se encontraron con la mortalidad a 30 días, en la que el miR-146a y el miR-16-5p mostraron niveles ostensiblemente más altos en los supervivientes respecto a los fallecidos.

Respecto a la asociación con eventos cardiovasculares mayores (*MACE*), el escaso número de ellos durante el seguimiento (2 ictus y 6 SCA, Tabla 5), y la ausencia de asociación del SCA –el más frecuente– con ninguno de los miRNAs propuestos en el análisis univariante (Tabla 9), hizo que no prosiguiéramos con su estudio.

Por el contrario, el miR-17-5p sí estaba significativamente disminuido en aquellos que presentaron etiología por *Streptococcus pneumoniae*, respecto a otras causas etiológicas y a etiología desconocida. Sin menospreciar este último resultado, dado que el objetivo de esta tesis era demostrar la capacidad pronóstica de los miRNAs en la NAC –y no diagnóstica– se decidió continuar el análisis con la mortalidad a 30 días y ambos miRNAs relacionados.

### Análisis de colinealidad para los miRNAs seleccionados

El siguiente paso fue dilucidar si ambos miRNAs candidatos presentaban algún tipo de colinealidad. Para ello se llevaron a cabo dos procedimientos.

El primero fue un análisis visual mediante representación gráfica –tipo *heatmap*– de los coeficientes de correlación de todos los miRNAs analizados (según test de correlación de Pearson) (Gráfico 5).

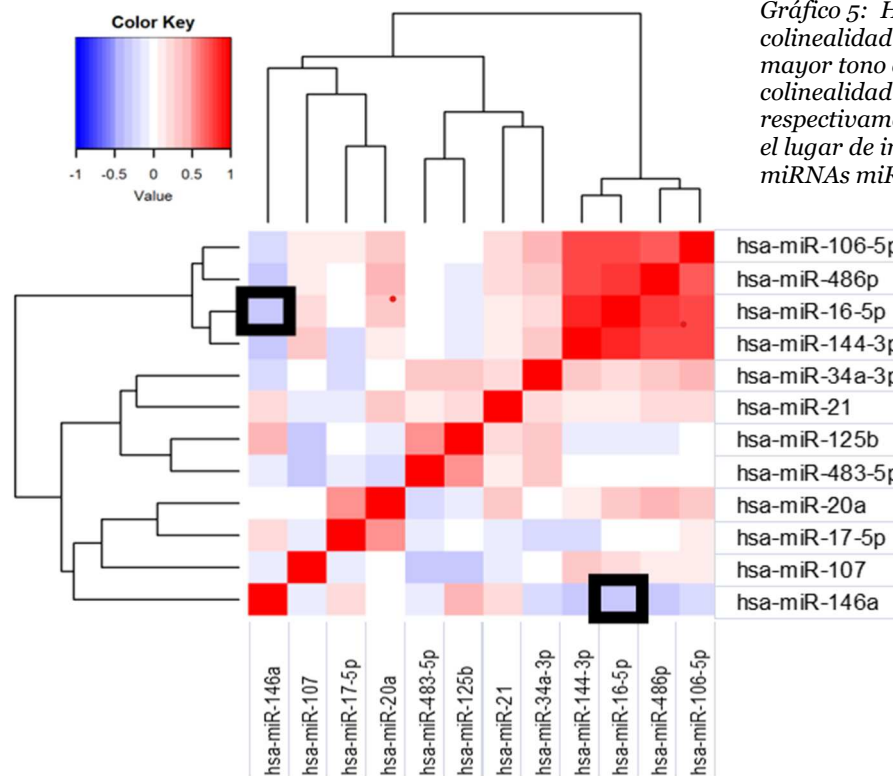


Gráfico 5: Heat-map del análisis de colinealidad de miRNAs analizados. A mayor tono de azul o rojo, mayor colinealidad (negativa o positiva, respectivamente). Recuadrado en negro el lugar de intersección entre los miRNAs miR-146a y miR-16-5p.

El segundo procedimiento fue comparar estadísticamente el grado de correlación entre el miR-146a y el miR-16-5p de forma directa. Para ello se llevó a cabo el test de correlación de Spearman, recomendable en distribuciones con valores extremos, como sucede en nuestro caso. A continuación, (Diagrama 4) se confrontan ambas distribuciones en un diagrama de dispersión.

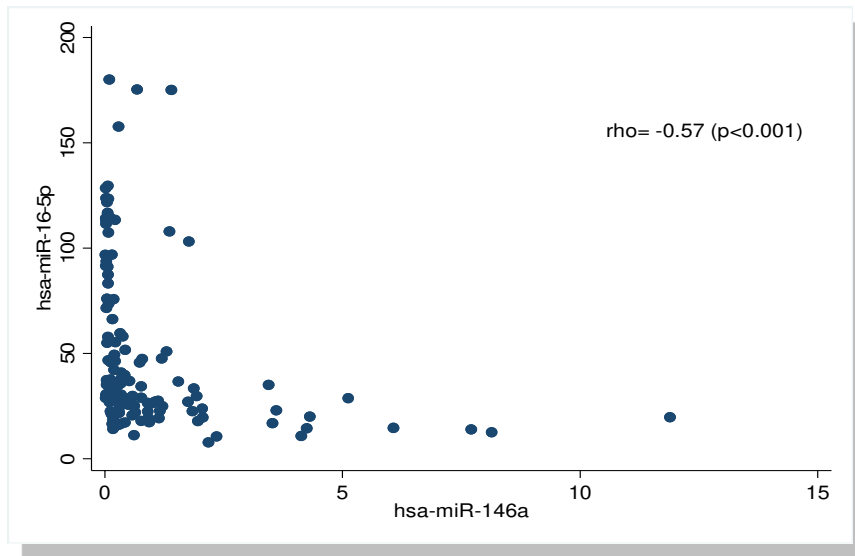


Gráfico 6: correlación entre niveles de miR-16-5p y miR-146a representado por diagrama de dispersión

Como puede observarse, la correlación es muy débil ( $\rho = -0,57$ ), de tipo inversamente proporcional, y por tanto, asumimos que no existe colinealidad. El p-valor mostrado hace referencia a la probabilidad de que ese coeficiente de correlación sea el correcto, con el número de datos proporcionados.

### Características basales y factores confusores según mortalidad a 30 días

Determinada la no colinealidad de ambos miRNAs, llegó el momento del estudio de los factores confusores. Para ello, se analizó la posible asociación entre antecedentes personales, hábitos tóxicos, características clínicas, radiológicas y analíticas del episodio de NAC, edad y sexo con mortalidad a 30 días.

Las principales variables clínicas de interés se muestran a continuación (Tabla 11), según mortalidad a 30 días, junto con los datos totales. La n analizada en este caso fue de 153 pacientes de la muestra original, con datos clínicos completos, similar a la muestra de 117 pacientes con miRNAs válidos, como se ha demostrado previamente.

Tabla 11: variables sociodemográficas y antecedentes personales según mortalidad a 30 días	TOTAL n=153		Mortalidad a 30 días				p-valor*
			VIVOS n=135		FALLECIDOS n=18		
	%	n	%	n	%	n	
Edad ( $\bar{X}$ / DE)	75,68	16,13	73,82	16,18	89,69	5,15	<0,001
Sexo (varón)	58,17	89	58,52	79	55,56	10	0,811
Raza (caucásica)	97,39	149	97,04	131	100	18	1,000
<b>Hábitos de vida y vacunación</b>							
Enolismo (activo o pasado)	8,50	13	8,89	12	5,56	1	1,000
Tabaquismo (activo o pasado)	65,10	99	65,93	89	58,82	10	0,563
<i>Tabaquismo IPA (<math>\bar{X}</math> / DE)</i>	<i>27,24</i>	<i>29,66</i>	<i>27,17</i>	<i>29,37</i>	<i>27,86</i>	<i>33,38</i>	0,935
Vacunación neumococo	41,33	62	40,60	54	47,06	8	0,611
Vacunación gripe último año	62,00	93	62,41	83	58,82	10	0,774
<b>Antecedentes personales</b>							
HTA	58,17	89	59,26	80	50,00	9	0,454
Diabetes Mellitus	16,34	25	17,04	23	11,11	2	0,739
Hipercolesterolemia	32,68	50	30,37	41	50,00	9	0,095
Obesidad	42,48	65	42,96	58	38,89	7	0,743
AIT	4,58	7	3,70	5	11,11	2	0,192
Ictus	11,76	18	9,63	13	27,78	5	<b>0,041</b>
Cardiopatía isquémica	8,50	13	7,41	10	16,67	3	0,183
Insuficiencia cardiaca	18,95	29	18,52	25	22,22	4	0,750
EDEV	1,96	3	1,48	2	5,56	1	0,315
ERC	14,38	22	14,81	20	11,11	2	1,000
Hepatopatía crónica	3,27	5	3,70	5	0,00	0	0,406
EPOC	31,37	48	31,85	43	27,78	5	0,794
EPOC GOLD IV-V	7,89	9	6,12	6	18,75	3	0,113
Asma	5,23	8	5,93	8	0,00	0	0,597
Infección por VIH	5,88	9	6,67	9	0,00	0	0,600
Neoplasia sólida	9,15	14	8,15	11	16,67	3	0,216
Leucemia	0,65	1	0,74	1	0,00	0	1,000
Linfoma	1,96	3	2,22	3	0,00	0	1,000
I. de Charlson modificado ( $\bar{X}$ / DE)	<i>3,12</i>	<i>2,94</i>	<i>2,98</i>	<i>2,98</i>	<i>4,22</i>	<i>2,39</i>	0,092
I. SCORE de RCV ( $\bar{X}$ / DE)	<i>7,00</i>	<i>4,69</i>	<i>7,42</i>	<i>4,68</i>	<i>10,56</i>	<i>3,24</i>	<0,001
<b>Tratamiento habitual</b>							
Broncodilatadores (cualquier tipo)	33,33	51	34,07	46	27,78	5	0,791
Corticoesteroides orales	3,97	6	3,73	5	5,88	1	0,518
Estatina	29,14	44	28,36	38	35,29	6	0,553
Antiagregante	26,14	40	25,19	34	33,33	6	0,460
<b>Situación funcional</b>							
Institucionalizado	7,84	12	5,93	8	22,22	4	<b>0,037</b>
Deterioro cognitivo	17,65	27	11,85	16	61,11	11	<0,001
Desnutrición	11,11	17	9,63	13	22,22	4	0,119
Historia de broncoaspiración	8,50	13	4,44	6	38,89	7	<0,001

I: Índice; IPA: Índice paquete-año; HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC: enfermedad renal crónica; EDEV: enfermedad tromboembólica venosa; RCV: riesgo cardiovascular  
 Variables cuantitativas: media y DE ; Variables cualitativas % y n ; \* Variables cualitativas: test chi-cuadrado o exacto de Fisher. Variables cuantitativas: t-test para varianzas iguales o desiguales según fuera necesario

En la siguiente tabla (Tabla 12), se muestran las características clínicas que presentaban los pacientes reclutados con NAC, sus constantes a su llegada a Urgencias, su exploración física inicial y la radiografía de tórax diagnóstica.

Tabla 12: características clínicas, exploratorias y radiográficas, según mortalidad a 30 días	TOTAL n=153		Mortalidad a 30 días				p-valor*
			VIVOS n=135		FALLECIDOS n=18		
<i><b>Clínica de la NAC</b></i>	%	n	%	n	%	n	
Días de clínica antes de ingreso	7,27	9,74	7,45	10,18	5,89	5,30	0,524
Inicio brusco	8,50	13	6,67	9	22,22	4	<b>0,049</b>
Síntomas vías respiratorias altas	21,57	33	22,22	30	16,67	3	0,765
Fiebre los días previos	63,40	97	62,22	84	72,22	13	0,450
Escalofríos	38,56	59	40,00	54	27,78	5	0,441
Cefalea	7,19	11	8,15	11	0,00	0	0,363
Tos los días previos	83,01	127	82,22	111	88,89	16	0,740
Expectoración purulenta	16,99	26	15,56	21	27,78	5	0,194
Dolor pleurítico	28,76	44	31,85	43	5,56	1	<b>0,024</b>
Sensación disneica	71,90	110	68,15	92	100,00	18	<b>0,004</b>
<i><b>Constantes a su llegada</b></i>	media	DE	media	DE	media	DE	
Frecuencia respiratoria	25,67	10,95	25,30	11,36	28,29	7,10	0,293
Presión arterial sistólica	131,01	26,95	131,79	26,84	125,11	27,82	0,325
Presión arterial diastólica	67,50	16,01	68,54	15,50	59,72	18,02	<b>0,028</b>
Frecuencia cardiaca	96,52	22,44	95,45	22,53	104,56	20,57	0,106
Temperatura en Urgencias	37,21	1,00	37,22	1,03	37,12	0,80	0,710
Saturación basal de O2	89,21	9,03	89,77	8,28	84,52	13,25	0,154
<i><b>Exploración física inicial</b></i>	%	n	%	n	%	n	
Auscultación: crepitantes	73,86	113	73,33	99	77,78	14	0,783
Auscultación: soplo tubárico	1,96	3	2,22	3	0,00	0	1,000
Auscultación: sibilancias	11,11	17	11,85	16	5,56	1	0,695
<i><b>Radiografía de tórax</b></i>	%	n	%	n	%	n	
Rx de tórax: infiltrado multilobar	30,92	47	29,63	40	41,18	7	0,332
Rx de tórax: cavitación	0,66	1	0,74	1	0,00	0	1,000
Rx de tórax: neumotórax	0,66	1	0,74	1	0,00	0	1,000
Rx de tórax: derrame pleural	13,82	21	14,07	19	11,76	2	1,000
Variables cuantitativas: media y DE ; Variables cualitativas % y n							
* Variables cualitativas: test chi-cuadrado o exacto de Fisher. Variables cuantitativas: t-test para varianzas iguales o desiguales según fuera necesario							

También se analizaron las principales moléculas determinadas en una analítica completa de ingreso, realizada en las primeras 24 horas desde la llegada del paciente a Urgencias (Tabla 13); se incluye colesterol total y niveles de colesterol HDL, relacionados en experimentación básica con variaciones en niveles de miRNAs plasmáticos.

Tabla 13: Analítica de sangre - primeras 24 horas de ingreso - según mortalidad a 30 días	TOTAL n=153		Mortalidad a 30 días				p-valor*
			VIVOS n=135		FALLECIDOS n=18		
	media	DE	media	DE	media	DE	
GAB: pH	7,44	0,52	7,44	0,46	7,44	0,88	0,752
GAB: PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	36,10	9,03	35,71	8,47	39,40	12,75	0,135
GAB: PaO <sub>2</sub> (mmHg)	59,35	15,87	60,06	15,86	53,33	15,20	0,121
GAB: HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/l)	24,51	4,43	24,34	4,45	25,95	4,08	0,185
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	275,32	69,81	278,05	70,01	252,35	65,91	0,179
Hematocrito (%)	36,92	6,06	37,38	6,03	33,46	5,31	<b>0,010</b>
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	242,02	127,23	243,56	127,50	230,44	128,25	0,683
Leucocitos (x10 <sup>3</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	11,96	5,70	12,05	5,54	11,28	6,91	0,589
Neutrófilos (%)	78,85	12,38	77,81	12,57	86,67	7,20	<b>0,004</b>
Linfocitos (%)	12,79	9,47	13,49	9,76	7,49	4,31	<b>&lt;0,001</b>
INR	1,29	0,55	1,29	0,58	1,28	0,24	0,914
Glucosa (mg/dl)	125,02	58,30	125,89	59,51	118,53	49,27	0,617
Creatitina (mg/dl)	1,52	7,05	1,58	7,50	1,05	0,39	0,763
BUN (mg/dl)	24,064	13,81	22,90	13,24	32,77	15,27	<b>0,004</b>
Sodio (mEq/l)	138,87	12,15	138,35	12,66	142,78	6,27	0,147
Potasio (mEq/l)	4,30	0,58	4,30	0,53	4,26	0,93	0,803
CPK (mg/dl)	132,79	231,77	119,77	223,26	235,41	276,82	0,115
LDH (UI/l)	206,67	90,41	202,50	90,27	239,29	87,23	0,114
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,77	2,10	0,80	2,23	0,55	0,46	0,645
GOT (UI/l)	33,78	61,31	33,74	64,46	34,06	29,27	0,984
GPT (UI/l)	31,03	77,92	31,11	82,26	30,39	30,71	0,971
Proteínas totales (g/dl)	5,96	0,59	6,01	0,55	5,63	0,75	<b>0,009</b>
Albúmina (g/dl)	3,24	0,54	3,29	0,51	2,85	0,60	<b>0,001</b>
Colesterol (mg/dl)	134,61	34,72	136,50	34,67	120,44	32,60	0,065
Colesterol HDL (mg/dl)	38,67	18,06	38,47	17,48	40,17	22,43	0,710
Proteína C Reactiva (mg/l)	13,82	9,62	13,56	9,88	15,73	7,33	0,370
Procalcitonina (ng/ml)	2,18	6,99	1,44	2,89	7,70	18,21	0,163
Lactato (nmol/l)	1,77	1,09	1,71	0,92	2,74	2,72	0,504

Variables cuantitativas: media y DE ; Variables cualitativas % y n

\* Variables cualitativas: test chi-cuadrado o exacto de Fisher. Variables cuantitativas: t-test para varianzas iguales o desiguales según fuera necesario

Como se puede observar, algunas de las variables analizadas mostraron asociación estadística significativa con la variable desenlace principal. Muchas de ellas (la edad, la historia de broncoaspiración, la presión arterial en Urgencias, el porcentaje de neutrófilos, el porcentaje de linfocitos, la elevación de BUN y la presencia de parámetros de BUN) se han relacionado con anterioridad con peor desenlace en la NAC.

Por último, se describen las principales escalas pronósticas en la neumonía adquirida en la comunidad (Tabla 14).

Tabla 14: Escalas pronósticas en la NAC con capacidad predictiva sobre mortalidad	TOTAL n=153		Mortalidad a 30 días				p-valor*
			VIVOS n=135		FALLECIDOS n=18		
	media	DE	media	DE	media	D	
Escala PSI - numérica	103,00	35,16	98,47	33,75	136,94	26,29	< 0,001
Escala PSI - categórica (de 1 a 5)	3,65	1,14	3,53	1,15	4,50	0,51	< 0,001
CURB-65 (de 0 a 5)	2,78	1,09	2,67	1,07	3,67	0,84	< 0,001
CRB-65 (de 0 a 4)	2,24	0,82	2,16	0,80	2,83	0,71	0,001
Cumplimiento $\geq$ 1 criterio de gravedad ATS/IDSA (% / n)	93,50	143	93,00	125	100,00	18	0,608

PSI: Pneumonia Severity Index  
 \* Variables cualitativas: test chi-cuadrado o exacto de Fisher. Variables cuantitativas: t-test para varianzas iguales o desiguales según fuera necesario

Como se observa, se encontró asociación entre mortalidad a 30 días con mayores puntuaciones tanto en la escala PSI (en su forma numérica y en su forma categórica), como en las escalas CURB-65 y CRB-65 estimadas al ingreso.

### Análisis multivariante no ajustado

Posteriormente, para evaluar el poder pronóstico de ambos miRNAs con asociación estadísticamente significativa en el análisis univariante (miR-146a y miR-16-5p), se construyó un modelo multivariante. Para ello, elaboramos una regresión logística aislada solo con ambos factores centrados en sus medianas, con el siguiente resultado:

**Tabla 15: Regresión logística para predecir mortalidad de un modelo con dos variables, miR-146 y miR-16-5p**

MODELO 2 VARIABLES	OR	IC95% OR		p
miR-146a	0,04	0,002	0,81	<b>0,036</b>
miR-16-5p	0,97	0,94	0,99	<b>0,025</b>



La ecuación de la regresión fue esta:

$$\pi_{\text{muerte 30}} = \frac{1}{1 + e^{[0,47 - 3,201 (\text{miR146a\_miana}) - 0,035 (\text{miR165p\_miana})]}}$$

Este modelo es significativamente mejor que el modelo nulo ( $\chi^2 = 14,887$ ;  $p = 0,001$ ), presentado una aceptable capacidad predictiva ( $R^2_{\text{Cox\&Snell}} = 0,119$  y  $R^2_{\text{Nagalkerke}} = 0,258$ ), que se podría interpretar como que hasta el 11,9% de la variación de la variable *muerte a los 30 días* (SI vs. NO) es explicada por el modelo con ambos miRNAs.

### **Análisis multivariante ajustado por variables de confusión**

Para este análisis se tuvieron en cuenta todas las variables con  $p \leq 0,10$  en el análisis univariante así como variables de trascendencia clínica como el *sexo* o la comorbilidad medida por el *índice de Charlson modificado* [165]. No se incluyeron en el modelo las escalas pronósticas (PSI o CURB65), al estar construidas a partir de variables clínicas y analíticas al ingreso –dada la alta probabilidad de incurrir en interacciones– con el objetivo de poder comparar la predicción pronóstica posteriormente del modelo estimado con ellas.

Para poder llevar a cabo la regresión logística, las variables cuantitativas se centraron en su mediana. Las variables finalmente introducidas en el modelo completo fueron las siguientes:

- Sexo
- Edad al ingreso
- Antecedente personal de hipercolesterolemia
- Antecedente personal de ictus
- Antecedente personal de deterioro cognitivo
- Antecedente personal de broncoaspiración
- Índice de Charlson modificado, en su modalidad cuantitativa
- Índice SCORE-OP, en su modalidad cuantitativa
- Condición de institucionalizado
- Característica del proceso neumónico: inicio brusco de la sintomatología
- Característica del proceso neumónico: dolor pleurítico
- Característica del proceso neumónico: disnea
- Constantes al ingreso: presión arterial diastólica (PAD)

- Constantes al ingreso: frecuencia cardiaca (FC)
- Analítica al ingreso: nivel de hematocrito (%)
- Analítica al ingreso: nivel de neutrófilos (%)
- Analítica al ingreso: nivel de linfocitos (%)
- Analítica al ingreso: valor del nitrógeno ureico en sangre (BUN)
- Analítica al ingreso: proteínas totales
- Analítica al ingreso: albúmina
- Analítica al ingreso: colesterol

Tras la selección por pasos, y manteniendo siempre en el modelo las dos variables dependientes principales seleccionadas (miR-16-5p y miR-146a), el resultado del análisis multivariante para un modelo con 4 variables fue el siguiente:

**Tabla 16: Regresión logística para predecir mortalidad de un modelo con cuatro variables, Historia de broncoaspiración, edad, miR-146 y miR-16-5p**

MODELO 4 VARIABLES	OR	IC95% OR		p
Broncoaspiración	22,70	1,68	305,86	<b>0,019</b>
miR-16-5-p (33,7 FC)	0,96	0,92	0,99	<b>0,040</b>
miR-146a (0,336 FC)	0,15	0,02	1,52	0,109
Edad (81,56 años)	1,21	1,05	1,40	<b>0,010</b>

Este modelo es mejor que el modelo nulo ( $\chi^2=37,192$ ;  $p<0,001$ ) y tiene una buena capacidad predictiva:  $R^2_{\text{Cox\&Snell}}=0,272$ ;  $R^2_{\text{Nagalkerke}}=0,587$ .

El mismo procedimiento, para un modelo de 5 variables (incluyendo sexo), produjo el siguiente resultado:

**Tabla 17: Regresión logística para predecir mortalidad de un modelo con cinco variables, Historia de broncoaspiración, edad, sexo, miR-146 y miR-16-5p**

MODELO 5 VARIABLES	OR	IC95% OR		p
Broncoaspiración	36,49	1,48	899,17	<b>0,028</b>
Edad (81,56 años)	1,36	1,05	1,77	<b>0,022</b>
miR-16-5-p (33,7 FC)	0,95	0,91	0,99	<b>0,021</b>
miR-146a (0,336 FC)	0,05	0,00	2,00	0,109
Sexo (hombre)	0,09	0,001	1,50	0,093

Este modelo es significativamente mejor que el modelo nulo ( $\chi^2 = 41,231$ ;  $p < 0,001$ ), presentado una buena capacidad predictiva:  $R^2_{\text{Cox\&Snell}} = 0,297$ ;  $R^2_{\text{Nagalkerke}} = 0,640$ .

Como se puede observar, miR-16-5p mantiene la significación estadística como marcador pronóstico en ambos modelos; además, tanto la edad como la presencia de antecedentes de broncoaspiración mantienen su significación como marcadores independientes pronósticos de mortalidad a 30 días.

Comparando nuestro modelo con un análisis exclusivo de selección por pasos no condicionado, el modelo con mejor capacidad predictiva fue el bivariado con *edad* y *antecedentes de broncoaspiración*, significativamente mejor que el modelo nulo ( $\chi^2=24,583$ ;  $p<0,001$ ) y con buena capacidad predictiva [ $R^2_{\text{Cox\&Snell}}=0,190$ ;  $R^2_{\text{Nagalkerke}}=0,408$ ], aunque inferior a los otros modelos propuestos (modelo de 4 y modelo de 5 variables) que incluyen nuestros miRNAs seleccionados miR-146a y miR-16-5p.

### Estudio de la interacción entre factores

Una vez demostrada la asociación de miR-16-5p con mortalidad a 30 días en el análisis multivariante, restaba explorar las posibles interacciones entre variables.

Para ello, se estudió un modelo en el que se introdujeron las variables elegidas y los términos de interacción en dos bloques diferentes.

En un *primer bloque* se introdujeron las cinco variables seleccionadas del estudio multivariante: *sexo*, *edad al ingreso*, *antecedente de broncoaspiración*, *miR-16-5p* y *miR-146a*, utilizando el procedimiento introducción forzada de variables.

En un *segundo bloque* se introdujeron las siguientes interacciones entre dos factores:

- miR16-5p x miR146a
- miR16-5p x sexo
- miR16-5p x edad al ingreso
- miR16-5p x broncoaspiración
- miR146a x edad al ingreso
- miR146a x antecedente de broncoaspiración
- edad al ingreso x antecedente de broncoaspiración

Los resultados se muestran a continuación (Tabla 18):

	OR	IC95% OR		P	
		Inferior	Superior		
Bloque 1	hsa-miR16-5p	0,78	0,20	2,97	0,713
	hsa-miR-146a	0,00	0,00	5,71X10 <sup>26</sup>	0,735
	Sexo	0,05	0,00	386,10	0,503
	Edad al ingreso	1,44	0,72	2,86	0,302
	Broncoaspiración	3,81X10 <sup>13</sup>	0,00		1,000
Bloque 2	hsa-miR-146a X hsa-miR16-5p	1,07	0,95	1,22	0,275
	hsa-miR16-5p X sexo	0,94	0,76	1,17	0,602
	Edad al ingreso X hsa-miR-16-5p	1,00	0,99	1,02	0,749
	Broncoaspiración X hsa-miR-16-5p	0,51	0,00	-	0,999
	hsa-miR-146a X sexo	625,23	0,05	7,76x10 <sup>6</sup>	0,181
	Edad al ingreso X hsa-miR-146a	0,97	0,43	2,21	0,949
	Broncoaspiración X hsa-miR-146a	0,00	0,00	-	0,999
Broncoaspiración X edad al ingreso	1,20	0,00	-	1,000	

Como se puede observar, no se encontraron interacciones significativas entre variables con ninguno de los procedimientos utilizados.

## Interpretación de los coeficientes con las variables centradas y expresión matemática de la regresión logística propuesta

Una vez descartada la presencia de interacciones entre las variables propuestas, fue necesario interpretar los OR de la regresión logística. Por recordar sus valores, volvemos a mostrar la tabla del modelo final (5 variables), solo con la fila del p-valor y de la OR (tabla 17 simplificada).

MODELO FINAL (5 variables)	p	OR
miR-16-5p	0,021	0,952
miR-146a	0,109	0,046
Broncoaspiración	0,028	36,485
Edad	0,022	1,361
Sexo	0,093	0,97

La *constante*,  $\exp(\beta_0) = e^{-0,030} = 0,970$  indica que cuando todas las variables cuantitativas toman el valor de su mediana, es decir, miR-16-5p = 33,7 FCs, miR-146a = 0,336 FCs, la Edad al ingreso = 81,56 años, no hay broncoaspiración y el sexo es varón, el número de pacientes que fallecen en los primeros 30 días es el 97,0% de los pacientes que no fallecen a los 30 días (odds = 0,970).

La OR de *broncoaspiración* indica el cambio en el logit cuando se pasa de no tener a tener broncoaspiración:  $\exp(\beta_1) = e^{3,597} = 36,485$ . Por tanto, la odds de muerte en broncoaspiración es 36,485 veces la odds de muerte sin broncoaspiración: odds =  $0,970 \times 36,485 = 35,450$ , manteniendo constante el resto de variables.

La OR de *edad al ingreso* indica el cambio en el logit cuando se incrementa en una unidad la mediana de edad, es decir,  $\exp(\beta_2) = e^{0,308} = 1,361$ . Por tanto, la odds de muerte por cada año más sobre 81,56 años es 1,361 veces la odds de muerte con 81,56 años: odds =  $0,970 \times 1,361 = 1,320$ , manteniendo constante el resto de variables.

La OR de *miR-16-5p* indica el cambio en el logit cuando se incrementa en una unidad la mediana de miR-16-5p, es decir,  $\exp(\beta_3) = e^{-0,049} = 0,952$ . Por tanto la odds de muerte por cada unidad que aumenta el miR-16-5p sobre 33,7 FCs es 0,9521 veces la odds de muerte con miR-16-5p: odds =  $0,970 \times 0,9521 = 0,923$ , manteniendo constantes el resto de variables. Esta OR se puede interpretar también de forma inversa: por cada unidad que disminuye el miR-16-5p respecto a su mediana existen  $1/0,952 = 1,05$  veces más probabilidad de sobrevivir.

La OR de *miR-146a* indica el cambio en el logit cuando se incrementa en una unidad la mediana de miR-146a, es decir,  $\exp(\beta_4) = e^{-3,085} = 0,046$ . Por tanto, la odds de muerte por cada unidad que aumenta el miR-146a sobre 0,336 FCs es 0,0457 veces la odds de muerte con miR-146a: odds =  $0,970 \times 0,0457 = 0,044$ , manteniendo constantes el resto de variables.

Por último, no se incluyen comentarios para las variables que no alcanzaron significación en el modelo final.

De esta forma, la ecuación final de regresión propuesta es:

$$\pi_{\text{muerte30d}} = \frac{1}{1 + e^{[-0,030 + 3,597(\text{Broncoaspiración}) + 0,308(\text{edad\_cent}) - 0,049(\text{R165cent}) - 3,085(\text{R146\_cent}) - 2,427(\text{sexo})]}}$$

Donde *Broncoaspiración* vale 0 cuando está ausente y 1 cuando está presente; *edad\_cent* es la edad al ingreso menos 81,56; *R165\_cent* es el valor de miR-16-5p menos 33,7; *R146\_cent* es el valor de miR-146a menos 0,336, y; *sexo* vale 0 en los varones y 1 en las mujeres.

### Desarrollo de curvas ROC y comparación de la capacidad predictiva mediante comparación de área bajo la curva (AUC)

Finalmente, una vez interpretada la regresión logística y descartadas interacciones, fue el momento de someter a evaluación del modelo propuesto.

Para ello, primero se estimó la capacidad predictiva del **modelo multivariante no ajustado** (sólo miR-16-5p y miR-146a) mediante elaboración de una curva ROC con los residuos, y determinación de mejores valores de sensibilidad y especificidad en el mejor punto de corte. Según tabla de coordenadas de la curva a continuación, (Tabla 19), el punto 0,058 es el mejor punto de corte, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 58,5% para predecir mortalidad a 30 días tras ingreso por NAC.

Positivo si es mayor o igual que <sup>a</sup>	Sensibilidad	1 - Especificidad	Especificidad	Combinación
0,04927	1,000	0,462	0,538	1,538
0,05036	1,000	0,453	0,547	1,547
0,05306	1,000	0,443	0,557	1,557
0,05559	1,000	0,434	0,566	1,566
0,05668	1,000	0,425	0,575	1,575
<b>0,05802</b>	<b>1,000</b>	<b>0,415</b>	<b>0,585</b>	<b>1,585</b>
0,06026	0,909	0,415	0,585	1,494
0,06306	0,909	0,406	0,594	1,503
0,06467	0,909	0,396	0,604	1,513
0,06747	0,818	0,396	0,604	1,422
0,07369	0,818	0,387	0,613	1,431

Representada la curva ROC (Gráfico 7) (probabilidad pronosticada de mortalidad a 30 días tras la NAC según ecuación de regresión logística [miR-146a & miR-16-5p]), el resultado fue una AUC de 0,824.

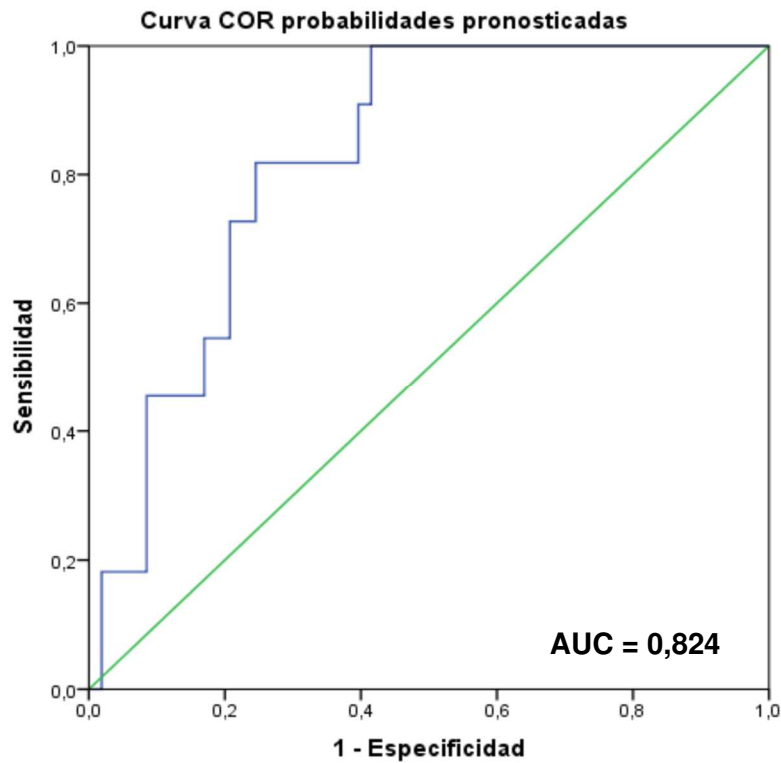


Gráfico 7: curva ROC de la probabilidad de mortalidad a 30 días según modelo multivariante con miR-146a y miR-16-5p

Posteriormente se determinó la capacidad predictiva del **modelo multivariante ajustado por edad, sexo e historia de broncoaspiración**, de nuevo buscando el punto de corte que permitiera una mejor clasificación de los pacientes (mejor combinación de sensibilidad y especificidad); el punto de corte seleccionado para el modelo fue 0,06 (asignar a la categoría fallecido si la probabilidad pronosticada de fallecer es mayor o igual que 0,06) (Tabla 20, a continuación).

Positivo si es mayor o igual que <sup>a</sup>	Sensibilidad	1 - Especificidad	Especificidad	Combinación
,0366602	1,000	,208	0,792	1,792
,0438471	1,000	,198	0,802	1,802
,0517336	1,000	,189	0,811	1,811
,0580944	1,000	,179	0,821	1,821
<b>,0616121</b>	<b>1,000</b>	<b>,170</b>	<b>0,830</b>	<b>1,830</b>
,0624762	,909	,170	0,830	1,739
,0700659	,909	,160	0,840	1,749
,0782745	,909	,151	0,849	1,758

Tabla 20: Extracto de las coordenadas de la curva. El punto 0,0616121 es el best cut-off.



Dicho criterio clasificó correctamente el 83,8% de los sujetos, con una sensibilidad, 100,0% y una especificidad 83,0%.

Representada la curva ROC (Gráfico 8), su AUC fue de 0,954, lo que podría considerarse una excelente capacidad predictiva del modelo.

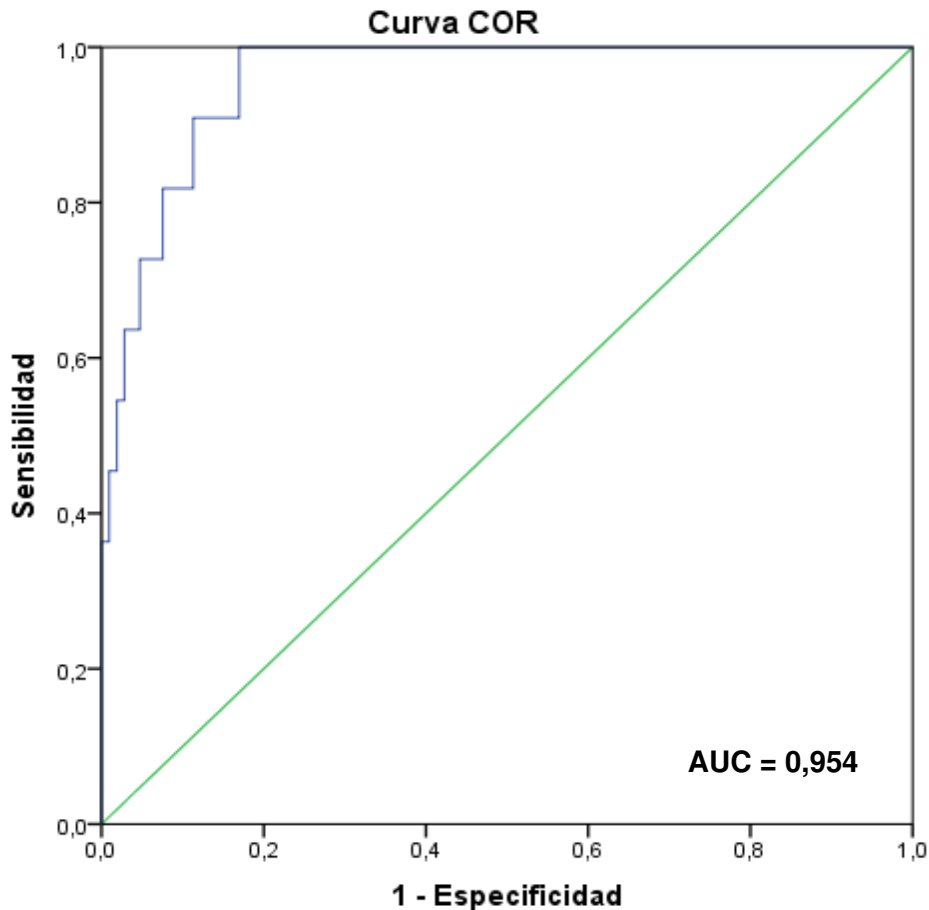


Gráfico 8:: curva ROC de la probabilidad de mortalidad a 30 días según modelo multivariante ajustado

En último lugar comparamos la **capacidad predictiva de ambos modelos (ajustado y no ajustado) mediante elaboración de una curva ROC con los residuos de ambos modelos, comparando sus AUC con las de otras escalas contrastadas en NAC (PSI y CURB-65)** para mortalidad a 30 días.

El resultado se muestra a continuación (Gráfico 9):

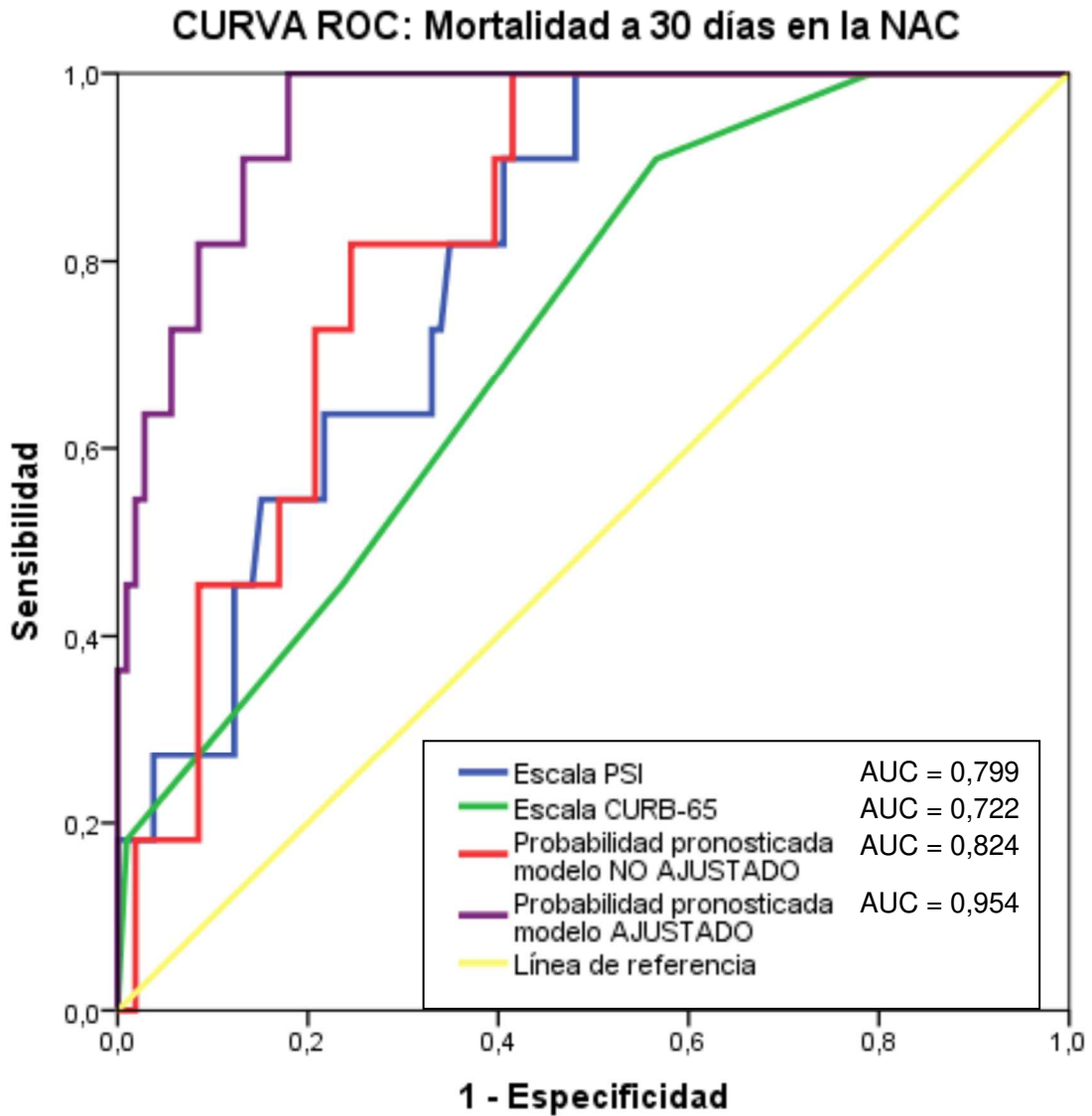


Gráfico 9: curvas ROC de la probabilidad de mortalidad a 30 días según modelo multivariante no ajustado (solo miRNAs), ajustado (5 variables), junto con escalas PSI y CURB-65

Como se puede apreciar (Gráfico 9), el AUC del modelo ajustado (AUC=0,954 IC95% [0,91-0,99]), era superior al modelo no ajustado (AUC=0,824 [0,73-0,92]), y mejor a su vez que las consolidadas escalas pronosticas para NAC PSI (AUC=0,799 [0,69-0,91]) y CURB-65 (AUC=0,722 [0,58-0,86]).

### **Comparación de modelos pronósticos mediante los índices IDI y NRI**

El índice IDI se define como la diferencia de las medias de las probabilidades del evento, estimadas por el modelo nuevo y por los modelos previos en los pacientes que

hacen evento, menos la misma diferencia en aquellos que no hacen evento. Es decir, el IDI representa lo que mejora en promedio el nuevo modelo en cuanto a la predicción de más verdaderos eventos, descontando lo que empeora por la predicción de falsos eventos [194]. Así, el IDI estimado para nuestro modelo ajustado vs. CURB-65 fue de -0,40 (EE= 0.12; p= 0,007) y vs. PSI fue de -0,41 (EE= 0,11; p= 0,004), cuya interpretación podría ser que nuestro modelo reclasifica peor a los pacientes que las escalas clásicas pronósticas, aunque con una magnitud de cambio pequeña.

Por otro lado, el cálculo del NRI exige categorizar las probabilidades predichas por los modelos previo y nuevo en un conjunto de categorías de riesgo y construir, con esas categorías, tablas de contingencia, una para los eventos y otra para los no eventos. El NRI se definiría como la diferencia de las proporciones de sujetos con evento que suben de categoría y los que bajan, menos esa misma diferencia en los sujetos sin evento [194]. Así, el NRI estimado para nuestro modelo multivariante vs. CURB-65 fue 59.61% (EE= 1391.69; p= 1) y vs. PSI fue 39.54% (SE= 1029.78; p= 1). La interpretación sería que nuestro modelo multivariado (edad, antecedentes de broncoaspiración, miR-146a y miR-16-5p) reclasifica a los pacientes casi un 40% - 60% mejor que las escalas clásicas, aunque los resultados no son estadísticamente significativos.

### ***Resumen comprensivo de los principales resultados***

A modo de resumen de la sección *Resultados*, podemos concluir que tras análisis de varios miRNAs candidatos, solo dos de ellos, *miR-146a* y *miR-16-5p* mostraron asociación estadísticamente significativa con la mortalidad a 30 días después de un ingreso por NAC (cuanto mayores eran sus valores, menos mortalidad asociaban); que otros muchos factores clínicos y analíticos se asociaron también con la principal variable desenlace; que tras análisis multivariante, solo dos variables clínicas aparte de los miRNAs mantuvieron su significación, *edad* y *antecedente de broncoaspiración*; que no existía colinealidad entre los miRNAs seleccionados ni interacción entre variables de interés; que el modelo con estas dos variables clínicas, junto con el sexo y los dos miRNAs candidatos tuvo una buena capacidad pronóstica según área bajo la curva ROC; y que ese modelo ajustado tenía una capacidad pronóstica comparable, si no mejor, que las principales escalas clínicas reconocidas en NAC, después de comparación de AUCs y evaluación con los índices de reclasificación IDI y NRI.

## Discusión

La presente memoria de tesis doctoral muestra la utilidad de la determinación de microRNAs circulantes como biomarcadores pronósticos en pacientes ingresados por una NAC. Para la selección de candidatos se realizó un estudio en dos pasos, con un primer abordaje global mediante *microarrays* unido a una selección basada en la literatura previa, seguido de una segunda etapa de confirmación mediante RT-PCR semi-cuantitativa. Tras el análisis de veinticinco miRNAs candidatos, solo dos de ellos, *miR-146a* y *miR-16-5p* mostraron asociación estadísticamente significativa con la mortalidad a 30 días después de un ingreso por NAC, de forma que valores elevados de ambos se asociaron con mayor supervivencia (Tabla 7, Gráficos 3 y 4). Esta asociación se mantuvo para el miR-16-5p en el análisis multivariante tras ajustar por edad, sexo y antecedente de broncoaspiración (Tabla 17).

Por tanto, y a la espera de estandarizar el método y replicarlo en otras cohortes, podemos concluir que la medida de miR-146a y miR-16-5p es útil para predecir mortalidad a corto plazo tras un ingreso por NAC.

### **Utilización de miRNAs circulantes como biomarcadores diagnósticos y pronósticos en NAC**

La utilización de miRNAs circulantes como biomarcadores no es nueva, y aunque todavía no esté extendida como práctica clínica habitual, se ha empleado con éxito en el campo de las enfermedades respiratorias [195].

A nivel diagnóstico, algunos autores han profundizado en la utilización de miRNAs como biomarcadores en NAC a partir de diversos líquidos biológicos. Zhang *y col.* encontraron que hasta 6 miRNAs determinados en suero podían identificar a pacientes con tuberculosis pulmonar activa respecto a controles sanos y respecto a pacientes con otras enfermedades respiratorias (solo uno de los grupos incluía pacientes con NAC); ni miR-146a, ni miR-16-5p se encontraban entre esos 6 miRNAs [196]. Lin *y col.* encontraron que la determinación de miRNAs exosomales en líquido pleural podía discriminar a pacientes con NAC, con tuberculosis y con cáncer de pulmón [197]. Yi *y col.* estudiaron el perfil de microRNAs en esputo de pacientes con tuberculosis [198]. Huang y su equipo encontraron que hasta 4 miRNAs diferentes podían diferenciar neumonías víricas de neumonías bacterianas en una población pediátrica [199]. Probablemente el trabajo más completo en este sentido (diferenciación de etiología

bacteriana, *Streptococcus pneumoniae*, respecto a etiología vírica, *influenzavirus H3N2*) ha sido el de Poore *y col.*, en donde no solo se estudió el perfil diferencial de miRNAs, sino sus vías biológicas relacionadas [200].

Por otro lado, fuera de las enfermedades respiratorias habría que reseñar los trabajos de Wang *y col.*, en donde la determinación de miR-146a plasmático fue utilizada con éxito como biomarcador diagnóstico de sepsis en pacientes con criterios clínicos de SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) [201].

A nivel pronóstico, pocos estudios han valorado la capacidad de estas moléculas para predecir evolución. En un reciente estudio, Wu *y col.* encontraron que miR-146a, miR-27a, miR-126 y miR-155 elevados en exosomas séricos se relacionaban con mayor aparición de síndrome de distrés respiratorio agudo en pacientes con NAC, e incluso concluyen que miR-126 podría ser utilizado como marcador pronóstico, al asociarse estadísticamente con la mortalidad a 28 días [202]. En otro artículo reciente, Zhang *y su equipo*, utilizando un microarray precargado específico para sepsis, (Sepsis 3.0, *Agilent miRNA chip technology*) concluyeron que el miR-223-3p podría ser utilizado para predecir el desarrollo de sepsis asociada a NAC [203].

Hasta donde nosotros sabemos, no existen otros estudios –aparte del presente– que hayan investigado la utilidad de la determinación de miRNAs circulantes con intención pronóstica.

La siguiente pregunta por contestar es si los dos miRNAs identificados en nuestro estudio como buenos biomarcadores pronósticos tienen funciones biológicas conocidas que pudieran explicar esta capacidad predictiva.

### Estructura, funciones y usos como biomarcador de miR-16-5p

El gen de este miRNA fue caracterizado a principios de los 2000 por dos grupos independientes, dentro del cromosoma 13, en la región 13q14 [6,204]. Su secuencia completa puede ser consultada a continuación (Figura 23).

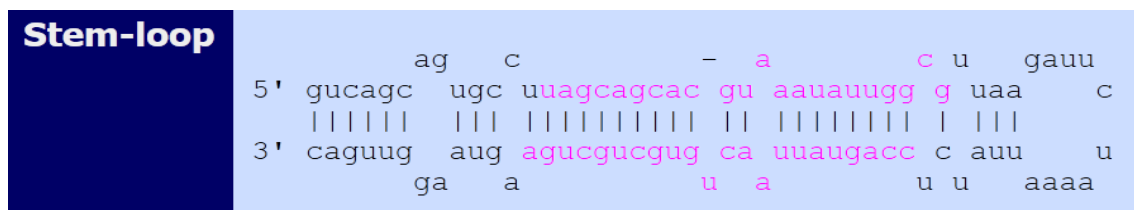


Figura 23: Secuencia de miR-16-5p según notación de mirbase.org [206]

Se ha documentado su expresión en la mayor parte de biofluidos estudiados, siendo uno de los miRNAs más abundantes en todo tipo de muestras [205]. Debido a esa abundancia y a su relativa estabilidad, ha sido utilizado como control endógeno (*housekeeping*) en estudios sobre cáncer [206] y daño miocárdico inducido [207].

Las funciones biológicas que se le atribuyen son múltiples. Este miRNA actúa como regulador negativo de la proliferación de células endoteliales, mediante bloqueo de los factores de crecimiento endotelial VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor-1*) [208]: es inhibidor de la proliferación celular en general (detención del ciclo celular en las fases G1/S) [209], y regulador positivo de los procesos de apoptosis de las células de músculo cardíaco y de músculo esquelético, mediante bloqueo de SESN1 [210]. También se ha identificado como regulador negativo de la angiogénesis [211], y se ha demostrado su capacidad como regulador negativo de la actividad del factor de transcripción NF-κB [212,213]. A nivel metabólico, miR-16-5p promueve la diferenciación de adipocitos mediante la supresión del gen EPT1 [214].

La actividad de miR-16-5p se ha relacionado con varios procesos de desarrollo tumoral. Se ha observado una disminución intracelular de sus niveles en la leucemia linfática crónica, de forma inversa a la expresión del gen Bcl2, básico en los procesos de desarrollo de esta patología [215]. Niveles reducidos de este miRNA se han relacionado con los procesos de proliferación celular, invasión y migración de algunos tumores como el cordoma o el cáncer gástrico, al permitir la expresión neta del oncogén Smad3 [216,217]. En el condrosarcoma, niveles disminuidos de miR-16-5p permiten la producción de VEGF-A por las células tumorales, facilitando su capacidad metastásica y procesos de angiogénesis [218]. En el hepatocarcinoma, la sobreexpresión *in vitro* de miR-16-5p inhibe la invasión y migración de células tumorales, al bloquear el efecto prometastásico de IGF1R [219]. En el cáncer de mama, el gen Akt3 puede ser inhibido por miR-16-5p vía NF-κB, consiguiendo bloquear el desarrollo tumoral [220]. Estudios en mesotelioma maligno han comprobado que el bloqueo de la secreción de exosomas en estas células tumorales promueve un aumento de miR-16-5p intracelular, lo que inhibe a las oncoproteínas CCND1 y BCL2, reduciendo su capacidad oncogénica [221].

Pocos son los estudios sobre el efecto neto de miR-16-5p en la defensa inmunitaria. En este sentido, niveles elevados de miR-16-5p circulante se han relacionado con la enfermedad mano-pie-boca producida por Enterovirus 71 (EV-71), con mayor número de complicaciones que otras causas etiológicas. La infección por EV-71 es capaz de aumentar la producción de este miRNA endógeno, induciendo apoptosis de células infectadas y la supresión de la replicación viral, actuando así como un verdadero

*feedback* positivo [222]. En estudios *in vitro* con células A549 de cáncer de pulmón, el aumento de miR-16-5p fue capaz de proteger del daño de LPS, mediante regulación del receptor de quimioquinas CXCR3 [223]; si bien no es completamente equiparable, este estudio sugiere que la sobreexpresión de este miRNA puede otorgar protección sobre agresiones por LPS, endotoxina característica de las infecciones por bacterias Gram positivas.

Como biomarcador, se ha propuesto su uso en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores, correlacionando niveles séricos elevados con complicaciones tras revascularización (biomarcador de mal pronóstico) [211]. También en pacientes con Artritis Reumatoide (AR), donde el miR-16-5p sérico fue progresivamente más alto a medida que la enfermedad estaba peor controlada (AR mal control > AR estable > no AR) [224].

En resumen, podemos decir que la acción global de miR-16-5p es antiinflamatoria, antiangiogénica, antiviral, quizá proaterogénica y decididamente antitumoral. La suma de estos efectos es coherente con los resultados de nuestro trabajo, en el que niveles elevados de este miRNA se asociaron con mejor pronóstico tras ingreso por NAC.

**miR-146a: estructura, funciones y utilización como biomarcador**

La secuencia génica de este miRNA fue predicha basándose en el miRNA homólogo verificado de ratón por el equipo de Lagos-Quintana [225] (Figura 24):

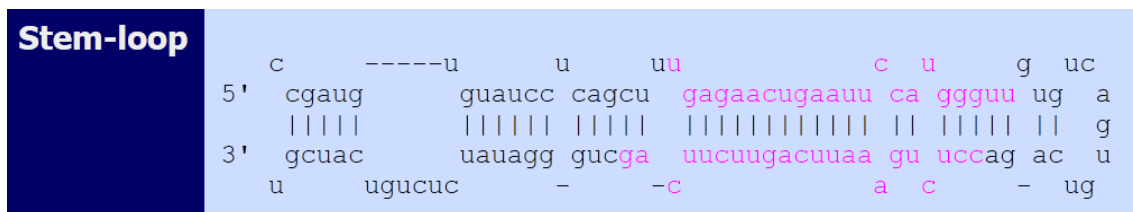


Figura 24: Secuencia de miR-146a según notación de mirbase.org [228]

Las funciones que se le atribuyen son muchas, aunque la primera y más estudiada es la relacionada con la regulación de la inmunidad. El miR-146a está implicado en la producción de células mieloides –incluido neutrófilos y monocitos– en el mantenimiento de subtipos de linfocitos T (en especial los Th1), y sobre todo en la regulación de la inmunidad innata mediante el control de la activación de la superfamilia TIR [66,226,227].



Como se ha comentado en la introducción, miR-146a actúa como regulador negativo de la cascada de activación de NF- $\kappa$ B mediante el bloqueo de la molécula intermedia TRAF6 [63]. Este efecto antiinflamatorio ha sido observado en modelos de fibroblastos gingivales [228], en fibroblastos senescentes humanos [229] y en modelos murinos articulares (inhibición de la osteoclastogénesis) [230], entre otros.

Esta acción sobre el bloqueo inflamatorio ha sido muy estudiada, especialmente en relación con infecciones víricas y bacterianas. Así, en estudios celulares, el bloqueo de miR-146a en contexto de una infección por hantavirus condicionaba una mayor respuesta inflamatoria y una reducción de la replicación viral [231].

En cambio, en infecciones bacterianas es tan importante la respuesta inmunitaria antimicrobiana como el control posterior de la inmunidad. En este sentido, algunos estudios con *Streptococcus pneumoniae* y modelos celulares con macrófagos han demostrado que el estímulo bacteriano sobre la vía TLR2 es capaz de estimular la producción de miR-146a, y este miRNA a su vez es capaz de bloquear la misma cascada de señalización, atemperando la inflamación sistémica y reduciendo el potencial daño tisular [232]. Este control de la inflamación sistémica ejercido por miR-146a se ha observado también en infecciones orales por *Porphyromonas gingivalis* [233]

También ha sido implicado en múltiples enfermedades neuronales. Se ha observado un aumento de niveles de miR-146a cerebral a medida que aumentaba la respuesta inflamatoria local –y la gravedad clínica– en las enfermedades priónicas cerebrales (por ejemplo, en la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), tanto en animales como en humanos [234]. También se ha observado un aumento de miR-146a en astrocitos de cerebros murinos tras la inducción de un estatus epiléptico [235]. Sin embargo, su relación con la patogenia de estas enfermedades no está clara. El efecto de miR-146a en la enfermedad de Alzheimer (EA) es complejo, pero parece deletéreo por varias vías. Por un lado, la sobreexpresión miR-146a en tejido cerebral provoca la reducción del factor complementario H (CFH), un importante agente inhibidor de la respuesta inflamatoria cerebral [236]. Por otro lado, el efecto proapoptótico de miR-146a se ha visto relacionado con el desarrollo de la EA: la sobreexpresión de miR-146a en células neuronales promueve la inactivación de la proteína Akt vía descenso de Lrp2, lo que potencia la apoptosis neuronal y la progresión de la EA [237].

En la esfera cardiovascular, el efecto antiinflamatorio de miR-146a parece ejercer un efecto antiaterogénico a largo plazo. Por un lado, miR-146a reduce el contenido de colesterol LDL en la placa de ateroma, así con la secreción de IL-6, IL-8 y otras citoquinas endoteliales, lo que disminuye la arterioesclerosis [238]. La clave de este

proceso son las células dendríticas en la placa, que sufren una inhibición en su proceso de maduración y secreción de citoquinas proinflamatorias debido a la represión de CD40L por este miRNA [239]. A nivel microvascular, estudios funcionales han comprobado que la sobreexpresión con agonistas miR-146a en células retinianas sometidas a hiperglucemia reduce la inflamación vía TLR4/NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$ , aminorando el desarrollo de retinopatía diabética [240].

Por el contrario, estudios *ex-vivo* con macrófagos estimulados con oxLDL encontraron una liberación de altas cantidades de miR-146a exosomal, promoviendo la formación de redes extracelulares neutrofilicas (NETs), lo que podría desencadenar eventos cardiovasculares a corto plazo [241]. No obstante, se ha implicado a este miRNA en los procesos de regeneración tisular tras isquemia: en un estudio, la modificación de células madre mesenquimales (MSCs) para que produzcan más miR-146a y su posterior infusión en modelos murinos de isquemia/reperfusión consiguió un aumento de expresión de VEGF y una reducción de las zonas fibróticas cardiacas [242].

Respecto a los procesos de angiogénesis, el efecto de miR-146a es inhibitorio. Se ha observado que la sobreexpresión de este miRNA es capaz de inducir la apoptosis de células vasculares de músculo liso (VSMCs) en modelos murinos de cardiopatía isquémica [243], mientras que su inhibición es capaz de bloquear la capacidad proliferativa y migratoria de las VSMCs *in vitro* [244].

Por último, el efecto de miR-146a sobre los procesos de tumorigénesis está menos estudiado. En un estudio en cáncer colorrectal (CCR) se determinó que este miRNA participaba en la estabilización de  $\beta$ -catenina y la producción de la proteína Numb, promoviendo la división celular simétrica (*symmetrical-cell-division*, SCD) en las células endoteliales colónicas, lo que facilitaba la progresión tumoral [245]. En este sentido, otro estudio del mismo grupo de investigación constató una gran presencia de este miRNA en exosomas del ambiente tumoral del CCR [246]. En otro tipo de tumores como el glioblastoma multiforme, miR-146a está infraexpresado; la adición de un agonista miR-146a fue capaz de activar Notch1 y aumentar la tasa de apoptosis de células tumorales, siendo ésta una potencial diana terapéutica [247].

Como biomarcador, miR-146a se ha empleado con éxito en el diagnóstico de cáncer de pulmón: la determinación de los niveles plasmáticos de este miRNA (junto con otros dos, miR-200b y miR-7) en un modelo con TC torácico, ayuda a diferenciar nódulos pulmonares solitarios benignos de cánceres de pulmón no microcítico de pequeño tamaño [248]. Este miRNA ya había sido citado previamente como potencial biomarcador en el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón no microcítico [249].

Por otro lado, dada su relación con la inflamación, se ha estudiado como biomarcador en enfermedades autoinmunes. Un reciente metaanálisis mostró que la elevación de miR-146a servía para identificar a pacientes con síndrome de Sjögren primario, mientras que no servía para discriminar a pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico [250]. Otro estudio demostró que este miRNA estaba elevado en PBMCs de pacientes con Artritis Reumatoide (AR) respecto a controles sanos [251].

En infecciones, se ha utilizado el gradiente de miR-146a entre la semana 0 y 48 postratamiento como biomarcador predictivo de seroconversión en pacientes infectados por el virus de la hepatitis B con HBeAg positivo, que recibieron tratamiento con análogos de nucleótidos [252].

Además, se ha encontrado significativamente más elevado en plasma de pacientes recién diagnosticados de DM-2, en comparación con controles pareados [253], así como en pacientes con historia de cardiopatía isquémica reciente [254]. En cambio, los niveles séricos de este miRNA fueron significativamente menores en pacientes que sufrieron un ictus isquémico agudo respecto a controles sanos [255].

Para resumir, podemos decir que la función biológica de este miRNA es antiinflamatoria, protectora de la aterogénesis macro y microvascular, favorecedora del desarrollo de la EA, antiangiogénica, y protumoral (Tabla 21). De nuevo, el balance global de estos efectos (sobre todo el antiinflamatorio y el antiaterogénico), es coherente con el mejor pronóstico observado en los pacientes con niveles elevados de este miRNA al ingreso por NAC.

<b>miR-16-5p</b>	<b>Ámbito</b>	<b>miR-146a</b>
↑ al ingreso en NAC con buen pronóstico a 1 año	<i>Infeccioso</i>	Gradiente, predictor de seroconversión VHB tras tratamiento ↑ al ingreso en NAC de buen pronóstico a 1 año de seguimiento
↑ Artritis Reumatoide	<i>Autoinmune</i>	↑ Artritis Reumatoide ↑ Enfermedad de Sjögren
	<i>Tumoral</i>	↑ en Ca. de pulmón (vs. NPS)
↑ Isquemia crítica MMII	<i>Cardiovascular</i>	↓ Fase aguda de ictus isquémico ↑ Cardiopatía isquémica reciente
	<i>Metabólico</i>	↑ DM-2 de reciente diagnóstico

Tabla 21: Ejemplos de utilización de miR-16-5p y miR-146a circulantes como biomarcadores

## **Efecto modulador de la respuesta inmune innata como explicación de un mejor pronóstico tras una NAC**

Nuestro hallazgo de menor mortalidad a 30 días con niveles elevados de miR-16-5p y miR-146a podría ser reflejo de una mejor y más adaptada respuesta inflamatoria contra el patógeno invasor, especialmente en un contexto de infección respiratoria bacteriana.

A nivel molecular, el miR-16-5p se ha relacionado con la protección frente al daño pulmonar tras infección. En modelos celulares sometidos a daño inducido por lipopolisacáridos (LPS), la sobreexpresión de miR-16-5p disminuía el daño pulmonar agudo a través de la inhibición de la respuesta inflamatoria sistémica vía inhibición de TNF- $\alpha$  e IL-6 [256]. Estos resultados se han replicado posteriormente en un modelo animal de infección pulmonar crónica con *Mycoplasma gallisepticum*; la sobreexpresión de miR-16-5p era capaz de detener la respuesta inflamatoria, ejerciendo su efecto inhibitorio directamente sobre la quinasa PI3K, clave en la cascada de activación de NF- $\kappa$ B, y por ende, de la producción de TNF- $\alpha$  [213].

En este mismo sentido, niveles elevados miR-146a se han asociado con una reducción de la inflamación pulmonar asociada a LPS: en un trabajo en el que se añadió miR-146a exógeno se observó que la respuesta celular inflamatoria a LPS (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ) estaba suprimida, a través de la inhibición de IRAK-1 y TRAF-6, moléculas intermedias necesarias en la cascada de activación de NF- $\kappa$ B [257]. Por otro lado, estudios *in vitro* encontraron que RelB (potente factor de transcripción de la familia NF- $\kappa$ B con efectos antiinflamatorios demostrados) regula la producción de mediadores proinflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$  en fibroblastos de pulmón humano en parte a través de un mecanismo que involucra miR-146a [258], mientras que otros estudios han encontrado este mismo efecto en células alveolares epiteliales humanas [259].

Además, resulta llamativo que ensayos en modelos murinos de neumonía por neumococo con miRNAs miméticos exógenos inhibitorios de esta vía –como miR-124-3p [260], o miR-302 [261]– han sido capaces de promover la regeneración de las células epiteliales alveolares y potenciar la recuperación de los individuos afectados por la neumonía bacteriana.

De esta forma, una explicación fisiopatogénica del efecto protector de miR-16-5p y miR-146a circulantes sería que niveles elevados de ambos detectados al ingreso por NAC estarían involucrados en una menor activación de las cascadas de inflamación secundarias a la infección pulmonar, disminuyendo la carga inflamatoria sistémica, y permitiendo una mejor evolución clínica a medio plazo.

Además, estos resultados estarían en consonancia con los ya publicados por nuestro grupo de investigación: que la inflamación no controlada en el seno de una NAC es la responsable última de la mala evolución clínica, y que esta inflamación puede ser medida mediante sencillos parámetros analíticos (como la procalcitonina, la proadrenomedulina o el porcentaje de neutrófilos) [114,157], mediante mediadores inflamatorios directos (como la IL-6) (comunicado en ERS'18 [262]), o mediante microRNAs circulantes, como el presente trabajo (comunicado en ATS'19 y SEPAR'19 [263], y recientemente publicado en PLoS One [264]) (trabajos disponibles en [Anexos](#)).

### **Importancia de la identificación temprana de pacientes con buen pronóstico**

La demostración de que el aumento de dos miRNAs circulantes medidos al ingreso se asocia con mejor pronóstico a medio plazo, puede servir para diseñar nuevas estrategias de atención a pacientes hospitalizados por NAC.

En este sentido, trabajos de revisión en los últimos años han incidido en varios puntos para mejorar el manejo de la NAC. Sobre todo se han centrado en tres grandes bloques: tratar rápido y con el antibiótico correcto a los pacientes con sospecha de NAC, valorar la gravedad inicial y durante la evolución con escalas de riesgo, con el objetivo de anticipar las complicaciones, y no olvidar el seguimiento tras el alta, al ser esta población –los pacientes que han necesitado hospitalización por NAC– un grupo de especial riesgo a medio y largo plazo [265]. La utilización habitual de biomarcadores al ingreso por NAC con capacidad pronóstica permitiría centrar el esfuerzo de protección en aquellos pacientes identificados como de especial riesgo, aumentando la efectividad de la intervención y mejorando los resultados globales en NAC.

Algunos estudios observacionales españoles apuntan a que una rápida secuenciación a antibioterapia oral en pacientes ingresados por NAC identificados como de buen pronóstico –estabilidad clínica en menos de 72 horas– no conlleva mayor mortalidad a 30 días, y sí una disminución de la estancia media, independientemente de su clasificación de riesgo según escalas clínicas habituales [266]. Un reciente ensayo clínico con más de 300 pacientes ingresados por NAC aleatorizó continuar tratamiento antibiótico o interrumpirlo al 5º día, sin observar peores resultados. De hecho, se encontró menos sintomatología (no significativo) entre aquellos que interrumpieron antes el tratamiento [267]. Por tanto, el uso de miRNAs que apoyen la identificación de pacientes con *buen pronóstico* puede ayudar a los clínicos a disminuir el tiempo de tratamiento, mejorando la eficiencia sin impacto sobre los resultados clínicos.

Por último, varios estudios han demostrado que la inflamación residual tras una NAC, medida a través de diversos biomarcadores inflamatorios a las 72 horas de ingreso [157] y al alta [101,268] es buena predictora de mortalidad a 30 días. Por tanto, la caracterización de microRNAs directamente implicados en la modulación de esa inflamación sostenida puede ayudar a definir el estado inflamatorio en la convalecencia, y a una mejor elección del momento del alta y de los cuidados tras el ingreso hospitalario.

### Utilidad de miR-17 como biomarcador diagnóstico etiológico

Uno de los resultados menos esperados del análisis univariante fue encontrar que niveles plasmáticos disminuidos de miR-17 al ingreso se asociaron con un agente etiológico concreto, el *Streptococcus pneumoniae*.

Este miRNA [269] (Figura 25), integrado en el *cluster* miR-17~92 ha demostrado ser un factor prooncogénico fundamental en la reprogramación metabólica tumoral [270]. También, está implicado en la replicación hepática del virus de la hepatitis C, inhibiendo la quinasa MAP3K8, vital en esa replicación [271].

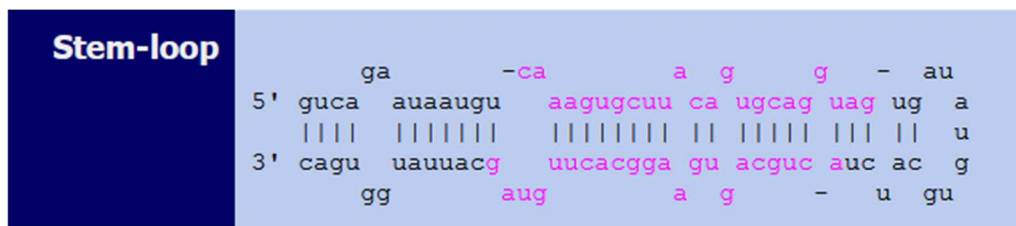


Figura 25: Secuencia de miR-17 según notación de mirbase.org [269]

Algunos estudios han relacionado niveles elevados en suero de miR-17-5p con el diagnóstico de tuberculosis [272], y se cree que este miRNA regula los procesos de autofagia de los macrófagos infectados por esta micobacteria [273]. Otros estudios han encontrado niveles séricos elevados de este miRNA en pacientes que contrajeron la gripe aviar (H7N9) [274], y en células humanas infectadas por *Toxoplasma gondii* [275]. Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos, la relación de miR-17 con el neumococo no era conocida en la literatura. Por tanto, este resultado debe de interpretarse con cautela y tendrá que ser replicado en futuras investigaciones.

## **La determinación de miRNAs circulantes carece de utilidad como biomarcadores de aparición de eventos cardiovasculares mayores**

Una de las hipótesis de partida más importante de este proyecto era que aquellos pacientes con NAC que mantenía una inflamación exuberante y persistente tras el ingreso tenían peor pronóstico a medio y largo plazo por un aumento de la incidencia de eventos cardiovasculares mayores, y que este desenlace probablemente podía ser estimado mediante la determinación de microRNAs al ingreso. La primera parte de esta hipótesis venía avalada por un gran número de trabajos sobre mortalidad cardiovascular tras NAC publicados en los últimos años [100,128,276,277].

La segunda parte, también parecía muy plausible: como hemos comentado en apartados anteriores, muchos estudios han asociado la desregulación y reducción de niveles de miR-146a circulantes con aterosclerosis [239,278], angina estable (vs. control) [279], infarto agudo de miocardio [280] o ictus isquémico [281]; también el descenso de miR-16-5p se ha relacionado con una rápida progresión de la aterosclerosis carotídea [282], aunque su relación con la enfermedad cardiovascular es más dudosa [211,279].

Sin embargo, en nuestro estudio ni los dos miRNAs relacionados con mortalidad ni ninguno del resto de microRNAs analizados mostraron relación significativa con la aparición de eventos cardiovasculares mayores (ictus o SCA) a 1 año de seguimiento.

Una posible explicación es que la causa del fallecimiento en algunos pacientes no fue suficientemente aclarada; es posible que estos pacientes sufrieran un evento cardiovascular mayor y fallecieran por ese motivo sin llegar a tener un diagnóstico, y por tanto, no computando para nuestro estudio.

Otra posible explicación de esta falta de asociación puede ser la baja incidencia de eventos cardiovasculares mayores en nuestra muestra, sólo 2 ictus y 6 síndromes coronarios agudos durante el primer año de seguimiento.

Por otro lado, podría argumentarse que el efecto deletéreo de la hiperinflamación acontecida durante la NAC no persiste tan a largo plazo: la disminución de los niveles de miR-146a y miR-16-5p al ingreso, que predicen bien mortalidad a 30 días, no alcanzan significación estadística en el análisis de mortalidad a 1 año. Este mismo argumento sería válido para justificar la no asociación de eventos cardiovascular mayores con niveles de microRNAs a 1 año. En cuanto a la búsqueda de asociación durante un seguimiento menor (30 días, por ejemplo), se vio abocada a los mismos



problemas de falta de eventos durante este tiempo, por lo que no se han llegado a mostrar los datos crudos.

En resumen, este estudio no ha podido identificar miRNAs circulantes que predigan la aparición de eventos cardiovasculares tras un ingreso por NAC, aunque no se excluye que estudios posteriores más amplios y con mayor tamaño muestral sean capaces de conseguirlo.

### **Debilidades y fortalezas de este estudio**

Consideramos que las principales debilidades de nuestro trabajo son la falta de una cohorte externa de validación, la difícil estandarización de la técnica –problema habitual en este tipo de estudios– y su limitación a pacientes hospitalizados, lo que dificulta su comparación con escalas pronósticas universalmente utilizadas.

Las principales fortalezas son el significativo tamaño muestral alcanzado, superior al de otros estudios clínicos con microRNAs circulantes; también, la utilización de estrictos criterios de calidad en la selección de muestras válidas, la utilización de varios miRNAs endógenos y exógenos en el proceso de normalización, y sobre todo, el proceso de selección de miRNAs en dos pasos, que ha asegurado una buena selección inicial de candidatos.

### **Futura dirección de esta investigación**

Para finalizar, nos gustaría indicar cuál sería la futura dirección de la investigación con miRNAs como biomarcadores pronósticos en NAC.

Como apuntamos en el párrafo anterior, este estudio se beneficiaría de una estandarización de la técnica en otros laboratorios y de una validación externa mediante la utilización de una cohorte multicéntrica de pacientes hospitalizados por NAC. Los resultados de esta validación tendrían, sin duda, mejor proyección.

Por otro lado, es necesario incluir la determinación de miRNAs circulantes en los estudios en marcha y proyectados sobre biomarcadores diagnósticos y pronósticos en NAC. En nuestra opinión, es de especial importancia comparar su capacidad predictiva con otras moléculas (por ejemplo, PCT o PCR) comúnmente utilizadas en investigación y cada vez más en la práctica clínica habitual.

Por último, consideramos que la principal utilidad de medir los niveles circulantes de miR-16-5p y miR-146a en hospitalizados por NAC es la identificación de pacientes con buen pronóstico a un mes desde el ingreso. Por tanto, una vez finalizada la validación externa antes propuesta, consideramos que el siguiente paso debería ser intentar la inclusión de estos marcadores en las escalas de riesgo clínicas habituales (PSI o CURB-65, por ejemplo) con el objetivo de conseguir mejorar su capacidad pronóstica.

Con ello, seguiremos acercando la medicina molecular a la toma de decisiones en la práctica clínica habitual en pacientes hospitalizados por NAC.

## Conclusiones

- ❖ Niveles plasmáticos elevados de miR-146a y miR-16-5p, determinados en el momento del ingreso en pacientes hospitalizados por una neumonía adquirida en la comunidad (NAC), se asocian con menor mortalidad a los 30 días de seguimiento.
- ❖ Niveles plasmáticos reducidos de miR-17 determinados al ingreso por NAC se asocian con *Streptococcus pneumoniae* como agente etiológico probable de la neumonía.
- ❖ Ninguno de los miRNAs plasmáticos analizados en el momento del ingreso se asocia con la aparición de eventos cardiovasculares mayores (síndrome coronario agudo o ictus) a 1 año de seguimiento tras hospitalización por NAC.
- ❖ Ninguno de los miRNAs plasmáticos analizados en el momento del ingreso se asocia con mortalidad a 1 año de seguimiento tras una hospitalización por NAC.
- ❖ Niveles plasmáticos elevados de miR-16-5p se asocian de manera independiente con menor mortalidad a 30 días desde el ingreso hospitalario, en un modelo que incluye miR-146a, ajustado por las variables clínicas edad, sexo y antecedente de broncoaspiración.
- ❖ La capacidad predictiva de miR-146a y miR-16-5p sobre mortalidad a 30 días tras un ingreso por NAC es equiparable a la capacidad predictiva de la escala pronóstica PSI y de la escala pronóstica CURB-65.
- ❖ La determinación de miR-146a y miR-16-5p en plasma en el momento del ingreso hospitalario puede ser utilizada como biomarcador de buena evolución en sujetos hospitalizados por NAC.

## Bibliografía

- 1 Kuhn TS. *La estructura de las revoluciones científicas*. 4ª. México: : Fondo de Cultura Económica 2013. <https://www.overdrive.com/search?q=988A10FD-6281-45B6-9622-CDF391C072B8> (accessed 2 Jan 2021).
- 2 Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 1970;**227**:561–3.
- 3 Mattick JS. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 2003;**25**:930–9. doi:10.1002/bies.10332
- 4 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;**75**:843–54.
- 5 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;**403**:901–6. doi:10.1038/35002607
- 6 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;**294**:853–8. doi:10.1126/science.1064921
- 7 Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001;**107**:823–6.
- 8 Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, *et al.* MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;**8**:467–77. doi:10.1038/nrclinonc.2011.76
- 9 Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;**408**:86–9. doi:10.1038/35040556
- 10 Ambros V, Bartel B, Bartel DP, *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA N Y N* 2003;**9**:277–9.
- 11 Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D68–73. doi:10.1093/nar/gkt1181
- 12 Lee H, Han S, Kwon CS, *et al.* Biogenesis and regulation of the *let-7* miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* 2016;**7**:100–13. doi:10.1007/s13238-015-0212-y
- 13 Bracht J, Hunter KMD, Eachus R, *et al.* Trans-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. *RNA* 2004;**10**:1586–94. doi:10.1261/rna.7122604
- 14 Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;**432**:231–5. doi:10.1038/nature03049

- 15 Gregory RI, Yan K-P, Amuthan G, *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;**432**:235–40. doi:10.1038/nature03120
- 16 Yi R, Qin Y, Macara IG, *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;**17**:3011–6. doi:10.1101/gad.1158803
- 17 Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;**293**:834–8. doi:10.1126/science.1062961
- 18 Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* 2008;**132**:9–14. doi:10.1016/j.cell.2007.12.024
- 19 Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;**11**:597–610. doi:10.1038/nrg2843
- 20 Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, *et al.* A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 2010;**465**:584–9. doi:10.1038/nature09092
- 21 Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 2009;**136**:215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- 22 Niaz S, Hussain MU. Role of GW182 protein in the cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2018;**101**:29–38. doi:10.1016/j.biocel.2018.05.009
- 23 Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 2008;**15**:346–53. doi:10.1038/nsmb.1405
- 24 Gu W, Xu Y, Xie X, *et al.* The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA* 2014;**20**:1369–75. doi:10.1261/rna.044792.114
- 25 Varani G. A cap for all occasions. *Struct Lond Engl* 1993 1997;**5**:855–8.
- 26 Rom E, Kim HC, Gingras A-C, *et al.* Cloning and Characterization of 4EHP, a Novel Mammalian eIF4E-related Cap-binding Protein. *J Biol Chem* 1998;**273**:13104–9. doi:10.1074/jbc.273.21.13104
- 27 Chen S, Gao G. MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs. *Protein Cell* 2017;**8**:750–61. doi:10.1007/s13238-017-0444-0
- 28 Franks TM, Lykke-Andersen J. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell* 2008;**32**:605–15. doi:10.1016/j.molcel.2008.11.001
- 29 Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, *et al.* Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 2006;**125**:1111–24. doi:10.1016/j.cell.2006.04.031
- 30 Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, *et al.* Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 2009;**11**:1143–9. doi:10.1038/ncb1929

- 31 Davis BN, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal CCS* 2009;**7**:18. doi:10.1186/1478-811X-7-18
- 32 Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999;**18**:3004–16. doi:10.1038/sj.onc.1202746
- 33 O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, *et al.* c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;**435**:839–43. doi:10.1038/nature03677
- 34 Chang T-C, Yu D, Lee Y-S, *et al.* Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 2008;**40**:43–50. doi:10.1038/ng.2007.30
- 35 Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, *et al.* Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 2010;**24**:992–1009. doi:10.1101/gad.1884710
- 36 Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, *et al.* Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 2007;**315**:1137–40. doi:10.1126/science.1138050
- 37 Valadi H, Ekström K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;**9**:654–9. doi:10.1038/ncb1596
- 38 Chen X, Liang H, Zhang J, *et al.* Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 2012;**22**:125–32. doi:10.1016/j.tcb.2011.12.001
- 39 Fernández-Messina L, Gutiérrez-Vázquez C, Rivas-García E, *et al.* Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* 2015;**107**:61–77. doi:10.1111/boc.201400081
- 40 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;**200**:373–83. doi:10.1083/jcb.201211138
- 41 Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:5003–8. doi:10.1073/pnas.1019055108
- 42 Wang K, Zhang S, Weber J, *et al.* Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010;**38**:7248–59. doi:10.1093/nar/gkq601
- 43 Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, *et al.* MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;**13**:423–33. doi:10.1038/ncb2210
- 44 Gallo A, Tandon M, Alevizos I, *et al.* The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012;**7**:e30679. doi:10.1371/journal.pone.0030679
- 45 Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, *et al.* Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011;**39**:7223–33. doi:10.1093/nar/gkr254

- 46 Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, *et al.* SORTING IT OUT: REGULATION OF EXOSOME LOADING. *Semin Cancer Biol* 2014;**28**:3–13. doi:10.1016/j.semcancer.2014.04.009
- 47 Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* 2013;**4**. doi:10.1038/ncomms3980
- 48 Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol Oncol* 2017;**11**:1673–86. doi:10.1002/1878-0261.12144
- 49 Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, *et al.* Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet* 2013;**4**:119. doi:10.3389/fgene.2013.00119
- 50 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;**431**:350–5. doi:10.1038/nature02871
- 51 Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2008;**65**:545–62. doi:10.1007/s00018-007-7355-9
- 52 Pauley KM, Chan EKL. MicroRNAs and Their Emerging Roles in Immunology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;**1143**:226–39. doi:10.1196/annals.1443.009
- 53 Kumar Kingsley SM, Vishnu Bhat B. Role of MicroRNAs in the development and function of innate immune cells. *Int Rev Immunol* 2017;**36**:154–75. doi:10.1080/08830185.2017.1284212
- 54 Murata K, Yoshitomi H, Furu M, *et al.* MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ* 2014;**66**:549–59. doi:10.1002/art.38269
- 55 Li Y, Dalli J, Chiang N, *et al.* Plasticity of leukocytic exudates in resolving acute inflammation is regulated by MicroRNA and proresolving mediators. *Immunity* 2013;**39**:885–98. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.011
- 56 Meisgen F, Xu Landén N, Wang A, *et al.* MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2014;**134**:1931–40. doi:10.1038/jid.2014.89
- 57 Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, *et al.* Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008;**451**:1125–9. doi:10.1038/nature06607
- 58 Fan H-B, Liu Y-J, Wang L, *et al.* miR-142-3p acts as an essential modulator of neutrophil development in zebrafish. *Blood* 2014;**124**:1320–30. doi:10.1182/blood-2013-12-545012
- 59 Zuo H, Yuan J, Chen Y, *et al.* A MicroRNA-Mediated Positive Feedback Regulatory Loop of the NF- $\kappa$ B Pathway in *Litopenaeus vannamei*. *J Immunol Baltim Md 1950* 2016;**196**:3842–53. doi:10.4049/jimmunol.1502358
- 60 Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, *et al.* Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:5282–7. doi:10.1073/pnas.0810909106



- 61 Schmeier S, MacPherson CR, Essack M, *et al.* Deciphering the transcriptional circuitry of microRNA genes expressed during human monocytic differentiation. *BMC Genomics* 2009;**10**:595. doi:10.1186/1471-2164-10-595
- 62 Moschos SA, Williams AE, Perry MM, *et al.* Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics* 2007;**8**:240. doi:10.1186/1471-2164-8-240
- 63 Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat Rev Immunol* 2016;**16**:279–94. doi:10.1038/nri.2016.40
- 64 O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, *et al.* MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:1604–9. doi:10.1073/pnas.0610731104
- 65 O’Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, *et al.* Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:7113–8. doi:10.1073/pnas.0902636106
- 66 Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, *et al.* NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:12481–6. doi:10.1073/pnas.0605298103
- 67 Ying H, Kang Y, Zhang H, *et al.* MiR-127 modulates macrophage polarization and promotes lung inflammation and injury by activating the JNK pathway. *J Immunol Baltim Md 1950* 2015;**194**:1239–51. doi:10.4049/jimmunol.1402088
- 68 Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 2014;**20**:460–9. doi:10.1016/j.molmed.2014.06.005
- 69 Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol* 2016;**231**:25–30. doi:10.1002/jcp.25056
- 70 Chen J-Q, Papp G, Szodoray P, *et al.* The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2016;**15**:1171–80. doi:10.1016/j.autrev.2016.09.003
- 71 Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* 2011;**8**:388–403. doi:10.1038/cmi.2011.26
- 72 Laín Entralgo P. *La Medicina hipocrática*. 1.reimpr. Madrid: : Alianza Ed 1987.
- 73 Laín Entralgo P. *Estudios de historia de la medicina y de antropología médica*. Tomo I. ;:375.
- 74 Lim WS, Baudouin SV, George RC, *et al.* BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax* 2009;**64**:iii1–55. doi:10.1136/thx.2009.121434
- 75 Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, *et al.* Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis* 2007;**44**:S27–72. doi:10.1086/511159

- 76 Marriott HM, Dockrell DH. The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res* 2007;**33**:493–505. doi:10.1080/01902140701756562
- 77 Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* 2008;**358**:716–27. doi:10.1056/NEJMra074111
- 78 Mizgerd JP. Respiratory infection and the impact of pulmonary immunity on lung health and disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;**186**:824–9. doi:10.1164/rccm.201206-1063PP
- 79 Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**160**:S5-11. doi:10.1164/ajrccm.160.supplement\_1.4
- 80 Yamamoto K, Ahyi A-NN, Pepper-Cunningham ZA, *et al.* Roles of lung epithelium in neutrophil recruitment during pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;**50**:253–62. doi:10.1165/rcmb.2013-0114OC
- 81 Pittet LA, Quinton LJ, Yamamoto K, *et al.* Earliest Innate Immune Responses Require Macrophage RelA during Pneumococcal Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;**45**:573–81. doi:10.1165/rcmb.2010-0210OC
- 82 Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP. Integrative Physiology of Pneumonia. *Physiol Rev* 2018;**98**:1417–64. doi:10.1152/physrev.00032.2017
- 83 Craig A, Mai J, Cai S, *et al.* Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun* 2009;**77**:568–75. doi:10.1128/IAI.00832-08
- 84 Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:159–75. doi:10.1038/nri3399
- 85 Hilliard KL, Allen E, Traber KE, *et al.* The Lung-Liver Axis: A Requirement for Maximal Innate Immunity and Hepatoprotection during Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;**53**:378–90. doi:10.1165/rcmb.2014-0195OC
- 86 Picard C, Casanova J-L, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IκBα deficiency. *Clin Microbiol Rev* 2011;**24**:490–7. doi:10.1128/CMR.00001-11
- 87 Wilkinson TM, Li CKF, Chui CSC, *et al.* Preexisting influenza-specific CD4<sup>+</sup> T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med* 2012;**18**:274–80. doi:10.1038/nm.2612
- 88 Strutt TM, McKinstry KK, Dibble JP, *et al.* Memory CD4<sup>+</sup> T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* 2010;**16**:558–64. doi:10.1038/nm.2142
- 89 Chen K, Kolls JK. T Cell–Mediated Host Immune Defenses in the Lung. *Annu Rev Immunol* 2013;**31**:605–33. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100019
- 90 Janssen WJ, Barthel L, Muldrow A, *et al.* Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**184**:547–60. doi:10.1164/rccm.201011-1891OC
- 91 Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 2010;**189**:1059–70. doi:10.1083/jcb.201004096

- 92 Kessler B, Rinchai D, Kewcharoenwong C, *et al.* Interleukin 10 inhibits pro-inflammatory cytokine responses and killing of *Burkholderia pseudomallei*. *Sci Rep* 2017;**7**:42791. doi:10.1038/srep42791
- 93 Singer BD, Mock JR, Aggarwal NR, *et al.* Regulatory T cell DNA methyltransferase inhibition accelerates resolution of lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;**52**:641–52. doi:10.1165/rcmb.2014-0327OC
- 94 Traber KE, Symer EM, Allen E, *et al.* Myeloid-epithelial cross talk coordinates synthesis of the tissue-protective cytokine leukemia inhibitory factor during pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017;**313**:L548–58. doi:10.1152/ajplung.00482.2016
- 95 Mizgerd JP. Inflammation and Pneumonia. *Clin Chest Med* 2018;**39**:669–76. doi:10.1016/j.ccm.2018.07.002
- 96 Netea MG, Joosten LAB, Latz E, *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016;**352**:aaf1098. doi:10.1126/science.aaf1098
- 97 Roquilly A, McWilliam HEG, Jacqueline C, *et al.* Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* 2017;**47**:135-147.e5. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.021
- 98 Sun K, Metzger DW. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon- $\gamma$  during recovery from influenza infection. *Nat Med* 2008;**14**:558–64. doi:10.1038/nm1765
- 99 Kellum JA, Kong L, Fink MP, *et al.* Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med* 2007;**167**:1655–63. doi:10.1001/archinte.167.15.1655
- 100 Yende S, D'Angelo G, Mayr F, *et al.* Elevated Hemostasis Markers after Pneumonia Increases One-Year Risk of All-Cause and Cardiovascular Deaths. *PLOS ONE* 2011;**6**:e22847. doi:10.1371/journal.pone.0022847
- 101 Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, *et al.* Inflammatory Markers at Hospital Discharge Predict Subsequent Mortality after Pneumonia and Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**177**:1242–7. doi:10.1164/rccm.200712-1777OC
- 102 Solomon CG, Wunderink RG, Waterer GW. Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med* 2014;**370**:543–51. doi:10.1056/NEJMcp1214869
- 103 Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis* 2017;**17**:1133–61. doi:10.1016/S1473-3099(17)30396-1
- 104 Mangen M-JJ, Huijts SM, Bonten MJM, *et al.* The impact of community-acquired pneumonia on the health-related quality-of-life in elderly. *BMC Infect Dis* 2017;**17**:208. doi:10.1186/s12879-017-2302-3

- 105 Andrade LF, Saba G, Ricard J-D, *et al.* Health related quality of life in patients with community-acquired pneumococcal pneumonia in France. *Health Qual Life Outcomes* 2018;**16**:28. doi:10.1186/s12955-018-0854-6
- 106 Broulette J, Yu H, Pyenson B, *et al.* The incidence rate and economic burden of community-acquired pneumonia in a working-age population. *Am Health Drug Benefits* 2013;**6**:494–503.
- 107 Konomura K, Nagai H, Akazawa M. Economic burden of community-acquired pneumonia among elderly patients: a Japanese perspective. *Pneumonia Nathan Qld* 2017;**9**:19. doi:10.1186/s41479-017-0042-1
- 108 Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012;**67**:71–9. doi:10.1136/thx.2009.129502
- 109 Peyrani P, Mandell L, Torres A, *et al.* The burden of community-acquired bacterial pneumonia in the era of antibiotic resistance. *Expert Rev Respir Med* 2018;**1**–14. doi:10.1080/17476348.2019.1562339
- 110 Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. iCMBD: indicadores y ejes de análisis del CMBD. 2016. <http://icmbd.es/indicadorAction.do?method=list> (accessed 26 Jan 2019).
- 111 Montull B, Menéndez R, Torres A, *et al.* Predictors of Severe Sepsis among Patients Hospitalized for Community-Acquired Pneumonia. *PLOS ONE* 2016;**11**:e0145929. doi:10.1371/journal.pone.0145929
- 112 Ranzani OT, Prina E, Menéndez R, *et al.* New Sepsis Definition (Sepsis-3) and Community-acquired Pneumonia Mortality. A Validation and Clinical Decision-Making Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;**196**:1287–97. doi:10.1164/rccm.201611-2262OC
- 113 Uranga A, España PP. Long-term Mortality in Community-acquired Pneumonia. *Arch Bronconeumol Engl Ed* 2018;**54**:412–3. doi:10.1016/j.arbr.2017.12.015
- 114 Curbelo J, Rajas O, Arnalich B, *et al.* Estudio del porcentaje de neutrófilos y el cociente de neutrófilos-linfocitos como marcadores pronósticos en pacientes hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad. *Arch Bronconeumol* 2019;**55**:472–7. doi:10.1016/j.arbres.2019.02.005
- 115 de Miguel-Díez J, Jiménez-García R, Hernández-Barrera V, *et al.* Trends in hospitalizations for community-acquired pneumonia in Spain: 2004 to 2013. *Eur J Intern Med* 2017;**40**:64–71. doi:10.1016/j.ejim.2016.12.010
- 116 Bartolomé M, Almirall J, Morera J, *et al.* A population-based study of the costs of care for community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2004;**23**:610–6.
- 117 Osler W. *The principles and practice of medicine, designed for the use of practitioners and students of medicine.* Edinburgh ; London : Young J. Putland, c1892 1892. <http://archive.org/details/principlespractooosle> (accessed 26 Jan 2019).
- 118 Luna CM, Palma I, Niederman MS, *et al.* The Impact of Age and Comorbidities on the Mortality of Patients of Different Age Groups Admitted with Community-

- acquired Pneumonia. *Ann Am Thorac Soc* 2016;**13**:1519–26. doi:10.1513/AnnalsATS.201512-848OC
- 119 Weir DL, Majumdar SR, McAlister FA, *et al.* The impact of multimorbidity on short-term events in patients with community-acquired pneumonia: prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2015;**21**:264.e7-264.e13. doi:10.1016/j.cmi.2014.11.002
- 120 Cillóniz C, Polverino E, Ewig S, *et al.* Impact of age and comorbidity on cause and outcome in community-acquired pneumonia. *Chest* 2013;**144**:999–1007. doi:10.1378/chest.13-0062
- 121 Ito A, Ishida T, Tokumasu H, *et al.* Prognostic factors in hospitalized community-acquired pneumonia: a retrospective study of a prospective observational cohort. *BMC Pulm Med* 2017;**17**:78. doi:10.1186/s12890-017-0424-4
- 122 Waterer GW, Self WH, Courtney DM, *et al.* In-Hospital Deaths Among Adults With Community-Acquired Pneumonia. *Chest* 2018;**154**:628–35. doi:10.1016/j.chest.2018.05.021
- 123 Yende S, Angus DC, Ali IS, *et al.* Influence of Comorbid Conditions on Long-Term Mortality After Pneumonia in Older People: MORTALITY AFTER PNEUMONIA HOSPITALIZATION. *J Am Geriatr Soc* 2007;**55**:518–25. doi:10.1111/j.1532-5415.2007.01100.x
- 124 Adamuz J, Viasus D, Jiménez-Martínez E, *et al.* Incidence, timing and risk factors associated with 1-year mortality after hospitalization for community-acquired pneumonia. *J Infect* 2014;**68**:534–41. doi:10.1016/j.jinf.2014.02.006
- 125 Mortensen EM, Kapoor WN, Chang C-CH, *et al.* Assessment of mortality after long-term follow-up of patients with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2003;**37**:1617–24. doi:10.1086/379712
- 126 Myles PR, Hubbard RB, Gibson JE, *et al.* Pneumonia mortality in a UK general practice population cohort. *Eur J Public Health* 2009;**19**:521–6. doi:10.1093/eurpub/ckp081
- 127 Mortensen EM, Kapoor WN, Chang C-CH, *et al.* Assessment of mortality after long-term follow-up of patients with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2003;**37**:1617–24. doi:10.1086/379712
- 128 Bruns AHW, Oosterheert JJ, Cucciolillo MC, *et al.* Cause-specific long-term mortality rates in patients recovered from community-acquired pneumonia as compared with the general Dutch population. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2011;**17**:763–8. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03296.x
- 129 Holter JC, Ueland T, Jennum PA, *et al.* Risk Factors for Long-Term Mortality after Hospitalization for Community-Acquired Pneumonia: A 5-Year Prospective Follow-Up Study. *PLoS One* 2016;**11**:e0148741. doi:10.1371/journal.pone.0148741
- 130 Johnstone J, Eurich DT, Majumdar SR, *et al.* Long-term morbidity and mortality after hospitalization with community-acquired pneumonia: a population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2008;**87**:329–34. doi:10.1097/MD.0b013e318190f444



- 131 Corrales-Medina VF, Alvarez KN, Weissfeld LA, *et al.* Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease. *JAMA* 2015;**313**:264–74. doi:10.1001/jama.2014.18229
- 132 Corrales-Medina VF, Taljaard M, Yende S, *et al.* Intermediate and long-term risk of new-onset heart failure after hospitalization for pneumonia in elderly adults. *Am Heart J* 2015;**170**:306–12. doi:10.1016/j.ahj.2015.04.028
- 133 Myint PK, Hawkins KR, Clark AB, *et al.* Long-term mortality of hospitalized pneumonia in the EPIC-Norfolk cohort. *Epidemiol Infect* 2016;**144**:803–9. doi:10.1017/S0950268815001971
- 134 Eurich DT, Marrie TJ, Minhas-Sandhu JK, *et al.* Ten-Year Mortality after Community-acquired Pneumonia. A Prospective Cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;**192**:597–604. doi:10.1164/rccm.201501-0140OC
- 135 Mortensen EM, Copeland LA, Pugh MJ, *et al.* Diagnosis of pulmonary malignancy after hospitalization for pneumonia. *Am J Med* 2010;**123**:66–71. doi:10.1016/j.amjmed.2009.08.009
- 136 Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, *et al.* Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**177**:1242–7. doi:10.1164/rccm.200712-1777OC
- 137 Yende S, D'Angelo G, Mayr F, *et al.* Elevated Hemostasis Markers after Pneumonia Increases One-Year Risk of All-Cause and Cardiovascular Deaths. *PLoS ONE* 2011;**6**:e22847. doi:10.1371/journal.pone.0022847
- 138 Peyrani P, Ramirez JA. One-Year Mortality in Patients with Community-Acquired Pneumonia. *J Respir Infect* 2017;**1**. doi:10.18297/jri/vol1/iss4/10
- 139 Koukkunen H, Penttilä K, Kempainen A, *et al.* C-reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in the prognostic classification of unstable angina pectoris. *Ann Med* 2001;**33**:37–47.
- 140 Castañeda S, Martín-Martínez MA, González-Juanatey C, *et al.* Cardiovascular morbidity and associated risk factors in Spanish patients with chronic inflammatory rheumatic diseases attending rheumatology clinics: Baseline data of the CARMA Project. *Semin Arthritis Rheum* 2015;**44**:618–26. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.12.002
- 141 Seedat MA, Feldman C, Skoularigis J, *et al.* A study of acute community-acquired pneumonia, including details of cardiac changes. *Q J Med* 1993;**86**:669–75.
- 142 Violi F, Cangemi R, Falcone M, *et al.* Cardiovascular Complications and Short-term Mortality Risk in Community-Acquired Pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2017;**64**:1486–93. doi:10.1093/cid/cix164
- 143 Eurich DT, Marrie TJ, Minhas-Sandhu JK, *et al.* Risk of heart failure after community acquired pneumonia: prospective controlled study with 10 years of follow-up. *BMJ* 2017;**356**:j413.
- 144 Corrales-Medina VF, Musher DM, Wells GA, *et al.* Cardiac complications in patients with community-acquired pneumonia: incidence, timing, risk factors, and association with short-term mortality. *Circulation* 2012;**125**:773–81. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040766

- 145 Corrales-Medina VF, Musher DM, Shachkina S, *et al.* Acute pneumonia and the cardiovascular system. *The Lancet* 2013;**381**:496–505.
- 146 Perry TW, Pugh MJV, Waterer GW, *et al.* Incidence of cardiovascular events after hospital admission for pneumonia. *Am J Med* 2011;**124**:244–51. doi:10.1016/j.amjmed.2010.11.014
- 147 Bruns AHW, Oosterheert JJ, Cucciolillo MC, *et al.* Cause-specific long-term mortality rates in patients recovered from community-acquired pneumonia as compared with the general Dutch population. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2011;**17**:763–8. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03296.x
- 148 Corrales-Medina VF, Taljaard M, Fine MJ, *et al.* Risk stratification for cardiac complications in patients hospitalized for community-acquired pneumonia. *Mayo Clin Proc* 2014;**89**:60–8. doi:10.1016/j.mayocp.2013.09.015
- 149 Viasus D, Garcia-Vidal C, Manresa F, *et al.* Risk stratification and prognosis of acute cardiac events in hospitalized adults with community-acquired pneumonia. *J Infect* 2013;**66**:27–33. doi:10.1016/j.jinf.2012.09.003
- 150 Sungurlu S, Balk RA. The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Management of Pneumonia. *Clin Chest Med* 2018;**39**:691–701. doi:10.1016/j.ccm.2018.07.004
- 151 Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, *et al.* A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med* 1997;**336**:243–50. doi:10.1056/NEJM199701233360402
- 152 Lim WS, Lewis S, Macfarlane JT. Severity prediction rules in community acquired pneumonia: a validation study. *Thorax* 2000;**55**:219–23. doi:10.1136/thorax.55.3.219
- 153 Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, *et al.* Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2007;**44 Suppl 2**:S27-72. doi:10.1086/511159
- 154 España PP, Capelastegui A, Gorordo I, *et al.* Development and Validation of a Clinical Prediction Rule for Severe Community-acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;**174**:1249–56. doi:10.1164/rccm.200602-177OC
- 155 Sibila O, Restrepo MI. Biomarkers in community-acquired pneumonia: still searching for the one. *Eur Respir J* 2019;**53**:1802469. doi:10.1183/13993003.02469-2018
- 156 Wang XH, Liu SQ, Wang YL, *et al.* Correlation of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 in patients with acute coronary syndrome. *Genet Mol Res* 2014;**13**:4260–6. doi:10.4238/2014.June.9.11
- 157 Curbelo J, Luquero Bueno S, Galván-Román JM, *et al.* Inflammation biomarkers in blood as mortality predictors in community-acquired pneumonia admitted patients: Importance of comparison with neutrophil count percentage or neutrophil-lymphocyte ratio. *PLOS ONE* 2017;**12**:e0173947. doi:10.1371/journal.pone.0173947



- 158 Bueno SL, Galván-Román JM, Curbelo J, *et al.* Interleukin-6 levels as an evolution marker of late mortality and cardiovascular events after an episode of community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2018;**52**:PA2606. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA2606
- 159 Nichols L, Chew B. Causes of sudden unexpected death of adult hospital patients. *J Hosp Med* 2012;**7**:706–8. doi:10.1002/jhm.1980
- 160 Kip KE, Hollabaugh K, Marroquin OC, *et al.* The Problem With Composite End Points in Cardiovascular Studies. *J Am Coll Cardiol* 2008;**51**:701–7. doi:10.1016/j.jacc.2007.10.034
- 161 Valgimigli M, Frigoli E, Leonardi S, *et al.* Bivalirudin or Unfractionated Heparin in Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 2015;**373**:997–1009. doi:10.1056/NEJMoa1507854
- 162 Johnston SC, Amarenco P, Albers GW, *et al.* Ticagrelor versus Aspirin in Acute Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med* 2016;**375**:35–43. doi:10.1056/NEJMoa1603060
- 163 Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, *et al.* 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2016;**37**:2315–81. doi:10.1093/eurheartj/ehw106
- 164 Cooney MT, Selmer R, Lindman A, *et al.* Cardiovascular risk estimation in older persons: SCORE O.P. *Eur J Prev Cardiol* 2016;**23**:1093–103. doi:10.1177/2047487315588390
- 165 Bordon J, Wiemken T, Peyrani P, *et al.* Decrease in Long-term Survival for Hospitalized Patients With Community-Acquired Pneumonia. *Chest* 2010;**138**:279–83. doi:10.1378/chest.09-2702
- 166 Murcia J, Llorens P, Sánchez-Payá J, *et al.* Functional status determined by Barthel Index predicts community acquired pneumonia mortality in general population. *J Infect* 2010;**61**:458–64. doi:10.1016/j.jinf.2010.08.006
- 167 Rajas O, Ortega-Gómez M, Román JMG, *et al.* The incidence of cardiovascular events after hospitalization due to CAP and their association with different inflammatory markers. *BMC Pulm Med* 2014;**14**:197.
- 168 Endzeliņš E, Berger A, Melne V, *et al.* Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer* 2017;**17**:730. doi:10.1186/s12885-017-3737-z
- 169 Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, *et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:14888–93. doi:10.1073/pnas.1408301111
- 170 Backes C, Meese E, Keller A. Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther* 2016;**20**:509–18. doi:10.1007/s40291-016-0221-4

- 171 Wang K, Yuan Y, Cho J-H, *et al.* Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma. *PLoS ONE* 2012;**7**:e41561. doi:10.1371/journal.pone.0041561
- 172 Wu X, Yang J, Yu L, *et al.* Plasma miRNA-223 correlates with risk, inflammatory markers as well as prognosis in sepsis patients. *Medicine (Baltimore)* 2018;**97**:e11352. doi:10.1097/MD.00000000000011352
- 173 Caserta S, Kern F, Cohen J, *et al.* Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Sci Rep* 2016;**6**:28006. doi:10.1038/srep28006
- 174 Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, *et al.* Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 2014;**11**:809–15. doi:10.1038/nmeth.3014
- 175 Andreu Z, Rivas E, Sanguino-Pascual A, *et al.* Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *J Extracell Vesicles* 2016;**5**:31655. doi:10.3402/jev.v5.31655
- 176 Brunetto MR, Cavallone D, Oliveri F, *et al.* A serum microRNA signature is associated with the immune control of chronic hepatitis B virus infection. *PloS One* 2014;**9**:e110782. doi:10.1371/journal.pone.0110782
- 177 Brunet-Vega A, Pericay C, Quílez ME, *et al.* Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits. *Anal Biochem* 2015;**488**:28–35. doi:10.1016/j.ab.2015.07.018
- 178 Kirschner MB, van Zandwijk N, Reid G. Cell-free microRNAs: potential biomarkers in need of standardized reporting. *Front Genet* 2013;**4**:56. doi:10.3389/fgene.2013.00056
- 179 Marabita F, de Candia P, Torri A, *et al.* Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform* 2016;**17**:204–12. doi:10.1093/bib/bbv056
- 180 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001;**25**:402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- 181 Pirola CJ, Gianotti TF, Castaño GO, *et al.* Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 2015;**64**:800–12. doi:10.1136/gutjnl-2014-306996
- 182 Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, *et al.* Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma. *PLoS ONE* 2011;**6**. doi:10.1371/journal.pone.0024145
- 183 Exiqon. miRCURY™ microRNA QC PCR Panel Expression Analysis Instruction manual v2.0 #203887-203892. 2014. <https://www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/QC-PCR-Panel-Manual.pdf>
- 184 Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, *et al.* Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods San Diego Calif* 2010;**50**:298–301. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.032

- 185 Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SC-H, *et al.* The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet* 2013;**4**. doi:10.3389/fgene.2013.00094
- 186 McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, *et al.* Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clin Chem* 2011;**57**:833–40. doi:10.1373/clinchem.2010.157198
- 187 Thorsen M, Blondal T, Mouritzen P. Quantitative RT-PCR for MicroRNAs in Biofluids. In: Gautier J-C, ed. *Drug Safety Evaluation*. New York, NY: : Springer New York 2017. 379–98. doi:10.1007/978-1-4939-7172-5\_21
- 188 Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, *et al.* Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 2015;**61**:1333–42. doi:10.1373/clinchem.2015.239459
- 189 D’haene B, Mestdagh P, Hellemans J, *et al.* miRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization. In: Fan J-B, ed. *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology*. Totowa, NJ: : Humana Press 2012. 261–72. doi:10.1007/978-1-61779-427-8\_18
- 190 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;**3**:research0034.1. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- 191 Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;**64**:5245–50. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- 192 Keller A, Rounge T, Backes C, *et al.* Sources to variability in circulating human miRNA signatures. *RNA Biol* 2017;**14**:1791–8. doi:10.1080/15476286.2017.1367888
- 193 Pencina MJ, Agostino RBD, Agostino RBD, *et al.* Evaluating the added predictive ability of a new marker: From area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med* 2008;**27**:157–72. doi:https://doi.org/10.1002/sim.2929
- 194 Unidad de Bioestadística Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal. 6.16 - Evaluación de los modelos de regresión logística. Mater. Docente. [http://www.hrc.es/bioest/IDI\\_y\\_%20NRI.html](http://www.hrc.es/bioest/IDI_y_%20NRI.html) (accessed 16 Nov 2020).
- 195 Abd-El-Fattah AA, Sadik NAH, Shaker OG, *et al.* Differential microRNAs expression in serum of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, and pneumonia. *Cell Biochem Biophys* 2013;**67**:875–84. doi:10.1007/s12013-013-9575-y
- 196 Zhang X, Guo J, Fan S, *et al.* Screening and Identification of Six Serum microRNAs as Novel Potential Combination Biomarkers for Pulmonary Tuberculosis Diagnosis. *PLOS ONE* 2013;**8**:e81076. doi:10.1371/journal.pone.0081076
- 197 Lin J, Wang Y, Zou Y-Q, *et al.* Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* Published Online First: 14 October 2016. doi:10.1007/s13277-016-5410-6

- 198 Yi Z, Fu Y, Ji R, *et al.* Altered microRNA signatures in sputum of patients with active pulmonary tuberculosis. *PloS One* 2012;**7**:e43184. doi:10.1371/journal.pone.0043184
- 199 Huang F, Bai J, Zhang J, *et al.* Identification of potential diagnostic biomarkers for pneumonia caused by adenovirus infection in children by screening serum exosomal microRNAs. *Mol Med Rep* 2019;**19**:4306–14. doi:10.3892/mmr.2019.10107
- 200 Poore GD, Ko ER, Valente A, *et al.* A miRNA Host Response Signature Accurately Discriminates Acute Respiratory Infection Etiologies. *Front Microbiol* 2018;**9**. doi:10.3389/fmicb.2018.02957
- 201 Wang L, Wang H-C, Chen C, *et al.* Differential expression of plasma miR-146a in sepsis patients compared with non-sepsis-SIRS patients. *Exp Ther Med* 2013;**5**:1101–4. doi:10.3892/etm.2013.937
- 202 Wu X, Wu C, Gu W, *et al.* Serum Exosomal MicroRNAs Predict Acute Respiratory Distress Syndrome Events in Patients with Severe Community-Acquired Pneumonia. *BioMed Res Int* 2019;**2019**:3612020. doi:10.1155/2019/3612020
- 203 Zhang W, Jia J, Liu Z, *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0. *BMC Pulm Med* 2019;**19**:93. doi:10.1186/s12890-019-0836-4
- 204 Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, *et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2002;**16**:720–8. doi:10.1101/gad.974702
- 205 Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, *et al.* A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* 2007;**129**:1401–14. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040
- 206 Rinnerthaler G, Hackl H, Gampenrieder SP, *et al.* miR-16-5p Is a Stably-Expressed Housekeeping MicroRNA in Breast Cancer Tissues from Primary Tumors and from Metastatic Sites. *Int J Mol Sci* 2016;**17**. doi:10.3390/ijms17020156
- 207 Thompson KL, Boitier E, Chen T, *et al.* Absolute Measurement of Cardiac Injury-Induced microRNAs in Biofluids across Multiple Test Sites. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2016;**154**:115–25. doi:10.1093/toxsci/kfw143
- 208 Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LOF, *et al.* MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:2595–606. doi:10.1161/ATVBAHA.111.236521
- 209 Sun Y, Xiong Y, Yan C, *et al.* Downregulation of microRNA-16-5p accelerates fracture healing by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of osteoblasts in patients with traumatic brain injury. *Am J Transl Res* 2019;**11**:4746–60.
- 210 Cai B, Ma M, Chen B, *et al.* MiR-16-5p targets SESN1 to regulate the p53 signaling pathway, affecting myoblast proliferation and apoptosis, and is involved

- in myoblast differentiation. *Cell Death Dis* 2018;**9**:367. doi:10.1038/s41419-018-0403-6
- 211 Spinetti G, Fortunato O, Caporali A, *et al.* MicroRNA-15a and MicroRNA-16 Impair Human Circulating Proangiogenic Cell Functions and Are Increased in the Proangiogenic Cells and Serum of Patients With Critical Limb Ischemia. *Circ Res* 2013;**112**:335–46. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300418
- 212 Ye E-A, Liu L, Jiang Y, *et al.* miR-15a/16 reduces retinal leukostasis through decreased pro-inflammatory signaling. *J Neuroinflammation* 2016;**13**:305. doi:10.1186/s12974-016-0771-8
- 213 Zhang K, Han Y, Zhao Y, *et al.* Upregulated gga-miR-16-5p Inhibits the Proliferation Cycle and Promotes the Apoptosis of MG-Infected DF-1 Cells by Repressing PIK3R1-Mediated the PI3K/Akt/NF-κB Pathway to Exert Anti-Inflammatory Effect. *Int J Mol Sci* 2019;**20**. doi:10.3390/ijms20051036
- 214 Xu J, Zhang L, Shu G, *et al.* microRNA-16-5p promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through regulating EPT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;**514**:1251–6. doi:10.1016/j.bbrc.2019.04.179
- 215 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:13944–9. doi:10.1073/pnas.0506654102
- 216 Zhu C, Huang Q, Zhu H. Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway. *DNA Cell Biol* 2018;**37**:244–52. doi:10.1089/dna.2017.4040
- 217 Zhang H, Yang K, Ren T, *et al.* miR-16-5p inhibits chordoma cell proliferation, invasion and metastasis by targeting Smad3. *Cell Death Dis* 2018;**9**:680. doi:10.1038/s41419-018-0738-z
- 218 Chen S-S, Tang C-H, Chie M-J, *et al.* Resistin facilitates VEGF-A-dependent angiogenesis by inhibiting miR-16-5p in human chondrosarcoma cells. *Cell Death Dis* 2019;**10**:31. doi:10.1038/s41419-018-1241-2
- 219 Cheng B, Ding F, Huang C-Y, *et al.* Role of miR-16-5p in the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;**23**:137–45. doi:10.26355/eurrev\_201901\_16757
- 220 Ruan L, Qian X. MiR-16-5p inhibits breast cancer by reducing AKT3 to restrain NF-κB pathway. *Biosci Rep* 2019;**39**. doi:10.1042/BSR20191611
- 221 Munson PB, Hall EM, Farina NH, *et al.* Exosomal miR-16-5p as a target for malignant mesothelioma. *Sci Rep* 2019;**9**:11688. doi:10.1038/s41598-019-48133-0
- 222 Zheng C, Zheng Z, Sun J, *et al.* MiR-16-5p mediates a positive feedback loop in EV71-induced apoptosis and suppresses virus replication. *Sci Rep* 2017;**7**:16422. doi:10.1038/s41598-017-16616-7
- 223 Liu G-P, Wang W-W, Lu W-Y, *et al.* The mechanism of miR-16-5p protection on LPS-induced A549 cell injury by targeting CXCR3. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol* 2019;**47**:1200–6. doi:10.1080/21691401.2019.1593998



- 224 Dunaeva M, Blom J, Thurlings R, *et al.* Circulating serum miR-223-3p and miR-16-5p as possible biomarkers of early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2018;**193**:376–85. doi:10.1111/cei.13156
- 225 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, *et al.* Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol CB* 2002;**12**:735–9. doi:10.1016/s0960-9822(02)00809-6
- 226 Williams AE, Perry MM, Moschos SA, *et al.* Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans* 2008;**36**:1211–5. doi:10.1042/BST0361211
- 227 Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 2008;**29**:343–51. doi:10.1016/j.it.2008.04.004
- 228 Xie Y-F, Shu R, Jiang S-Y, *et al.* miRNA-146 negatively regulates the production of pro-inflammatory cytokines via NF- $\kappa$ B signalling in human gingival fibroblasts. *J Inflamm Lond Engl* 2014;**11**:38. doi:10.1186/s12950-014-0038-z
- 229 Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, *et al.* MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging* 2009;**1**:402–11. doi:10.18632/aging.100042
- 230 Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, *et al.* The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;**63**:1582–90. doi:10.1002/art.30321
- 231 Chen Q-Z, Luo F, Lu M-X, *et al.* HTNV-induced upregulation of miR-146a in HUVECs promotes viral infection by modulating pro-inflammatory cytokine release. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;**493**:807–13. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.073
- 232 Griss K, Bertrams W, Sittka-Stark A, *et al.* MicroRNAs Constitute a Negative Feedback Loop in *Streptococcus pneumoniae* –Induced Macrophage Activation. *J Infect Dis* 2016;**214**:288–99. doi:10.1093/infdis/jiw109
- 233 Jiang S-Y, Xue D, Xie Y-F, *et al.* The negative feedback regulation of microRNA-146a in human periodontal ligament cells after *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al* 2015;**64**:441–51. doi:10.1007/s00011-015-0824-y
- 234 Lukiw WJ, Dua P, Pogue AI, *et al.* Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome. *J Toxicol Environ Health A* 2011;**74**:1460–8. doi:10.1080/15287394.2011.618973
- 235 Aronica E, Fluiters K, Iyer A, *et al.* Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2010;**31**:1100–7. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07122.x
- 236 Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem* 2008;**283**:31315–22. doi:10.1074/jbc.M805371200

- 237 Zhang B, Wang L-L, Ren R-J, *et al.* MicroRNA-146a represses LRP2 translation and leads to cell apoptosis in Alzheimer’s disease. *FEBS Lett* 2016;**590**:2190–200. doi:10.1002/1873-3468.12229
- 238 Yang K, He YS, Wang XQ, *et al.* MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 2011;**585**:854–60. doi:10.1016/j.febslet.2011.02.009
- 239 Chen T, Li Z, Jing T, *et al.* MicroRNA-146a regulates the maturation process and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting CD40L in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett* 2011;**585**:567–73. doi:10.1016/j.febslet.2011.01.010
- 240 Ye E-A, Steinle JJ. miR-146a Attenuates Inflammatory Pathways Mediated by TLR4/NF-κB and TNFα to Protect Primary Human Retinal Microvascular Endothelial Cells Grown in High Glucose. *Mediators Inflamm* 2016;**2016**:3958453. doi:10.1155/2016/3958453
- 241 Zhang Y-G, Song Y, Guo X-L, *et al.* Exosomes derived from oxLDL-stimulated macrophages induce neutrophil extracellular traps to drive atherosclerosis. *Cell Cycle Georget Tex* 2019;**18**:2674–84. doi:10.1080/15384101.2019.1654797
- 242 Seo H-H, Lee S-Y, Lee CY, *et al.* Exogenous miRNA-146a Enhances the Therapeutic Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells by Increasing Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Ischemia/Reperfusion-Injured Heart. *J Vasc Res* 2017;**54**:100–8. doi:10.1159/000461596
- 243 Wu ZW, Liu YF, Wang S, *et al.* miRNA-146a induces vascular smooth muscle cell apoptosis in a rat model of coronary heart disease via NF-κB pathway. *Genet Mol Res GMR* 2015;**14**:18703–12. doi:10.4238/2015.December.28.19
- 244 Dong S, Xiong W, Yuan J, *et al.* MiRNA-146a regulates the maturation and differentiation of vascular smooth muscle cells by targeting NF-κB expression. *Mol Med Rep* 2013;**8**:407–12. doi:10.3892/mmr.2013.1538
- 245 Hwang W-L, Jiang J-K, Yang S-H, *et al.* MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat Cell Biol* 2014;**16**:268–80. doi:10.1038/ncb2910
- 246 Cheng W-C, Liao T-T, Lin C-C, *et al.* RAB27B-activated secretion of stem-like tumor exosomes delivers the biomarker microRNA-146a-5p, which promotes tumorigenesis and associates with an immunosuppressive tumor microenvironment in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2019;**145**:2209–24. doi:10.1002/ijc.32338
- 247 Hu H-Q, Sun L-G, Guo W-J. Decreased miRNA-146a in glioblastoma multiforme and regulation of cell proliferation and apoptosis by target Notch1. *Int J Biol Markers* 2016;**31**:e270-275. doi:10.5301/jbm.5000194
- 248 Xi K, Wang W, Wen Y, *et al.* Combining Plasma miRNAs and Computed Tomography Features to Differentiate the Nature of Pulmonary Nodules. *Front Oncol* 2019;**9**:975. doi:10.3389/fonc.2019.00975
- 249 Xi K-X, Zhang X-W, Yu X-Y, *et al.* The role of plasma miRNAs in the diagnosis of pulmonary nodules. *J Thorac Dis* 2018;**10**:4032–41. doi:10.21037/jtd.2018.06.106



- 250 Sun H-Y, Lv A-K, Yao H. Relationship of miRNA-146a to primary Sjögren's syndrome and to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2017;**37**:1311–6. doi:10.1007/s00296-017-3756-8
- 251 Abou-Zeid A, Saad M, Soliman E. MicroRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factor-alpha and disease activity. *Genet Test Mol Biomark* 2011;**15**:807–12. doi:10.1089/gtmb.2011.0026
- 252 Ouyang Y, Fu X, Peng S, *et al.* Plasma miR-146a predicts serological conversion of hepatitis B e-antigen (HBeAg) in chronic hepatitis B patients treated with nucleotide analogs. *Ann Transl Med* 2019;**7**:449. doi:10.21037/atm.2019.08.72
- 253 Rong Y, Bao W, Shan Z, *et al.* Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2013;**8**:e73272. doi:10.1371/journal.pone.0073272
- 254 Ramkaran P, Khan S, Phulukdaree A, *et al.* miR-146a polymorphism influences levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in young patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Biophys* 2014;**68**:259–66. doi:10.1007/s12013-013-9704-7
- 255 Kotb HG, Ibrahim AH, Mohamed EF, *et al.* The expression of microRNA 146a in patients with ischemic stroke: an observational study. *Int J Gen Med* 2019;**12**:273–8. doi:10.2147/IJGM.S213535
- 256 Cai Z-G, Zhang S-M, Zhang Y, *et al.* MicroRNAs are dynamically regulated and play an important role in LPS-induced lung injury. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;**90**:37–43. doi:10.1139/y11-095
- 257 Zeng Z, Gong H, Li Y, *et al.* Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury. *Exp Lung Res* 2013;**39**:275–82. doi:10.3109/01902148.2013.808285
- 258 McMillan DH, Woeller CF, Thatcher TH, *et al.* Attenuation of inflammatory mediator production by the NF- $\kappa$ B member RelB is mediated by microRNA-146a in lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;**304**:L774–781. doi:10.1152/ajplung.00352.2012
- 259 Perry MM, Moschos SA, Williams AE, *et al.* Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008;**180**:5689–98. doi:10.4049/jimmunol.180.8.5689
- 260 Gao W, Yang H. MicroRNA-124-3p attenuates severe community-acquired pneumonia progression in macrophages by targeting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *Int J Mol Med* 2019;**43**:1003–10. doi:10.3892/ijmm.2018.4011
- 261 Wang Y, Li Y, Zhang P, *et al.* Regenerative therapy based on miRNA-302 mimics for enhancing host recovery from pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;**116**:8493–8. doi:10.1073/pnas.1818522116
- 262 Luquero-Bueno S, Galván-Román JM, Curbelo J, *et al.* Interleukin-6 levels as an evolution marker of late mortality and cardiovascular events after an episode of community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2018;**52**:PA2606. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA2606

- 263 Galvan Roman J m., Lancho A, Luquero Bueno S, *et al.* Usefulness of Plasmatic MiR-146a and MiR-16-5p as Prognostic Biomarkers in Community-Acquired Pneumonia. In: *A28. BACTERIAL AND VIRAL LUNG INFECTIONS AND PATHOGENESIS*. American Thoracic Society 2019. A1204–A1204. doi:10.1164/ajrccm-conference.2019.199.1\_MeetingAbstracts.A1204
- 264 Galván-Román JM, Lancho-Sánchez Á, Luquero-Bueno S, *et al.* Usefulness of circulating microRNAs miR-146a and miR-16-5p as prognostic biomarkers in community-acquired pneumonia. *PLOS ONE* 2020;**15**:e0240926. doi:10.1371/journal.pone.0240926
- 265 Waterer G, Bennett L. Improving outcomes from community-acquired pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 2015;**21**:219–25. doi:10.1097/MCP.000000000000155
- 266 Viasus D, Simonetti AF, Garcia-Vidal C, *et al.* Impact of antibiotic de-escalation on clinical outcomes in community-acquired pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2017;**72**:547–53. doi:10.1093/jac/dkw441
- 267 Uranga A, España PP, Bilbao A, *et al.* Duration of Antibiotic Treatment in Community-Acquired Pneumonia: A Multicenter Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med* 2016;**176**:1257–65. doi:10.1001/jamainternmed.2016.3633
- 268 Petersen PT, Egelund GB, Jensen AV, *et al.* Associations between biomarkers at discharge and co-morbidities and risk of readmission after community-acquired pneumonia: a retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 2018;**37**:1103–11. doi:10.1007/s10096-018-3224-8
- 269 miRNA Entry for MI0000071. [http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000071](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000071) (accessed 24 Jan 2021).
- 270 Izreig S, Samborska B, Johnson RM, *et al.* The miR-17~92 microRNA Cluster Is a Global Regulator of Tumor Metabolism. *Cell Rep* 2016;**16**:1915–28. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.036
- 271 Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, *et al.* Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PloS One* 2014;**9**:e97078. doi:10.1371/journal.pone.0097078
- 272 Tu H, Yang S, Jiang T, *et al.* Elevated pulmonary tuberculosis biomarker miR-423-5p plays critical role in the occurrence of active TB by inhibiting autophagosome-lysosome fusion. *Emerg Microbes Infect* 2019;**8**:448–60. doi:10.1080/22221751.2019.1590129
- 273 Kumar R, Sahu SK, Kumar M, *et al.* MicroRNA 17-5p regulates autophagy in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages by targeting Mcl-1 and STAT3. *Cell Microbiol* 2016;**18**:679–91. doi:10.1111/cmi.12540
- 274 Zhu Z, Qi Y, Ge A, *et al.* Comprehensive characterization of serum microRNA profile in response to the emerging avian influenza A (H7N9) virus infection in humans. *Viruses* 2014;**6**:1525–39. doi:10.3390/v6041525
- 275 Zeiner GM, Norman KL, Thomson JM, *et al.* Toxoplasma gondii infection specifically increases the levels of key host microRNAs. *PloS One* 2010;**5**:e8742. doi:10.1371/journal.pone.0008742

- 276 Violi F, Cangemi R, Falcone M, *et al.* Cardiovascular Complications and Short-term Mortality Risk in Community-Acquired Pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2017;**64**:1486–93. doi:10.1093/cid/cix164
- 277 Corrales-Medina VF, Musher DM, Wells GA, *et al.* Cardiac complications in patients with community-acquired pneumonia: incidence, timing, risk factors, and association with short-term mortality. *Circulation* 2012;**125**:773–81. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040766
- 278 Ma A-J, Zhu X-Y, Yang S-N, *et al.* Associations of CXCL16, miR-146a and miR-146b in atherosclerotic apolipoprotein E-knockout mice. *Mol Med Rep* 2018;**18**:2995–3002. doi:10.3892/mmr.2018.9270
- 279 O Sullivan JF, Neylon A, McGorrian C, *et al.* miRNA-93-5p and other miRNAs as predictors of coronary artery disease and STEMI. *Int J Cardiol* 2016;**224**:310–6. doi:10.1016/j.ijcard.2016.09.016
- 280 Kazmierczyk E, Eljaszewicz A, Zembko P, *et al.* The relationships among monocyte subsets, miRNAs and inflammatory cytokines in patients with acute myocardial infarction. *Pharmacol Rep PR* 2019;**71**:73–81. doi:10.1016/j.pharep.2018.09.007
- 281 Li S-H, Chen L, Pang X-M, *et al.* Decreased miR-146a expression in acute ischemic stroke directly targets the Fbxl10 mRNA and is involved in modulating apoptosis. *Neurochem Int* 2017;**107**:156–67. doi:10.1016/j.neuint.2017.01.011
- 282 Jiang H, Toscano JF, Song SS, *et al.* Differential expression of circulating exosomal microRNAs in refractory intracranial atherosclerosis associated with antiangiogenesis. *Sci Rep* 2019;**9**. doi:10.1038/s41598-019-54542-y

## Anexos

Anexo 1: Carta de aprobación del Comité de Ética de la Investigación Clínica, abril 2015.



### COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Madrid, 13 de abril de 2015

El **Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa** en su reunión del día 09-04-2015 (acta 07/15) evaluó el siguiente proyecto de investigación:

**TÍTULO:** Identificación de microRNAs implicados en la respuesta inflamatoria, aparición de eventos cardiovasculares y mortalidad en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad

**Nº de Registro:** PI-823

**Investigador principal:** Dr. Javier Aspa Marco (Servicio de Neumología)

**Decisión tomada:** Aprobación (9-04-15)

Este Comité Ético de Investigación Clínica considera que tanto el proyecto de investigación como la Hoja de información al paciente y consentimiento informado son **ética y metodológicamente aceptables**. Asimismo, considera que los investigadores son competentes para llevar a cabo este proyecto que está enmarcado dentro de las líneas de investigación prioritarias del Hospital Universitario de La Princesa.



Fdo: **Dr. Francisco Abad Santos**  
Presidente del C.E.I.C.

Anexo 2: Comunicación en ATS International Conference 2019, Dallas (Tx, EEUU), mayo 2019.

304

# Usefulness of Plasmatic miR-146a and miR-16-5p as Prognostic Biomarkers in Community-Acquired Pneumonia

JM. Galván Roman<sup>1</sup>, A. Lanchó<sup>2</sup>, S. Luquero Bueno<sup>3</sup>, L. Vega Piris<sup>4</sup>, J. Curbelo<sup>1</sup>, G. Mateos<sup>2</sup>, M. Gomez<sup>4</sup>, M. Ortega Gomez<sup>3</sup>, J. Aspa<sup>2</sup>

(1) Internal Medicine, H.U. de La Princesa, (HUP), Madrid, Spain. / (2) Pneumology, HUP, Madrid, Spain. / (3) Biobank, Health Research Institute of HUP (IS-PRINCESA) / (4) Methodology Unit, (IS-PRINCESA)

### Background

MicroRNAs (miRNA) are a type of small non-coding RNA involved in a large number of biological processes through their regulatory function on messenger RNA. miRNAs have been linked to the evolution of inflammatory processes. However, its pattern of expression has not been well characterized in community-acquired pneumonia (CAP), the main inflammatory pulmonary disease.

Adapted from Ryan et al [1]

### Methods

Subjects were selected from a cohort of Spanish patients admitted for CAP in 2015. Clinical, analytical and outcomes variables were recorded until 1-year follow-up. RNA from frozen plasma samples was purified with a column-based protocol and reverse transcription reaction was performed (Exqon). Synthetic controls RNA spike-in were added. Quality by microRNA qPCR panel was performed and 117 samples passed the test completely.

Eight samples (4 patients who suffered an adverse event during follow-up and 4 who did not) were used to perform an exploratory test by a miRNA microarray analysis in order to determine a global miRNA expression profile and a preliminary pattern of miRNA expression in patients with different evolution pneumonias. A total of 25 miRNA candidates were chosen both from pilot study and from previous scientific literature. PCR was carried out in 384-well plates in a CFX384 Real-Time System (Roche). Relative amount of each miRNA was calculated as  $\Delta Ct = Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ UniSp2}$ . Normalization process was made with 4 endogenous target of reference, chosen through GeNorm algorithm. Final data were derived from the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  and values were expressed in fold changes (FC) with respect to UniSp2 [2]. Statistical analysis was performed by the program STATA.

### Results

The main clinical and sociodemographic characteristics of the complete cohort of 153 patients are shown in the table on the right. A total of 117 patients with of good enough quality plasma samples were included in the subsequent analysis. Of the 25 miRNAs tested, only 10 had valid semiquantitative results in all selected patients (miR107, miR17-5p, miR21, miR144-3p, miR16-5p, miR486, miR20a, miR34a-3p, miR106b-5p, miR146a). miR17-5p was significantly reduced in patients who suffered pneumococcal pneumonia ( $p=0.025$ ). miR16-5p and miR146a were significantly higher in surviving patients at 30-days follow-up with respect to non-surviving (see figures below)

### Conclusions

The strategy of selecting miRNAs candidates by searching the literature and using microarrays with small representative subgroups is a valid approach for the study of miRNAs in CAP. Elevated levels of miR-146a and miR-16-5p at the time of admission for CAP are associated with lower mortality at 30 days of follow-up. Both miRNAs could be used as biomarkers of good prognosis in this group of patients.

### Discussion

This study shows that the molecular response measured by the levels of certain circulating miRNAs at the beginning of a CAP is related to the prognosis in the medium-term follow-up. The control of the infection and the control of the unbridled inflammation is the cornerstone for a good evolution of the CAP. In this sense, miR-146a has been implicated in the regulation of the nuclear signaling factor, NF- $\kappa$ B [3], and miR-16 seems to inhibit the activation of the NLRP3 inflammasome [4] - both by blocking the TLR4 pathway - which would lead to an anti-inflammatory protective effect in acute lung infection.

### References

- Ryan B, John G, Williams JM. Plasmid released microRNA and their potential contributions to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci*. 2015;9:236-245.
- Martín-Baron C, Cardeas P, Tor A, Torgé J, Akbergen S, Berez BL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform*. 2016;17(2):204-12.
- Nahed MA, Salah M, Char EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2011;8:386-403.
- Yang Y, Wang S, Wang Y, et al. miR-16 inhibits IL-6/STAT3 signaling pathway in acute lung injury. *Biomol Biotechnol*. 2019;Apr;12:108954.

### Objectives

**MAIN:** Study of the expression of circulating miRNAs in patients with CAP who require hospital admission.

**SECONDARY:**

- Correlating selected miRNA levels with the etiology, severity and short-/long-term prognosis of pneumonia.
- Analysis of the capacity of miRNAs to predict the occurrence of CVD in the follow-up after an episode of CAP.

### Fundings

### Institutions

### Conclusions

Interestingly, all patients whose miR-16-5p was higher than 66.32 FCs (30 patients, 26.6% of the sample) were alive at 30-days follow-up. None of the miRNAs analyzed showed association with mortality or CVD onset at 1-year follow-up.

### References

### Background

The main clinical and sociodemographic characteristics of the complete cohort of 153 patients are shown in the table on the right.


Main clinical and sociodemographic characteristics	mean / %	SD / n
Age (years)	75.8	16.1
Gender (male)	59.2	89
Alcoholism (former or active)	8.5	13
Smoking status (former or active)	65.1	100
Cognitive impairment	17.7	27
Charlson Comorbidity Index modified (CCI <sub>m</sub> )	3.12	2.94
SCORE-CP cardiovascular index	7.4	4.7
Pneumonia Severity Index (PSI)	103	35.2
CURB-65 index	2.8	1.1
Et. <i>Streptococcus Pneumoniae</i>	11.1	17
Mortality at 30-days follow-up	11.8	37
Mortality at 1-year follow-up	24.2	37
Cardiovascular disease and mortality at 1-year	40.5	62

### Results

### Fundings



Anexo 3: Comunicación en 52º Congreso SEPAR, Santiago de Compostela, junio 2019



**52º CONGRESO SEPAR SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
DEL 20 AL 26 DE JUNIO DE 2019

#18

## UTILIDAD DE LOS microRNAs miR-146A Y miR-16-5p PLASMÁTICOS COMO BIOMARCADORES PRONÓSTICOS EN LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

José María Galván Román<sup>1</sup>, Ángel Lancho Sánchez<sup>1</sup>, Sergio Luquero Bueno<sup>2</sup>, Lorena Vega Piris<sup>2</sup>, Jose Curbelo García<sup>1</sup>, Gloria Mateo Jiménez<sup>1</sup>, Manuel Gómez Gutiérrez<sup>2</sup>, Mara Ortega Gómez<sup>2</sup>, Javier Aspa Marco<sup>1</sup>

1. Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España. / 2. Instituto de Investigación Sanitaria del H.U. de La Princesa (IIS-IP), Madrid, España

**Introducción**

Los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) sufren una respuesta inflamatoria sistémica que se relaciona con la mortalidad y con la aparición de eventos cardiovasculares (ECV). Los microRNAs (miRNAs) participan en la inflamación como moduladores de la respuesta inmune. Su patrón de expresión y su papel como biomarcadores en la NAC no ha sido completamente caracterizado.

**Objetivos**

**PRINCIPAL:** Estudiar la expresión de miRNAs circulantes en pacientes con NAC que requieren ingreso hospitalario

**SECUNDARIOS:**

- (1) Correlacionar los niveles de miRNAs con la gravedad de la NAC.
- (2) Analizar la capacidad predictiva de los miRNAs en la aparición de ECV en el seguimiento de pacientes tras un episodio de NAC.

**Material y métodos**

Estudio observacional prospectivo sobre una cohorte de 153 pacientes Ingresados por NAC en 2015 en el H.U. de La Princesa (Madrid). A estos pacientes se les extrajo una analítica de sangre el primer día de ingreso y se recogieron variables clínicas al ingreso y hasta un año de seguimiento. Las variables principales fueron mortalidad a los 30 días y al año de seguimiento, y la aparición de eventos cardiovasculares mayores (IAM, ictus o muerte) en el mismo periodo de tiempo. Se purificó RNA de pequeño tamaño a partir de plasma mediante protocolo basado en columnas (Exiqon®). Se evaluó la calidad el proceso (QC control) y 117 muestras pasaron la prueba de idoneidad. Se seleccionaron 8 muestras (4 pacientes que habían sufrido un evento adverso durante el seguimiento y 4 que no) y se testó un panel de 752 miRNAs humanos con el fin de determinar un patrón preliminar de expresión diferencial de miRNAs entre pacientes con NAC de diferente evolución. Se eligieron 25 miRNAs candidatos, procedentes del estudio exploratorio y de la literatura científica. La PCR se llevó a cabo mediante rt-PCR CFX384 (Roche®). La cantidad relativa de cada miRNA se calculó con  $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{UniSP2}$  y fue normalizada mediante el algoritmo GeNorm. Los datos finales se calcularon con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y los valores se expresaron en número de veces que la cantidad relativa se duplicó (fold changes, FC) respecto a UniSP2. El programa estadístico utilizado fue STATA.

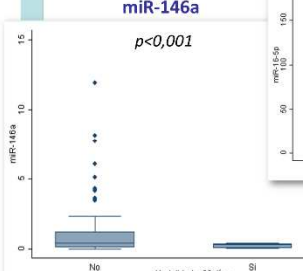
**Resultados**

Las principales características clínicas y sociodemográficas de la cohorte se muestran en la siguiente tabla:

Principales características de la cohorte	n=153	
	media / %	DE / n
Edad	75,68	16,13
Sexo (varón)	58,2	89
Enoismo (activo o pasado)	8,5	13
Tabaquismo (activo o pasado)	65,1	100
Deterioro cognitivo	17,7	27
Índice de Charlson modificado	3,12	2,94
Índice SCORE-OP de RCV	7,42	4,69
Escala de Fine (PSI)	103,00	35,16
Escala CURB-65	2,78	1,09
Etiología <i>Strept. Pneumoniae</i>	11,1	17
Mortalidad a 30 días	11,8	18
Mortalidad a 1 año	24,2	37
ECV y mortalidad a 1 año	40,5	62

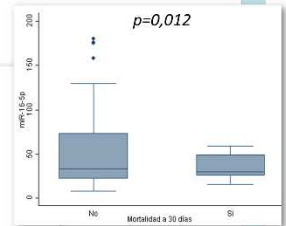
Un total de 117 pacientes tuvieron datos válidos sobre niveles de miRNAs circulantes y fueron incluidos para su análisis posterior. El miR17-5p fue significativamente menor en pacientes con NAC neumocócica (p=0,025). MiR16-5p y miR146a fueron significativamente más altos en los pacientes vivos a los 30 días de seguimiento respecto a los fallecidos (gráficos mostrados a continuación)

**miR-146a**



p < 0,001

**miR-16-5p**




p = 0,012

Llamativamente, todos los pacientes cuyo miR-16-5p fue superior a 66 FCs (30 pacientes, 26.6%) estaban vivos a los 30 días. Ninguno de los miRNAs analizados se asoció con mortalidad o aparición de eventos cardiovasculares mayores a 1 año de seguimiento.

**Conclusiones**

**Niveles elevados de miR-146a-5p y miR-16-5p al ingreso por NAC se asocian con una menor mortalidad a los 30 días de seguimiento.** Estos dos miRNAs podrían ser utilizados como biomarcadores de buena evolución en sujetos hospitalizados por NAC.

Participan:



Financiado por:



Anexo 4: Artículo original publicado en la revista PLoS One, octubre de 2020 (primera página)

## PLOS ONE

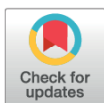
RESEARCH ARTICLE

## Usefulness of circulating microRNAs miR-146a and miR-16-5p as prognostic biomarkers in community-acquired pneumonia

José María Galván-Román<sup>1,2\*</sup>, Ángel Lancho-Sánchez<sup>3,4</sup>, Sergio Luquero-Bueno<sup>5</sup>, Lorena Vega-Piris<sup>6</sup>, Jose Curbelo<sup>1</sup>, Marcos Manzanque-Pradales<sup>4</sup>, Manuel Gómez<sup>6</sup>, Hortensia de la Fuente<sup>2</sup>, Mara Ortega-Gómez<sup>5</sup>, Javier Aspa<sup>3</sup>

1 Department of Internal Medicine, University Hospital La Princesa, Madrid, Spain, 2 Department of Immunology, Biomedical Research Institute of UH La Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain, 3 Department of Immunology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, 4 Department of Pneumology, University Hospital La Princesa, Madrid, Spain, 5 Biobank, Biomedical Research Institute of UH La Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain, 6 Methodology Unit, Biomedical Research Institute of UH La Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain

\* josemaria.galvan@salud.madrid.org



## OPEN ACCESS

**Citation:** Galván-Román JM, Lancho-Sánchez Á, Luquero-Bueno S, Vega-Piris L, Curbelo J, Manzanque-Pradales M, et al. (2020) Usefulness of circulating microRNAs miR-146a and miR-16-5p as prognostic biomarkers in community-acquired pneumonia. PLoS ONE 15(10): e0240926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240926>

**Editor:** Bernard Mari, Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire, FRANCE

**Received:** April 3, 2020

**Accepted:** October 5, 2020

**Published:** October 23, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240926>

**Copyright:** © 2020 Galván-Román et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All data generated during this research are openly available from

## Abstract

## Introduction

Patients with community-acquired pneumonia (CAP) undergo a dysregulated host response that is related to mortality. MicroRNAs (miRNAs) participate in this response, but their expression pattern and their role as biomarkers in CAP have not been fully characterized.

## Methods

A prospective observational study was performed in a cohort of 153 consecutive patients admitted to hospital with CAP. Clinical and analytical variables were collected, and the main outcome variable was 30-day mortality. Small RNA was purified from plasma of these patients obtained on the first day of admission, and miRNA expression was analyzed by RT-PCR. Univariate and multivariate analyses were carried out through the construction of a logistic regression model. The proposed model was compared with established prognostic clinical scales using ROC curve analysis.

## Results

The mean age of the patients included was 74.7 years [SD 15.9]. Their mean PSI was 100.9 [SD 34.6] and the mean modified Charlson index was 2.9 [SD 3.0]. Both miR-146a and miR-16-5p showed statistically significant association with 30-day mortality after admission due to CAP (1.10 vs. 0.23 and 51.74 vs. 35.23, respectively), and this association remained for miR-16-5p in the multivariate analysis adjusted for age, gender and history of bronchoaspiration (OR 0.95,  $p = 0.021$ ). The *area-under-the-curve* (AUC) of our adjusted multivariate model (AUC = 0.954 95%CI [0.91–0.99]), was better than those of prognostic scales such as PSI (AUC = 0.799 [0.69–0.91]) and CURB-65 (AUC = 0.722 [0.58–0.86]).