



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

FACULDADE
DE
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

PEDRO MIGUEL DA SILVA TEIXEIRA

***O Papel do Microbioma Respiratório na Doença Pulmonar
Obstrutiva Crónica***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE PNEUMOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

SARA ELISABETE MARTA DE OLIVEIRA DA SILVA FREITAS

TIAGO MANUEL POMBO ALFARO

MAIO DE 2020

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA – RNA ribossomal 16S

BOLD – *Burden of Obstructive Lung Disease*

CAT – Teste de avaliação de DPOC

CCL – *C-C motif chemokine ligand*

CD – *Cluster* de diferenciação

CRP – Proteína C reativa

CXCL – *C-X-C motif chemokine ligand*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

FEV1 – Volume expiratório forçado no 1º segundo

FVC – Capacidade vital forçada

G:F – Gammaproteobacteria:Firmicutes

GOLD – *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*

ICS – Corticosteróide inalado

IFN - Interferão

IL - Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

LABA – Agonista beta de longa duração

LAMA – Antagonista muscarínico de longa duração

LBA – Lavado broncoalveolar

LPS - Lipopolissacarídeo

LTB4 – Leucotrieno B4

MBL – *Mannose binding lectin*

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

NET – Armadilhas extracelulares de neutrófilos

OTU – Unidade taxonómica operacional

PAMP – Padrão molecular associado a patógeno

PCR – Reação em cadeia de polimerase

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa

RNA – Ácido ribonucleico

TC – Tomografia Computorizada

Th – Célula T *helper*

TLR – Recetor do tipo *Toll*

TNF – Fator de necrose tumoral

VE – Vesícula extracelular

VSR – Vírus sincicial respiratório

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução.....	3
2. Metodologia	5
3. O estudo do microbioma.....	6
3.1 MÉTODOS DE SEQUENCIAÇÃO.....	6
3.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE AMOSTRA	7
3.3 TOPOGRAFIA E DINÂMICAS.....	9
4. O microbioma pulmonar de indivíduos saudáveis	11
5. Modificações na DPOC.....	12
5.1 O MICROBIOMA NA DPOC ESTÁVEL.....	12
5.2 O MICROBIOMA NAS EXACERBAÇÕES.....	16
6. A influência do tabaco.....	20
7. Microbioma e inflamação	22
8. Impacto das terapêuticas.....	26
8.1 EXPOSIÇÃO A ANTIBIOTERAPIA.....	26
8.2 EXPOSIÇÃO A CORTICOSTERÓIDES.....	29
9. Conclusão.....	32
10. Apêndice	33
TABELA 1. RESUMO DOS ESTUDOS QUE INVESTIGARAM O MICROBIOMA PULMONAR DE DOENTES COM DPOC ESTÁVEL	33
TABELA 2. RESUMO DOS ESTUDOS QUE INVESTIGARAM O MICROBIOMA PULMONAR DE DOENTES EM EXACERBAÇÃO AGUDA DE DPOC.....	35
11. Bibliografia	37

RESUMO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) é uma doença complexa, prevenível e tratável, que representa uma das principais causas mundiais de morbimortalidade. A inflamação das vias respiratórias possui um papel central na sua patogénese, contudo os mecanismos envolvidos não estão ainda totalmente esclarecidos. Com base nas novas técnicas independentes de cultura, atualmente é reconhecida a existência de alterações na composição e abundância do microbioma das vias aéreas de doentes com patologia pulmonar, particularmente na DPOC. Porém, está ainda por clarificar se a ocorrência de disbiose é causa ou consequência das transformações fisiopatológicas subjacentes à doença e de que forma pode influenciar a progressão desta.

Nesta revisão, fornece-se uma perspetiva sobre os métodos de estudo do microbioma respiratório, sobre a sua composição e sobre as modificações que nele ocorrem, no âmbito da DPOC. É também discutido o efeito dos regimes terapêuticos e de que forma modulam a microbiota respiratória na doença estável e nas exacerbações. Finalmente, são descritas as limitações dos estudos atuais e as perspetivas futuras de investigação.

PALAVRAS CHAVE: doença pulmonar obstrutiva crónica; doenças respiratórias; microbioma pulmonar; disbiose; inflamação; sequenciação 16S rRNA

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a complex, preventable and treatable disease, that represents a leading cause of morbimortality worldwide. Inflammation of the respiratory tract plays a central role in its pathogenesis, though the mechanisms involved are not yet fully understood. Based on the new culture-independent techniques, nowadays it is acknowledged the existence of changes in the composition and abundance of the respiratory tract microbiome of patients with pulmonary diseases, particularly COPD. However, it remains to be clarified whether the occurrence of dysbiosis is a cause or a consequence of the pathophysiological changes implied in the disease and how it can influence its progression.

In this review, a perspective is given on the methods of studying the respiratory microbiome, on its composition and on the changes that occur in it, regarding COPD. It is also discussed the effects of therapeutic regimens and how they modulate the respiratory microbiota in stable disease and in exacerbations. Finally, the limitations of current studies and future perspectives of investigation are described.

KEYWORDS: chronic obstructive pulmonary disease; respiratory diseases; pulmonary microbiome; dysbiosis; inflammation; 16S rRNA sequencing

1. INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) é uma doença comum, heterogénea, caracterizada por sintomas respiratórios persistentes e limitação do débito aéreo devido a alterações nas vias respiratórias e/ou alveolares. Atualmente, é a terceira causa mundial de morte e morbilidade, afetando mais de 380 milhões de pessoas em todo o planeta e estima-se que, devido a esta, ocorram 3 milhões de mortes anualmente.¹ Em Portugal, de acordo com um estudo no âmbito do *Burden of Obstructive Lung Disease* (BOLD), a prevalência da DPOC situa-se nos 14,2%, sendo que 7,3% apresentam DPOC pelo menos de grau moderado.² De acordo com a Iniciativa Global pela Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*, GOLD), é uma doença prevenível e tratável, contudo não totalmente reversível e geralmente com agravamento progressivo ao longo do tempo.³

A inalação de fumo de tabaco ou de outras partículas nocivas como a combustão de biomassa causa uma resposta fisiológica normal de inflamação pulmonar. Todavia, na DPOC a resposta inflamatória aparenta estar modificada, induzindo várias alterações estruturais e fisiopatológicas nas vias aéreas, na superfície alveolar e nos vasos pulmonares. Entre elas incluem-se o enfisema pulmonar, a bronquite crónica e a doença das pequenas vias aéreas. O enfisema é caracterizado como um alargamento anómalo das paredes alveolares distais aos bronquíolos terminais, com perda do *recoil* elástico, que tem como consequência a perda das ligações alveolares e a limitação do débito aéreo e das trocas gasosas. A bronquite crónica é definida por tosse crónica produtiva com duração superior a 3 meses, durante pelo menos 2 anos consecutivos. Está relacionada com a inflamação das paredes brônquicas, aumento do infiltrado inflamatório, disfunção do epitélio ciliado e hiperplasia das células caliciformes com consequente aumento da secreção de muco. A limitação do débito aéreo compreende adicionalmente alterações da contratilidade do músculo liso, hiperreatividade brônquica e hiperinsuflação dinâmica. Na DPOC está também envolvido um componente sistémico inflamatório que pode incluir fraqueza muscular, mau status nutricional e IMC reduzido. Subjacente a estas alterações, têm sido propostos vários mecanismos, nomeadamente stress oxidativo, desequilíbrio protease-antiprotease, ativação de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, linfócitos CD8+), aumento de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-8, TNF- α , LTB4) e fibrose peribronquiolar.⁴

As exacerbações agudas são outra característica da doença. Correspondem a episódios de agravamento sintomático incluindo aumento da produção de expectoração, dispneia, tosse e pieira, cuja etiologia inclui agentes infecciosos e não infecciosos. São

mais frequentes em doentes com DPOC avançada e normalmente requerem terapêutica adicional e em casos mais graves internamento hospitalar.

Apesar de ser bem conhecida a associação entre a DPOC, o tabaco e outros poluentes atmosféricos, a fisiopatologia subjacente às alterações mencionadas não está totalmente esclarecida, desconhecendo-se a razão pela qual existe uma diversidade significativa, tanto na apresentação clínica e funcional, como também na resposta ao tratamento e no prognóstico. Deste modo, torna-se fundamental definir quais os determinantes biológicos implicados na heterogeneidade da DPOC, assim como identificar novos biomarcadores para guiar a individualização das estratégias terapêuticas.

Recentemente, o advento de novas técnicas de identificação de micro-organismos independentes de cultivo desencadeou uma onda de interesse no microbioma humano. Quando o Projeto do Microbioma Humano foi lançado em 2008, o estudo dos pulmões não foi incluído, dada a crença prevalente de que o pulmão saudável era estéril.⁵ Contudo, na última década vários estudos têm refutado esta ideia ao evidenciar a presença de um microbioma pulmonar diverso, tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos com patologia pulmonar, através de técnicas de sequenciação de genes, metagenómica, metatranscriptómica e metabolómica.⁶

O microbioma respiratório é, portanto, caracterizado pelos micro-organismos e respetivos genomas, presentes no tracto respiratório nas suas condições ambientais específicas. Tal como alterações do microbioma intestinal têm sido ligadas a várias patologias, também no microbioma respiratório têm sido descritas alterações em diversas doenças pulmonares tais como fibrose quística⁷, asma⁸, cancro do pulmão⁹ e DPOC. Com efeito, na DPOC, têm sido reportadas modificações na abundância e na diversidade em correlação com sintomatologia¹⁰, capacidade funcional^{11,12}, parâmetros inflamatórios¹³, entre outras.

Nesse sentido, o objetivo desta revisão é oferecer uma visão geral sobre a temática, sumariando a evidência mais recente relativamente ao impacto das alterações do microbioma na fisiopatologia da DPOC e, em última instância, fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos patogénicos subjacentes. Finalmente, pretende também discutir as suas limitações e as perspetivas futuras com relevância clínica.

2. METODOLOGIA

Na realização desta revisão bibliográfica foi efetuada uma pesquisa abrangente e sistemática de artigos publicados nas bases eletrônicas de referência da literatura médica MEDLINE, PUBMED e EMBASE. Foram utilizados os seguintes termos MeSH: *microbiome, lung microbiome, dysbiosis, chronic obstructive pulmonary disease, exacerbation*. A base de seleção compreendeu artigos entre Janeiro de 2010 e Janeiro de 2020, tendo adicionalmente sido incluídos artigos prévios à data estabelecida, devido à sua relevância clínica atual. Foram abrangidos artigos de língua inglesa, portuguesa e espanhola. Finalmente, foram também analisados artigos que constavam como referências dos artigos inicialmente pesquisados.

Os artigos científicos foram inicialmente triados com base na leitura dos resumos pela sua pertinência aos objetivos estabelecidos e à temática em estudo. Posteriormente foi realizada a leitura integral da bibliografia previamente selecionada. Foi dada preferência a artigos científicos originais, nomeadamente estudos clínicos comparativos e estudos multicêntricos, mas quando relevante foram também incluídos artigos de revisão de peritos.

DISCUSSÃO

3. O estudo do microbioma

3.1 Métodos de sequenciação

Os métodos de sequenciação não dependentes de cultura revelaram que o ser humano alberga um microbioma que vai muito para além daquele que era detetável através das técnicas de cultura convencionais.⁵ A escolha do melhor método para caracterizar um microbioma deve ter em conta qual o objetivo do estudo, assim como quais os pontos fortes e fracos de cada técnica.

Atualmente, a maioria dos estudos do microbioma pulmonar são baseados na sequenciação do gene 16S rRNA através de amplificação por PCR, gene este exclusivamente presente nas bactérias.¹⁴ Neste gene existem nove regiões hipervariáveis (V1-V9), sendo que as regiões V1-V3 têm maior sensibilidade, enquanto que V4-V5 maior especificidade, sendo estas últimas as mais comumente utilizadas na sequenciação de amostras de microbioma.¹⁵ Estas regiões permitem a distinção entre praticamente quase todas as bactérias patológicas, classificando-as taxonomicamente de forma rápida e a um custo relativamente baixo, através de bibliotecas taxonómicas disponíveis.

A unidade taxonómica operacional ou *operational taxonomic unit* (OTU) é a classificação habitualmente usada na análise de uma amostra microbiológica, agrupando sequências baseadas na sua similaridade, geralmente com um limiar acima de 97%. Desta forma, uma comunidade microbiana pode ser descrita usando vários parâmetros, desde o número de OTUs diferentes (diversidade/*richness*), a abundância relativa de cada um deles (equidade/*evenness*) ou a dominância de uma OTU singular. As métricas mais usadas são o parâmetro alfa (α), que mede a diversidade dentro de uma amostra, e o parâmetro beta (β) que mede a diversidade entre amostras. Assim, um microbioma que albergue uma larga variedade de espécies bacterianas terá uma diversidade α elevada. Por outro lado, um microbioma que varie substancialmente em relação a outro terá uma diversidade β elevada.¹⁶

Contudo, a técnica de sequenciação do gene 16S rRNA apresenta diversas limitações. A primeira delas é que oferece uma perspetiva qualitativa e não quantitativa, e por isso é recomendado que sejam usados métodos complementares como a PCR quantitativa para que se obtenha uma informação mais completa acerca da comunidade analisada. Outra limitação é que não permite distinguir bactérias vivas de bactérias

mortas, o que em certos casos, nomeadamente na avaliação do impacto de um antibiótico, poderá ser problemático. Para além disso, esta técnica não fornece informação sobre a presença de vírus ou fungos ou sobre a interação destes com a microbiota bacteriana. Finalmente, dado que as sequências do gene 16S rRNA são relativamente curtas, bactérias filogeneticamente próximas poderão partilhar sequências semelhantes, confundindo os resultados obtidos.⁶

Mais recentemente, outras abordagens têm sido realizadas no estudo do microbioma pulmonar, tais como estudos de sequenciação de metagenoma e metatranscriptoma. O estudo do metagenoma tem como principais vantagens oferecer uma resolução e um espectro mais alargado de deteção de micro-organismos e fornecer informação sobre a sua capacidade funcional e metabólica, permitindo conhecer não só quais são os organismos presentes, mas também o que estes fazem. Ainda assim, tal como a sequenciação do gene 16S rRNA, esta abordagem não distingue entre o DNA de organismos vivos ou mortos, e as alterações ao nível da expressão dos genes não são tidas em conta.¹⁷

A sequenciação do metatranscriptoma avalia o conteúdo genético ao nível do RNA. Ao contrário das técnicas anteriormente referidas, o metatranscriptoma foca-se na microbiota viva, representando a sua expressão genética e, nesse sentido, fornece um quadro mais fidedigno da capacidade funcional do microbioma. Além disso, ao analisar tanto RNA microbiano como RNA humano, permite conhecer as interações entre o microbioma e o próprio hospedeiro. Dado que os resultados podem refletir um enviesamento para genes com taxas de transcrição altas, esta técnica deve ser complementada por técnicas de sequenciamento de DNA para que a própria atividade transcricional seja examinada através de ratios RNA/DNA.¹⁸ Outra precaução está relacionada com o facto do RNA ter uma semivida curta e por isso requer cuidado extra na colheita, armazenamento e processamento de amostras.¹⁹

3.2 Métodos de obtenção de amostra

O estudo do microbioma pulmonar apresenta desafios técnicos próprios. No caso do estudo do microbioma do sistema digestivo, particularmente do microbioma intestinal, a alta carga biológica da amostra ultrapassa largamente qualquer potencial contaminação que tenha ocorrido. Contudo, no estudo do microbioma pulmonar, dada a baixa quantidade relativa de biomassa microbiana e a dificuldade na acessibilidade,

são necessários cuidados adicionais ao nível da técnica de obtenção da amostra e no processamento desta.²⁰

A amostra preferencialmente utilizada é o lavado bronco-alveolar (LBA) obtido através de broncoscopia mas outras amostras como expetoração, escovado da mucosa brônquica ou biópsia desta são igualmente usadas.²⁰ No entanto, a broncoscopia tem os seus inconvenientes tais como o desconforto causado, o custo e a necessidade de sedação. Adicionalmente, existe o risco da passagem do broncoscópio pela cavidade oral ou nasal e pela faringe poder contaminar as amostras, arrastando micro-organismos da via aérea superior para a inferior, influenciando os resultados obtidos.²¹ Contudo, Bassis *et al.*²² demonstraram que este possível risco de contaminação é mínimo dado que, por exemplo, não existem diferenças entre o local de inserção do broncoscópio (nasal versus oral), apesar do microbioma destes dois locais ser substancialmente diferente. Diversos estudos²²⁻²⁴ sugerem igualmente que em amostragens seriadas não existe um efeito de diluição progressivo que seria de esperar caso realmente existisse uma contaminação significativa pela passagem do broncoscópio na naso ou orofaringe.

Todavia, num estudo mais recente e de maior dimensão, Grønseth *et al.*²⁵ compararam o LBA obtido através de broncoscopia protegida, demonstrando que as amostras obtidas através deste método diferiam significativamente mais em relação ao lavado oral que as amostras obtidas por broncoscopia não protegida. Isto poderá querer indicar que, apesar de tudo, o efeito de contaminação não é totalmente negligenciável e este deve ser tido em conta na análise dos resultados obtidos.

A expetoração tem sido amplamente utilizada no estudo do microbioma pulmonar de várias doenças, nomeadamente da DPOC. Por ser facilmente obtida de forma não invasiva, tem sido empregue particularmente em estudos de perfil longitudinal ou que incluem um grande número de participantes. Contudo, por estar sujeita a um risco de contaminação superior às amostras obtidas por broncoscopia (como é o caso do LBA), é essencial para a interpretação dos resultados saber se esta reflete verdadeiramente a composição do microbioma das vias aéreas inferiores.¹⁸ Durack *et al.*²⁶ demonstraram um aumento de bactérias da cavidade oral em amostras de expetoração induzida versus biópsia brônquica. Foram também reportadas por Tangedal *et al.*²⁷, em doentes com DPOC, diferenças significativas entre a composição de amostras de expetoração natural e amostras de expetoração induzida. Adicionalmente, Gershman *et al.*²⁸ demonstraram que a duração da indução da expetoração afeta a composição desta, concluindo que as amostras recolhidas mais tardiamente correspondem a vias aéreas mais periféricas.

É necessário, no entanto, referir que apesar de estar sujeita a um risco de contaminação superior que o LBA, múltiplos estudos observaram uma correlação significativa tanto ao nível do grau da doença²⁹ como também na frequência de exacerbações^{30,31}, presença de inflamação³² e resposta a exposição viral.³³ Assim, ainda que a expetoração não reflita com extrema precisão o microbioma das vias aéreas inferiores, os biomarcadores presentes poderão ser úteis, tendo em conta a sua correlação com a clínica já evidenciada.

3.3 Topografia e dinâmicas

O tracto respiratório inferior está topograficamente fora do corpo humano, apresentando uma continuidade desde os alvéolos mais periféricos até à cavidade oral e nasal. Teoricamente, sempre que a laringe está aberta não existe qualquer barreira mecânica a separar estas duas regiões, pelo que será de supor que a composição do seu microbioma seja dinâmica e variável.

Com efeito, o microbioma pulmonar e sua carga biológica dependem do equilíbrio de três fatores: imigração, eliminação e reprodução microbiana.³⁴ Uma alteração na sua constituição está em direta relação com modificações nestas três condições (Figura 1.)

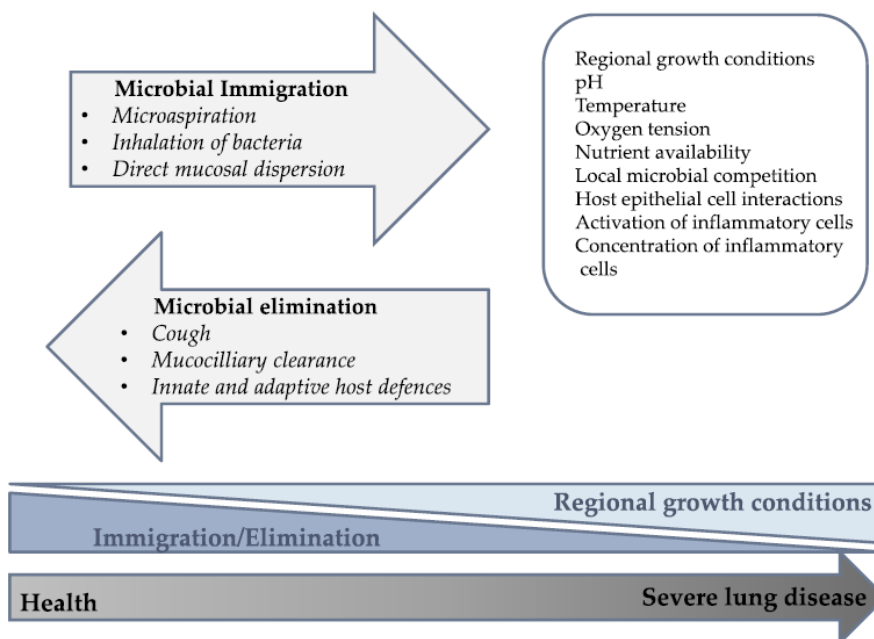


Figura 1. – Dinâmicas do microbioma pulmonar. Adaptado com permissão de Dima *et al.*³⁵

A imigração microbiana ocorre através de fenómenos de microaspiração, inalação de ar e dispersão direta através da mucosa. Destes, a microaspiração é provavelmente o mecanismo mais significativo, conforme é relatado por Charlson *et al.*³⁶ e por Dickson *et al.*³⁷. Já antes, em 1976 tinha sido descrito por Huxley *et al.*³⁸ que este fenómeno ocorre em adultos saudáveis pelo que é plausível o seu contributo major na constituição do microbioma respiratório, mesmo em indivíduos sem patologia respiratória.

A eliminação dos microrganismos das vias aéreas inferiores é um processo contínuo baseado na clearance mucociliar. Através do movimento constante dos cílios das células epiteliais, sob uma camada secretada de muco, os micro-organismos vão sendo progressivamente expulsos no sentido ascendente. Adicionalmente, o sistema imunitário pulmonar possui ferramentas celulares e humorais que reconhecem e eliminam microbiota, conforme Segal *et al.*²³ descreveram num estudo em que correlacionou o aumento de marcadores inflamatórios no pulmão com o aumento de bactérias caracteristicamente de origem supraglótica.

Em relação às condições de proliferação, vários fatores devem ser tidos em conta no crescimento bacteriano: tensão de oxigénio, pH, perfusão sanguínea, ventilação, temperatura, estrutura das células epiteliais, deposição de partículas inaladas e concentração de células inflamatórias.²⁰ Nesse sentido, seria de esperar que em regiões diferentes do pulmão, sujeitas a condições ambientais e pressões de seleção díspares, deveriam também existir diferenças significativas e consistentes na composição do microbioma (por exemplo, as regiões apicais teriam uma composição substancialmente distinta das bases por serem áreas de menor perfusão e maior oxigenação). Porém, Dickson *et al.*²⁴, em amostras obtidas por broncoscopia protegida, demonstraram que a variação espacial intrapulmonar não é significativa, ao contrário da variação inter-individual. Estes resultados refletem, portanto, que a composição do microbioma pulmonar em indivíduos saudáveis depende principalmente da imigração e eliminação bacteriana, e menos das condições de pressão seletiva. Com base nestes achados, Dickson e colegas propuseram um modelo biogeográfico de ilha adaptado, postulando que o tracto respiratório consiste num ecossistema único, de topografia contínua, sujeito à imigração microbiana das vias superiores através de fenómenos de microaspiração e dispersão direta através da mucosa. Posteriormente, um novo estudo do mesmo autor analisou escovados de mucosa respiratória progressivamente mais distais (traqueia proximal, traqueia média, carina, brônquios intermédios proximais e brônquios intermédios distais) e LBA do lobo médio e língula. O perfil topográfico encontrado foi consistente com o modelo anteriormente referido, assente na imigração bacteriana

fundamentalmente através de fenómenos de microaspiração subclínicos, e cuja composição varia de forma decrescente e contínua ao longo do tracto respiratório.³⁷

Finalmente, Pragman *et al.*³⁹, num estudo inédito à data, analisaram amostras de parênquima pulmonar e mucosa brônquica obtidas durante lobectomias a doentes com DPOC leve a moderada e, portanto, livres de qualquer contaminação pelas vias aéreas superiores. Os resultados obtidos mostraram a presença de bactérias tipicamente orais e das vias respiratórias superiores, suportando desta forma a hipótese anteriormente proposta por Dickson.

4. O microbioma pulmonar de indivíduos saudáveis

O pulmão saudável era até há relativamente pouco tempo considerado estéril, baseado nos estudos de cultura convencionais. Todavia, com a emergência das novas técnicas independentes de cultivo, hoje sabe-se que não é o caso. O primeiro estudo que documentou a presença de um microbioma nas vias aéreas inferiores de indivíduos saudáveis foi publicado por Hilty *et al.*⁴⁰ em 2010. Neste estudo, Hilty *et al.* analisaram através da sequenciação do gene 16S rRNA os escovados brônquicos de três grupos de participantes: controlos saudáveis, doentes com asma e doentes com DPOC. Inesperadamente, encontraram uma diversidade significativa de bactérias em todas as amostras, com uma abundância semelhante entre grupos, mas com composições qualitativas diferentes. Desde aí, estes achados têm sido replicados em vários estudos^{11,20,21,41}, sendo hoje consensual a existência de uma comunidade microbiana pulmonar filogeneticamente diversa.

Conforme mencionado no capítulo anterior, o microbioma pulmonar provém fundamentalmente das vias aéreas superiores e da cavidade oral. Com efeito, as bactérias mais frequentemente identificadas em indivíduos saudáveis pertencem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes (cerca de 80%), ambos comensais da cavidade oral e orofaringe, sendo que aproximadamente 10% pertencem ao filo Proteobacteria. Ao nível de género, *Prevotella* (Bacteroidetes), *Veillonella* e *Streptococcus* (ambos Firmicutes) são as mais predominantes, com uma presença pouco significativa de bactérias patogénicas como *Haemophilus*, *Moraxella* e *Pseudomonas* (Proteobacteria).⁴²

Relativamente ao *timing* da colonização, considera-se que esta ocorre *in utero*, evoluindo posteriormente após o parto.⁴³ Tal como o pulmão, assumiu-se durante décadas que o ambiente *in utero* é estéril, com base em estudos que empregavam

métodos tradicionais de cultura e microscopia. Todavia, pesquisas mais recentes com métodos independentes de cultivo, sugerem uma aquisição do microbioma humano *in utero*, comprovada pela identificação de DNA bacteriano na placenta, no líquido amniótico e nas membranas fetais em gravidezes saudáveis.⁴⁴ Deste modo, supõe-se que a própria aquisição do microbioma respiratório inicia-se ainda antes do parto.

De facto, nos 5 minutos após o nascimento já é possível identificar comunidades microbiológicas na cavidade oral e nasofaringe dos recém-nascidos, sendo plausível que o próprio pulmão também albergue neste período um microbioma próprio. Em aspirados brônquicos de recém-nascidos pré-termo já foi observado DNA bacteriano, particularmente de espécies de *Staphylococcus* e *Ureaplasma*. Lohmann *et al.*⁴⁵ também detetaram DNA bacteriano em todas as amostras de aspirados brônquicos de 25 neonatos pré-termo com menos de 32 semanas de gestação. O tempo estimado de desenvolvimento de um microbioma pulmonar estável é desconhecido, porém sabe-se que a carga e a composição bacteriana da orofaringe variam ao longo dos primeiros 2 anos.⁴⁶ Analogamente, também se desconhecem que fatores influenciam a microbiota respiratória durante os primeiros meses de vida, embora o tipo de parto, o aleitamento materno e a exposição perinatal a antibióticos sejam elementos a considerar. Em crianças, um estudo reportou diferenças entre a microbiota do trato respiratório superior e a microbiota pulmonar, sendo que na última incluíam-se espécies de *Moraxella* spp, *Haemophilus* spp e *Streptococcus* spp.

5. Modificações na DPOC

5.1 O microbioma na DPOC estável

As doenças crónicas pulmonares, em particular a DPOC, alteram a topografia e as dinâmicas do *turnover* microbiano. No caso do enfisema, existe uma destruição da arquitetura alveolar que reduz de forma muito significativa a área de superfície interna dos pulmões. A bronquite crónica, outra componente da DPOC, é caracterizada pela deficiente *clearance* mucociliar, diminuindo a eliminação microbiana. Para além disso, está associada a um aumento da produção de muco, criando locais ricos em nutrientes, com concentrações de oxigénio baixas e temperatura aumentada, favoráveis ao crescimento bacteriano. Com o avanço da doença, a composição do microbioma passa a ser menos definida pelo balanço entre a imigração e eliminação, e mais pelas condições locais de crescimento e pelas diferentes taxas reprodutivas.³⁴ Em contrapartida, as alterações na própria composição da microbiota vão induzir a ativação

de mecanismos inflamatórios no hospedeiro, modificando ainda mais as condições ambientais. Deste modo, a existência deste ciclo de disbiose e inflamação poderá estar na base das manifestações clínicas irreversíveis observadas na DPOC, funcionando não só como efeito, mas também como a própria causa.¹⁴

O estudo pioneiro de Hilty *et al.*⁴⁰ revelou não só a presença de um microbioma pulmonar em indivíduos saudáveis, mas também a existência de diferenças qualitativas comparativamente com doentes com DPOC. Mais especificamente, mostrou um aumento relativo de Proteobacteria e uma diminuição de Bacteroidetes quando comparado com amostras de indivíduos saudáveis ou doentes com asma.

Desde essa altura, vários estudos têm reportado diferentes composições e variações no microbioma respiratório dos doentes com DPOC. Embora por vezes discordantes, estas disparidades podem ser explicadas pela própria heterogeneidade da doença, pelo tipo de amostra biológica e pelas características dos participantes de cada estudo, nomeadamente idade, localização geográfica, exposição a tabaco, terapêuticas prévias e estadios de doença. Ainda assim, é consensual em toda a literatura que na DPOC existe um microbioma pulmonar claramente distinto daquele encontrado em indivíduos sem patologia respiratória. Em anexo encontra-se um resumo dos estudos que analisaram o microbioma pulmonar de doentes com DPOC estável (tabela 1.).

Um achado consistentemente evidenciado tem sido a diminuição da diversidade alfa, particularmente em doentes com DPOC mais avançada. Aguirre *et al.*⁴⁷ e Galiana *et al.*⁴⁸ reportaram que doentes com obstrução respiratória grave exibiam menor diversidade alfa e um aumento da carga bacteriana em amostras de expectoração quando comparados com doentes com obstrução leve a moderada. De igual modo, Erb-Downward *et al.*⁴¹ replicaram os mesmos resultados num estudo comparativo que analisou o LBA entre participantes saudáveis não fumadores, saudáveis fumadores e doentes com DPOC. Também Garcia-Nuñez *et al.*²⁹ demonstraram esta relação entre a gravidade da doença e a diversidade da flora microbiana: o microbioma menos diverso dos participantes com FEV1 superior a 50% tinha maior diversidade alfa que o microbioma mais diverso daqueles com FEV1 inferior a 50%. Mais recentemente, em 2019, um estudo de Millares *et al.*⁴⁹ analisou a expectoração de 72 doentes com DPOC estável, tendo encontrado uma correlação inversa da diversidade alfa com a idade e a função pulmonar. Este facto poderá estar relacionado não apenas com as alterações esperadas decorrentes da evolução natural da doença, mas também advir do uso

repetido de antibióticos, mais frequentemente utilizados em doentes de maior gravidade e com exacerbações mais frequentes.

Em relação à composição qualitativa, tem sido observado em várias pesquisas um deslocamento no sentido do aumento de bactérias pertencentes à classe Gammaproteobacteria com destaque para os géneros *Pseudomonas* e *Haemophilus*, e uma diminuição do filo Bacteroidetes. Num estudo de parênquima pulmonar obtido em explantes de não fumadores, fumadores, doentes com DPOC grau GOLD IV e doentes com fibrose quística, Sze *et al.*¹¹ encontraram nos doentes com DPOC, expansão de Proteobacteria e contração de Bacteroidetes quando comparados com os restantes. A justificação para estes achados poderá estar na existência de um mecanismo de competição por espaço na superfície alveolar reduzida, criada pela destruição enfisematosa, que leva a um aumento relativo de bactérias mais resistentes. Também Garcha *et al.*⁵⁰ reportaram um aumento da carga bacteriana e da abundância de bactérias potencialmente patogénicas do filo Proteobacteria tais como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* em correlação com a limitação do fluxo aéreo em doentes com DPOC estável. Noutro pequeno estudo de amostras de expetoração, LBA e biópsias de mucosa brônquica de 8 doentes com DPOC grave, Cabrera-Rubio *et al.*⁵¹ evidenciaram bactérias de género semelhante, nomeadamente *Haemophilus*, *Prevotella*, *Streptococcus* e *Moraxella*. Mais tarde uma pesquisa de Millares *et al.*⁴⁹ replicou estes achados, tendo observado um aumento progressivo da abundância relativa de *Pseudomonas* em contraste com uma diminuição do género *Treponema*. A explicação poderá estar, mais uma vez, no uso recorrente de terapia antibiótica por parte dos doentes mais graves, considerando a sensibilidade a estes por parte de *Treponema* e a resistência de *Pseudomonas*.

Lee *et al.*¹⁹ recorreram a técnicas de metatranscriptómica com o objetivo de definir com mais precisão a composição qualitativa do microbioma pulmonar de doentes com DPOC. Neste estudo de pequena dimensão (n=8), analisaram a expetoração de doentes com DPOC moderada e DPOC grave estáveis (GOLD 2 e GOLD 3). Apesar de observarem diferenças entre as técnicas usadas (sequenciação do gene 16S rRNA e sequenciação do metatranscriptoma), os filos dominantes em ambas corresponderam àqueles observados em estudos prévios (Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes). Com efeito, nos doentes com grau mais avançado de doença, foi observada uma diminuição de Bacteroidetes. Relativamente ao género, a sequenciação do transcriptoma demonstrou uma maior representação de *Veillonella* no grupo de DPOC moderada e de *Prevotella* no grupo de DPOC severa, sugerindo que alterações nestas

bactérias transcriptamente mais ativas poderão estar na base das diferenças entre a DPOC moderada e grave. De modo similar, foi também observada uma abundância crescente de *Haemophilus influenzae* e *Haemophilus parainfluenzae*, particularmente nos grupos com doença mais grave. Estes achados estão em linha com os outros estudos previamente descritos.

Num estudo único à data, Engel *et al.*¹² comparou o microbioma de controlos saudáveis com o de doentes GOLD I e II com alterações visíveis em Tomografia Computorizada (TC). Desta forma, demonstrou uma abundância maior de *Prevotella* nas amostras de controlo e nos doentes sem alterações radiológicas significativas, e em contrapartida um aumento de *Streptococcus* nos doentes com fenótipo radiológico mais grave. Esta correlação mais uma vez reforça o profundo impacto que a alteração da estrutura pulmonar provoca no microbioma, provocando um deslocamento de bactérias não patogénicas para bactérias tipicamente patogénicas.

De facto, os fenómenos de disbiose parecem estar presentes não apenas em doentes com graus mais avançados da doença, mas também em doentes de níveis mais leves. Molyneaux *et al.*³³ estudaram a expetoração de controlos saudáveis não fumadores, saudáveis fumadores e doentes com DPOC GOLD II, antes e após serem sujeitos a infeção por *Rhinovirus*. Previamente à infeção viral, o microbioma das amostras de indivíduos com DPOC era semelhante aos controlos saudáveis, sendo constituído por abundâncias relativamente baixas de géneros como *Haemophilus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*. Todavia, após exposição ao vírus, a expetoração destes doentes apresentou um aumento muito significativo de bactérias do filo Proteobacteria, particularmente de *Haemophilus influenzae*, ao contrário dos controlos que se mantiveram relativamente estáveis. Este aumento traduz, muito provavelmente, o sobrecrescimento de espécies previamente já presentes na própria comunidade bacteriana de base, e não a aquisição de novas espécies ou novas estirpes. Conclui-se, portanto, que embora a linha de base do microbioma em doentes com DPOC inicial possa ser semelhante àquela observada em indivíduos sem patologia respiratória, a resposta da comunidade bacteriana a um insulto inflamatório está alterada e poderá contribuir para a fisiopatologia das exacerbações e nas modificações associadas.

Recentemente foi também sugerida uma relação entre o microbioma respiratório da DPOC e fatores genéticos. Doentes com défice de lectina de ligação a manose (mannose binding lectin, MBL) apresentam uma microbiota com mais diversidade e menos abundância de *Haemophilus* spp, menos marcadores de inflamação e menor risco de desenvolver exacerbações.⁵² A explicação reside no papel inibitório que a MBL

possui na fagocitose, impedindo a *clearance* bacteriana, particularmente de *Haemophilus* spp. A perda da diversidade da microbiota com dominância de *Haemophilus* spp está associada a doença mais grave, maior frequência de exacerbações e aumento da inflamação das vias respiratórias.

São poucos os estudos longitudinais que se debruçam sobre a variação do microbioma ao longo do tempo. Na realidade, apenas um único estudo realizado em 2018, de Sinha *et al.*⁵³, analisou as dinâmicas em doentes clinicamente estáveis GOLD II, recolhendo amostras de cada um distanciadas em períodos de tempo curto (<2 dias) e períodos de tempo longo (2-9 meses). Os resultados observados em ambas as amostras refletiram uma estabilidade temporal tanto da diversidade como também da própria composição taxonómica ao nível de filo e género. Sugere-se assim que o microbioma pulmonar permaneça relativamente inalterado no tempo em doentes com DPOC clinicamente estável.

5.2 O microbioma nas exacerbações

As exacerbações agudas da DPOC são caracterizadas por um aumento da sintomatologia que se desvia da própria variação basal diária, surgindo de forma abrupta e requerendo, geralmente, uma mudança no tratamento. Estão associadas tipicamente a sintomas respiratórios como tosse, aumento da produção de expectoração, dispneia e pieira, mas também podem incluir sintomas sistémicos como febre, astenia e fadiga generalizada. A evolução normalmente tende para restituição da função pulmonar prévia do doente, embora em muitos casos a função regrida para um novo patamar de base mais grave que o anterior.⁵⁴ É importante também ressaltar que a exacerbação aguda da DPOC é uma entidade distinta das infeções primárias pulmonares, como a pneumonia lobar. A frequência da sua ocorrência está relacionada com a gravidade da obstrução aérea, mas muitos doentes têm exacerbações frequentemente apesar da sua doença basal ser leve ou moderada, o designado fenótipo de exacerbador frequente.⁵⁵

O papel das bactérias nas exacerbações como importante fator etiológico tem sido amplamente discutido. A maioria dos estudos baseados em cultura têm-se focado na identificação de espécies singulares de bactérias como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae*. Contudo, em muitos doentes estáveis é igualmente possível identificar a colonização por estes mesmos organismos, o que reflete que a relação entre as bactérias e as exacerbações não se deve à sua mera presença.¹⁴

Neste sentido, as dinâmicas do microbioma nas exacerbações agudas da DPOC têm sido alvo de estudo nos últimos anos. Em anexo encontra-se um resumo dos estudos que analisaram o microbioma pulmonar de doentes em exacerbação aguda de DPOC (tabela 2.). Ghebre *et al.*⁵⁶ analisaram a expetoração de doentes com asma grave e com DPOC moderada a grave, tendo identificado que os doentes se dividiam em 3 *clusters* de subtipos de exacerbação, cada um exibindo um perfil de microbiota distinto (Figura 2.). As exacerbações categorizadas como bacterianas eram constituídas na sua maioria pelos participantes com DPOC e apresentavam a maior abundância de Gammaproteobacteria, contendo um *ratio* Gammaproteobacteria/Firmicutes (G:F) superior às restantes. Em contrapartida, as exacerbações categorizadas como eosinofílicas exibiam maior diversidade alfa. Com efeito, também Haldar *et al.*⁵⁷ sugerem que este *ratio* Gammaproteobacteria/Firmicutes está implicado na fisiopatologia das exacerbações. Neste estudo, demonstrou que o *ratio* G:F correlaciona-se positivamente com marcadores inflamatórios (% de neutrófilos, proteína C reativa, IL-1 β) e negativamente com o status respiratório (FEV1), sugerindo que a sua pesquisa sistemática poderá ter utilidade na prática clínica como fator preditor de doença.

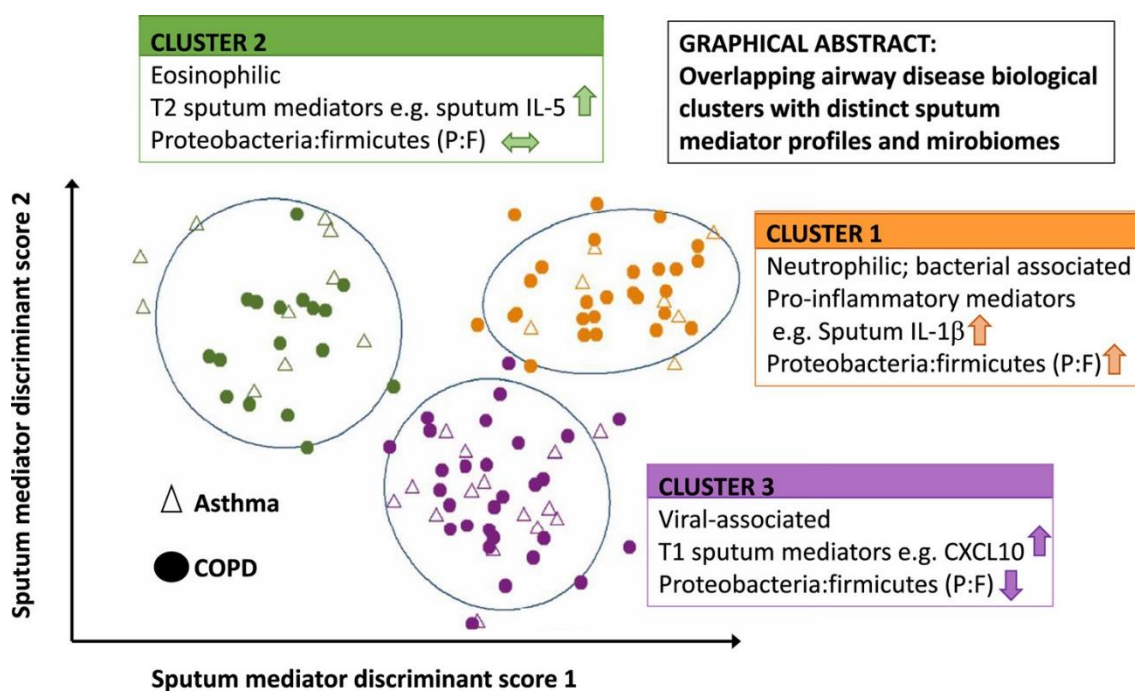


Figura 2. – Diferentes *clusters* biológicos nas exacerbações por DPOC e asma. Adaptado com permissão de Ghebre *et al.*⁵⁶

Dada a heterogeneidade de cada doente e os diferentes perfis de exacerbação, para entender melhor esta relação é necessário ter em conta a variação temporal individual. Num estudo longitudinal de Huang *et al.*⁵⁸, foram recolhidas amostras de expetoração de 12 doentes com DPOC antes, no momento e após episódios de exacerbação. Os resultados demonstraram diferenças significativas na abundância relativa de bactérias específicas aquando da exacerbação, nomeadamente um aumento de espécies de Proteobacteria como *Moraxella* e *Pseudomonas*. Adicionalmente, identificou-se um crescimento de Proteobacteria não patogénicas como *Pasteurella*, filogeneticamente relacionadas com bactérias patogénicas como *H. influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Moraxella catarrhalis*. Isto sugere que alterações em bactérias tipicamente não patogénicas podem também contribuir para a fisiopatologia das exacerbações. Huang e colegas especulam que é este estado de disbiose, com diferentes interações inter-microbianas e hospedeiro, que induz uma resposta inflamatória desregulada, com a tradução clínica conhecida. Neste sentido, Leitão Filho *et al.*⁵⁹ colocaram como hipótese que a redução de bactérias potencialmente comensais estava associada a piores *outcomes* clínicos nas exacerbações. Os seus resultados demonstraram que a presença de espécies de *Staphylococcus* (potencialmente patogénicos) e a ausência de *Veillonella* (comensal) estavam fortemente associados a menor diversidade alfa e a um aumento da mortalidade a um ano. Estes achados refletem que não só micro-organismos patogénicos, mas também micro-organismos não patogénicos do microbioma respiratório, neste caso *Veillonella*, têm um papel relevante nas exacerbações de DPOC.

Wang *et al.*¹⁰ debruçaram-se sobre as interações complexas entre o sistema imune do hospedeiro, fatores ambientais e o microbioma respiratório. Em consonância com os estudos previamente descritos, os seus resultados demonstram uma associação entre os episódios de exacerbação e a diminuição da diversidade alfa e um aumento da abundância relativa de Proteobacteria. Para além disso, observaram diferenças significativas entre as populações microbianas das exacerbações bacterianas e exacerbações eosinofílicas, refletindo a existência de diferenças fundamentais na imunopatogénese destas duas entidades.

Posteriormente, Wang *et al.*⁶⁰, no âmbito do consortium COPDMAP, analisaram longitudinalmente o microbioma pulmonar em 716 amostras de expetoração de 281 indivíduos com DPOC de 3 centros clínicos do Reino Unido, naquele que é o estudo com a maior coorte à data realizado neste âmbito. A composição do microbioma foi semelhante entre centros, assim como entre estável e exacerbações, com exceção de

um aumento de *Moraxella* spp e uma ligeira diminuição de *Veillonella* nas exacerbações. Contudo, tal como no estudo anteriormente descrito, os microbiomas das exacerbações associadas a bactérias e das exacerbações eosinofílicas foram claramente distintos. Com efeito, em 41% dos episódios de exacerbação estava presente disbiose, definida como um desvio significativo da composição microbiana em relação à composição basal de cada indivíduo. Este fenómeno de disbiose associou-se a um aumento da gravidade das exacerbações, traduzindo-se numa queda superior da FEV1 e FVC e num aumento muito significativo do score CAT, particularmente nas exacerbações com inflamação eosinofílica concomitante. Verificou-se também que doentes com exacerbações mais frequentes apresentavam diversidade beta diminuída. Desta forma, os resultados sugerem a existência de três subgrupos de exacerbação distintos: exacerbações associadas a disbiose, exacerbações associadas a eosinofilia e exacerbações associadas a ambas. Neste sentido, traduzem muito provavelmente diferenças na sua imunopatogénese, logo requerendo abordagens terapêuticas distintas. Os autores afirmam mesmo que estes achados poderão estabelecer um novo paradigma na estratificação das exacerbações da DPOC, de acordo com a presença/ausência de disbiose e eosinofilia, guiando futuras terapias personalizadas.

Noutro estudo longitudinal de grande dimensão, Mayhew *et al.*⁶¹ descreveram pela primeira vez a natureza não aleatória das exacerbações experienciadas por um indivíduo ao longo do tempo. Mayhew e colegas demonstraram a estabilidade temporal do microbioma de cada indivíduo, intercalados com episódios de disbiose correspondentes a episódios de exacerbação, sendo que os exacerbadores mais frequentes apresentavam padrões de disbiose superiores. Adicionalmente, a análise dos fenótipos de exacerbação revelou que as exacerbações bacterianas ou eosinofílicas tinham maior probabilidade de se vir a repetir nas subsequentes, ao contrário das virais. Por outras palavras, um indivíduo que tenha uma exacerbação bacteriana ou eosinofílica tem maior probabilidade que a próxima exacerbação seja do mesmo tipo que a anterior. Finalmente, foi também reportado a associação de bactérias como *Haemophilus* e *Moraxella* com a gravidade da doença, número de eventos de exacerbação e desenvolvimento de bronquiectasias.

Já em 2019, Pragman *et al.*⁶² recrutou 11 exacerbadores frequentes e 11 exacerbadores infrequentes que não tinham tido exposição a antibioterapia e a corticoterapia no último mês com o objetivo de comparar a microbiota presente na sua expetoração. Foi observado que as amostras dos exacerbadores frequentes continham menor diversidade alfa mesmo durante períodos de estabilidade, com predomínio de

Gammaproteobacteria (*Moraxella* e *Haemophilus*), reforçando os achados de estudos anteriores.

Numa tentativa de compreender melhor de que forma o microbioma impacta o aparecimento das exacerbações, Millares *et al.*³¹ conduziram um estudo de metagenômica com o objetivo de detetar alterações funcionais na microbiota pulmonar aquando dos episódios. Apesar de não terem sido identificadas alterações na abundância relativa de nenhum filo ou género, foram detetadas diferenças significativas em várias funcionalidades metabólicas bacterianas, nomeadamente em vias de metabolismo de hidratos de carbono, cancro, crescimento e morte celular, transporte e catabolismo. Estas alterações estão associadas a uma resposta modificadora da expressão genética de genes de virulência, através de três mecanismos fundamentais: aquisição de nutrientes, aderência a células eucarióticas e interferência com proteínas imunitárias do hospedeiro.⁶³ De um modo geral, estas modificações na função do microbioma respiratório poderão refletir maior capacidade de virulência e patogenicidade das bactérias em episódios de exacerbação, ainda que a composição do microbioma se mantenha relativamente inalterada.

6. A influência do tabaco

O tabaco é a principal causa mundial de DPOC. Contudo, nem todos os fumadores desenvolvem DPOC, havendo diversos fatores de suscetibilidade (por ex., défice de alfa1-antitripsina) que influenciam em quem e de que forma a doença se manifesta. São conhecidos os efeitos do tabaco no epitélio do tracto respiratório, nomeadamente os efeitos na diferenciação das células basais, na composição da matriz extracelular subepitelial e nas *tight junctions*.⁶⁴ Destas alterações resulta hipersecreção de muco, *clearance* mucociliar deficiente e obstrução do fluxo aéreo. Para além disso, sabe-se também que o próprio fumo do tabaco induz alterações pro-inflamatórias através da ativação e supressão de genes.⁶⁵ Neste sentido, é razoável supor que o microbioma respiratório seja igualmente afetado pelo tabaco.

Com efeito, já foram reportadas alterações no microbioma nasofaríngeo de fumadores.⁶⁶ Existe uma proporção maior de patógenos oportunistas como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, comparativamente a não-fumadores, que contêm principalmente streptococci α -hemolíticos, *Peptostreptococcus* spp e *Prevotella* spp. Curiosamente, a cessação

tabágica parece estar associada a uma reversão do microbioma para aquele encontrado em indivíduos que nunca fumaram.⁶⁷

A influência do tabaco no microbioma pulmonar foi investigada por Morris *et al.*⁶⁸. Neste estudo, foram obtidas amostras de lavado oral e LBA de 45 fumadores saudáveis e 19 controlos não fumadores com espirometrias normais. Não foram encontradas diferenças significativas na composição microbiana dos LBA entre grupos, ao contrário do que sucedeu nos lavados orais. Um estudo de Erb-Downward *et al.*⁴¹ replicou os mesmos resultados, ao não encontrar diferenças nas comunidades microbianas de fumadores saudáveis e não fumadores. Estes achados sugerem que, embora o fumo induza disbiose na cavidade oral e orofaringe, as alterações nas vias aéreas inferiores só surgem com o aparecimento de sintomatologia crónica e/ou função pulmonar anormal.

Einarsson *et al.*⁶⁹ também analisaram o LBA de doentes com DPOC, fumadores sem doença respiratória e saudáveis não fumadores. Contudo, ao contrário dos estudos anteriores, foi demonstrada uma diminuição de Bacteroidetes como *Prevotella* spp, assim como um decréscimo da diversidade alfa e beta no grupo de doentes com DPOC e no grupo fumadores, comparando com os controlos saudáveis não fumadores.

Numa abordagem inovadora, Kim *et al.*⁷⁰ propuseram-se também a comparar o microbioma de 13 controlos não fumadores, 13 fumadores com espirometrias normais e 13 doentes com DPOC em amostras de tecido pulmonar. Para isso, para além do próprio tecido, investigaram também as vesículas extracelulares (VEs) aí presentes. As vesículas extracelulares são partículas nanométricas secretadas pelas bactérias, rodeadas por uma bicamada lipídica, que se pensa que podem transmitir fatores de virulência e modular a resposta imune do hospedeiro. Os resultados demonstraram nos três grupos de estudo um número significativamente superior de OTUs nas VEs *versus* tecido pulmonar e, curiosamente, demonstraram também a presença de alguns micro-organismos que não foram detetados no tecido pulmonar, sugerindo assim que algumas VEs terão origem em lobos adjacentes ou mesmo em outros órgãos. Adicionalmente, as VEs de doentes com DPOC e fumadores saudáveis apresentavam menor diversidade microbiana quando comparadas com não fumadores, assim como maior dominância de alguns micro-organismos específicos. Estes achados replicam os de Einarsson *et al.*, que também demonstraram menor diversidade microbiológica nos fumadores saudáveis *versus* não fumadores.

Em conjunto, embora aparentemente discordantes entre si, os estudos reforçam a noção de que a resposta à exposição ao tabaco é heterogênea. É plausível que as alterações na microbiota pulmonar estejam relacionadas com modificações na imunidade e na estrutura das vias respiratórias provocadas pelo tabaco. A própria variabilidade da incidência de DPOC em fumadores pode ser explicada por fatores intrínsecos do indivíduo, estando já descritos vários polimorfismos genéticos associados a maior suscetibilidade de desenvolvimento da doença.⁷¹ Assim, sugere-se também que a influência do tabaco em fenómenos de disbiose dependa igualmente da resposta individual do hospedeiro.

7. Microbioma e inflamação

A DPOC é uma doença caracterizada por inflamação das vias aéreas, estando esta implicada na patogénese e na progressão dos sintomas crónicos, na obstrução do fluxo aéreo permanente e na ocorrência de exacerbações. A resposta inflamatória é tipicamente causada inicialmente pela exposição ao fumo do tabaco e/ou a outras partículas tóxicas externas derivadas da poluição atmosférica. Contudo, mesmo após remoção do estímulo nocivo, por exemplo pela cessação tabágica, a inflamação persiste cronicamente, atingindo pequenas, médias e grandes vias aéreas através de mecanismos complexos de ação. Esta progressão temporal, embora ainda não compreendida na totalidade, pensa-se que seja consequência de alterações na imunidade e no microambiente da vias aéreas.⁷²

Conforme já descrito anteriormente, o microbioma pulmonar do doente com DPOC é notoriamente diferente do microbioma de indivíduos sem patologia respiratória. A questão natural que se coloca é se as mudanças microbiológicas encontradas são mera consequência da evolução natural da doença ou se são as próprias alterações da microbiota existente que conduzem à progressão da inflamação e ao consequente agravamento da DPOC.

A inflamação tem, indubitavelmente, um papel fundamental na modificação das condições ecológicas do pulmão, na medida em que afeta as condições locais de crescimento bacteriano de várias formas.⁴² O aumento da permeabilidade vascular leva a um aumento da *pool* de nutrientes tais como fontes de carbono, aminoácidos, vitaminas e ferro. O dano nas células epiteliais cria zonas expostas da membrana basal que facilitam a aderência bacteriana. A hiperplasia das células caliciformes provoca um aumento da produção de muco, criando bolsas pobres em oxigénio e de temperatura

elevada que dificultam a fagocitose, favorecendo o crescimento bacteriano. Finalmente, também as células inflamatórias são fonte de catecolaminas que podem modular a virulência bacteriana.⁴

Certos grupos taxonómicos, especialmente os encontrados na classe Gammaproteobacteria, possuem a capacidade metabólica de utilizar os produtos da inflamação para prosperar em condições de baixa concentração de oxigénio.⁷³ Estas bactérias proliferam mais em relação a outras que não têm a mesma aptidão metabólica para beneficiar com as mudanças provocadas pelas reações inflamatórias. Por outro lado, a própria microbiota alterada vai promover inflamação através de múltiplos mecanismos, nomeadamente através de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs).⁴² Um exemplo é o lipopolissacarídeo (LPS), um tipo de PAMP presente em bactérias gram-negativas, que interage com o recetor do tipo toll 4 (*toll-like receptor 4*, TLR4) que se encontra nas células epiteliais pulmonares e estimula a libertação de mediadores pro-inflamatórios tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, CXCL1 e TNF- α .⁴ O estudo de Larsen *et al.*⁷⁴ avaliou a resposta inflamatória a bactérias gram-negativas, neste caso mediada por TLR2. Os resultados demonstraram que espécies de *Prevotella* (comensais da microbioma respiratório) induzem substancialmente menos inflamação quando comparadas com espécies de *Haemophilus*. Posteriormente, foi também observado numa análise de 112 doentes pós-transplantação pulmonar que um deslocamento no sentido contrário à dominância de *Prevotella* correlaciona-se com o desenvolvimento de um perfil inflamatório em macrófagos.⁷⁵ No seu conjunto, estes estudos traduzem que alterações na composição do microbioma podem efetivamente acentuar os mecanismos inflamatórios subjacentes à DPOC.

De facto, vários estudos têm correlacionado fenómenos de disbiose com o aumento de marcadores inflamatórios. Um pesquisa de Singh *et al.*⁷⁶ recolheu amostras de expetoração de 99 doentes com DPOC estável, tendo encontrado uma correlação positiva significativa entre a carga bacteriana total e o aumento de marcadores inflamatórios. Adicionalmente, relatou também que a presença de *Haemophilus influenzae* estava associada ao aumento de níveis de inflamação das vias respiratórias. Barker *et al.*³² replicaram estes achados num estudo com PCR quantitativa em 120 amostras de expetoração: cargas bacterianas altas de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* correlacionam-se positivamente com concentrações elevadas de IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α . Também já foi demonstrado que Proteobacteria e Actinobacteria estão

associadas à infiltração de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos B no parênquima pulmonar, num estudo de amostras de pulmão obtidas em doentes com DPOC grave.⁷⁷

A caracterização do transcriptoma e proteoma da expetoração de doentes com DPOC revela associações significativas entre a abundância de *Moraxella* e *Haemophilus* e vias de sinalização pro-inflamatórias.³⁰ *Moraxella* correlaciona-se mais fortemente com vias de interferão durante eventos exacerbatórios, enquanto *Haemophilus* correlaciona-se mais com neutrofilia tanto em exacerbações como também na doença estável.

Com efeito, mesmo em indivíduos sem patologia respiratória, existe uma associação entre inflamação subclínica e a microbiota pulmonar. Um microbioma com maior carga bacteriana e maior quantidade de espécies supraglóticas (*Veillonella* e *Prevotella*) apresenta uma concentração superior de células inflamatórias como neutrófilos e linfócitos.²³ Num outro estudo por Segal *et al.*⁷⁸, usando técnicas de análise metabolómica, foi descrito que o LBA com a taxa supraglótica referida possuía um perfil metabólico distinto, com a presença de um fenótipo inflamatório de linfócitos Th17. Por sua vez, esta resposta mediada por Th17 parece diminuir a resposta TLR4 dos macrófagos alveolares. Tendo em conta os estudos anteriormente referidos, estas observações apoiam um modelo em que a exposição do sistema imune pulmonar a microbiota de origem supraglótica (particularmente *Prevotella* spp) no indivíduo saudável contribui para o processo homeostático de regulação da resposta inflamatória respiratória.⁷⁹

A inflamação neutrofílica é também característica da DPOC ao contribuir para o dano das vias respiratórias através da libertação de proteases e espécies reativas de oxigénio. Um dos mecanismos de ação antimicrobiana do neutrófilo é a formação de armadilhas extracelulares (*neutrophil extracellular trap*, NET), tendo já sido identificadas na expetoração de doentes com DPOC estável ou com exacerbações. O estudo de Dicker *et al.*⁸⁰ sugere que menor diversidade microbiana está associada ao aumento de NETs, que por sua vez conduzem a reduzida capacidade fagocitária dos neutrófilos e a piores *outcomes* clínicos, nomeadamente pior função pulmonar e aumento do risco de exacerbação.

Recentemente, para explicar a heterogeneidade da inflamação das vias respiratórias, foi proposta a existência de perfis inflamatórios distintos, particularmente a existência de um perfil neutrofílico e um perfil eosinofílico. Para validar estes fenótipos, várias abordagens tais como a análise de *clusters* têm sido aplicadas.⁵⁶ Um estudo de

doentes com asma e DPOC revelou a presença de 3 *clusters* distintos. *Cluster 1* composto predominantemente por doentes com DPOC continha um predomínio de neutrófilos e mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6 e TNF- α , associado a um aumento do *ratio* Gammaproteobacteria:Firmicutes (G:F). Por outro lado, o *cluster 2*, composto principalmente por doentes asmáticos e alguns doentes com DPOC, continha predomínio de eosinófilos e mediadores de resposta inflamatória Th2 como IL-5, IL-13, CCL13 e CCL26, associado a um *ratio* G:F equivalente. Finalmente, o *cluster 3* continha mediadores Th1 (CXCL10, CXCL11 e IFN- γ), estava associado a um *ratio* G:F reduzido e traduzia exacerbações de etiologia viral. Efetivamente, os autores sugerem que a definição do tipo de perfil inflamatório poderá ter um papel importante a dirigir a abordagem terapêutica das exacerbações. O *cluster 1*, neutrofílico e associado a bactérias patogénicas, responderá a antibióticos. De igual modo, o *cluster 2* associado a eosinofilia e inflamação Th2 responderá melhor a corticoterapia. A definição de *clusters* inflamatórios nas exacerbações da DPOC foi também descrita por Bafadhel *et al.*⁸¹, tendo sido identificados quatro grupos com base na etiologia e no tipo de inflamação: *cluster* neutrofílico com níveis elevados de IL-1 β associado a bactérias, *cluster* com níveis elevados de CXCL10 associado a vírus, *cluster* associado a eosinofilia e *cluster* “pauci-inflamatório”.

Contudo, a grande maioria destes estudos apenas fornecem uma perspetiva de correlação, podendo somente ser especulada uma possível ligação causal entre o microbioma bacteriano e a DPOC. Na tentativa de estabelecer esta relação de causalidade, Yadava *et al.*¹³ induziram em modelo murino características típicas da DPOC através da exposição a LPS/elastase intranasal. Similarmente ao que ocorre em humanos, a composição da microbiota pulmonar estava alterada, particularmente através do aumento de géneros como *Pseudomonas* e *Lactobacillus* e redução de *Prevotella*, sendo também observado um aumento da inflamação e formação de folículos linfóides. Os modelos previamente tratados com antibióticos (microbiota reduzida) e os modelos axénicos (sem microbiota) apresentavam menos inflamação, particularmente níveis reduzidos de IL-17A. Todavia, a transferência do LBA, enriquecido pelo microbioma pulmonar, dos modelos doentes para os modelos tratados com antibiótico ou axénicos aumentou nestes a produção de IL-17A, sugerindo uma relação causal entre o microbioma bacteriano pulmonar, inflamação e a formação de folículos linfóides mediada pela citocina IL-17A.

Em suma, a relação entre inflamação e alterações do microbioma, vulgo disbiose, parece constituir uma via bidirecional, na qual uma fonte inflamatória induz uma cascata

de respostas inflamatórias que alteram as condições locais do pulmão, favorecendo o crescimento seletivo de determinadas espécies de bactérias mais imunogénicas. Por sua vez, as mudanças no microbioma expõem a superfície pulmonar a PAMPs e a metabolitos microbianos que provocam inflamação acrescida (Figura 1).²⁰ Desta forma, o ciclo vicioso de inflamação-disbiose perpetua-se no tempo, mesmo se o estímulo inicial for removido, contribuindo de forma decisiva para a progressão da DPOC e para a perda de capacidade funcional pulmonar.

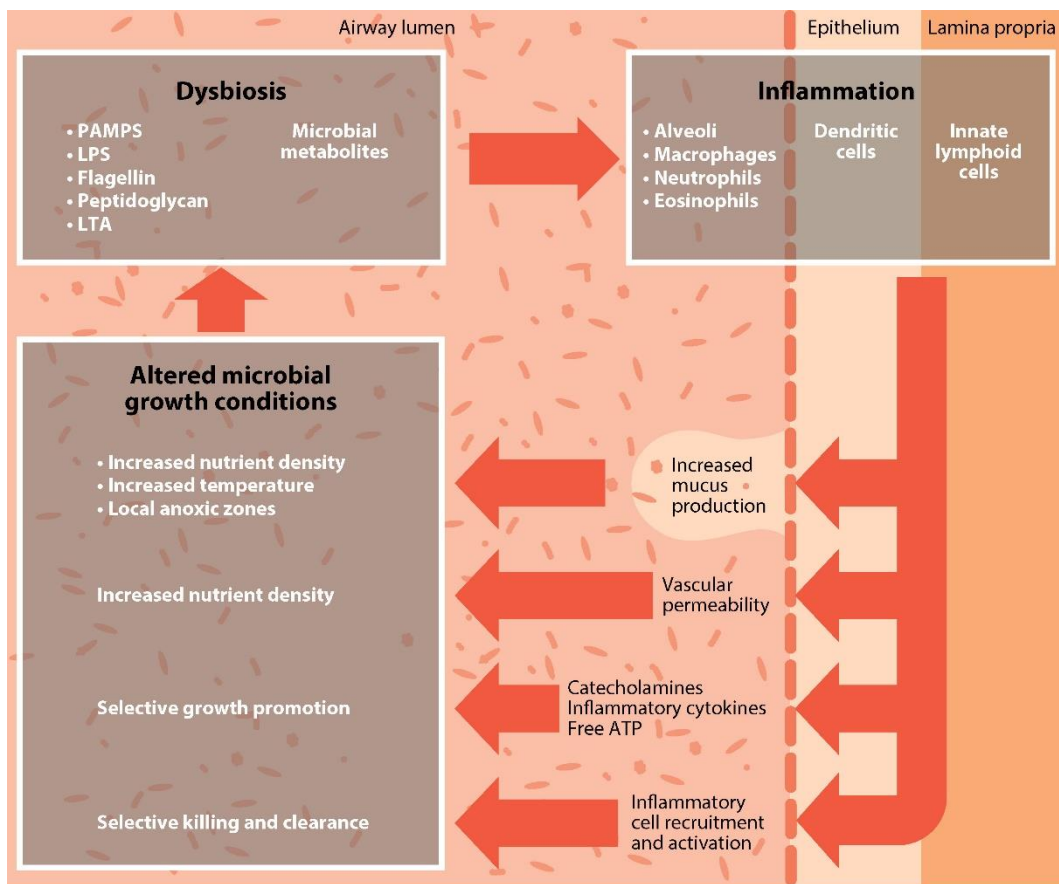


Figura 3 – Ciclo de inflamação-disbiose. Adaptado com autorização de Dickson *et al.*²⁰

8. Impacto das terapêuticas

8.1 Exposição a antibioterapia

O uso de antibióticos na terapêutica crónica da DPOC tem sido alvo de intensa investigação nos últimos anos, particularmente o uso de macrólidos (azitromicina, eritromicina, claritromicina) na prevenção de exacerbações.

Os macrólidos são antibióticos de largo espectro, com ação bacteriostática e exercem o seu efeito ao ligar-se à subunidade ribossomal 50S, inibindo dessa forma a síntese proteica. Para além disso, são também conhecidos os seus efeitos imunomoduladores incluindo a inibição de citocinas inflamatórias IL-5, IL-6, IL-8, IL-1 β e IL-10 e de TNF- α , relacionados com a sobreprodução de muco.⁸² Os principais efeitos secundários são a ototoxicidade e o aumento do intervalo QT, tendo sido já descrito um ligeiro aumento do risco cardiovascular com o seu uso.

De entre os macrólidos, o mais estudado tem sido indubitavelmente a azitromicina. De facto, múltiplos estudos têm indicado a sua eficácia na prevenção de exacerbações de DPOC. O estudo publicado em 2010 por Albert *et al.*⁸³ foi o primeiro estudo de grande dimensão (n=1142) que demonstrou que a toma diária de 250mg de azitromicina diminuiu a frequência de exacerbações e aumentou a qualidade vida de doentes com DPOC, particularmente em não fumadores. Foi também reportado uma ligeira perda auditiva num número pequeno de doentes, na maioria dos casos reversível ou parcialmente reversível. O ensaio clínico COLUMBUS⁸⁴ demonstrou também que a adição de azitromicina à terapêutica de manutenção standard conduziu a uma diminuição significativa das taxas de exacerbação em doentes exacerbadores frequentes. Finalmente, uma revisão sistemática da Cochrane concluiu, com base em 14 estudos envolvendo 3932 participantes, que o uso de macrólidos em regime profilático tem um benefício clínico significativo na redução das exacerbações de doentes com DPOC.⁸⁵ Neste sentido, as atuais recomendações da Iniciativa Global pela DPOC indicam o uso de azitromicina em doentes não controlados com regime de manutenção com LABA e LAMA com eosinófilos < 100 células/ μ l, e em doentes não controlados com LABA, LAMA e ICS, especialmente se não fumadores.³

Tendo em conta o impacto previamente descrito da terapêutica com macrólidos na DPOC, a questão que se coloca é descortinar qual o impacto destes na microbiota pulmonar e se o seu benefício advém dos efeitos na resposta imunitária, no microbioma ou em ambos.

Com efeito, as alterações no microbioma induzidas pelos macrólidos, particularmente a azitromicina, já foram estudadas em várias doenças respiratórias. Um estudo longitudinal em doentes com asma descreveu que a terapêutica com azitromicina durante 6 semanas está associada a uma diminuição da diversidade microbiana e a uma redução de bactérias patogénicas do género *Pseudomonas*, *Haemophilus* e *Staphylococcus*.⁸⁶ Foi também já reportado que o tratamento durante 2 semanas com azitromicina na bronquiolite por vírus sincicial respiratório (VSR) modifica o microbioma

das vias aéreas superiores, reduzindo a abundância de *Moraxella*.⁸⁷ Adicionalmente, no ensaio clínico BLESS foi analisado o impacto do tratamento a longo prazo com eritromicina em doentes com bronquiectasias não-fibrose quística. Verificou-se uma mudança na composição da microbiota respiratória, nomeadamente uma redução da abundância de *H. influenzae* e um aumento de *P. aeruginosa*, mais resistente aos macrólidos.⁸⁸

Numa tentativa de responder às questões colocadas anteriormente, Segal *et al.*⁸⁹ elaboraram um estudo com o objetivo de descrever as alterações no microbioma provocadas pelos macrólidos e os seus efeitos nos metabolitos bacterianos e nas citocinas inflamatórias das vias aéreas, através de análises *in vivo* e *ex vivo*. Para isso, foi examinado o LBA de 20 fumadores com evidência radiológica de enfisema, previamente expostos durante 8 semanas a 250mg diários de azitromicina *versus* placebo. Os resultados demonstraram que a exposição a azitromicina alterou o microbioma pulmonar, causando uma redução consistente da diversidade alfa. Adicionalmente, houve um aumento da produção dos metabolitos bacterianos ácido benzoico, ácido glicólico, índole-3-acetato e ácido linoleico e uma redução dos níveis de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-12, IL-13 e CXCL1. No estudo *ex-vivo*, a exposição aos metabolitos bacterianos descritos diminuiu a quantidade de citocinas inflamatórias, ao contrário do que sucedeu na exposição à azitromicina isolada. Isto poderá traduzir que o efeito anti-inflamatório da azitromicina é mediado pelos metabolitos bacterianos e não exclusivamente pela sua ação direta no sistema imunitário. Neste sentido, Segal *et al.* sugerem que o microbioma pulmonar é sensível ao stress induzido pelo antibiótico, estimulando a produção de metabolitos anti-inflamatórios e, deste modo, alterando a interação entre o microbioma e a imunidade do hospedeiro.

Todavia, o impacto de outros antibióticos na microbiota respiratória ainda não está totalmente clarificado, assim como o possível risco de indução de resistências. Na verdade, o único estudo à data foi o ensaio de Brill *et al.*⁹⁰ que se propôs a analisar a expetoração de 86 doentes com DPOC estável, sujeitos a três antibióticos diferentes (moxifloxacina, doxiciclina e azitromicina) durante 3 meses. Os resultados revelaram a inexistência de alterações significativas da carga bacteriana pelos três regimes, tanto através de técnicas de cultura como também através da técnica de 16S qPCR. Desta forma, uma possível explicação para a redução da frequência de exacerbações evidenciada por outros estudos não residirá na diminuição da carga bacteriana total do microbioma, mas sim na mudança da composição de base deste ou, em alternativa, na

atenuação do aumento da carga bacteriana aquando da ocorrência da exacerbação. Adicionalmente, nos três braços de estudo, as concentrações inibitórias mínimas triplicaram em relação ao placebo, refletindo um aumento da resistência antibiótica.

Mais pesquisas devem ser realizadas para averiguar qual o papel dos antibióticos na modulação do microbioma pulmonar e quais os seus riscos associados.

8.2 Exposição a corticosteróides

Os corticosteróides inalados constituem umas das terapêuticas recomendadas em doentes com DPOC com risco alto de exacerbação, particularmente em doentes mal controlados com LABA + LAMA. Atualmente é recomendado o seu uso em doentes com DPOC moderada a muito grave, em associação com um broncodilatador de longa duração, tendo sido demonstrada uma redução significativa do número de exacerbações e uma melhoria da qualidade de vida.³ Paradoxalmente, o principal efeito secundário reportado é o aumento do risco de pneumonia. Recentemente, vários estudos demonstraram que o valor de eosinófilos no sangue periférico é um bom preditor da resposta à terapia com corticosteróides inalados, sendo um biomarcador fidedigno para identificar os doentes que poderão beneficiar mais com esta terapêutica. Com efeito, para valores <100 células/ μ l não são observados efeitos relevantes, enquanto que para valores >300 células/ μ l o benefício é muito significativo.^{91,92}

Em relação aos corticosteróides sistémicos, estes devem ser reservados para o tratamento das exacerbações agudas em doentes hospitalizados ou idas à urgência. O seu perfil de efeitos secundários, nomeadamente a miopatia que provoca fraqueza muscular e induz agravamento da função respiratória, contraindica o seu uso na terapêutica crónica da DPOC, não tendo sido demonstrado um benefício significativo que contrabalance as complicações associadas.³

Várias investigações debruçaram-se sobre o impacto dos corticosteróides no sistema imunitário pulmonar. Sabe-se que podem enfraquecer a *clearance* bacteriana através da redução da atividade dos macrófagos⁹³, da inibição da libertação de citocinas com TNF e IL-10 e da sub-expressão de moléculas MHC classe II.⁹⁴ Contudo, também já foi demonstrado que poderão reduzir a invasão bacteriana do epitélio respiratório.⁹⁵

Tendo em conta os efeitos descritos na resposta imunitária a bactérias, é expectável que o microbioma respiratório na DPOC sofra alterações após a exposição

a corticoterapia. De facto, já foi demonstrado que o uso de corticosteróides inalados na asma aumenta a abundância de Proteobacteria (especialmente *Pseudomonas* spp) e diminui a de Bacteroidetes (*Prevotella* spp) e Fusobacteria.⁹⁶ Também num modelo murino de exacerbação aguda de DPOC induzida por *Rhinovirus*, a exposição a fluticasona enfraqueceu as respostas imunes inatas (IFNs tipo 1) e adaptativas (células T CD4 e CD8) , traduzindo-se em *clearance* antiviral reduzida, hipersecreção de muco e aumento da carga bacteriana.⁹⁷

Um estudo de Huang *et al.*⁵⁸ analisou as alterações no microbioma de doentes com DPOC antes, durante e após exacerbação. Nesta pesquisa observou-se que o uso de corticosteróides sistémicos como tratamento isolado das exacerbações conduziu a um aumento significativo da carga bacteriana, principalmente do filo Proteobacteria, mas também ligeiramente de Bacteroidetes e Firmicutes. Pelo contrário, o uso de antibióticos reduziu a abundância destes grupos. Noutro estudo longitudinal de 87 indivíduos com DPOC, Wang *et al.*¹⁰ obtiveram quatro amostras em períodos diferentes: doença estável, exacerbação, duas semanas após terapêutica e seis semanas após recuperação clínica. Os resultados replicaram os de Huang *et al.* descritos anteriormente, observando-se no grupo tratado com corticosteróides isolados uma redução da diversidade microbiana e um aumento do ratio Proteobacteria:Firmicutes. De igual modo, verificou-se o inverso nos doentes que receberam antibioterapia. Estes achados demonstram, portanto, que a terapêutica das exacerbações influencia o microbioma respiratório e que estas alterações se mantêm no tempo mesmo após a recuperação clínica.

Para responder à questão do impacto da terapêutica crónica da DPOC com corticosteróides inalados, Contoli *et al.*⁹⁸ desenharam um estudo randomizado prospetivo com 60 doentes com DPOC moderada estável, na qual um grupo recebeu durante 1 ano salmeterol diário (LABA) e o outro salmeterol e propionato de fluticasona diários (LABA + ICS), sendo o *outcome* primário a mudança na carga bacteriana ao longo do tratamento. Os resultados demonstraram efetivamente um aumento da carga bacteriana no segundo grupo, assim como um aumento da abundância de bactérias potencialmente patogénicas (*Pneumococcus*, *Haemophilus* e *Moraxhella*). Curiosamente, estas alterações foram mais significativas nos doentes deste grupo com contagens de eosinófilos mais baixas, sendo que nos doentes com contagens mais altas praticamente não se verificou mudança na carga bacteriana. Estes achados estão em consonância com a atual literatura: os doentes com níveis baixos de eosinófilos beneficiam menos da terapêutica crónica com ICS na prevenção das exacerbações.

Estes doentes desenvolvem maior carga bacteriana, particularmente de bactérias potencialmente patogénicas, o que se traduz num aumento do risco de eventos infecciosos, explicando também assim o aumento do risco do surgimento de pneumonias bacterianas.

9. CONCLUSÃO

A DPOC é uma doença heterogênea, com fatores intrínsecos e extrínsecos a contribuírem para o seu surgimento, evolução e prognóstico. Na última década, o estudo do microbioma pulmonar tem-se revelado chave no melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenrolar da doença e na compreensão da variabilidade fenotípica inter-individual. Desde o primeiro estudo, que revelou a presença de uma comunidade microbiana pulmonar, sucessivas pesquisas têm correlacionado alterações na sua composição e abundância, com os diversos estádios da doença e a ocorrência de episódios de exacerbação aguda. A evidência atual reflete a existência de uma resposta inflamatória desregulada, como consequência da manutenção temporal de um ciclo de disbiose e inflamação, na qual existe um deslocamento de bactérias comensais não patogênicas para bactérias patogênicas, particularmente bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria.

Todavia, a maioria dos estudos da área apenas se limitam a descrever a associação entre doença e disbiose, e não permitem discernir se são as próprias alterações no microbioma que provocam a doença, ou se estas são meramente resultado das modificações locais que ocorrem no pulmão doente. Outra questão premente é de que forma o microbioma pulmonar pode ser manipulado terapêuticamente para reverter a evolução natural da doença. Para responder a estas questões, são necessários novos estudos longitudinais, com protocolos estandardizados, que permitam descrever de forma mais precisa os mecanismos relacionados com o aparecimento da doença, a sua progressão e a própria resposta à terapêutica. Nesse sentido, as novas abordagens de metagenômica, metatranscriptômica e metabolômica têm indubitavelmente um papel central. Por outro lado, também o estudo e desenvolvimento de modelos animais constitui uma ferramenta chave na clarificação das relações entre o microbioma e a patogênese da DPOC, no âmbito da medicina translacional.

Finalmente, a melhor compreensão destas interações poderá levar ao desenvolvimento de novos biomarcadores simples, seguros e de uso pragmático na prática clínica que auxiliem o médico numa decisão terapêutica mais personalizada, nomeadamente no uso de antibioterapia e imunossuppressores.

10. APÊNDICE

Tabela 1. Resumo dos estudos que investigaram o microbioma pulmonar de doentes com DPOC estável

Autor (Ano)	Técnica	Caraterísticas dos participantes	Tipo de amostra	Resultados significativos
Hilty <i>et al.</i> (2010) ⁴⁰	16S rRNA	5 indivíduos com DPOC, 11 com asma, 8 controlos saudáveis	LBA	-Aumento de Proteobacteria (<i>Haemophilus</i>) e redução de Bacteroidetes na DPOC
Erb-Downward <i>et al.</i> (2011) ⁴¹	16S rRNA	6 indivíduos com DPOC grave, 4 com DPOC leve a moderada, 7 fumadores saudáveis, 3 não fumadores	Amostras de tecido de explantes; LBA	-Diferenças micro-anatómicas da composição microbiana no mesmo pulmão na DPOC grave; -Redução da diversidade na DPOC moderada e grave
Cabrera-Rubio <i>et al.</i> (2012) ⁵¹	16S rRNA	8 indivíduos com DPOC	Expetoração, LBA, biópsias de mucosa brônquica	-Menor diversidade em amostras de expetoração comparando com outro tipo de amostras.
Garcha <i>et al.</i> (2012) ⁵⁰	qPCR	134 indivíduos com DPOC GOLD II-IV	Expetoração	-Associação entre a redução de FEV1 e o aumento da carga bacteriana total e de espécies patogénicas (<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Moraxella catarrhalis</i>)
Sze <i>et al.</i> (2012) ¹¹	16S rRNA; qPCR	4 indivíduos com DPOC muito grave, 8 com fibrose quística, 8 fumadores saudáveis, 8 não fumadores	Amostras de pulmão obtidas cirurgicamente	-Aumento de Proteobacteria e redução de Bacteroidetes na DPOC
Molyneaux <i>et al.</i> (2013) ³³	16S rRNA; qPCR	14 indivíduos com DPOC, 17 controlos saudáveis	Expetoração colhida antes e após infeção por Rhinovirus	-Após infeção por Rhinovirus, aumento da carga bacteriana e crescimento significativo de <i>Haemophilus influenzae</i> na DPOC, não observado em saudáveis

Galiana <i>et al.</i> (2014) ⁴⁸	16S rRNA; qPCR	9 indivíduos com DPOC leve a moderada, 10 com DPOC grave a muito grave	Expetoração	-Maior carga bacteriana e menor diversidade no grupo com DPOC mais grave
Garcia-Nunez <i>et al.</i> (2014) ²⁹	16S rRNA	8 indivíduos com DPOC moderada a grave, 9 DPOC muito grave	Expetoração	-Menor diversidade no grupo com DPOC muito grave
Lee <i>et al.</i> (2016) ¹⁹	16S rRNA; metatranscriptoma	4 indivíduos com DPOC moderada e 4 com DPOC grave	Expetoração	-Redução na expressão de <i>Veillonella</i> e aumento da expressão de <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Haemophilus parainfluenzae</i> nos grupos com doença mais grave
Engel <i>et al.</i> (2017) ¹²	16S rRNA	12 indivíduos com DPOC com alterações significativas em TC, 4 indivíduos sem alterações e 9 controles	Escovados brônquicos	-Aumento de <i>Streptococcus</i> e redução de <i>Prevotella</i> nos indivíduos com alterações radiológicas
Dicker <i>et al.</i> (2018) ⁵²	16S rRNA	141 indivíduos com DPOC de uma coorte total de 1796 submetidos a genotipagem de MBL	Expetoração	-Doentes com déficit de MBL apresentaram uma microbiota com mais diversidade e menos abundância de <i>Haemophilus spp</i> , menos marcadores de inflamação e menor risco de desenvolver exacerbações
Sinha <i>et al.</i> (2018) ⁵³	16S rRNA	4 indivíduos com DPOC moderada e estável	Expetoração colhida a tempo curto (2 dias) e longo (2-9 meses)	-Diversidade e composição mantiveram-se estáveis entre os 2 períodos.
Millares <i>et al.</i> (2019) ⁴⁹	16S rRNA	72 indivíduos com DPOC	Expetoração	-Correlação inversa da diversidade alfa com a idade e a função pulmonar

FEV1: Volume expiratório forçado em 1 segundo; LBA: lavado broncoalveolar; MBL: *Mannose Binding Lectin*; qPCR: PCR quantitativa

Tabela 2. Resumo dos estudos que investigaram o microbioma pulmonar de doentes em exacerbação aguda de DPOC

Autor (Ano)	Técnica	Caraterísticas dos participantes	Tipo de amostra	Resultados significativos
Huang et al. (2014) ⁵⁸	16S rRNA; qPCR	12 indivíduos com DPOC	Expetoração colhida antes, durante e após exacerbação	-Aumento de Proteobacteria durante exacerbação; -Efeitos opostos no microbioma pela terapêutica com corticosteróides ou antibióticos
Millares et al. (2015) ³¹	16S rRNA; metagenómica	8 indivíduos com DPOC grave	Expetoração colhida em doença estável e em exacerbação	-Alterações em vias de metabolismo e crescimento celular durante exacerbação
Wang et al. (2016) ¹⁰	16S rRNA; qPCR	87 indivíduos com DPOC	Expetoração colhida em doença estável, exacerbação e após 2-6 semanas	-Redução na diversidade e aumento de Proteobacteria durante exacerbação
Haldar et al. (2017) ⁵⁷	16S rRNA; qPCR	58 indivíduos com DPOC	Expetoração colhida em doença estável, durante exacerbação e após 14 e 42 dias	-O <i>ratio</i> G:F correlaciona-se positivamente com marcadores inflamatórios (% de neutrófilos, CRP, IL-1 β) e negativamente com o status respiratório (FEV1)
Wang et al. (2018) ⁶⁰	16S rRNA	281 indivíduos com DPOC de 3 centros clínicos	Expetoração colhida em doença estável e durante exacerbação	-Disbiose correlaciona-se com a gravidade da exacerbação (score CAT e FEV1); -Exacerbadores frequentes apresentam menor diversidade
Mayhew et al. (2018) ⁶¹	16S rRNA	101 indivíduos com DPOC	Expetoração colhida em doença estável e durante exacerbação	-Associação entre <i>Haemophilus</i> e <i>Moraxella</i> com a gravidade da doença e a ocorrência de exacerbações; -Composição distinta entre exacerbações bacterianas e exacerbações virais e eosinofílicas; -O tipo de exacerbação tende a repetir-se na seguinte
Ghebre et al. (2018) ⁵⁶	16S rRNA	73 indivíduos com DPOC e 32 indivíduos com asma	Expetoração colhida durante exacerbação	-Definidos 3 <i>clusters</i> com perfil inflamatório e microbioma distinto -Exacerbações bacterianas de DPOC caraterizadas por aumento de mediadores pro-

				inflamatórios, inflamação neutrofílica e aumento de Proteobacteria
Leitao Filho et al. (2019) ⁵⁹	16S rRNA	102 indivíduos internados por exacerbação de DPOC	Expetoração colhida durante internamento e no <i>follow-up</i> de 1 ano	- Redução da diversidade, diminuição de <i>Veillonella</i> e aumento de <i>Staphylococcus</i> associados a aumento da mortalidade a 1 ano
Pragman et al. (2019) ⁶²	16S rRNA; qPCR	11 indivíduos exacerbadores frequentes e 11 infrequentes	Expetoração	-Exacerbadores frequentes apresentam menor diversidade com aumento de Gammaproteobacteria
Wang et al. (2019) ³⁰	16S rRNA; qPCR; transcriptoma; proteoma	43 indivíduos com DPOC e 16 controlos saudáveis	Expetoração colhida em doença estável, durante exacerbação e após 2 e 6 semanas e 6 meses	-Associação entre <i>Moraxella</i> e <i>Haemophilus</i> e vias de inflamação -Redução da diversidade e aumento da abundância de <i>Moraxella</i> durante episódio de exacerbação

CAT: teste de avaliação de DPOC; CRP: proteína C reativa; FEV1: volume expiratório forçado em 1 segundo; G:F: ratio Gammaproteobacteria:Firmicutes; IL-1 β : Interleucina 1 beta; qPCR: PCR quantitativa

11. BIBLIOGRAFIA

1. Ferkol T, Schraufnagel D. The global burden of respiratory disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2014. doi:10.1513/AnnalsATS.201311-405PS
2. Bárbara C, Rodrigues F, Dias H, et al. Chronic obstructive pulmonary disease prevalence in lisbon, portugal: The burden of obstructive lung disease study. *Rev Port Pneumol*. 2013. doi:10.1016/j.rppneu.2012.11.004
3. Singh D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report 2019. *Eur Respir J*. 2019. doi:10.1183/13993003.00164-2019
4. Su YC, Jalalvand F, Thegerström J, Riesbeck K. The interplay between immune response and bacterial infection in COPD: Focus Upon non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Front Immunol*. 2018;9(NOV):1-26. doi:10.3389/fimmu.2018.02530
5. Consortium THMP. Hmp Ref 2. *Nature*. 2013;486(7402):207-214. doi:10.1038/nature11234.Structure
6. Faner R, Sibila O, Agustí A, et al. The microbiome in respiratory medicine: Current challenges and future perspectives. *Eur Respir J*. 2017;49(4):1-12. doi:10.1183/13993003.02086-2016
7. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, et al. The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations. *PLoS One*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045001
8. Di Cicco M, Pistello M, Jacinto T, et al. Does lung microbiome play a causal or casual role in asthma? *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(10):1340-1345. doi:10.1002/ppul.24086
9. Mao Q, Jiang F, Yin R, et al. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Lett*. 2018. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.036
10. Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J*. 2016;47(4):1082-1092. doi:10.1183/13993003.01406-2015
11. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, et al. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(10):1073-1080. doi:10.1164/rccm.201111-2075OC
12. Engel M, Endesfelder D, Schlöter-Hai B, et al. Influence of lung CT changes in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) on the human lung microbiome. *PLoS One*. 2017;12(7):1-22. doi:10.1371/journal.pone.0180859
13. Yadava K, Pattaroni C, Sichelstiel AK, et al. Microbiota promotes chronic pulmonary inflammation by enhancing IL-17A and autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med*.

- 2016;193(9):975-987. doi:10.1164/rccm.201504-0779OC
14. Huang YJ, Erb-Downward JR, Dickson RP, Curtis JL, Huffnagle GB, Han MLK. Understanding the role of the microbiome in chronic obstructive pulmonary disease: principles, challenges, and future directions. *Transl Res*. 2017;179:71-83. doi:10.1016/j.trsl.2016.06.007
 15. Sun Y, Cai Y, Huse SM, et al. A large-scale benchmark study of existing algorithms for taxonomy-independent microbial community analysis. *Brief Bioinform*. 2012;13(1):107-121. doi:10.1093/bib/bbr009
 16. Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(7):410-422. doi:10.1038/s41579-018-0029-9
 17. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*. 2017;35(9):833-844. doi:10.1038/nbt.3935
 18. Ditz B, Christenson S, Rossen J, et al. Sputum microbiome profiling in COPD : beyond singular pathogen detection. 2020:1-7. doi:10.1136/thoraxjnl-2019-214168
 19. Lee SW, Kuan CS, Wu LSH, Weng JTY. Metagenome and Metatranscriptome Profiling of Moderate and Severe COPD Sputum in Taiwanese Han Males. *PLoS One*. 2016;11(7):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0159066
 20. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol*. 2016;78(1):481-504. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105238
 21. Charlson ES, Bittinger K, Chen J, et al. Assessing Bacterial Populations in the Lung by Replicate Analysis of Samples from the Upper and Lower Respiratory Tracts. *PLoS One*. 2012;7(9):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0042786
 22. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio*. 2015;6(2):1-10. doi:10.1128/mBio.00037-15
 23. Segal LN, Alekseyenko A V., Clemente JC, et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*. 2013;1(1):1-12. doi:10.1186/2049-2618-1-19
 24. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(6):821-830. doi:10.1513/AnnalsATS.201501-029OC
 25. Grønseth R, Drengenes C, Wiker HG, et al. Protected sampling is preferable in bronchoscopic studies of the airway microbiome. *ERJ Open Res*. 2017;3(3):00019-02017. doi:10.1183/23120541.00019-2017

26. Durack J, Huang YJ, Nariya S, et al. Bacterial biogeography of adult airways in atopic asthma. *Microbiome*. 2018;6(1):1-16. doi:10.1186/s40168-018-0487-3
27. Tangedal S, Aanerud M, Grønseth R, et al. Comparing microbiota profiles in induced and spontaneous sputum samples in COPD patients. *Respir Res*. 2017;18(1):1-9. doi:10.1186/s12931-017-0645-3
28. Gershman NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy J V. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: Evidence that different lung compartments are sampled at different time points. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(2 I):322-328. doi:10.1016/S0091-6749(99)70374-X
29. Garcia-Nuñez M, Millares L, Pomares X, et al. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4217-4223. doi:10.1128/JCM.01967-14
30. Wang Z, Maschera B, Lea S, et al. Airway host-microbiome interactions in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2019;20(1):1-14. doi:10.1186/s12931-019-1085-z
31. Millares L, Pérez-Brocal V, Ferrari R, et al. Functional metagenomics of the bronchial microbiome in COPD. *PLoS One*. 2015;10(12):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0144448
32. Barker BL, Haldar K, Patel H, et al. Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations. *Chest*. 2015;147(1):46-55. doi:10.1378/chest.14-0764
33. Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(10):1224-1231. doi:10.1164/rccm.201302-0341OC
34. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet*. 2014;384(9944):691-702. doi:10.1016/S0140-6736(14)61136-3
35. Dima E, Kyriakoudi A, Kaponi M, et al. The lung microbiome dynamics between stability and exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Current perspectives. *Respir Med*. 2019;157(August):1-6. doi:10.1016/j.rmed.2019.08.012
36. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(8):957-963. doi:10.1164/rccm.201104-0655OC
37. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al. Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. *MBio*. 2017. doi:10.1128/mBio.02287-16
38. Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, Pierce AK. Pharyngeal aspiration in normal adults and

- patients with depressed consciousness. *Am J Med.* 1978. doi:10.1016/0002-9343(78)90574-0
39. Pragman AA, Lyu T, Baller JA, et al. The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome.* 2018;6(1):1-19. doi:10.1186/s40168-017-0381-4
 40. Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010;5(1). doi:10.1371/journal.pone.0008578
 41. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, et al. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One.* 2011;6(2). doi:10.1371/journal.pone.0016384
 42. Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: A two-way street. *Mucosal Immunol.* 2017;10(2):299-306. doi:10.1038/mi.2016.108
 43. Gallacher DJ, Kotecha S. Respiratory microbiome of new-born infants. *Front Pediatr.* 2016;4(FEB):1-10. doi:10.3389/fped.2016.00010
 44. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014. doi:10.1126/scitranslmed.3008599
 45. Lohmann P, Luna RA, Hollister EB, et al. The airway microbiome of intubated premature infants: Characteristics and changes that predict the development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res.* 2014. doi:10.1038/pr.2014.85
 46. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EAM, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014. doi:10.1164/rccm.201407-1240OC
 47. Aguirre E, Galiana A, Mira A, et al. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Apmis.* 2015;123(5):427-432. doi:10.1111/apm.12363
 48. Galiana A, Aguirre E, Rodriguez JC, et al. Sputum microbiota in moderate versus severe patients with COPD. *Eur Respir J.* 2014;43(6):1787-1790. doi:10.1183/09031936.00191513
 49. Millares L, Pascual S, Montón C, et al. Relationship between the respiratory microbiome and the severity of airflow limitation, history of exacerbations and circulating eosinophils in COPD patients. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1):1-9. doi:10.1186/s12890-019-0867-x
 50. Garcha DS, Thurston SJ, Patel ARC, et al. Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax.* 2012;67(12):1075-1080. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-201924

51. Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3562-3568. doi:10.1128/JCM.00767-12
52. Dicker AJ, Crichton ML, Cassidy AJ, et al. Genetic mannose binding lectin deficiency is associated with airway microbiota diversity and reduced exacerbation frequency in COPD. *Thorax.* 2018;73(6):510-518. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209931
53. Sinha R, Weissenburger-Moser LA, Clarke JL, et al. Short term dynamics of the sputum microbiome among COPD patients. *PLoS One.* 2018;13(3). doi:10.1371/journal.pone.0191499
54. López-Campos JL, Soler-Cataluña JJ, Miravittles M. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2019 Report: Future Challenges. *Arch Bronconeumol.* 2020;56(2):65-67. doi:10.1016/j.arbr.2019.06.014
55. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2010;363(12):1128-1138. doi:10.1056/NEJMoa0909883
56. Ghebre MA, Pang PH, Diver S, et al. Biological exacerbation clusters demonstrate asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap with distinct mediator and microbiome profiles. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(6):2027-2036.e12. doi:10.1016/j.jaci.2018.04.013
57. Haldar K, Bafadhel M, Lau K, et al. Microbiome balance in sputum determined by PCR stratifies COPD exacerbations and shows potential for selective use of antibiotics. *PLoS One.* 2017;12(8):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0182833
58. Huang YJ, Sethi S, Murphy T, Nariya S, Boushey HA, Lynch S V. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):2813-2823. doi:10.1128/JCM.00035-14
59. Filho FSL, Alotaibi NM, Ngan D, et al. Sputum microbiome is associated with 1-year mortality after chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019. doi:10.1164/rccm.201806-1135OC
60. Wang Z, Singh R, Miller BE, et al. Sputum microbiome temporal variability and dysbiosis in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: An analysis of the COPD MAP study. *Thorax.* 2018;73(4):331-338. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210741
61. Mayhew D, Devos N, Lambert C, et al. Longitudinal profiling of the lung microbiome in the AERIS study demonstrates repeatability of bacterial and eosinophilic COPD exacerbations. *Thorax.* 2018;73(5):422-430. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210408
62. Pragman AA, Knutson KA, Gould TJ, Isaacson RE, Reilly CS, Wendt CH. Chronic

- obstructive pulmonary disease upper airway microbiota alpha diversity is associated with exacerbation phenotype: A case-control observational study. *Respir Res.* 2019;20(1):1-14. doi:10.1186/s12931-019-1080-4
63. Shelburne SA, Davenport MT, Keith DB, Musser JM. The role of complex carbohydrate catabolism in the pathogenesis of invasive streptococci. *Trends Microbiol.* 2008. doi:10.1016/j.tim.2008.04.002
 64. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: A mechanistic review. *Int J Environ Res Public Health.* 2018. doi:10.3390/ijerph15051033
 65. Kopa PN, Pawliczak R. Effect of smoking on gene expression profile—overall mechanism, impact on respiratory system function, and reference to electronic cigarettes. *Toxicol Mech Methods.* 2018. doi:10.1080/15376516.2018.1461289
 66. Garmendia J, Morey P, Bengoechea JA. Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *Eur Respir J.* 2012. doi:10.1183/09031936.00061911
 67. Brook I, Gober AE. Effect of smoking cessation on the microbial flora. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2007. doi:10.1001/archotol.133.2.135
 68. Morris A, Beck JM, Schloss PD, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(10):1067-1075. doi:10.1164/rccm.201210-1913OC
 69. Einarsson GG, Comer DM, McIlreavey L, et al. Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax.* 2016;71(9):795-803. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207235
 70. Kim HJ, Kim YS, Kim KH, et al. The microbiome of the lung and its extracellular vesicles in nonsmokers, healthy smokers and COPD patients. *Exp Mol Med.* 2017;49(4). doi:10.1038/emm.2017.7
 71. Cho MH, McDonald MLN, Zhou X, et al. Risk loci for chronic obstructive pulmonary disease: A genome-wide association study and meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2014. doi:10.1016/S2213-2600(14)70002-5
 72. Brightling C, Greening N. Airway inflammation in COPD: Progress to precision medicine. *Eur Respir J.* 2019. doi:10.1183/13993003.00651-2019
 73. Scales BS, Dickson RP, Huffnagle GB. A tale of two sites: how inflammation can reshape the microbiomes of the gut and lungs. *J Leukoc Biol.* 2016. doi:10.1189/jlb.3mr0316-106r
 74. Larsen JM, Musavian HS, Butt TM, Ingvorsen C, Thyssen AH, Brix S. Chronic obstructive

- pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal *Prevotella* spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology. *Immunology*. 2015;144(2):333-342. doi:10.1111/imm.12376
75. Bernasconi E, Pattaroni C, Koutsokera A, et al. Airway microbiota determines innate cell inflammatory or tissue remodeling profiles in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016. doi:10.1164/rccm.201512-2424OC
 76. Singh R, Mackay AJ, Patel ARC, et al. Inflammatory thresholds and the species-specific effects of colonising bacteria in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2014;15(1):1-10. doi:10.1186/s12931-014-0114-1
 77. Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, et al. Host response to the lung microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(4):438-445. doi:10.1164/rccm.201502-0223OC
 78. Segal LN, Clemente JC, Tsay JCJ, et al. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol*. 2016;1(5):1-11. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.31
 79. Man WH, De Steenhuijsen P, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(5):259-270. doi:10.1038/nrmicro.2017.14
 80. Dicker AJ, Crichton ML, Pumphrey EG, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):117-127. doi:10.1016/j.jaci.2017.04.022
 81. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: Identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(6):662-671. doi:10.1164/rccm.201104-0597OC
 82. Suresh Babu K, Kastelik J, Morjaria JB. Role of long term antibiotics in chronic respiratory diseases. *Respir Med*. 2013. doi:10.1016/j.rmed.2013.02.009
 83. Albert RK, Connett J, Bailey WC, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med*. 2011. doi:10.1056/NEJMoa1104623
 84. Uzun S, Djamin RS, Kluytmans JAJW, et al. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014. doi:10.1016/S2213-2600(14)70019-0
 85. Herath SC, Normansell R, Maisey S, Poole P. Prophylactic antibiotic therapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cochrane database Syst Rev*. 2018.

doi:10.1002/14651858.CD009764.pub3

86. Slater M, Rivett DW, Williams L, et al. The impact of azithromycin therapy on the airway microbiota in asthma. *Thorax*. 2014;69(7):673-674. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204517
87. Zhou Y, Bacharier LB, Isaacson-Schmid M, et al. Azithromycin therapy during respiratory syncytial virus bronchiolitis: Upper airway microbiome alterations and subsequent recurrent wheeze. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):1215-1219.e5. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.054
88. Rogers GB, Bruce KD, Martin ML, Burr LD, Serisier DJ. The effect of long-term macrolide treatment on respiratory microbiota composition in non-cystic fibrosis bronchiectasis: An analysis from the randomised, double-blind, placebo-controlled BLESS trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(12):988-996. doi:10.1016/S2213-2600(14)70213-9
89. Segal LN, Clemente JC, Wu BG, et al. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial with azithromycin selects for anti-inflammatory microbial metabolites in the emphysematous lung. *Thorax*. 2017;72(1):13-22. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208599
90. Brill SE, Law M, El-Emir E, et al. Effects of different antibiotic classes on airway bacteria in stable COPD using culture and molecular techniques: A randomised controlled trial. *Thorax*. 2015;70(10):930-938. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207194
91. Siddiqui SH, Pavord ID, Barnes NC, et al. Blood eosinophils: A biomarker of COPD exacerbation reduction with inhaled corticosteroids. *Int J COPD*. 2018. doi:10.2147/COPD.S179425
92. Bafadhel M, Peterson S, De Blas MA, et al. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *Lancet Respir Med*. 2018. doi:10.1016/S2213-2600(18)30006-7
93. Stolberg VR, McCubbrey AL, Freeman CM, et al. Glucocorticoid-Augmented Efferocytosis Inhibits Pulmonary Pneumococcal Clearance in Mice by Reducing Alveolar Macrophage Bactericidal Function. *J Immunol*. 2015. doi:10.4049/jimmunol.1402217
94. van de Garde MDB, Martinez FO, Melgert BN, Hylkema MN, Jonkers RE, Hamann J. Chronic Exposure to Glucocorticoids Shapes Gene Expression and Modulates Innate and Adaptive Activation Pathways in Macrophages with Distinct Changes in Leukocyte Attraction. *J Immunol*. 2014. doi:10.4049/jimmunol.1302138
95. Barbier M, Agustí A, Albertí S. Fluticasone propionate reduces bacterial airway epithelial invasion. *Eur Respir J*. 2008. doi:10.1183/09031936.00020608
96. Denner DR, Sangwan N, Becker JB, et al. Corticosteroid therapy and airflow obstruction

- influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2016. doi:10.1016/j.jaci.2015.10.017
97. Singanayagam A, Glanville N, Girkin JL, et al. Corticosteroid suppression of antiviral immunity increases bacterial loads and mucus production in COPD exacerbations. *Nat Commun.* 2018. doi:10.1038/s41467-018-04574-1
98. Contoli M, Pauletti A, Rossi MR, et al. Long-term effects of inhaled corticosteroids on sputum bacterial and viral loads in COPD. *Eur Respir J.* 2017;50(4). doi:10.1183/13993003.00451-2017