

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Polimorfismos y expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M como marcadores de gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos chilenos

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

ARIEL ALEXIS TOLEDO GÓMEZ

**Directoras de Tesis: Dra. Sandra Ampuero Llanos
Dra. Vivian Luchsinger Farías**

Programa de Virología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Santiago-CHILE

Abril 2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ARIEL ALEXIS TOLEDO GÓMEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día 29 de abril del 2021

Directora de Tesis:

Dra. Sandra Ampuero

Directora de Tesis:

Dra. Vivian Luchsinger

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreud

Dr. Mauricio Farfán

Dr. Dante Miranda

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	XI
AGRADECIMIENTOS	XIV
CONGRESOS	XVI
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XX
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC)	1
I.2 Evaluación y categorización clínica del adulto con NAC	2
I.2.1 Índice de gravedad de la neumonía (PSI)	2
I.2.2 CURB-65	4
I.3 Etiología de la NAC	5
I.4 Sistema Inmune	6
I.4.1 Respuesta inmune innata vía Toll/IL-1R en el reconocimiento de patógenos	6
I.4.2 Familia IRAK	7
I.4.2.1 IRAK-4	8
I.4.2.2 IRAK-M	9
I.4.2.3 Alteraciones de IRAK-4 e IRAK-M	10
II.1 HIPÓTESIS	13
II.2 OBJETIVO GENERAL	13
II.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1 Población de estudio	14
III.2 Clasificación de gravedad de adultos con NAC	15
III.3 Muestras biológicas estudiadas	15

III.4 Reactivos y materiales	16
III.5 Detección de agentes	17
III.6 Determinación de genotipos de los polimorfismos c.1282G>A (rs4251545) de <i>irak-4</i> y c.439A>G (rs1152888) de <i>irak-3</i>	
III.6.1 Obtención de ADN genómico	18
III.6.2 Determinación genotípica	18
III.6.3 Estandarización de partidores para genotipificación	19
III.7 Determinación de la expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M	
III.7.1 Obtención de ARN	22
III.7.2 Eliminación de contaminantes	23
III.7.3 Transcripción inversa	23
III.7.4 PCR en tiempo real	23
III.8 Cuantificación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en plasma mediante Luminex®	
III.8.1 Muestras de plasma	28
III.8.2 Cuantificación con Luminex®	28
III.9 Análisis estadístico	28
IV. RESULTADOS	
IV.1 Características clínicas y demográficas de adultos con NAC	
IV.1.1 Según clasificación de gravedad por PSI	31
IV.1.2 Según clasificación de gravedad por CURB-65	32
IV.2 Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs en adultos con NAC	
IV.2.1 SNP c.1282G>A (rs4251545) de <i>irak-4</i>	34
IV.2.1.1 Según clasificación de gravedad por PSI	34
IV.2.1.2 Según clasificación de gravedad por CURB-65	36
IV.2.1.3 Frecuencia del SNP c.1282G>A de <i>irak-4</i> según sexo, detección de agentes y comorbilidades de los adultos con NAC	38
IV.2.1.4 Frecuencia del SNP c.1282G>A de <i>irak-4</i> según la presencia de sepsis en adultos con NAC	39
IV.2.2 SNP c.439A>G (rs1152888) de <i>irak-3</i> (<i>irak-m</i>)	40

IV.2.2.1 Según clasificación de gravedad por PSI	40
IV.2.2.2 Según clasificación de gravedad por CURB-65	42
IV.2.2.3 Frecuencia del SNP c.439A>G de <i>irak-3</i> según sexo, detección de agentes y comorbilidades de los adultos con NAC	44
IV.2.2.4 Frecuencia del SNP c.439A>G de <i>irak-3</i> según la presencia de sepsis en adultos con NAC	45
IV.2.3 Frecuencias de haplotipos de los SNP c.1282G>A de <i>irak-4</i> y c.439A>G de <i>irak-3</i> en adultos con NAC	46
IV.3 Expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M en adultos con NAC	
IV.3.1 Expresión génica de IRAK-4 en sangre	
IV.3.1.1 En adultos con NAC clasificados por gravedad según PSI	47
IV.3.1.2 En adultos con NAC clasificados por gravedad según CURB-65	48
IV.3.1.3 Expresión génica de IRAK-4 en adultos con NAC según edad, sexo, comorbilidades, sepsis y agentes detectados.....	50
IV.3.2 Expresión génica de IRAK-M en sangre	
IV.3.2.1 En adultos con NAC clasificados por gravedad según PSI	50
IV.3.2.2 En adultos con NAC clasificados por gravedad según CURB-65	52
IV.3.2.3 Expresión génica de IRAK-M en adultos con NAC según edad, sexo, comorbilidades, sepsis y agentes detectados	53
IV.3.3 Análisis de la asociación con gravedad de los SNPs c.1282G>A (rs4251545) de <i>irak-4</i> , c.439A>G (rs1152888) de <i>irak-3</i> y la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M en sangre de adultos chilenos con NAC	54
IV.4 Concentración de citoquinas y quimioquinas en adultos con NAC	56
IV.4.1 Según gravedad por PSI	57
IV.4.2 Según gravedad por CURB-65	60
IV.4.3 Entre adultos con NAC y asintomáticos	61
IV.5 Asociación del genotipo GA del SNP c.1282G>A (rs4251545) de <i>irak-4</i> a PSI y CURB-65 mediante curvas ROC	63

V. DISCUSIÓN

V.1 Asociación genotípica y alélica de los SNP c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* con la gravedad de adultos con NAC

V.1.1 SNP c.1282G>A de *irak-4* como potencial uso de biomarcador 67

V.1.2 SNP c.1282G>A de *irak-4* y su relación con sepsis en adultos con NAC 69

V.1.3 SNP c.439A>G de *irak-3* no se relaciona con la gravedad de adultos con NAC 70

V.1.4 SNP c.439A>G de *irak-3* y su relación con sepsis en adultos con NAC 70

V.1.5 Frecuencias de los SNPs c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* en población chilena difieren de otras poblaciones 71

V.2 Expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M no se relaciona con la gravedad de adultos con NAC 72

V.3 Cambios a nivel de citoquinas relacionados con gravedad de la NAC

V.3.1 Diferencias en los niveles de RANTES, IL-1 β y TNF- α entre adultos con NAC graves y no graves 74

V.3.2 Diferencias entre adultos asintomáticos y adultos con NAC 74

V.4 Relación entre el SNP c.1282G>A, la expresión génica de IRAK-4 y los niveles de citoquinas en los adultos con NAC 75

V.5 Limitaciones del estudio..... 76

VI. CONCLUSIONES 78

VII. BIBLIOGRAFÍA 79

VIII. ANEXO 87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización en la que participan IRAK-4 e IRAK-M para la Producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias	10
Figura 2. Gráfico representativo de la curva HRM para la genotipificación del polimorfismo c.1282G>A (rs4251545) de <i>irak-4</i>	20
Figura 3. Gráfico representativo de la curva de HRM para la genotipificación del polimorfismo c.439A>G (rs1152888) de <i>irak-3</i>	22
Figura 4. Gráfico representativo de la curva de fusión obtenida para la expresión relativa del gen de IRAK-4	25
Figura 5. Gráfico representativo de la curva de fusión obtenida para la expresión relativa del gen de IRAK-M	27
Figura 6. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de <i>irak-4</i> en 194 adultos con NAC graves y no graves según PSI	34
Figura 7. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de <i>irak-4</i> en 194 adultos con NAC graves y no graves según evolución y PSI	36
Figura 8. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de <i>irak-4</i> en 194 adultos con NAC graves y no graves según CURB65	37
Figura 9. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de <i>irak-4</i> en 194 adultos con NAC graves y no graves según evolución y CURB65	38
Figura 10. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de <i>irak-3</i> en 194 adultos con NAC graves y no graves según PSI	41
Figura 11. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de <i>irak-3</i> en 194 adultos con NAC graves y no graves según evolución y PSI	42
Figura 12. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de <i>irak-3</i> en 194 adultos con NAC graves y no graves según CURB65	43
Figura 13. Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.439A>G	

de <i>irak-3</i> en adultos con NAC graves y no graves según evolución y CURB65	44
Figura 14. Expresión génica relativa de IRAK-4 en 67 adultos con NAC no graves y 55 graves según PSI	47
Figura 15. Expresión génica relativa de IRAK-4 en 54 adultos con NAC no graves y 68 graves según evolución y PSI	48
Figura 16. Expresión génica relativa de IRAK-4 en 83 adultos con NAC no graves y 39 graves según CURB65	49
Figura 17. Expresión génica relativa de IRAK-4 en 52 adultos con NAC no graves y 70 graves según evolución y CURB65	49
Figura 18. Expresión génica relativa de IRAK-M en 87 adultos con NAC no graves y 82 graves según PSI	51
Figura 19. Expresión génica relativa de IRAK-M en 71 adultos con NAC no graves y 98 graves según evolución y PSI	51
Figura 20. Expresión génica relativa de IRAK-M en 120 adultos con NAC no graves y 49 graves según CURB65	52
Figura 21. Expresión génica relativa de IRAK-M en 97 adultos con NAC no graves y 72 graves según evolución y CURB65	53
Figura 22. Niveles de concentración de RANTES en plasma en adultos con NAC de acuerdo con la clasificación por escalas y evolución	59
Figura 23. Niveles de concentración de IL-1 β en plasma en adultos con NAC de acuerdo con la clasificación por escalas y evolución	59
Figura 24. Niveles de concentración de TNF- α en plasma en adultos con NAC de acuerdo con la clasificación por escalas y evolución	60
Figura 25. Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica CURB65	64
Figura 26. Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica CURB65 + genotipo GA	64
Figura 27. Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica PSI	65
Figura 28. Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica PSI + genotipo GA	65
Figura 29. Esquema representativo de los resultados obtenidos en la vía de señalización regulada por IRAK-4 e IRAK-M	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala PSI utilizada en la clasificación de adultos con neumonía adquirida en la comunidad	3
Tabla 2. Gravedad clínica de 356 adultos chilenos con neumonía adquirida en la comunidad según el índice Fine y agente infeccioso detectado	5
Tabla 3. Descripción de las variantes rs4251545 de <i>irak-4</i> y rs1152888 de <i>irak-3</i>	19
Tabla 4. Secuencia de partidores para la genotipificación de los SNPs c.1282G>A de <i>irak-4</i> y c.439A>G de <i>irak-3</i>	19
Tabla 5. Concentración de reactivos en la reacción de PCR-HRM para el análisis del polimorfismo c.1282G>A de <i>irak-4</i>	20
Tabla 6. Programa de amplificación para el polimorfismo c.1282G>A de <i>irak-4</i>	20
Tabla 7. Concentración de reactivos en la reacción de PCR-HRM para el análisis del polimorfismo c.439A>G de <i>irak-3</i>	21
Tabla 8. Programa de amplificación para el polimorfismo c.439A>G de <i>irak-3</i>	21
Tabla 9. Secuencia de partidores para medir la expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M	24
Tabla 10. Concentración de reactivos para el análisis de la expresión del mensajero del gen de IRAK-4 mediante la reacción de PCR en tiempo real	24
Tabla 11. Programa de amplificación para la expresión relativa del gen de IRAK-4	25
Tabla 12. Concentración de reactivos para el análisis de la expresión del mensajero del gen de IRAK-M mediante la reacción de PCR en tiempo real	26
Tabla 13. Programa de amplificación para la expresión relativa del gen de IRAK-M	26
Tabla 14. Características clínicas de 203 adultos con NAC categorizados por gravedad según la escala PSI	32
Tabla 15. Características clínicas de 203 adultos con NAC categorizados por gravedad según la escala CURB-65	33
Tabla 16. Frecuencia genotípica y alélica del SNP c.1282G>A de <i>irak-4</i> en adultos con NAC y sepsis, clasificados por gravedad según PSI,	

y reclasificados por evolución y PSI	40
Tabla 17. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP c.439A>G de <i>irak-3</i> en adultos con NAC y sepsis, clasificados por gravedad según CURB-65 y evolución	45
Tabla 18. Relación entre el SNP c.1282G>A de <i>irak-4</i> y expresión génica de IRAK-4 con gravedad en 192 adultos con NAC	54
Tabla 19. Relación entre el SNP c.1282G>A de <i>irak-4</i> , expresión génica de IRAK-4, edad y sexo con gravedad en 192 adultos con NAC	56
Tabla 20. Concentración de citoquinas y quimioquinas en 182 adultos con NAC graves y no graves según PSI y reclasificados por evolución	58
Tabla 21. Concentración de citoquinas y quimioquinas en 183 adultos con NAC graves y no graves según CURB-65 y reclasificados por evolución	61
Tabla 22. Concentración de citoquinas y quimioquinas en 22 adultos asintomáticos y 183 adultos con NAC	61

Abstract: IRAK-4 and IRAK-M polymorphism and gene expression as severity markers of community acquired pneumonia in Chilean adults

Community-Acquired Pneumonia (CAP) is a pulmonary acute disease caused mainly by viruses and bacteria with high morbidity and mortality, especially in adults older than 65 years. Its evolution varies from low risk to life-threatening clinical pictures. Mortality risk in adults with CAP is assessed by using prognostic scales, such as the Pneumonia Severity Index (PSI) and CURB-65. Although if they present good predicting values, mistaken categorization of patients may occur. Therefore, finding new biomarkers that enhance the predicting value of these scales is required. In previous studies of Chilean adults with CAP, a differential expression of IRAK-4 and IRAK-M genes was observed. IRAK-4 is a proinflammatory cytokine expression-promoting kinase, meanwhile IRAK-M inhibits this response. Some Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) in these genes have been associated to a higher infection susceptibility and a lower response against pathogens. Despite the importance of IRAK-4 and IRAK-M in the regulation of the immune response, they have not been studied in adults with CAP. The **hypothesis** of this study is: *“Chilean adults with severe Community-Acquired Pneumonia have risk genotypes in SNPs rs4251545 of irak-4 and/or rs1152888 of irak-3, with a lowered IRAK-4 genetic expression, rise of IRAK-M genetic expression and a decline in proinflammatory cytokines and chemokines in comparison to non-severe Community-Acquired Pneumonia diseased adults, constituting CAP prognostic severity value markers”*. The **main objective** of this study was to evaluate if Chilean adults with severe CAP have risk genotypes in SNPs c.1282G>A (rs4251545) of *irak-4* and c.439A>G (rs1152888) of *irak-3*, diminished IRAK-4 genetic expression,

increased IRAK-M genetic expression and lowered cytokines and chemokines compared to adults with non-severe CAP. **Methods:** 203 adults with severe or non-severe CAP according to PSI, CURB65 and evolution (Critical Care Unit or death) were studied. Viral and bacterial agents in urine and nasopharyngeal swab were detected. Genotyping (n:194) was determined in blood using PCR-HRM and relative genetic expression (n:169) by employing real-time RT-PCR applying the $\Delta\Delta C_t$ method. Plasmatic cytokines related to the NF κ B pathway (RANTES, IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF, IL-12 (p40 y p70), IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α and eotaxin) plasmatic levels were quantified with Luminex[®] technology (n=168). Chi-squared, Fisher, Mann-Whitney and Armitage were applied with softwares Unphased, GraphPad 8 and STATA, being significative if $p < 0.05$. **Results:** GG genotype c.1282G>A of *irak-4* SNP was more frequent in severe cases ($p < 0.03$) and GA genotype in non-severe cases ($p < 0.05$). Allele G was most frequent in severe cases and Allele A in non-severe cases, but only by PSI ($p < 0.01$). Both genotypic and allelic frequencies of the SNP c.439A>G of *irak-3* and IRAK-4 and IRAK-M relative genetic expression were not associated to severity of CAP diseased adults. Plasmatic cytokines and chemokines presented differences according to the patient classification scale used: in severe cases defined by both scales and evolution RANTES and IL-1 β levels were lower and TNF- α were higher ($p < 0.04$); in severe cases by PSI IL-2, IL-12 (p40 y p70) levels were lower and IP-10 ($p < 0.04$) levels were higher; By evolution (according to PSI), GM-CSF y MIP-1 α levels were lower in severe cases ($p < 0.01$ and those of IL-6 e IL-8 were higher in severe cases defined by evolution (and CURB 65) ($p < 0.03$). While both the specificity and sensibility of CURB65 augmented when the GA genotype (AOC from 0,83 to 0,88) was included, those of PSI remained the same (AOC from 0,89 to 0,87). **Conclusions:** In CAP Chilean adults, GG genotype and SNP rs4251545 (c.1282G>A) of the G allele of *irak-4* are associated with severity while the GA

genotype and the A allele are associated with a lower risk of severe CAP, Therefore, this SNP is proposed as a possible severity biomarker of CAP in Chilean adults. Genetic expression of IRAK-4 and IRAK-M appear not to be related with severity of CAP in Chilean adults. Plasmatic cytokine concentrations vary according to clinical severity of CAP in adults, RANTES and IL-1 β levels are lower, while TNF- α concentrations are higher in severe cases, diminishing the immunity response in these cases; severity also seems related to the presence of the GG genotype at SNP c.1282G>A of *irak-4*.

These results suggest a genetic susceptibility factor in the development of severe CAP cases with possible effects on the immune response. Future studies should strengthen the use of genetic biomarkers in order to enhance the discriminatory capacity of currently used CAP-severity prognostic scales.

AGRADECIMIENTOS

Primero, agradecer a mi familia. A mi madre, por siempre luchar y salir adelante frente a la adversidad, y no rendirse frente a la enfermedad de mi hermano. Gracias porque aún con todas las dificultades me apoyaste, esto es un premio para ti, para que te sientas más orgullosa de lo que estás ahora. A mi padre, que aún cuando no sea su hijo biológico, mostraste más paternidad que muchos. Siempre serás mi padre y esto también es para ti, para que te sientas orgulloso de tu hijo, gracias por estar en mi vida. A mi tía Myriam, a mis primas Karla y Pía, por recibirme con los brazos abiertos cuando llegué a estudiar a Santiago, junto con mi tío José, que desde pequeño fue un modelo de persona para mí, y por siempre creer en mí, también va para ti. Y a mi primo Esteban, el “Jano”, que siempre hemos estado unidos desde que tengo uso de razón, y a pesar de los altibajos seguimos unidos.

A mis amigos y compañeros de la universidad que hoy en día son de lo mejor que uno pudiese pedir. En especial a la Morgui, Flaca, Juanjo, Dani, Jessy, Rodrigo, Poly, Bárbara, con uds pasé muchos de los mejores momentos en la U y a modo personal también. Espero que sigamos disfrutando muchos momentos tan buenos como los que hemos vivido estos 11 años juntos. Agradecer también a mi amigo de barrio Jaime, que el tiempo no envejece nuestra amistad, gracias por también preocuparte y ayudar a mi familia ahora que estoy a km de distancia.

Agradecer de manera especial a Guti y a su familia. Gracias por ser un verdadero amigo, gracias a los tíos por tenerme siempre presente, acogerme cuando lo necesité y tratarme como uno más de su familia, no sabes cuán agradecido estoy por estos años de amistad, y aunque no siempre uno exprese eso, te valoro enormemente como amigo, como mi mejor amigo, mi pana. Espero un día retribuirles a todos todo el apoyo que me brindaron desde que los conocí, esto también va para uds, muchas gracias.

Agradecer a la profesora Daniela y a la profesora Toña, por tenerme paciencia, comprensión y ayuda en los momentos complicados que tuve a nivel académico y personal, muchas gracias.

Agradecer a las personas del programa de virología, a Rosita, al Gabo, Mane, al doc Avendaño, por todos los buenos momentos. Al laboratorio de virus respiratorios, a Yara, a

Paulina, a Javiera y don Cristian por la ayuda, las risas y los buenos momentos en el lab. A la Dra. Vivian, por su guía que me ayudó a mejorar enormemente a nivel académico, pero también agradecer por su apoyo en un momento complejo de mi salud, aún cuando los tiempos eran complicados, muchas gracias por eso, a ud y a todos en el lab. Gracias a la Dra. Carmen Larrañaga, por ayudarme sin dudar, aún cuando no me conocía mucho.

A nuestro grupo de “Buscando genes”, a la sra. Dina, a Guille, a la Cami, a don Luis y todas aquellas personas con las que compartí gratamente desde que llegué al lab. Gracias por todos los buenos momentos junto a uds, por la ayuda y la alegría que siempre abunda en ese lab. Sin duda uno de los mejores laboratorios en el que uno puede estar.

Finalmente, agradecer de corazón a mi jefa, la profe Sandra, quien me ayudó y estuvo conmigo en todas mis etapas desde el primer día que llegué a realizar unidad, estuvo conmigo. Gracias por creer en mí, por su amabilidad, sus consejos, y muchas cosas más. El agradecimiento que tengo con ud va más allá de las palabras, siempre tendrá un reconocimiento especial y admiración por mi parte.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes presentaciones y congresos

- Polimorfismos y expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M en la neumonía adquirida en la comunidad en adultos chilenos. Ariel Toledo, Luis Lizama, Vivian Luchsinger, Guillermo Bahamonde, Mauricio Ruiz, Rolando Pizarro, Patricio Rossi, Lucía Huenchur, Sandra Ampuero. XLI Reunión Anual de la Sociedad de Microbiología de Chile. Puerto Varas, Chile. 2019.

-*irak-4* en neumonía adquirida en la comunidad viral y/o bacteriana en el adulto chileno: relación de los genotipos del SNP c.1282G>A con los niveles de citoquinas plasmáticas. Ariel Toledo, Sandra Ampuero, Luis Lizama, Guillermo Bahamonde, Mauricio Ruiz, Rolando Pizarro, Patricio Rossi, Lucía Huenchur, Vivian Luchsinger. Congreso Digital de la Sociedad de Microbiología de Chile. 2020.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT Regular N° 1171643

Resumen

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una enfermedad pulmonar aguda causada principalmente por virus y bacterias con una elevada morbilidad y mortalidad, en especial en mayores de 65 años. La evolución es entre cuadros clínicos de bajo riesgo y cuadros con riesgo vital. El riesgo de mortalidad de un adulto con NAC se evalúa con escalas pronósticas, como el índice de gravedad de la neumonía (PSI) y CURB65. Aunque poseen buen valor predictor, pueden categorizar erróneamente a algunos pacientes, por tanto, se requieren nuevos biomarcadores que mejoren su capacidad predictora. En estudios previos de perfiles transcripcionales de adultos chilenos con NAC se detectó una expresión diferenciada de los genes de IRAK-4 e IRAK-M. IRAK-4 es una quinasa que promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias, mientras que IRAK-M inhibe esta respuesta. Algunos polimorfismos de un nucleótido (SNP) en estos genes se asocian con mayor susceptibilidad a infecciones y menor respuesta inmunológica frente a patógenos. Pese a la importancia de IRAK-4 e IRAK-M en la regulación de la respuesta inmunológica, no se han estudiado en adultos con NAC. La **hipótesis** de este estudio es: *“Adultos chilenos con neumonía adquirida en la comunidad graves presentan genotipos de riesgo en los SNPs rs4251545 de irak-4 y/o rs1152888 de irak-3, con una disminución de la expresión génica de IRAK-4, aumento de la expresión génica de IRAK-M y disminución de la concentración de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en sangre respecto a adultos con neumonía adquirida en la comunidad no graves, constituyendo marcadores con valor pronóstico de gravedad de la NAC”*. El **objetivo** de este estudio fue evaluar si adultos chilenos con NAC graves presentan genotipos de riesgo en los SNPs c.1282G>A (rs4251545) de irak-4 y c.439A>G (rs1152888) de irak-3, disminución de la expresión génica de IRAK-4, aumento de la expresión génica

de IRAK-M y disminución de la concentración de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en sangre respecto a adultos con NAC no graves. **Metodología:** Se estudiaron 203 adultos con NAC graves y no graves según PSI, CURB65, y evolución (UCI y/o fallecidos). Se detectaron agentes virales y bacterianos en orina e hisopado nasofaríngeo. Se determinó en sangre la genotipificación (n:194) mediante PCR-HRM y la expresión génica relativa (n:169) mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el método $\Delta\Delta Ct$. Se cuantificaron las citoquinas plasmáticas relacionadas con la vía de NF κ B (RANTES, IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF, IL-12 (p40 y p70), IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α y eotaxina) mediante tecnología Luminex[®] (n=168). Se aplicaron las pruebas estadísticas Chi-Cuadrado, Fisher, Mann-Whitney y Armitage, con los programas Unphased, Graphpad 8 y STATA, siendo significativo si $p < 0,05$. **Resultados:** El genotipo GG del SNP c.1282G>A de irak-4 fue más frecuente en los casos graves ($p < 0,03$) y el genotipo GA en los casos no graves ($p < 0,05$). El alelo G fue más frecuente en los casos graves y el alelo A en los no graves, pero solo por PSI ($p < 0,01$). Las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP c.439A>G de irak-3 y la expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M no se asociaron con la gravedad. Las citoquinas y quimioquinas plasmáticas presentaron diferencias según la escala aplicada: en los casos graves según ambas escalas y evolución, los niveles de RANTES e IL-1 β fueron menores y mayores los de TNF- α ($p < 0,04$); en los casos graves por PSI los niveles de IL-2, IL-12 (p40 y p70) fueron menores y mayores los de IP-10 ($p < 0,04$); los niveles de GM-CSF y MIP-1 α fueron menores en los casos graves por evolución (según PSI) ($p < 0,01$) y mayores los de IL-6 e IL-8 en los casos graves según evolución (y CURB65) ($p < 0,03$). La especificidad y sensibilidad pronóstica de CURB65 aumentaron al incluir el genotipo GA (AOC de 0,83 a 0,88), mientras que las de PSI no se modificaron (AOC de 0,89 a 0,87). **Conclusiones:** En adultos chilenos con NAC, el genotipo GG y alelo G del SNP rs4251545

(c.1282G>A) de *irak-4* se asocian a gravedad mientras que el genotipo GA y alelo A se asocian a menor riesgo de una NAC grave, proponiéndose este SNP como eventual biomarcador de la gravedad de la NAC en adultos chilenos. La expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M no se relacionaría con la gravedad de la NAC en adultos chilenos. Las concentraciones plasmáticas de citoquinas varían según la gravedad clínica de los adultos con NAC, disminuyendo RANTES e IL-1 β y aumentando TNF- α en los casos graves, lo que disminuiría la respuesta inmunitaria en estos casos, y se relacionaría con el genotipo presente del SNP c.1282G>A de *irak-4*.

Estos resultados sugieren una susceptibilidad genética en el desarrollo de cuadros NAC graves con posibles efectos en la respuesta inmune. Estudios futuros podrían fortalecer el uso de biomarcadores genéticos que mejoren la capacidad discriminativa de las actuales escalas pronósticas de gravedad en NAC.

Abstract: IRAK-4 and IRAK-M polymorphism and gene expression as severity markers of community acquired pneumonia in Chilean adults

Community-Acquired Pneumonia (CAP) is a pulmonary acute disease caused mainly by viruses and bacteria with high morbidity and mortality, especially in adults older than 65 years. Its evolution varies from low risk to life-threatening clinical pictures. Mortality risk in adults with CAP is assessed by using prognostic scales, such as the Pneumonia Severity Index (PSI) and CURB-65. Although if they present good predicting values, mistaken categorization of patients may occur. Therefore, finding new biomarkers that enhance the predicting value of these scales is required. In previous studies of Chilean adults with CAP, a differential expression of IRAK-4 and IRAK-M genes was observed. IRAK-4 is a proinflammatory cytokine expression-promoting kinase, meanwhile IRAK-M inhibits this response. Some Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) in these genes have been associated to a higher infection susceptibility and a lower response against pathogens. Despite the importance of IRAK-4 and IRAK-M in the regulation of the immune response, they have not been studied in adults with CAP. The **hypothesis** of this study is: *“Chilean adults with severe Community-Acquired Pneumonia have risk genotypes in SNPs rs4251545 of irak-4 and/or rs1152888 of irak-3, with a lowered IRAK-4 genetic expression, rise of IRAK-M genetic expression and a decline in proinflammatory cytokines and chemokines in comparison to non-severe Community-Acquired Pneumonia diseased adults, constituting CAP prognostic severity value markers”*. The **main objective** of this study was to evaluate if Chilean adults with severe CAP have risk genotypes in SNPs c.1282G>A (rs4251545) of *irak-4* and c.439A>G (rs1152888) of *irak-3*, diminished IRAK-4 genetic expression,

increased IRAK-M genetic expression and lowered cytokines and chemokines compared to adults with non-severe CAP. **Methods:** 203 adults with severe or non-severe CAP according to PSI, CURB65 and evolution (Critical Care Unit or death) were studied. Viral and bacterial agents in urine and nasopharyngeal swab were detected. Genotyping (n:194) was determined in blood using PCR-HRM and relative genetic expression (n:169) by employing real-time RT-PCR applying the $\Delta\Delta C_t$ method. Plasmatic cytokines related to the NF κ B pathway (RANTES, IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF, IL-12 (p40 y p70), IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α and eotaxin) plasmatic levels were quantified with Luminex® technology (n=168). Chi-squared, Fisher, Mann-Whitney and Armitage were applied with softwares Unphased, GraphPad 8 and STATA, being significative if $p < 0.05$. **Results:** GG genotype c.1282G>A of *irak-4* SNP was more frequent in severe cases ($p < 0.03$) and GA genotype in non-severe cases ($p < 0.05$). Allele G was most frequent in severe cases and Allele A in non-severe cases, but only by PSI ($p < 0.01$). Both genotypic and allelic frequencies of the SNP c.439A>G of *irak-3* and IRAK-4 and IRAK-M relative genetic expression were not associated to severity of CAP diseased adults. Plasmatic cytokines and chemokines presented differences according to the patient classification scale used: in severe cases defined by both scales and evolution RANTES and IL-1 β levels were lower and TNF- α were higher ($p < 0.04$); in severe cases by PSI IL-2, IL-12 (p40 y p70) levels were lower and IP-10 ($p < 0.04$) levels were higher; By evolution (according to PSI), GM-CSF y MIP-1 α levels were lower in severe cases ($p < 0.01$ and those of IL-6 e IL-8 were higher in severe cases defined by evolution (and CURB 65) ($p < 0.03$). While both the specificity and sensibility of CURB65 augmented when the GA genotype (AOC from 0,83 to 0,88) was included, those of PSI remained the same (AOC from 0,89 to 0,87). **Conclusions:** In CAP Chilean adults, GG genotype and SNP rs4251545 (c.1282G>A) of the G allele of *irak-4* are associated with severity while the GA

genotype and the A allele are associated with a lower risk of severe CAP, Therefore, this SNP is proposed as a possible severity biomarker of CAP in Chilean adults. Genetic expression of IRAK-4 and IRAK-M appear not to be related with severity of CAP in Chilean adults. Plasmatic cytokine concentrations vary according to clinical severity of CAP in adults, RANTES and IL-1 β levels are lower, while TNF- α concentrations are higher in severe cases, diminishing the immunity response in these cases; severity also seems related to the presence of the GG genotype at SNP c.1282G>A of *irak-4*.

These results suggest a genetic susceptibility factor in the development of severe CAP cases with possible effects on the immune response. Future studies should strengthen the use of genetic biomarkers in order to enhance the discriminatory capacity of currently used CAP-severity prognostic scales.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC)

La neumonía se define como una infección respiratoria aguda provocada principalmente por virus y bacterias, afectando los alveolos y presentando características clínicas como tos, fiebre, expectoración purulenta y dolores musculares. Tiene una mayor incidencia en adultos mayores de 65 años, con una alta tasa de morbilidad y mortalidad a nivel global, con casi tres millones de defunciones cada año, siendo la primera causa de muerte de origen infeccioso en el mundo (Ochoa-Gondar *et al*, 2008) (File y Marrie, 2010) (Millett *et al*, 2013) (World Health Organization, 2018). En Chile, en el año 2009 la tasa de mortalidad fue 20,8/100.000 habitantes en la población general, mientras que en adultos mayores a 65 años la tasa de mortalidad asciende a 199,8/100.000 habitantes (MINSAL, 2011). El 2017, la neumonía fue la séptima causa de muerte con una tasa de mortalidad en la población general de 18/100.000 habitantes.

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) se refiere a la infección adquirida fuera de un recinto hospitalario, por lo que se excluyen los pacientes hospitalizados previamente y se incluyen a quienes viven en casas de reposo. En el mundo, la NAC tiene una tasa de incidencia de 1.600 casos por cada 100.000 habitantes y una mortalidad del 5-10% (Saldías *et al*, 2017). En Europa, la tasa de incidencia en adultos mayores de 65 años es de 76-140 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que en Estados Unidos es de 63 casos por cada 100.000 habitantes (Cillóniz *et al*, 2018). Debido a esta alta tasa de incidencia y mortalidad, es relevante identificar las causas y tratar adecuadamente a estos enfermos con el fin de disminuir la mortalidad.

I.2. Evaluación y categorización clínica del adulto con NAC

El riesgo de complicaciones en un adulto con NAC es variable, pudiendo desarrollar desde un cuadro clínico de riesgo bajo hasta un cuadro grave con riesgo vital. En general, la letalidad en un adulto con NAC categorizado como bajo riesgo es 1-2%, mientras que en los hospitalizados se eleva entre 5-15% debido a la presencia de factores de riesgo tales como tabaquismo, alcoholismo, enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC), insuficiencia renal, inmunodeficiencia, entre otras. Algunos pacientes de este último grupo requieren ser internados en unidades de cuidados intensivos (UCI), donde el riesgo de muerte asciende entre el 20-50%. Los adultos con NAC se clasifican en tres categorías de riesgo que determinan el manejo clínico (Saldías *et al*, 2014):

- **Pacientes de bajo riesgo:** Tratamiento ambulatorio
- **Pacientes de riesgo intermedio:** Presenta comorbilidad y/o factores de riesgo. Puede tratarse a nivel ambulatorio bajo vigilancia o requerir hospitalización.
- **Pacientes de alto riesgo:** Tratados en la unidad de intermedio o de cuidados intensivos (UCI).

Los pacientes se evalúan mediante escalas pronósticas clínicas que permiten incluirlos en una de las categorías de riesgo. Dentro de las escalas pronósticas se incluyen el índice de gravedad de la neumonía (PSI) y CURB-65.

I.2.1 Índice de gravedad de la neumonía (PSI)

El índice de gravedad de la neumonía, también conocido como escala de Fine (Fine *et al*, 1997), fue diseñado específicamente para identificar a aquellos adultos con NAC que presentan bajo riesgo de mortalidad. Se basa en 20 variables: 3 demográficas, 5

comorbilidades, 5 parámetros determinados en el examen físico y 7 exámenes de laboratorio. A cada variable se le asigna un puntaje (**Tabla 1.a**) y el puntaje total obtenido determina la clasificación en 5 grupos con diferente mortalidad (**Tabla 1.b**). Los grupos I y II son pacientes con muy bajo riesgo de muerte y se tratan de manera ambulatoria, mientras que el grupo III incluye pacientes que requieren una breve hospitalización. En el caso de los grupos IV y V, los pacientes deben ser hospitalizados, requiriendo algunas veces ingreso a UCI debido al alto riesgo de mortalidad que presentan, alcanzando un 20% en el grupo V.

Tabla 1. Escala PSI utilizada en la clasificación de adultos con neumonía adquirida en la comunidad.

a)

Factores de riesgo	Puntos
Factores demográficos	
Edad hombres	Edad en años
Edad mujeres	Edad- 10 en años
Residente en asilo	+10
Enfermedades coexistentes	
Neoplasia activa	+30
Hepatopatía crónica	+20
Insuficiencia cardíaca	+10
Enfermedad cerebrovascular	+10
Nefropatía crónica	+10
Alteraciones en examen físico	
Alteración del nivel de conciencia	+20
Frecuencia respiratoria ≥ 30 /min	+20
Tensión arterial sistólica <90 mmHg	+20
Temperatura $<35^{\circ}\text{C}$ or $\geq 40^{\circ}\text{C}$	+15
Frecuencia cardíaca ≥ 125 /min	+10
Hallazgos de laboratorio y radiográficos	
pH arterial <7.35	+30
Nitrógeno ureico ≥ 30 mg/dL (11 mmol/L)	+20
Sodio <130 mmol/L	+20
Glucosa ≥ 250 mg/dL (14 mmol/L)	+10
Hematocrito $<30\%$	+10
Presión arterial de oxígeno <60 mmHg*	+10
Derrame pleural	+10

b)

Clase	Puntuación	Mortalidad (%)
I	0	0.1
II	<70	0.6
III	71 -90	0.9
IV	91 -130	9.3
V	>130	27.0

a) Variables consideradas y puntaje asignado. b) Clasificación de acuerdo con el puntaje total obtenido y porcentaje de mortalidad de cada grupo

I.2.2 CURB-65

Esta escala pronóstica fue elaborada por la British Thoracic Society y a diferencia de la escala PSI es más simple y sencilla de aplicar en la práctica clínica habitual. Su sigla está constituida por los siguientes parámetros: C: confusión; U: urea >7 mmol/l; R: frecuencia respiratoria ≥ 30 respiraciones/min; B: presión arterial (*blood pressure*) sistólica < 90 mmHg o diastólica < 60 mmHg; 65: por edad ≥ 65 años. A cada variable se le asigna un punto, y los pacientes se clasifican según el puntaje final. Los enfermos con puntuación 0 y 1 tienen bajo riesgo de mortalidad (1,5%), por lo que reciben un tratamiento extrahospitalario. Para el caso de pacientes con puntuación 2, el riesgo de mortalidad es mayor al primer grupo (9,2%), por lo que deben ser hospitalizados. En el caso de una puntuación ≥ 3 , presentan una elevada mortalidad (22%) por lo que el enfermo debe ser hospitalizado y muy posiblemente ingresar a UCI, principalmente aquellos con puntajes de 4 o 5 (Lim *et al*, 2009).

Aunque ambas escalas tienen un buen valor predictor con respecto a pacientes ambulatorios y que requieren hospitalización, presentan limitaciones en la predicción de la evolución del adulto con NAC, de tal forma que algunos enfermos con NAC categorizados como no grave finalmente requieren UCI y/o fallecen. Se ha descrito que entre el 10% y 30% de pacientes hospitalizados con NAC necesitarán cuidados intensivos, existiendo diferencias en los criterios aplicados por distintos establecimientos para decidir el ingreso de los pacientes a esta unidad, clasificando erróneamente enfermos que evolucionan grave como no graves (Blanquer & Sanz, 2010) (Saldías *et al*, 2014). Por ello, es necesario encontrar nuevos marcadores -clínicos y/o moleculares- que mejoren el valor predictor de las escalas de riesgo con el fin de disminuir la mortalidad al optimizar el manejo médico del paciente.

I.3 Etiología de la NAC

El principal causante de NAC en el adulto como patógeno único es la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Otras bacterias detectadas son *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae*. En el caso de los virus, influenza es el patógeno más frecuente detectado en adultos con NAC (Marcos *et al*, 2009; Luchsinger *et al*, 2013; Cillóniz *et al*, 2018). Con el avance de las técnicas moleculares se ha aumentado (principalmente) la detección de agentes virales relacionados con la NAC, tanto en infecciones únicas como en coinfecciones bacteriana y viral. En Chile, se detectaron infecciones por virus respiratorios en un 39,3% y mixtas (infección por virus y bacterias) en 16,9% (Saldías *et al*, 2014).

Pese a la diversidad de agentes infecciosos causantes de NAC, la evidencia sugiere que no existe relación entre el agente infeccioso detectado con la clasificación de riesgo del paciente, de forma que el riesgo de muerte del adulto con NAC es independiente de la presencia o ausencia de virus y/o bacterias, según la clasificación por PSI (**Tabla 2**) (Luchsinger *et al*, 2013). Por esto, debieran existir otros factores propios del individuo y/o medioambientales que expliquen la variabilidad en la evolución de la gravedad.

Tabla 2. Gravedad clínica de 356 adultos chilenos con neumonía adquirida en la comunidad según el índice Fine y agente infeccioso detectado

Fine class	Total cases		Without agent		With agent		Bacteria		Virus		Bacteria and virus	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	84	23.6	24	19.4	60	25.9	38	25.0	33	23.6	11	18.3
2	74	20.8	28	22.6	46	19.8	25	16.4	31	22.0	10	16.7
3	69	19.4	29	23.4	40	17.2	27	17.8	28	21.3	15	25.0
4	87	24.4	33	26.6	54	23.3	39	25.7	31	22.0	16	26.7
5	42	11.8	10	8.1	32	13.8	23	15.1	17	12.1	8	13.3
Total	356	100	124	34.8	232	65.2	152	42.7	140	39.3	60	16.9

Santiago, Chile, February 2005–December 2007.
Statistical analyses were performed using Z test, p>0.1.

Extraído de Luchsinger *et al*, 2013

I.4 Sistema Inmune

El sistema inmunológico es un complejo sistema de defensa contra patógenos, cuya respuesta puede variar por cambios a nivel genético y proteico de las distintas moléculas que participan en la vía de señalización de la respuesta inmunológica. Estos cambios pueden disminuir la respuesta a vacunas y aumentar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Monneret *et al*, 2006; Zeddou *et al*, 2007; Waitt *et al*, 2011; Castelo-Branco & Soveral, 2014). Considerando la etiología infecciosa de la NAC es importante evaluar la respuesta inmunológica que podría contribuir a la distinta evolución de esta enfermedad.

Estudios previos de perfiles transcripcionales de adultos chilenos con NAC grave y no grave mediante microarreglos realizados en el laboratorio de virus respiratorios del Programa de Virología de la Universidad de Chile, mostraron expresión diferenciada en diversos genes, la mayoría de los cuales se relacionan con la respuesta inmunológica y entre ellos se incluyen algunos que participan en el sistema inmune innato (Proyecto FONDECYT N° 1121025/2012). En base a estos antecedentes se enfocó el estudio en mayor profundidad en las vías en las que participan estos genes y su posible asociación con la evolución del adulto con NAC.

I.4.1 Respuesta inmune innata vía Toll/IL-1R en el reconocimiento de patógenos

Tanto la familia de receptores tipo Toll (TLR) como la familia de los receptores de interleuquina 1 (IL-1R) son cruciales para la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos y para el control inflamatorio. Estos son parte de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), que reconocen moléculas específicas de patógenos llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y activan la respuesta

inmune innata. Tanto IL-1R como todos los TLR (exceptuando TLR-3 y ciertas señales de TLR-4), se unen directamente, mediante sus dominios de receptor toll/interleuquina 1 (TIR), a la molécula adaptadora factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88), o indirectamente a través de la molécula adaptadora similar a MyD88, Mal (también conocida como proteína adaptadora que contiene dominios TIR, TIRAP). La formación de estos complejos (TLR-MyD88 o TLR-Mal-MyD88) recluta la familia de quinasas asociada al receptor de IL-1 (IRAK), las cuales juegan un rol significativo en el sistema inmune innato (Wesche *et al*, 1997; Wang *et al*, 2001; Gosu *et al*, 2012).

I.4.2 Familia IRAK

La familia IRAK está constituida por quinasas intracelulares del tipo serina/treonina que forman parte del eje de redes de señalización del sistema inmune innato y su rol es crítico en el proceso de transducción de la señal mediada por los receptores IL-1/Toll-like (Cao *et al*, 1996) (Medzhitov *et al*, 1998). En humanos, se han descrito cuatro miembros: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M (también conocido como IRAK-3) e IRAK-4, los que cumplen diferentes funciones en múltiples vías, activando factores de transcripción como NF κ B, AP-1, MAPK y factores reguladores de IFN o interferón (IRF). Estas vías promueven la expresión génica de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. En mamíferos, IRAK-1, IRAK-2 e IRAK-4 se expresan de manera ubicua, mientras que IRAK-M sólo se expresa en monocitos, macrófagos y células del epitelio pulmonar (Lagler *et al*, 2009; van der Windt *et al*, 2012). Los cuatro miembros poseen estructuras similares, contienen un dominio de muerte (DD) N-terminal, un dominio rico en prolina, serina y treonina (proST), un dominio quinasa central conservado, y un dominio C terminal (excepto IRAK-4 quien carece del dominio C-terminal) (Janssens y Beyaert, 2003). IRAK-1 e IRAK-4 son quinasas activas, mientras que IRAK-2 e

IRAK-M son pseudoquinasas, puesto que son inactivas, aunque posean un dominio quinasa (Flannery *et al*, 2010). Este estudio se centra en dos de los miembros de esta familia, IRAK-4 e IRAK-M.

I.4.2.1 IRAK-4

El gen *irak-4* humano que codifica para la proteína IRAK-4 se ubica en el cromosoma 12, región 12q12, tiene un tamaño de 30.6 kb y codifica para una proteína de 460 aminoácidos. Es el último miembro de la familia IRAK en ser descrito (Li *et al*, 2002). Es una serina/treonina quinasa que activa diversos factores de transcripción como NFκB, AP-1, MAPK o IRF-5. IRAK-4 forma un complejo con MyD88 llamado complejo mydosomal, mediante sus dominios de muerte DD, lo que permite reclutar a IRAK-1 o IRAK-2 (Motshwene *et al*, 2009).

IRAK-4 fosforila a IRAK-1/IRAK-2, activando la cascada de señalización que culmina con la translocación de los factores de transcripción al núcleo y la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α, GM-CSF y quimioquinas como IL-8, MCP-1, MIP-1α, IP-10, RANTES, eotaxina. También, induce la síntesis de interferón IFN-α/β e IFN-λ en respuesta a la infección viral generando protección inmunitaria (Yang *et al*, 2005).

La carencia de IRAK-4 en modelos murinos mostró un grave daño en la respuesta inmunológica a lipopolisacáridos (LPS), con una disminución significativa de la producción de citoquinas proinflamatorias, indicando su rol esencial en la respuesta inmune (Suzuki *et al*, 2002). Además de su importancia en la mediación de la respuesta inmune innata, existen estudios que indican la participación de IRAK-4 en la respuesta inmune adaptativa activando

la vía de NF κ B para el desarrollo de la respuesta en células T (Suzuki *et al*, 2006; Lye *et al*, 2008).

I.4.2.2 IRAK-M

IRAK-M es el tercer miembro de la familia IRAK y a diferencia de IRAK-4, es un regulador negativo de la respuesta inmune innata (Wesche *et al*, 1999; Kobayashi *et al*, 2002). El gen *irak-3* humano que codifica IRAK-M también se ubica en el cromosoma 12, en la región 12q14.3, tiene un tamaño de 65744 pb y codifica para una proteína de 68 kDa. Se expresa sólo en monocitos, macrófagos y en células del epitelio pulmonar, mientras que en modelos murinos se expresa también en células dendríticas (Wesche *et al*, 1999; Turnis *et al*, 2010); van der Windt *et al*, 2012).

IRAK-M interacciona con IRAK-4 uniéndose al complejo mydosomal a través de sus dominios DD, lo que evita la escisión del complejo e inhibe la vía de señalización (Du *et al*, 2014). También regula la vía no canónica de NF κ B, (Su *et al*, 2007; Su *et al*, 2009; Zhou *et al*, 2013).

Diversos factores regulan la expresión de IRAK-M (Lagler *et al*, 2009; Miyata *et al*, 2015; Jin *et al*, 2016; Lyroni *et al*, 2017), donde destaca AP-1, siendo un factor de transcripción activado a través de la vía de IRAK-4, que a su vez es inhibido por IRAK-M. Estos antecedentes indican que existe una retroalimentación negativa de la activación de la vía, regulando la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias para mantener la homeostasis de la respuesta inmune (**Figura 1**) (Scotton *et al*, 2005; Hubbard *et al*, 2010).

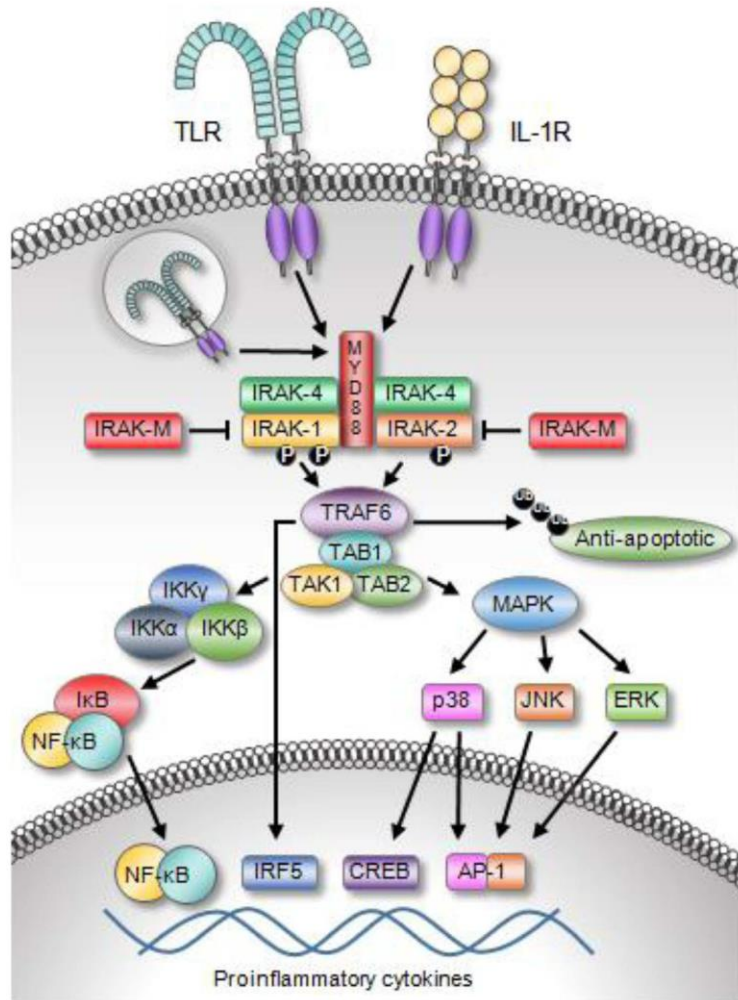


Figura 1. Vía de señalización en la que participan IRAK-4 e IRAK-M para la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. IRAK-M ejerce una regulación negativa sobre la vía (Jain *et al*, 2014).

I.4.2.3 Alteraciones de IRAK-4 e IRAK-M

La deficiencia de IRAK-4 en humanos ocasiona una respuesta inmunológica disminuida frente a infecciones virales y/o bacterianas (Medvedev *et al*, 2003; Picard *et al*, 2003; Ku *et al*, 2007; Picard *et al*, 2010). En modelos celulares o murinos con sepsis por *Streptococcus pneumoniae* o *Pseudomonas aeruginosa*, la sobreexpresión de IRAK-M se asocia con tolerancia a LPS al disminuir la respuesta inmunológica (Escoll *et al*, 2003; Deng *et al*, 2006;

Van't Veer *et al*, 2007; van der Windt *et al*, 2012; Xia *et al*, 2018). En neumonía murina por influenza la deficiencia de IRAK-M aumentó la letalidad y disminuyó la eliminación efectiva del virus (Seki *et al*, 2009).

Se han asociado variantes genéticas de *irak-4* con riesgo de infecciones. En pacientes críticos con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, la presencia del alelo A en el polimorfismo de un nucleótido (SNP) rs4251545 (c.1282G>A) se asociaba a un mayor riesgo de sufrir infecciones producidas por bacterias Gram positivas en pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), disminuyendo la respuesta inmunitaria (Sutherland *et al*, 2011), así como en pacientes con sepsis se asociaba a un mayor riesgo de una enfermedad grave (Yin *et al*, 2012). Carrasco-Colom y cols. asociaron el genotipo CC del SNP rs4251513 (g.44174204G>C) con algún tipo de secuela producida por la enfermedad neumocócica invasiva grave (SIPD), mientras el alelo A del SNP rs1141168 (g.44182706A>G) y el genotipo CC y alelo C del SNP rs1461567 (g.44164689G>A) se asociaron con un mayor riesgo de mortalidad (Carrasco-Colom *et al*, 2015).

Se han descrito variantes genéticas de *irak-3* relacionadas con el desarrollo de asma, asociando haplotipos con la disminución de la expresión proteica de IRAK-M en pacientes asmáticos de origen italiano (Balaci *et al*, 2007); sin embargo, estas diferencias no fueron detectadas en población japonesa (Nakashima *et al*, 2006). En artritis reumatoide, el genotipo TT del SNP rs11541076 (g.66648328A>T) predice una mejor respuesta al tratamiento con anti-TNF- α en población danesa (Sode *et al*, 2016). Por otra parte, en sepsis, el genotipo GG y alelo G del SNP rs1152888 (c.439A>G) se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollo de sepsis, mientras que el genotipo AA y el alelo A se asociaron con protección al desarrollo de sepsis en población china (Dong *et al*, 2013).

Pese a la importancia que presentan IRAK-4 e IRAK-M en la regulación de la respuesta inmunológica (**Figura 1**), no existen estudios en pacientes con NAC que relacionen la gravedad de la enfermedad con polimorfismos o cambios en la expresión génica de IRAK-M o de IRAK-4.

II.1 HIPÓTESIS

Adultos chilenos con neumonía adquirida en la comunidad graves presentan genotipos de riesgo en los SNPs rs4251545 de *irak-4* y/o rs1152888 de *irak-3*, con una disminución de la expresión génica de IRAK-4, aumento de la expresión génica de IRAK-M y disminución de la concentración de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en sangre respecto a adultos con neumonía adquirida en la comunidad no graves, constituyendo marcadores con valor pronóstico de gravedad de la NAC.

II.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si los adultos chilenos con neumonía adquirida en la comunidad graves presentan los genotipos de riesgo en los SNPs rs4251545 de *irak-4* y rs1152888 de *irak-3*, disminución de la expresión génica de IRAK-4, aumento de la expresión génica de IRAK-M y disminución de la concentración de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en sangre respecto a adultos con NAC no graves.

II.3 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar genotipos de riesgo de los SNPs rs4251545 de *irak-4* y rs1152888 de *irak-3* asociados a gravedad de NAC comparando las frecuencias alélicas y genotípicas en adultos chilenos con NAC graves y no graves.
- 2.- Relacionar la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M con la gravedad de la NAC en adultos chilenos, comparando su expresión en sangre de adultos con NAC graves y no graves.
- 3.- Determinar el efecto de los cambios de expresión de IRAK-4 e IRAK-M en la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias involucradas en la vía de NFκB, comparando sus concentraciones sanguíneas entre adultos con NAC no graves y graves.
- 4.- Analizar la utilidad de los SNPs rs4251545 de *irak-4*, rs1152888 de *irak-3* y la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M como marcadores de gravedad de NAC en adultos chilenos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Población de estudio

Se estudiaron 225 adultos hospitalizados con NAC entre julio de 2017 y octubre de 2019; en 203 se dispuso de datos clínicos. Los pacientes fueron enrolados en los hospitales Dr. Lucio Córdova, Clínico de la Universidad de Chile y Complejo Hospitalario San José. Los criterios de inclusión fueron: mayores de 18 años hospitalizados por neumonía confirmada por radiografía de tórax, según definición del MINSAL. Los días de evolución de enfermedad fueron considerados a partir del inicio de los síntomas indicados por el paciente al momento de su hospitalización. Se utilizaron como criterios de exclusión la hospitalización en al menos 30 días previos a la incorporación en el estudio, condiciones de inmunosupresión (terapia inmunosupresora, tratamiento activo para cáncer, trasplante de órganos, diálisis, infección por VIH). Además, se incluyó un total de 22 voluntarios adultos sin enfermedad respiratoria durante, al menos, 45 días previos a su enrolamiento y con detección negativa de agentes infecciosos respiratorios.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, por el comité de Ética de Investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y por los comités de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Sur y Norte. Todos los participantes del estudio se incorporaron voluntariamente, lo que fue confirmado con su firma del consentimiento informado aprobado por los comités de ética (Ver Anexo).

III.2 Clasificación de gravedad de adultos con NAC

Se utilizaron las escalas pronósticas PSI y CURB-65 para la clasificación de gravedad de los adultos con NAC. De acuerdo con el valor obtenido en cada escala, los adultos se clasificaron en NAC no grave (PSI: 1-2-3; CURB-65: 0-1-2) y NAC grave (PSI: 4-5; CURB-65: 3-4-5). Se analizaron los 194 adultos con NAC que pudieron ser clasificados tanto por PSI como por CURB-65: 91 adultos fueron categorizados como no graves y 103 adultos como graves según PSI y 129 adultos fueron categorizados como no graves y 65 adultos como graves según CURB-65.

Con el fin de minimizar los errores de categorización de las escalas clínicas, los pacientes con NAC se reclasificaron por gravedad en base a su evolución, considerándose como grave a quienes ingresaron a UCI o fallecieron (evolución), independiente de la clasificación definida según las escalas clínicas. Así, se reclasificaron 17 de los 91 enfermos NAC no graves según PSI y 24 de los 129 pacientes no graves según CURB-65. Esta reclasificación se indica como “Evolución” no grave o grave en los resultados.

III.3 Muestras biológicas estudiadas

De cada caso estudiado se obtuvo una muestra respiratoria a través de un hisopado nasofaríngeo con tórula estéril depositada en un tubo con medio de transporte universal (UTM) para la detección de agentes (bacterias y virus), orina de primer chorro en frasco estéril para la detección de bacterias y 10 mL de sangre venosa periférica depositada en un tubo (con EDTA), de la cual se utilizó 1 mL para la genotipificación y la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M y el plasma para la cuantificación de citoquinas. Las muestras fueron

obtenidas por personal de enfermería y kinesiología de cada hospital en las 24 hrs post-hospitalización y enrolamiento.

III.4 Reactivos y materiales

Reactivos

- Agua libre de nucleasas (IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos).
- Buffer Tris-EDTA (TE) (Winkler, Santiago, Chile).
- Etanol, cloroformo, isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Glicógeno (Merck, Darmstadt, Alemania).
- dNTPs (Omega Biotek, Norcross, Georgia, Estados Unidos).
- Transcriptasa reversa MMLV, RNasin®, random primers (PROMEGA®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).
- Partidores para polimorfismos c.1282G>A de *irak-4*, c.439A>G de *irak-3* y para expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M (IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos).
- TRIzol (Invitrogen®, Carlsbad, California, EE. UU.).

Sistemas comerciales

- Amplificación múltiple RT-PCR MWS (Argene®, Marcy-l'Étoile, Francia).
- BinaxNOW® (Abbott, Chicago, Illinois, Estados Unidos).
- Biotools DNA Polimerasa (Biotools, Madrid, España).
- Extracción de ácidos nucleicos totales por columna (Favorgen®, PingTung, Taiwán).
- innuPREP Blood DNA mini *kit* (Analytic Jena®, Jena, Alemania).
- Kapa HRM Fast (Kapa Biosystems, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

- Kapa SYBR Fast® (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).
- MILLIPLEX® MAP (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos)
- HCYTOMAG60K-25
- HCYTOMAG60K-02
- TURBO DNA-free™ (Ambion™, Austin, Texas, Estados Unidos).

Equipos

- ECO real time PCR (Illumina®, San Diego, California, Estados Unidos).
- Espectrofotómetro EPOCH (Biotek™, Winooski, Vermont, Estados Unidos).
- Termociclador MIC (Biomolecular Systems, Goald Coast, Australia).
- Termociclador PxE 0.2 (THERMO®, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).
- MAGPIX® (Merck, Darmstadt, Alemania).

III.5 Detección de agentes

El ARN y el ADN de las muestras respiratorias se obtuvieron con el sistema comercial de extracción de ácidos nucleicos totales por columna (Favorgen®), y la extracción se realizó por personal de laboratorio siguiendo las indicaciones del fabricante con las medidas de bioseguridad correspondiente al manejo de muestras biológicas. La detección de los agentes, bacterias y virus se realizó mediante transcripción inversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés) con el sistema comercial de amplificación múltiple RT-PCR MWS (Argene®), utilizando el termociclador MIC (Biomolecular Systems). Este sistema comercial permite la detección de las bacterias *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *L. pneumophila*, y de los virus influenza A (FluA) y B (FluB), rinovirus (RV), virus respiratorio sincicial (VRS), coronavirus humano

(HCoV), virus parainfluenza (PIV), metapneumovirus humano (hMPV), bocavirus humano (HBoV), adenovirus (AdV) y enterovirus (EV).

En las muestras de orina, se detectó *Streptococcus pneumoniae* y de *Legionella pneumophila* por inmunocromatografía (Binax Now®).

Todos los resultados de detección fueron reportados al grupo médico de los respectivos hospitales, con el fin de contribuir al diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

III.6 Determinación de genotipos de los polimorfismos c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4* y c.439A>G (rs1152888) de *irak-3*

III.6.1. Obtención de ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico (ADNg) a partir de 400 µL de la sangre completa, utilizando el sistema comercial “innuPREP Blood DNA mini kit” (Analytic Jena®), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido fue tratado con Proteinasa K y RNAsa (incluidos en el sistema comercial) y se cuantificó en el espectrofotómetro EPOCH (Biotek™). Se almacenaron alícuotas de 5 ng/µL a -20°C, mientras que las muestras concentradas fueron guardadas a -80°C.

III.6.2. Determinación genotípica

Las determinaciones genotípicas de los SNPs c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* se realizaron mediante PCR en tiempo real acoplado a fusión de alta resolución (*High Resolution Melting*, HRM) (PCR-HRM) (**Tabla 3**). Los partidores fueron diseñados de acuerdo con la secuencia genómica descrita en el sitio NCBI (NM_001114182.2 para *irak-4* y NM_007199.2 para *irak-3*), utilizando el programa Beacon Designer 8 (Premier Biosoft int®, San Francisco, California, Estados Unidos) y se indican en la **Tabla 4**. Para la

genotipificación se emplearon 10 ng de ADNg por reacción, utilizando el sistema comercial Kapa HRM Fast (Kapa Biosystems) en el equipo ECO real time PCR (Illumina®). El producto amplificado esperado tiene un tamaño de 90 pb para *irak-4* y 84 pb para *irak-3*

Tabla 3. Descripción de las variantes rs4251545 de *irak-4* y rs1152888 de *irak-3*

SNP	Gen	Posición cromosoma	Variante en mRNA	Variante en proteína
rs4251545	<i>irak-4</i>	12q12	c.1282G>A	p.Ala428Thr
rs1152888	<i>irak-3</i>	12.14.3	c.439A>G	p.Ile147Val

Ambos SNP producen una mutación *missense* a nivel de proteína.

Tabla 4. Secuencia de partidores para la genotipificación de los SNPs c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3*

Polimorfismo	Partidor directo (5'-3')	Partidor reverso (5'-3')
c.1282 G>A <i>irak-4</i>	TGATGCTGATTCCACTTC	TTCTTAATGTCTGGTCTCTTAT
c.439 A>G <i>irak-3</i>	GGTGATGTTTCCTTCTTAGC	TTTGAAAGCTGATGGAAGAT

III.6.3. Estandarización de partidores para la genotipificación.

Se optimizó la genotipificación del SNP c.1282 G>A de *irak-4* con 10 ng de ADNg, en un volumen final de 10µL, estableciéndose las concentraciones de los reactivos (**Tabla 5**). El programa de amplificación para el PCR-HRM fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 120 segundos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y apareamiento de partidores a 53°C durante 15 segundos, seguido de HRM desde 55°C a 95°C (**Tabla 6**). La **Figura 2** muestra un gráfico representativo de las curvas de HRM para determinar los genotipos de cada muestra.

Tabla 5. Concentración de reactivos en la reacción de PCR-HRM para el análisis del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4*

	Concentración inicial	Concentración final
KAPA HRM	2X	1X
IRAK-4 HD	10 µM	0,25 µM
IRAK-4 HR	10 µM	0,25 µM
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM
Agua libre de nucleasas		Para completar volumen a 10µL

Tabla 6. Programa de amplificación para el polimorfismo c.1282G>A de *irak-4*

	Temperatura	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturación inicial	95°C	120	1
Desnaturación	95°C	5	45
Apareamiento	53°C	15	
HRM	55-95 °C		

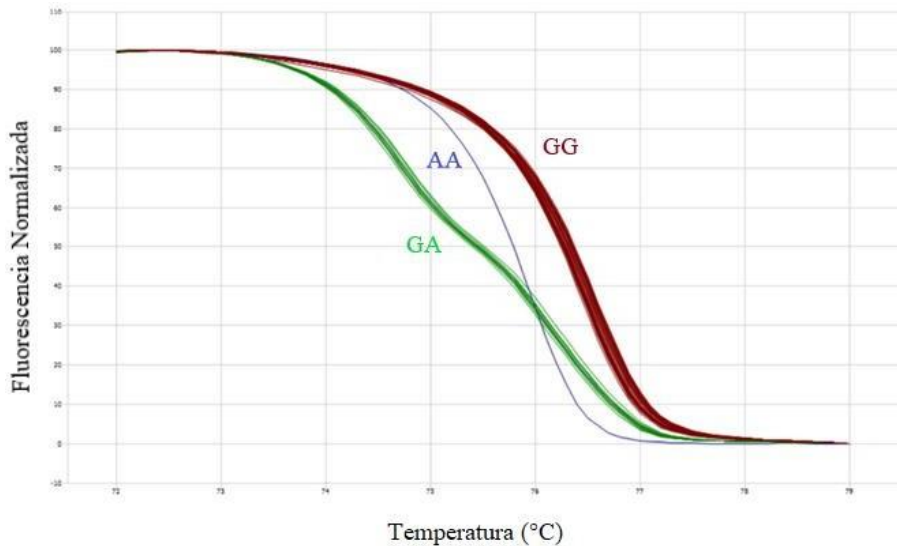


Figura 2. Gráfico representativo de la curva de HRM para la genotipificación del polimorfismo c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4*. La curva café representa la obtenida en individuos homocigoto GG, la curva azul representa a los individuos homocigoto AA y la verde a los individuos heterocigoto GA.

Las **Tablas 7** describe las concentraciones de reactivos, mientras que el programa de amplificación para la reacción de PCR-HRM optimizada para los estudios del SNP c.439A>G de *irak-3* fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 120 segundos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y apareamiento de partidores a 54°C durante 15 segundos, seguido de HRM desde 55°C a 95°C (**Tabla 8**). Se utilizaron 10 ng de ADNg, en un volumen final de 10µL. La **Figura 3** muestra un gráfico representativo de las curvas de HRM para determinar los genotipos de cada muestra.

Tabla 7. Concentración de reactivos en la reacción de PCR-HRM para el análisis del polimorfismo c.439A>G de *irak-3*

	Concentración inicial	Concentración final
KAPA HRM	2X	1X
IRAK-M HD	10 µM	0,25 µM
IRAK-M HR	10 µM	0,25 µM
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM
Agua libre de nucleasas		Para completar volumen a 10µL

Tabla 8. Programa de amplificación para el polimorfismo c.439A>G de *irak-3*

	Temperatura	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	120	1
Desnaturalización	95°C	5	45 ciclos
Apareamiento	54°C	15	
HRM	55-95 °C		

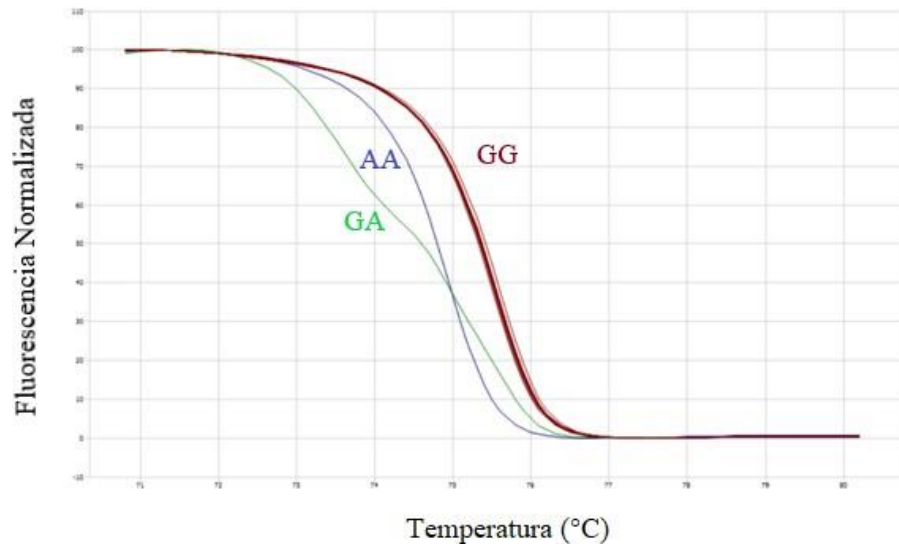


Figura 3. Gráfico representativo de la curva de HRM para la genotipificación del polimorfismo c.439A>G (rs1152888) de *irak-3*. La curva café representa individuos homocigoto G, la curva azul a los individuos homocigoto A y la verde a los individuos heterocigoto GA.

III.7 Determinación de la expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M

III.7.1. Obtención de ARN

El ARN se obtuvo agregando un mL de guanidinio tiocianato-fenol-cloroformo (TRIzol, Invitrogen®) y 200 μ L de cloroformo a 400 μ L de sedimento celular de la sangre de los pacientes. La mezcla se centrifugó a 17000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se mezcló con isopropanol y 1 μ L de glicógeno (20 ng/ μ L) y se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se centrifugó a 17000 g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento obtenido se lavó con etanol 75% frío y se agregó 1 μ L de glicógeno (20 ng/ μ L). Luego se centrifugó durante 2 minutos a 17000 g a 4°C. Eliminado el sobrenadante, el sedimento se secó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se resuspendió en TE

MasterPure™ 1X. La muestra resuspendida se cuantificó mediante espectrofotometría (EPOCH, Biotek®) a 260 y 280 nm.

III.7.2. Eliminación de contaminantes

El ARN obtenido se trató con DNAsa (sistema comercial TURBO DNA-free™, Ambion™) para eliminar el ADN contaminante siguiendo las indicaciones del fabricante. Se incubó 1U de enzima por cada 10 µg de ARN obtenido durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima utilizando el inactivador incluido en el sistema comercial. El ARN tratado se cuantificó y se le agregó 1 µL de RNAsin (PROMEGA®). Este ARN se utilizó inmediatamente para realizar la transcripción inversa.

III.7.3. Transcripción inversa

Se prepararon alícuotas de 2 µg de ARN tratado con DNAsa para realizar la transcripción inversa (RT) con el fin de obtener el ADN complementario (ADNc). Se utilizó la enzima MMLV RT (PROMEGA®) y partidores aleatorios (-Random Primers- PROMEGA®) siguiendo las indicaciones del proveedor. La reacción se realizó a 37°C durante 1 hora en termociclador (THERMO®), con un volumen final por reacción de 25 µL. Las muestras de ADNc se guardaron a -80°C.

III.7.4. PCR en tiempo real

La expresión génica a nivel transcripcional de IRAK-4 e IRAK-M se determinó mediante PCR en tiempo real (PCR-tr) con los partidores diseñados (**Tabla 9**) utilizando el programa Beacon Designer 8 (Premier Biosoft int. ®) en base a la secuencia descrita de la variante larga de los mensajeros de IRAK-4 e IRAK-M (NM_001114182 de IRAK-4 y NM_007119 de IRAK-M). La PCR-tr se realizó con el sistema comercial Kapa SYBR Fast® (Sigma-

Aldrich) para realizar las reacciones de PCR-tr en el equipo Eco Real Time PCR (Illumina®). El producto amplificado tiene un tamaño de 149 pb para IRAK-4 y de 81 pb para IRAK-M. Se seleccionó β -tubulina como gen normalizador, cuya expresión no se modifica en distintas situaciones patológicas, para analizar la expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M mediante el método $\Delta\Delta C_t$.

Tabla 9. Secuencia de partidores para medir la expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M

Gen	Partidor directo (5'-3')	Partidor reverso (5'-3')
<i>irak-4</i>	GATGAACACCGTGAACCT	AGACATTGACTAGCAACAGAG
<i>irak-3</i>	TCAGAGAAGAGTTATCAGGAAGGT	AAGAACATTATCCACGGTGACATT

Para evaluar la expresión a nivel transcripcional de IRAK-4, se optimizaron las concentraciones de reactivos (**Tabla 10**) y se usó el siguiente el programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 180 segundos, seguido de 45 de desnaturalización a 95°C durante 3 segundos, apareamiento de partidores a 55°C durante 15 y extensión a 72°C durante 1 segundo, seguido de la curva de fusión desde 55°C a 95°C (**Tabla 11**). Se utilizaron 2 μ L de ADNc (obtenidos a partir de 2 μ g de ARN tratado) y un volumen final de 10 μ L. La

Figura 4 muestra un gráfico representativo de las curvas de fusión obtenidas:

Tabla 10. Concentración de reactivos para el análisis de la expresión del mensajero del gen de IRAK-4 mediante la reacción de PCR en tiempo real

	Concentración inicial	Concentración final
KAPA SYBR Fast	2X	1X
IRAK-4 cD	10 μ M	0,2 μ M
IRAK-4 cR	10 μ M	0,2 μ M
Agua libre de nucleasas		Para completar volumen a 10 μ L

Tabla 11. Programa de amplificación para la expresión relativa del gen de IRAK-4

	Temperatura	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturación inicial	95°C	180	1
Desnaturación	95°C	3	45 ciclos
Apareamiento	55°C	15	
Extensión	72°C	1	
Curva de Fusión	55-95 °C		

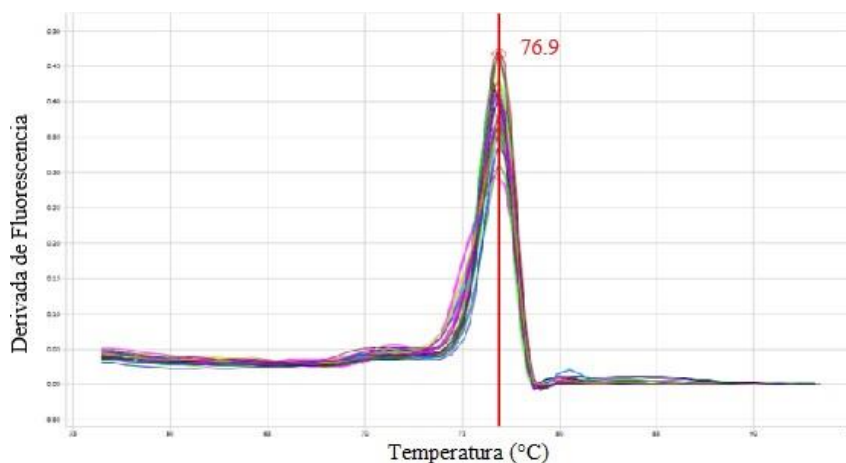


Figura 4. Gráfico representativo de la curva de fusión obtenida para la expresión relativa del gen de IRAK-4. El valor de la Temperatura de fusión (Tm) para las reacciones fue 76.9° C.

La optimización de la PCR para determinar la expresión génica de IRAK-M fue determinada con 2 μ L de muestra de ADNc obtenidos a partir de 2 μ g de ARN tratado, en un volumen final de 10 μ L. Las concentraciones de reactivos se detallan en la **Tabla 12**, mientras que el programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 180 segundos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 3 segundos, apareamiento de partidores a 57°C durante 10 segundos y extensión a 72°C durante 1

segundo, seguido de la curva de fusión desde 55°C a 95°C. La **Figura 5** muestra un gráfico representativo de las curvas de fusión obtenida de las reacciones.

Tabla 12. Concentración de reactivos para el análisis de la expresión del mensajero del gen de IRAK-M mediante la reacción de PCR en tiempo real

	Concentración inicial	Concentración final
KAPA SYBR Fast	2X	1X
IRAK-4 cD	10 µM	0,2 µM
IRAK-4 cR	10 µM	0,2 µM
Agua libre de nucleasas		Para completar volumen a 10 µL

Tabla 13. Programa de amplificación para la expresión relativa del gen de IRAK-M

	Temperatura	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturación inicial	95°C	180	1
Desnaturación	95°C	3	45 ciclos
Apareamiento	57°C	10	
Extensión	72°C	1	
Curva de Fusión	55-95 °C		

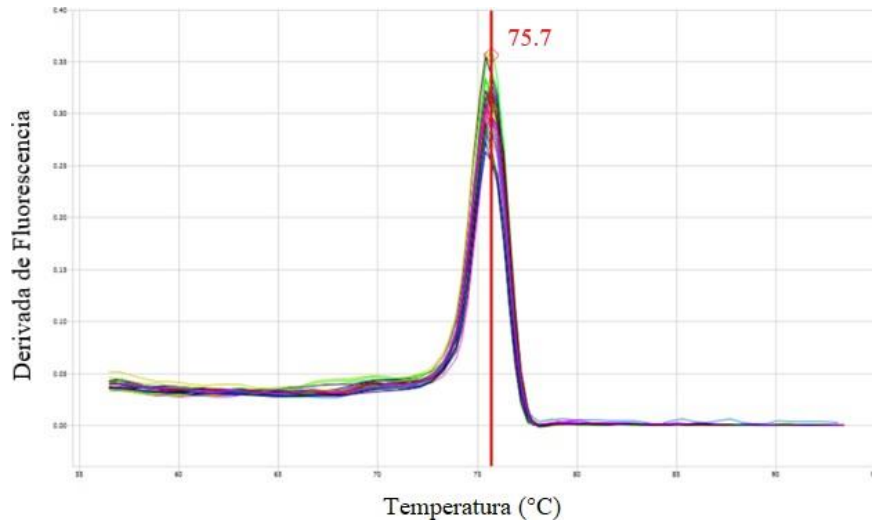


Figura 5. Gráfico representativo de la curva de fusión obtenida para la expresión relativa del gen de IRAK-M. El valor de la Temperatura de fusión (T_m) para las reacciones fue de 75,7 °C.

Se realizaron 5 diluciones seriadas de una muestra positiva (factor de dilución de 10) para determinar la eficiencia de las reacciones de PCR-tr. La curva estándar incluyó 5 puntos de dilución, cada uno en triplicado, graficando el C_T (número de ciclos) vs el logaritmo en base 10 de la concentración del ADNc, y los puntos de la curva se ajustaron a una recta mediante una regresión lineal. A partir de la pendiente de la curva estándar se determinó la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la siguiente fórmula: $\text{Eficiencia} = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Vandesompele *et al*, 2008). Se obtuvo una pendiente de -3,6, con una eficiencia del 89% para IRAK-4, mientras que para IRAK-M se obtuvo una pendiente de -3,48, con una eficiencia del 93,8%.

III.8 Cuantificación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en plasma mediante Luminex®

III.8.1. Muestras de plasma

Se obtuvo el plasma de las muestras sanguíneas de adultos con NAC mediante centrifugación a 358 xg durante 5 minutos. Se recolectaron 120 a 240 µL de sobrenadante en tubos, los que se almacenaron a -80° C.

III.8.2. Cuantificación con Luminex®

Se utilizó el sistema comercial MILLIPLEX® MAP para el análisis de las siguientes citoquinas y quimioquinas RANTES, IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF, IL-12 (p40 y p70), IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α y eotaxina, siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando el equipo MAGPIX® con el programa xPONENT. Los datos fueron analizados usando una curva logística de 5 parámetros mediante el programa Milliplex analyst.

III.9 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las características de la población chilena estudiada (sexo, edad, gravedad, comorbilidades) y variables de estudio (frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas, expresión génica y concentración en plasma de citoquinas) a través de medidas de tendencia central (promedios o medianas) y de dispersión (desviación estándar, rangos) para las variables cuantitativas y distribución de frecuencias para las variables categóricas.

Se compararon las variables cualitativas y cuantitativas entre los adultos con NAC graves y no graves definidos por la escala PSI o CURB-65 mediante las pruebas de Chi-Cuadrado, Fisher y Mann-Whitney, respectivamente, con el programa GraphPad Prism V 8.0

(GraphPadSoftware, Inc). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si $p < 0,05$.

En todos los SNPs se analizó el equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) usando la prueba del chi-cuadrado, obteniéndose un $p > 0,05$ (población en equilibrio HWE).

La asociación de las frecuencias genotípica de los SNPs con la gravedad de la enfermedad se analizó mediante el programa Unphased (Dudbrigde, 2003), mientras que la asociación de las frecuencias alélicas se analizó utilizando el programa Unphased y la prueba de Armitage (sitio web: <https://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa un $p < 0,05$.

Para la comparación de los niveles de citoquinas y quimioquinas entre adultos con NAC no graves y graves, se tomó como valor mínimo y máximo el límite de detección de fluorescencia para cada citoquina y quimioquina estudiada.

La asociación de los polimorfismos y la expresión génica con la gravedad de la NAC se determinó mediante una regresión lineal múltiple, utilizando el programa STATA. Se utilizó como variable respuesta la gravedad de los adultos con NAC, y como variables predictoras se utilizaron los genotipos GG y GA del SNP c.1282G>A de *irak-4*, y GG y GA del SNP c.439A>G de *irak-3* y los valores de expresión superiores a 1,5 veces de cambio o menores a 0,5 veces de cambio, tanto para IRAK-4 como para IRAK-M. Además, en algunos análisis se incluyeron la edad y el sexo. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa un $p < 0,05$.

La especificidad y sensibilidad del genotipo GA del SNP c.1282G>A de *irak-4* como marcador, se realizó mediante curvas ROC. Los portadores del genotipo GA previamente

categorizados como graves se reclasificaron como no graves asignándoseles un puntaje de 2 para CURB-65 y 3 para PSI. Por otra parte, los individuos graves (ingreso a UCI o fallecidos) que fueron categorizados como no graves, se les asignó un puntaje de 3, 4 y 5 según CURB-65 si ingresó a UCI, si falleció, o ambos, respectivamente, mientras que para PSI se asignó puntaje 4 si el enfermo fue admitido a UCI o falleció y 5 con ambos sucesos. Se utilizó como referencia la clasificación de los pacientes según evolución. Se consideró una diferencia significativa un $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1 Características clínicas y demográficas de adultos con NAC

IV.1.1 Según clasificación de gravedad por PSI

Las características demográficas y clínicas de los adultos con NAC clasificados según la gravedad clínica por PSI se describen en la **Tabla 14**. La mediana de edad de los casos graves fue significativamente mayor que los casos no graves, y, aunque la proporción de mujeres fue menor, la diferencia no fue significativa. De acuerdo con lo esperable, la mortalidad y el ingreso a UCI fueron significativamente mayores en el grupo grave. La hipertensión arterial (HTA), la diabetes, y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) fueron las comorbilidades más frecuentes en la población chilena estudiada (41%, 31% y 24%, respectivamente), y en proporciones similares en ambos grupos, mientras que la proporción con insuficiencia cardíaca y enfermedad neurológica fue significativamente superior en los casos graves.

Tabla 14. Características clínicas de 203 adultos con NAC categorizados por gravedad según la escala PSI

	No Graves	Graves	p
N	96	107	
Mujeres n (%)	54 (56,3%)	46 (43,0%)	0,05
Edad mediana [rango]	62 [20-91]	79 [40-95]	<0,0001
UCI n (%)	10 (10,4%)	26 (24,3%)	0,0097
Días hospitalizados mediana [rango]	7 [1-25]	10 [1-77]	0,0020
Fallecidos n (%)	7 (7,5%)	25 (23,6%)	0,0021
Alcoholismo n (%)	6 (6,4%)	8 (7,5%)	0,7612
Tabaquismo n (%)	21 (22,3%)	26 (24,3%)	0,7434
Comorbilidades			
Diabetes n (%)	25 (26,3%)	38 (35,5%)	0,1590
Insuficiencia Cardíaca n (%)	6 (6,3%)	29 (27,4%)	<0,0001
Insuficiencia Renal n (%)	5 (5,2%)	13 (12,2%)	0,0824
HTA n (%)	34 (36,6%)	50 (46,7%)	0,1461
EPOC n (%)	21 (21,9%)	27 (25,2%)	0,5739
Fibrosis Pulmonar /Enfisema n (%)	7 (7,6%)	6 (6%)	0,6576
Neoplasia n (%)	3 (3,2%)	9 (8,4%)	0,1149
Enfermedad Neurológica n (%)	6 (6,3%)	30 (28,3%)	<0,0001
Daño Hepático n (%)	2(2,1%)	5(4,7%)	0,3127
Asma n (%)	10(10,4%)	8(7,5%)	0,4619

n: número de adultos; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; HTA: Hipertensión Arterial; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para la edad y los días de hospitalización, y la prueba del chi cuadrado para las demás categorías. Se consideró significativo si $p < 0,05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

IV.1.2 Según clasificación de gravedad por CURB-65

Las características clínicas y demográficas de los adultos con NAC según gravedad definida por CURB-65 se observan en la **Tabla 15**. Al igual que la clasificación por PSI, la mediana de edad de los adultos graves fue significativamente mayor que los no graves, pero la proporción de mujeres fue mayor, aunque también sin diferencias significativas. La mortalidad fue significativamente mayor en el grupo grave, pero contrario a lo esperado, el ingreso a UCI fue similar en ambos grupos. Al igual que en la gravedad por PSI, la proporción

de casos con insuficiencia cardíaca y con enfermedad neurológica fue significativamente mayor en los casos graves.

Tabla 15. Características clínicas de 203 adultos con NAC categorizados por gravedad según la escala CURB-65

	No Graves	Graves	p
N	135	68	
Mujeres	63(46,7%)	37(54,4%)	0,2975
Edad mediana [rango]	65 [20-95]	80 [40-95]	<0,0001
UCI n (%)	19(14,1%)	17(25%)	0,0544
Días hospitalizados mediana [rango]	7,5 [1-27]	11[1-77]	0,0013
Fallecidos n (%)	6(5,3%)	26(37,9%)	<0,0001
Alcoholismo n (%)	9(6,8%)	5(7,4%)	0,8773
Tabaquismo n (%)	30(22,6%)	17(25%)	0,6986
Comorbilidades			
Diabetes n (%)	42(31,3%)	21(30,9%)	0,9467
Insuficiencia Cardíaca n (%)	16(6,3%)	20(27,4%)	0,0020
Insuficiencia Renal n (%)	10(5,2%)	8(12,2%)	0,3026
HTA n (%)	54(40,9%)	30(44,1%)	0,6632
EPOC n (%)	32(23,7%)	16(23,5%)	0,9780
Fibrosis Pulmonar /Enfisema n (%)	10(7,6%)	3(4,9%)	0,4856
Neoplasia n (%)	6(4,5%)	6(8,8%)	0,2169
Enfermedad Neurológica n (%)	12(9,0%)	24(35,8%)	<0,0001
Daño Hepático n (%)	4(3,0%)	3(4,4%)	0,5934
Asma n (%)	13(9,6%)	5(7,4%)	0,5902

n: número de adultos; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; HTA: Hipertensión Arterial; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para edad y días de hospitalización, y la prueba del chi cuadrado para las demás categorías. Se consideró significativo $p < 0,05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

IV.2 Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs en adultos con NAC

IV.2.1 SNP c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4*

Se analizó el SNP rs4251545 de *irak-4* en 194 adultos con NAC. Este SNP genera un cambio de G por A en la posición 1282 en el mensajero (c.1282G>A), ocasionando un cambio aminoacídico de alanina (Ala) por treonina (Thr) en la posición 428 en el dominio quinasa de la proteína (**Tabla 3**; sección Materiales y Métodos).

IV.2.1.1 Según clasificación de gravedad por PSI

La frecuencia genotípica y alélica del SNP c.1282G>A de *irak-4* se determinó en 91 adultos con NAC no graves y 103 graves según la clasificación por PSI (**Figura 6**).

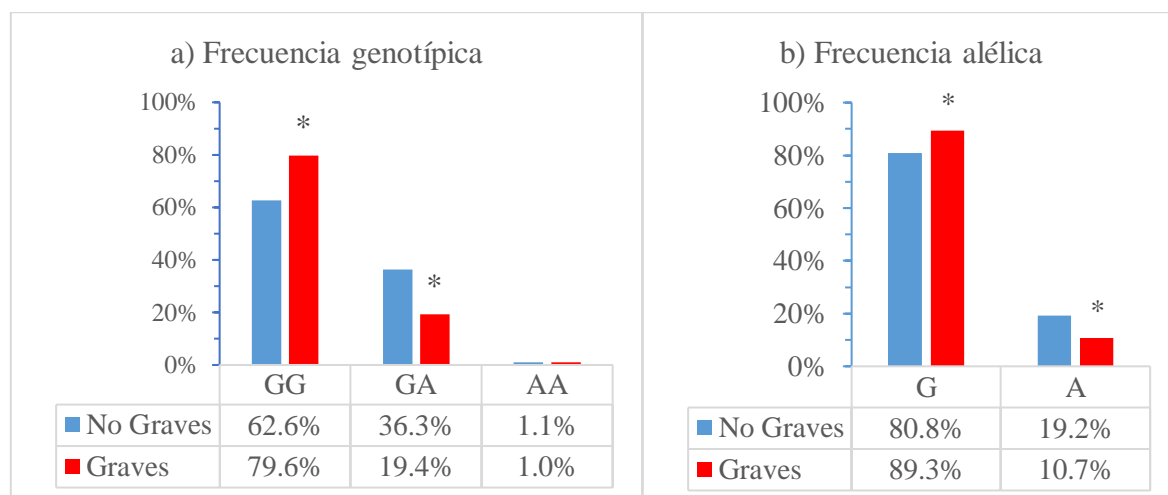


Fig. 6 Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en 194 adultos con NAC graves y no graves según PSI. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Unphased para la frecuencia genotípica y alélica y la prueba de Armitage para el caso de asociación alélica, siendo significativo $p < 0,05$. Las diferencias significativas se indican con *.

Fue significativamente mayor la frecuencia del genotipo GG en pacientes graves ($p < 0,01$), y del genotipo GA en los casos no graves ($p < 0,01$). La frecuencia del genotipo AA fue similar en ambos grupos de pacientes ($p = 0,9$).

La asociación alélica del SNP c.1282G>A con la gravedad de la NAC se analizó con el programa Unphased, Se encontraron diferencias significativas en ambos alelos, siendo el alelo G más frecuente en adultos graves y el alelo A más frecuente en los casos no graves ($p=0,02$). Por otra parte, mediante la prueba de Armitage (prueba de asociación a riesgo alélico) se obtuvieron diferencias significativas en la asociación a riesgo en ambos alelos, siendo el alelo G asociado a un riesgo mayor de gravedad (OR: 1,98), mientras que el alelo A se asoció a un menor riesgo de gravedad (0,50) ($p<0,01$). Estos resultados indican que el genotipo GG y el alelo G están asociados a un mayor riesgo de desarrollar un cuadro grave de la enfermedad, mientras que el heterocigoto GA y el alelo A se asociaría a menor riesgo de una NAC grave.

La reclasificación de enfermos por gravedad según PSI, denominado “evolución” (como se explica en materiales y métodos), esto es, incluyendo entre los graves a los enfermos considerados no graves, pero que ingresaron a UCI y/o fallecieron, permitió analizar este SNP en 74 adultos no graves y 120 adultos graves. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 7**.

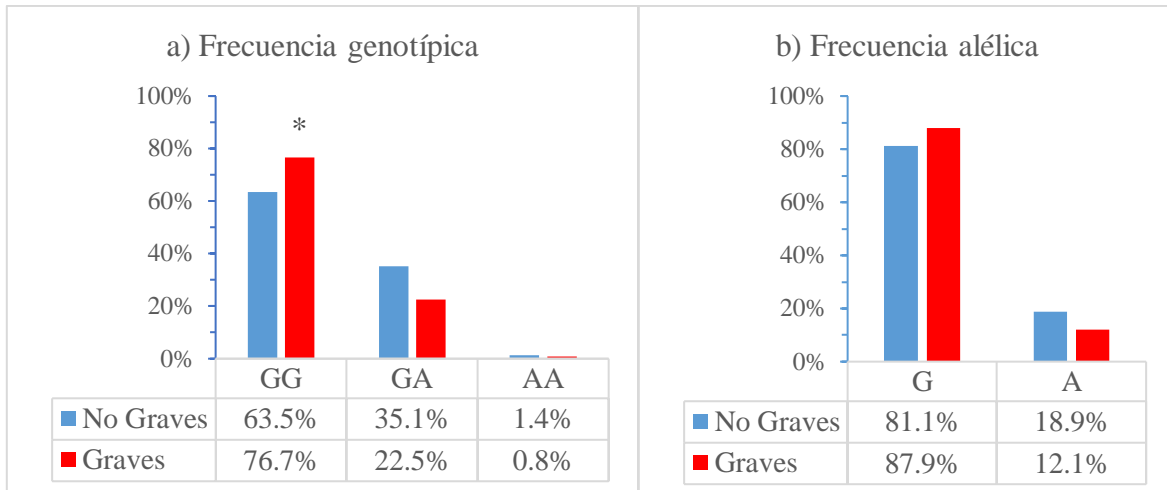


Fig. 7 Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en 194 adultos con NAC graves y no graves según evolución y PSI. Se aplicó el programa Unphased para las frecuencias genotípicas y alélicas y la prueba de Armitage para la asociación alélica. Se consideró significativo para un $p < 0.05$. Las diferencias significativas se indican con *.

El genotipo GG se detectó con mayor frecuencia en pacientes graves con NAC ($p < 0,05$), mientras que no hubo diferencias significativas respecto al genotipo GA ($p > 0,05$) ni AA ($p = 0,72$). Las frecuencias alélicas fueron similares entre grupos graves y no graves de acuerdo con lo obtenido mediante el programa Unphased ($p = 0,06$). Por otra parte, la prueba de Armitage no mostró asociación a riesgo en ninguno de los dos alelos ($p > 0,05$). Así, con estos resultados se mantiene la asociación del genotipo GG con un mayor riesgo de una evolución grave de la NAC, pero no las otras asociaciones.

IV.2.1.2 Según clasificación de gravedad por CURB-65

De acuerdo con CURB-65, 129 adultos fueron categorizados como no graves y 65 como graves. Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas se observan en la **Figura 8**.

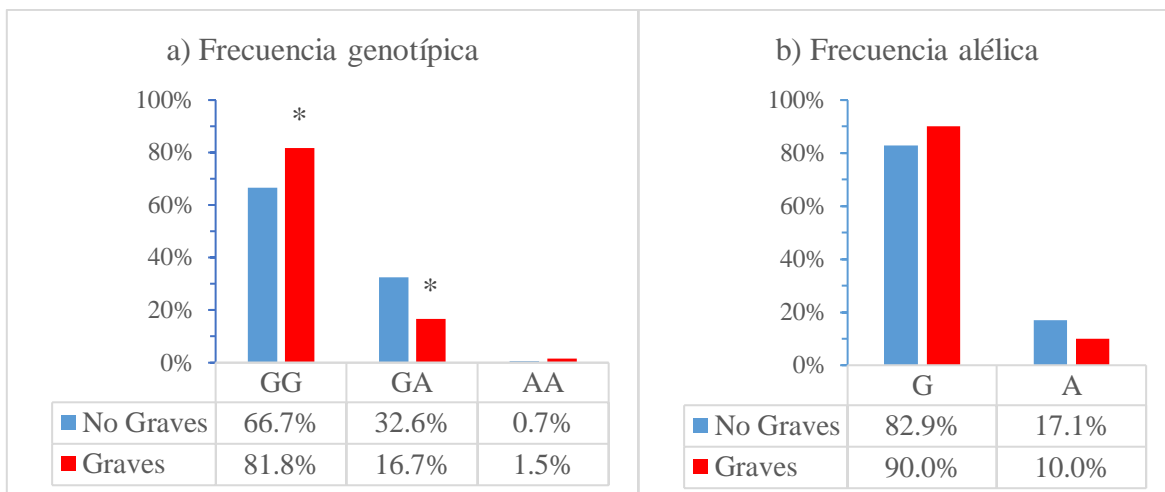


Fig. 8 Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en 194 adultos con NAC graves y no graves según CURB-65. Las frecuencias genotípicas y alélicas se analizaron con el programa Unphased y la asociación alélica con la prueba de Armitage. Se consideró significativo si $p < 0.05$. Las diferencias significativas se indican con *.

La frecuencia genotípica analizada con Unphased mostró mayor frecuencia del genotipo GG en pacientes graves ($p=0,03$), y mayor frecuencia del genotipo GA en pacientes no graves ($p=0,02$). No se encontraron diferencias significativas en el genotipo AA ($p=0,61$) ni tampoco en la frecuencia alélica ($p=0,06$). La prueba de Armitage no detectó asociación de riesgo en ninguno de los dos alelos ($p > 0,05$). Estos resultados indican que el genotipo GG se asocia a un mayor riesgo de desarrollar una NAC grave, mientras que el genotipo GA se asocia a un menor riesgo de una NAC grave.

El análisis de los pacientes reclasificados según evolución y CURB-65, permitió comparar la frecuencia genotípica del SNP c.1282G>A en 105 adultos no graves y 89 graves. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 9**.

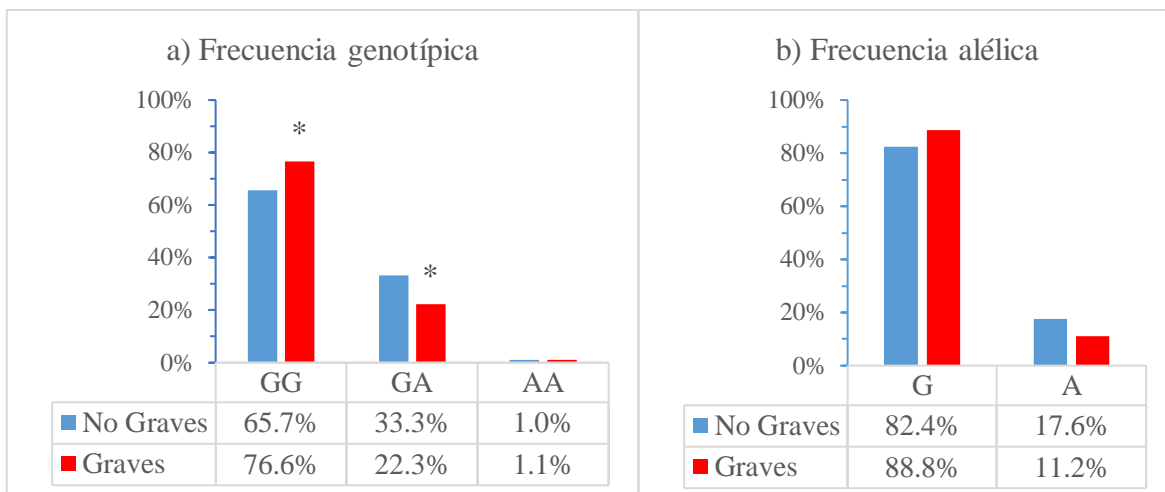


Fig. 9 Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en adultos con NAC graves y no graves según evolución y CURB-65. Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo un $p < 0,05$. Las diferencias significativas se indican con *.

Respecto a la frecuencia genotípica, el genotipo GG fue significativamente más frecuente en adultos graves ($p=0,04$), mientras que el genotipo GA fue más frecuente en los enfermos no graves ($p=0,04$). No se encontraron diferencias en la frecuencia del genotipo AA. Tampoco se detectaron diferencias significativas en la frecuencia alélica mediante el programa Unphased ($p=0,07$) y no se encontró asociación a riesgo en ninguno de los dos alelos utilizando la prueba de Armitage ($p > 0,05$). Estos resultados indican una asociación del genotipo GG con mayor riesgo de evolucionar a un cuadro grave de NAC y del genotipo GA con menor riesgo de gravedad.

IV.2.1.3 Frecuencia del SNP c.1282G>A de *irak-4* según sexo, detección de agentes y comorbilidades de los adultos con NAC

El análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP c.1282G>A de *irak-4* respecto a otros parámetros mostró similitudes por sexo, y diferencias por agentes detectados y

comorbilidades. El genotipo AA sólo se detectó en los casos con infección mixta (virus y bacterias) ($p < 0,01$). En el caso de las comorbilidades más frecuentes (HTA, diabetes y EPOC) en los adultos clasificados por PSI y CURB-65, se encontraron diferencias significativas, siendo mayor la frecuencia del genotipo GA en los pacientes no graves con HTA (GA $p = 0,04$) o EPOC (GA $p = 0,03$), mientras que el genotipo GG fue más frecuente en los clasificados graves que presentaron HTA (GG $p = 0,04$) o EPOC (GG $p = 0,02$) [ver Tablas en anexo, sección rs4251545 (c.1282G>A) de *irak-4*: género, detección de agentes y comorbilidades].

IV.2.1.4 Frecuencia del SNP c.1282G>A de *irak-4* según la presencia de sepsis en adultos con NAC

Considerando que la sepsis es una complicación frecuente de la NAC en el adulto y el reporte del SNP c.1282G>A con sepsis grave en población china (Yin *et al*, 2012), se analizó este SNP en 55 adultos con NAC que desarrollaron sepsis. En la **Tabla 16** se describen los resultados según la clasificación PSI por gravedad y sepsis, encontrándose diferencias significativas tanto en la frecuencia genotípica como alélica. La frecuencia del genotipo GG ($p < 0,01$) y del alelo G ($p = 0,01$) fue mayor en los casos graves, y del genotipo GA ($p < 0,01$) y del alelo A ($p = 0,01$) en los no graves. Esta diferencia se mantiene al reclasificar los enfermos por evolución y PSI, siendo el genotipo GG ($p < 0,01$) y el alelo G ($p = 0,01$) más frecuente en pacientes graves, mientras el genotipo GA ($p = 0,002$) y alelo A fueron más frecuentes en los casos no graves.

Tabla 16. Frecuencia genotípica y alélica del SNP c.1282G>A de *irak-4* en adultos con NAC y sepsis, clasificados por gravedad según PSI, y reclasificados por evolución y PSI

	PSI			EVOLUCIÓN		
	No graves	Graves	p	No graves	Graves	p
	n: 18	n: 37		n: 10	n: 45	
Genotipo GG (%)	38,9	81,1	0,001	33,3	76,8	0,004
Genotipo GA (%)	61,1	16,2	0,0007	66,7	20,9	0,002
Genotipo AA (%)	0	2,7	0,4	0	2,3	0,5
Alelo G (%)	69,4	89,2		66,7	87,2	
Alelo A (%)	30,6	10,8	0,01	33,3	12,8	0,01

Los análisis estadísticos de la frecuencia genotípica y alélica se realizaron con el programa Unphased y de la asociación alélica con la prueba de Armitage. Se consideró significativo si $p < 0,05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

En el análisis de los pacientes clasificados por CURB-65, sólo se encontraron diferencias significativas al reclasificar por gravedad los casos, siendo el genotipo GA más frecuente en adultos con NAC y sepsis no graves [ver Tabla en anexo, sección rs4251545 (c.1282G>A) de *irak-4*: sepsis].

IV.2.2 SNP c.439A>G (rs1152888) de *irak-3* (*irak-m*)

Se analizó el SNP rs1152888 de *irak-3*, que involucra un cambio de A>G en la posición 439 del mensajero (c.439A>G), generando un cambio aminoacídico de isoleucina (Ile) por valina (Val) en la posición 147, en el dominio proST de la proteína. En ninguno de los 194 adultos con NAC se detectó el genotipo AA.

IV.2.2.1 Según clasificación de gravedad por PSI

Entre los adultos con NAC graves y no graves clasificados por la escala PSI, no se detectaron diferencias significativas en la frecuencia genotípica ($p=0,5$), ni alélica con el programa

Unphased ($p=0,5$). Tampoco se encontró asociación a riesgo alélico mediante la prueba Armitage ($p=0,5$) (**Figura 10**), por lo que el SNP c.439A>G de *irak-3* no se asocia con la gravedad de la NAC.

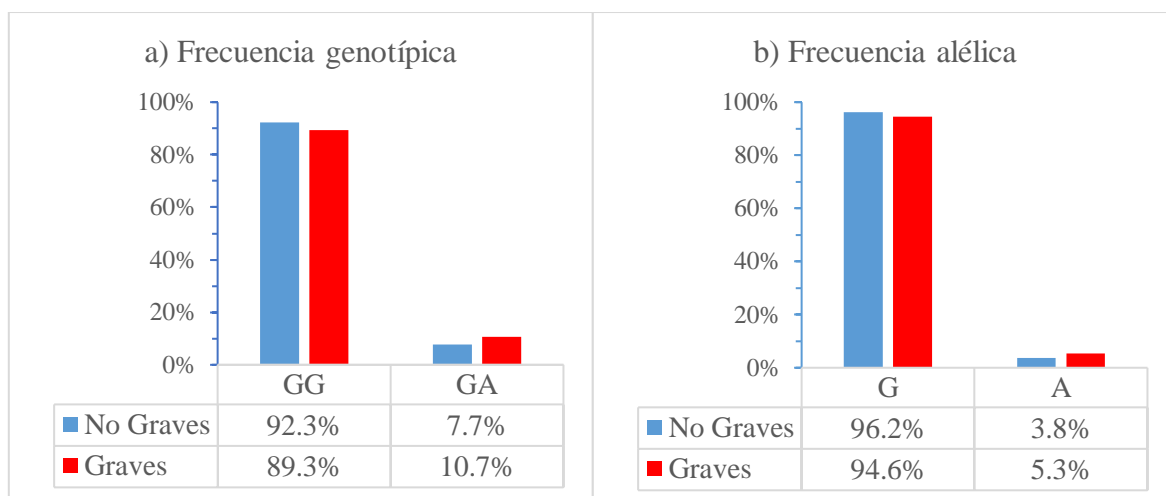


Fig. 10 Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en 194 adultos con NAC graves y no graves según PSI. Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo $p<0,05$.

Estos resultados se mantuvieron al analizar a los pacientes reclasificados por evolución y PSI, no detectándose diferencias significativas en la frecuencia genotípica ($p=0,6$), ni en la frecuencia alélica de acuerdo con el análisis por Unphased ($p=0,6$), ni asociación alélica a riesgo con la prueba de Armitage ($p=0,6$) (**Figura 11**), indicando que no existe relación del SNP c.439A>G con la gravedad de la NAC.

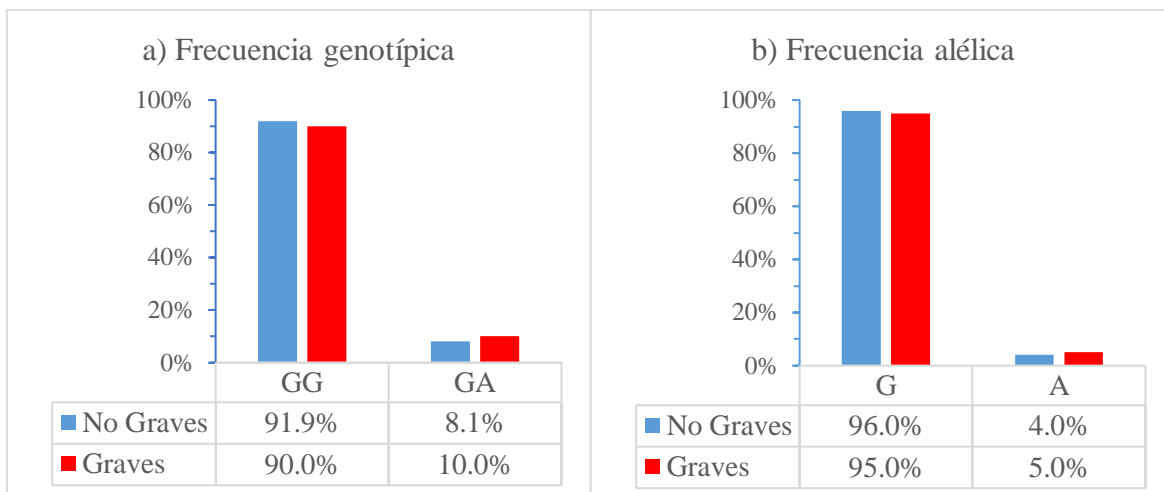


Fig. 11 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en 194 adultos con NAC graves y no graves según evolución y PSI. Las frecuencias genotípicas y alélicas se analizaron con el programa Unphased y la asociación alélica con la prueba de Armitage. Se consideró significativo si $p < 0,05$.

IV.2.2.2 Según clasificación de gravedad por CURB-65

Contrario a lo observado en la clasificación por PSI, el análisis de los casos graves y no graves según CURB-65, mostró diferencias significativas en la frecuencia genotípica y alélica. El genotipo GG fue más frecuente en adultos graves y el GA fue más frecuente en los no graves ($p=0,03$), mientras que la frecuencia del alelo G fue mayor en graves y del alelo A en no graves con el programa Unphased ($p=0,04$). Mediante la prueba de Armitage se detectó un mayor riesgo de gravedad con la presencia del alelo A (OR: 2,75), y menor riesgo con la del alelo G (OR: 0,43) ($p=0,04$) (Figura 13). Estos resultados indican que el genotipo GG y el alelo G se asociarían a menor riesgo de gravedad, mientras que el genotipo GA y el alelo A se asocian a mayor riesgo de desarrollar una NAC grave, en base a la categorización por gravedad según CURB-65.

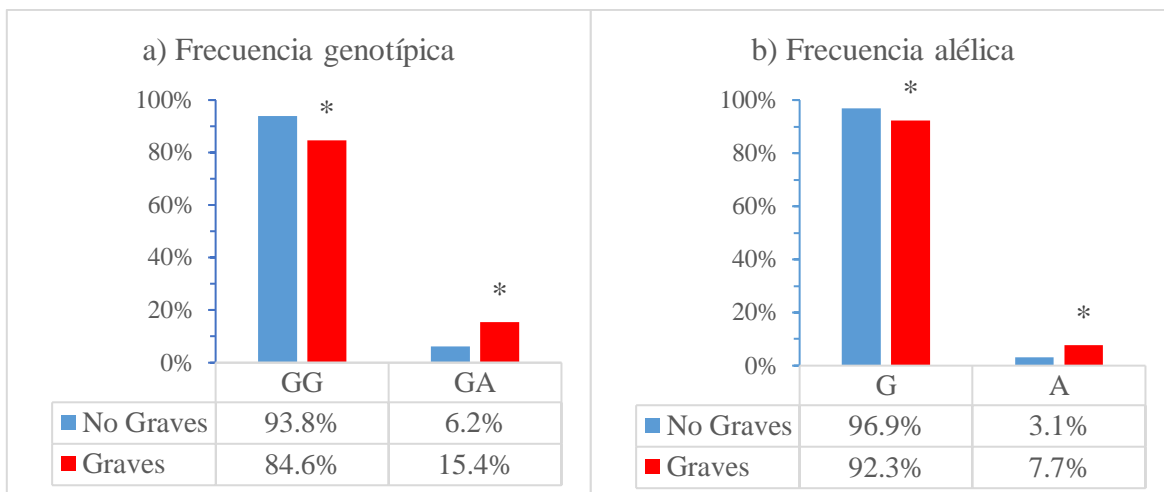


Fig. 12 Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en 194 adultos con NAC graves y no graves según CURB-65. Las frecuencias genotípicas y alélicas se analizaron con el programa Unphased y la asociación alélica con la prueba de Armitage. Se consideró significativo si $p < 0,05$. Las diferencias significativas se indican con *.

En el análisis de los casos reclasificados por evolución y CURB-65 no se detectó asociación del SNP c.439A>G de *irak-3* con gravedad en la frecuencia genotípica ($p=0,1$), y en la frecuencia alélica mediante el programa Unphased ($p=0,1$). Además, no se encontró asociación a riesgo alélico utilizando la prueba de Armitage ($p=0,1$) (**Figura 13**). Estos resultados indican que el SNP c.439A>G se relaciona con la gravedad del adulto con NAC si se utiliza la clasificación dada por CURB-65, pero esta asociación no se detecta al considerar la evolución de la NAC.

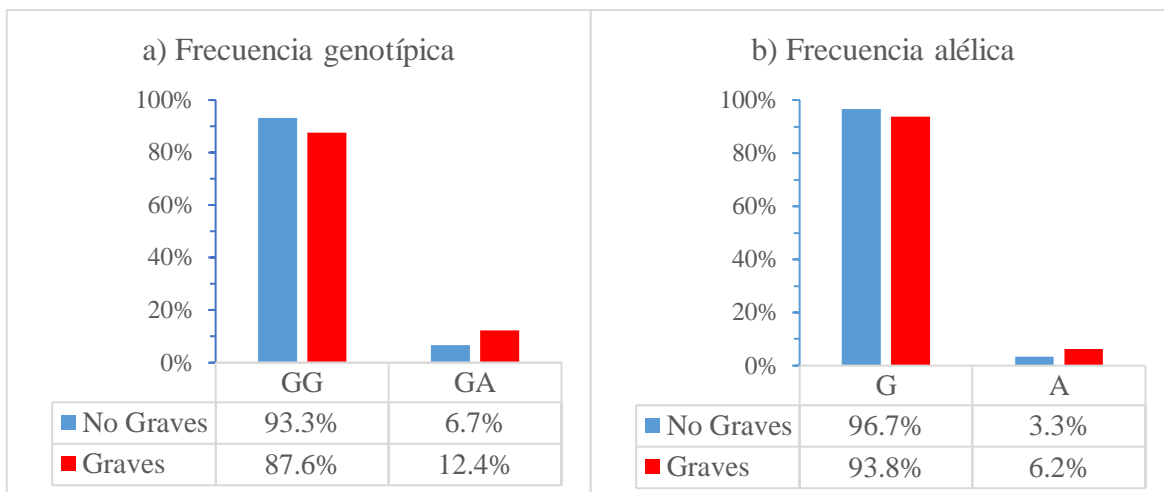


Fig. 13 Frecuencia genotípica (a) y alélica (b) del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en 194 adultos con NAC graves y no graves según evolución y CURB-65. Las frecuencias genotípicas y alélicas se analizaron con el programa Unphased y la asociación alélica con la prueba de Armitage. Se consideró significativo si $p < 0.05$.

IV.2.2.3 Frecuencia del SNP c.439A>G de *irak-3* según sexo, detección de agentes y comorbilidades de los adultos con NAC

Al analizar el polimorfismo c.439A>G de *irak-3* respecto a otras variables, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia alélica y genotípica en hombres clasificados por gravedad en base a CURB-65, siendo la frecuencia del genotipo GG y el alelo G más frecuente en hombres con NAC no graves y el genotipo GA y alelo A más frecuente en graves (genotipo $p < 0,03$; alelo $p < 0,05$). Según agente detectado, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas ni alélicas del SNP c.439A<G. Por otro lado, al analizar las comorbilidades más frecuentes, no se encontraron diferencias significativas en adultos con NAC que presentaron EPOC, pero sí adultos con HTA o diabetes clasificados por gravedad según CURB-65. El genotipo GG y el alelo G fueron más frecuentes en pacientes no graves con HTA o diabetes, y el genotipo GA y alelo A en pacientes graves, ya sea con HTA (genotipo $p < 0,01$; alelo $p < 0,01$) o con diabetes (genotipo $p = 0,01$; alelo $p = 0,01$)

(ver Tablas en anexo, sección rs1152888 (c.439A>G) de *irak-3*: sexo, detección de agentes y comorbilidades).

IV.2.2.4 Frecuencia del SNP c.439A>G de *irak-3* según la presencia de sepsis en adultos con NAC

Dado que Dong *et al* mostraron una asociación del SNP c.439A>G con sepsis en población china (Dong *et al*, 2013), se analizaron los 55 casos con NAC que presentaron sepsis. En los clasificados por CURB-65 se detectaron diferencias significativas, siendo más frecuente el genotipo GG y alelo G en los casos no graves y el genotipo GA y alelo A en los casos graves (Genotipo p=0,02; Alelo p=0,03) (**Tabla 17**). En el análisis de los casos reclasificados por evolución y CURB-65, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia genotípica, siendo el genotipo GG más frecuente en adultos no graves, y el genotipo GA en los graves (p=0,04).

Tabla 17. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP c.439A>G de *irak-3* en adultos con NAC y sepsis, clasificados por gravedad según CURB-65 y evolución

	CURB-65			EVOLUCIÓN		
	No graves	Graves	p	No graves (evolución)	Graves (evolución)	p
n	32	23		16	39	
Genotipo GG (%)	96,9	78,3		100	82,9	
Genotipo GA (%)	3,1	21,7	0,02	0	17,1	0,04
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	98,4	89,1		100	91,4	
Alelo A (%)	1,6	10,9	0,03	0	8,6	0,05

Los análisis estadísticos de la frecuencia genotípica y alélica se realizaron con el programa Unphased, y la asociación la asociación alélica con prueba de Armitage. Se consideró significativo si p<0,05. En negrita se destacan las diferencias significativas.

IV.2.3 Frecuencias de haplotipos de los SNP c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* en adultos con NAC

Debido a que tanto *irak-4* como *irak-3* se ubican en el mismo cromosoma (**Tabla 3**, materiales y métodos), se realizó un análisis conjunto de haplotipos y de frecuencias genotípicas para determinar si existe asociación con gravedad de la NAC, de acuerdo con la clasificación por PSI, CURB-65 y su reclasificación por evolución.

Al clasificar por PSI, se encontró mayor frecuencia de la combinación GG-GG (c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3*) en los casos graves ($p < 0,05$), y GA-GG (c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3*) en los casos no graves ($p = 0,01$). En el caso de los alelos, el haplotipo A-G (c.1282 G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3*) fue más frecuente en los casos no graves ($p = 0,01$). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas al analizar los casos reclasificados por evolución y PSI.

Al clasificar por CURB-65, se encontró mayor frecuencia de la combinación GA-GG (c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3*) en los casos no graves ($p = 0,02$). En el caso de los alelos, el haplotipo A-G (c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3*) fue más frecuente en los casos no graves ($p = 0,04$). Sin embargo, al analizar los pacientes reclasificados por evolución y CURB-65, no se encontraron diferencias significativas en el análisis de haplotipos. De esta forma, la asociación de estos SNP con gravedad detectada al clasificar sólo en base a las escalas clínicas PSI y CURB-65, no se detecta al considerar la evolución de la NAC. [ver Tablas en anexo, sección haplotipos].

IV.3 Expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M en adultos con NAC

IV.3.1 Expresión génica de IRAK-4 en sangre

IV.3.1.1 En adultos con NAC clasificados por gravedad según PSI

Considerando que la expresión génica de IRAK-4 mostró variaciones temporales en el análisis preliminar de 139 enfermos, con una menor expresión en los 17 pacientes con más de 7 días de enfermedad (0,44 veces de cambio, $p=0,03$), estos casos se excluyeron de los análisis de expresión. Para estudiar la expresión génica relativa (veces de cambio: Vc), se consideró el grupo no grave como grupo comparativo o “control”.

De acuerdo con la clasificación por PSI, entre los 55 adultos graves y 67 no graves, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica relativa (Vc graves=0,79; $p=0,5$) (Figura 14).

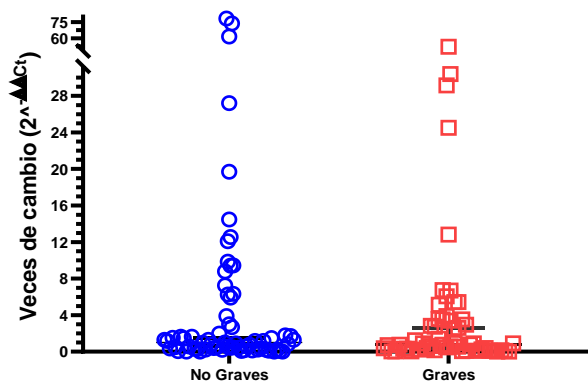


Fig. 14 Expresión génica relativa de IRAK-4 en 67 adultos con NAC no graves y 55 graves según PSI. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$).

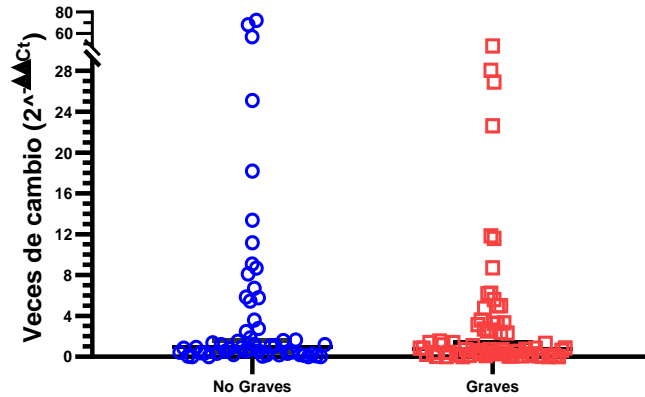


Fig. 15 Expresión génica relativa de IRAK-4 en 54 adultos con NAC no graves y 68 graves según evolución y PSI. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$).

Al analizar los enfermos por evolución (y PSI), las Vc de los 68 casos no fue significativamente diferente a la de los 54 casos no graves ($Vc= 0,72$; $p=0,4$) (**Figura 15**). Estos resultados indican que no se detecta relación de la expresión génica de IRAK-4 con la gravedad de la NAC.

IV.3.1.2 En adultos con NAC clasificados por gravedad según CURB-65

La evaluación de la expresión de IRAK-4 en los adultos con NAC clasificados por gravedad según CURB-65, no mostró diferencias significativas entre los 39 adultos graves y los 83 casos no graves ($Vc=0,81$; $p=0,7$). (**Figura 16**).

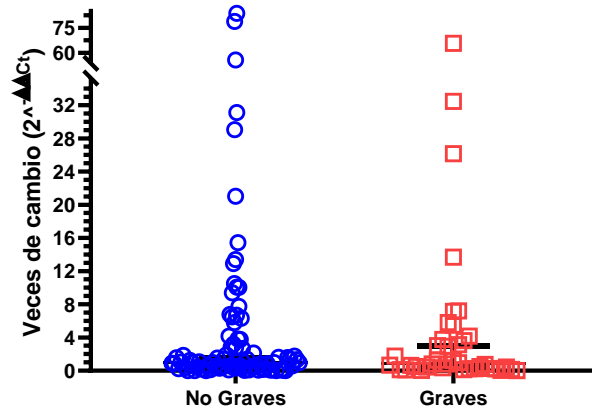


Fig. 16 Expresión génica relativa de IRAK-4 en 83 adultos con NAC no graves y 39 graves según CURB-65. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$).

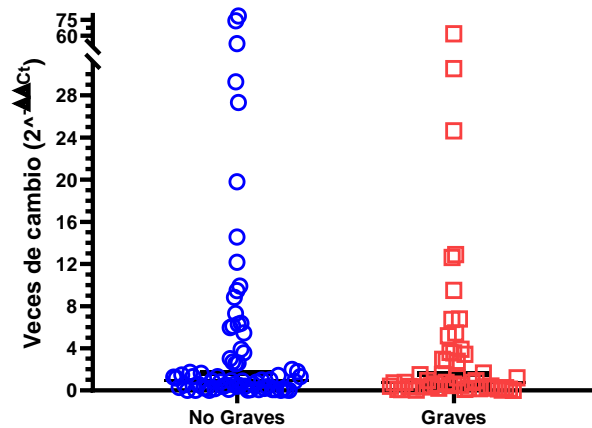


Fig. 17 Expresión génica relativa de IRAK-4 en 52 adultos con NAC no graves y 70 graves según evolución y CURB-65. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$).

En el análisis de los casos reclasificados por evolución y CURB-65, el valor de Vc fue 0,77 para los 52 adultos graves, sin ser significativamente diferente de los 70 adultos no graves

($p=0,6$) (**Figura 17**). Los resultados muestran relación entre la expresión génica de IRAK-4 y la gravedad de la NAC en el adulto chileno.

IV.3.1.3 Expresión génica de IRAK-4 en adultos con NAC según edad, sexo, comorbilidades, sepsis y agentes detectados

Se analizó la expresión génica de IRAK-4 con otros parámetros de los adultos con NAC, resultando mayor en hombres que en mujeres y similar por edad y agente detectado, tanto al comparar entre los casos con o sin agentes como al comparar por el tipo de agente detectado.

En el análisis de comorbilidades, se encontró una menor expresión génica en pacientes con EPOC respecto aquellos sin esta enfermedad, mientras que fue similar entre los casos con y sin HTA, diabetes o sepsis [ver Tablas en anexo, sección Expresión génica de IRAK-4: edad, sexo, comorbilidades, sepsis y agentes detectados].

IV.3.2 Expresión génica de IRAK-M en sangre

IV. 3.2.1 En adultos con NAC clasificados por gravedad según PSI

Los análisis de expresión de IRAK-M se realizaron en los 169 adultos con NAC clasificados por gravedad según PSI, dado que no se detectaron diferencias en la expresión sistémica de IRAK-M con respecto a los días de evolución de la enfermedad. La mediana de las Vc de los 82 adultos graves fue 1,65 y aunque mayor que la expresión génica de los 87 casos no graves, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,1$) (**Figura 18**).

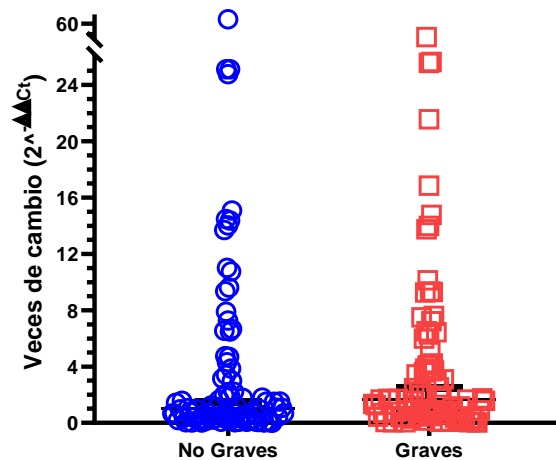


Fig. 18 Expresión génica relativa de IRAK-M en sangre de 87 adultos con NAC no graves y 82 graves según PSI. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta Ct$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$).

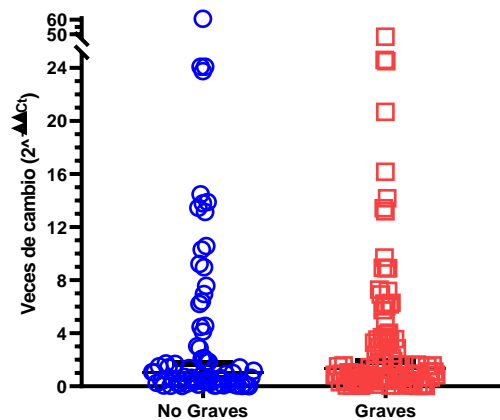


Fig. 19 Expresión génica relativa de IRAK-M en sangre de 71 adultos con NAC no graves y 98 graves según evolución y PSI. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta Ct$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$).

Al analizar los casos reclasificados por evolución y PSI tampoco se detectaron diferencias significativas en las Vc (1,36) entre los 98 casos con NAC graves y 71 no graves ($p = 0,4$)

(Figura 19). Estos resultados indican que la gravedad de la NAC no se asocia con la expresión génica de IRAK-M en los enfermos clasificados por PSI.

VI.3.2.2 En adultos con NAC clasificados por gravedad según CURB-65

Los resultados del análisis de 120 adultos con NAC no graves y 49 graves según CURB-65 se muestran en la Figura 20.

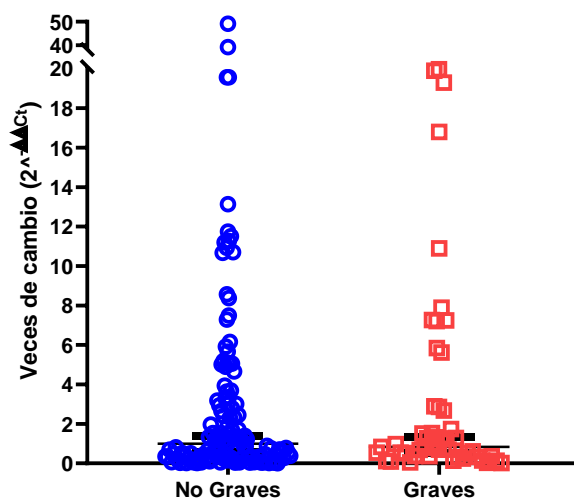


Fig. 20 Expresión génica relativa de IRAK-M en sangre de 120 adultos con NAC no graves y 49 graves según CURB-65. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$).

Las Vc obtenidas para el grupo grave respecto a los casos no graves fue 0,83, sin que este valor fuera significativamente diferente ($p=0,8$). Al realizar el análisis de los reclasificados por evolución y CURB-65, las Vc para los 72 pacientes graves fue 0,78, siendo similar a las de los 97 casos no graves ($p=0,9$) (Figura 21). Estos resultados indican que la gravedad de la NAC no se asocia con la expresión génica de IRAK-M en sangre de adultos con NAC categorizados por CURB-65.

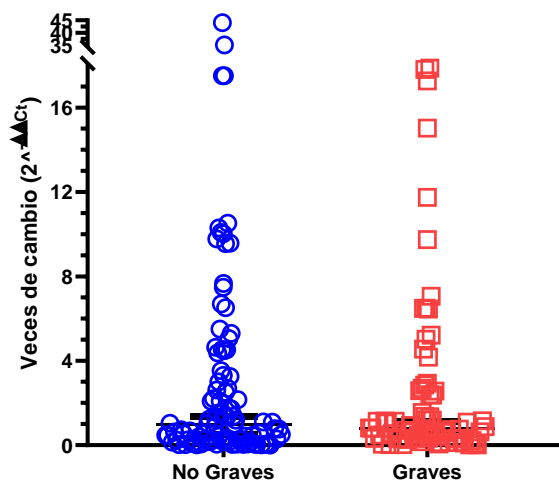


Fig. 21 Expresión génica relativa de IRAK-M en sangre de 97 adultos con NAC no graves y 72 graves según evolución y CURB-65. Se muestran los valores individuales de las veces de cambio utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y el grupo no grave como control. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de este grupo= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$).

IV.3.2.3 Expresión génica de IRAK-M en sangre de adultos con NAC según edad, sexo, comorbilidades, sepsis y agentes detectados

Al analizar la expresión génica de IRAK-M con otras variables en los adultos con NAC, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica por edad ni por agente detectado, mientras que, por sexo, la expresión fue significativamente superior en hombres ($V_c=1,81$) que en mujeres.

En el caso de las comorbilidades más frecuentes, la expresión génica de IRAK-M fue menor en los pacientes con EPOC que en aquellos sin esta enfermedad ($V_c=0,44$; $p=0,04$), mientras que fue similar en los adultos con y sin HTA, diabetes o sepsis [ver Tablas en anexo, sección Expresión génica de IRAK-M: edad, sexo, comorbilidades, sepsis y detección de agentes].

IV.3.3 Análisis de la asociación con gravedad de los SNPs c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4*, c.439A>G (rs1152888) de *irak-3* y la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M en sangre de adultos chilenos con NAC

Se determinó la relación entre los SNPs estudiados y la expresión génica sistémica de éstos con la gravedad de la NAC mediante regresión lineal. La **Tabla 18** muestra los resultados obtenidos más destacados.

Tabla 18. Relación entre el SNP c.1282G>A de *irak-4* y expresión génica de IRAK-4 con gravedad en 192 adultos con NAC

	OR	Intervalo de confianza (95%)	p
PSI			
c.1282G>A (rs4251545)	0,42	0,219-0,807	0,009
CURB-65			
c.1282G>A (rs4251545)	0,42	0,201-0,896	0,025
CURB-65			
c.1282G>A (rs4251545)	0,21	0,07-0,672	0,008
Expresión de IRAK-4<0,5	0,78	0,292-2,102	0,629
Expresión de IRAK-4>1,5	0,65	0,249-1,736	0,399
Evolución y CURB-65			
c.1282G>A (rs4251545)	0,50	0,262-0,979	0,043
Evolución y CURB-65			
c.1282G>A (rs4251545)	0,37	0,159-0,880	0,024
Expresión de IRAK-4<0,5	1,26	0,516-3,109	0,605
Expresión de IRAK-4>1,5	1,03	0,419-2,574	0,934

Los análisis estadísticos se realizaron con regresión logística multinomial para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0,05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

Al analizar tanto la asociación de los genotipos GG y GA del SNP c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4* y la expresión génica de IRAK-4 de acuerdo con la clasificación por PSI y reclasificación según evolución (con PSI), se encontró que, individualmente, el genotipo GA del SNP de *irak-4* se asociaría con un menor riesgo de gravedad de acuerdo con la clasificación por PSI. Esto se relaciona con los resultados obtenidos anteriormente, donde GA es el genotipo más frecuente en los adultos no graves. Por otra parte, al integrar como

variables la expresión génica de IRAK-4 de acuerdo con la clasificación por PSI (tanto individualmente como en conjunto con el SNP de *irak-4*), no se encontró relación significativa para la expresión génica, mientras que no hay relación significativa entre la gravedad con el SNP de *irak-4* al considerar los parámetros de expresión génica de IRAK-4. Finalmente, no se encontró relación estadísticamente significativa ni para el polimorfismo ni expresión génica de IRAK-4 de manera individual o conjunta al analizar los casos reclasificados por evolución.

Al realizar los análisis de los casos clasificados por CURB-65 y reclasificados según evolución, el genotipo GA del SNP c.1282G>A de *irak-4* se asoció a un menor riesgo de gravedad, concordando con los resultados previamente mencionados. Esta asociación se mantiene al agregar al análisis la variable expresión génica de IRAK-4 al considerar tanto la clasificación por CURB-65 como los casos reclasificados por evolución. No se encontró asociación relacionada a la expresión génica. Por tanto, en base a estos resultados, el genotipo GA del polimorfismo c.1282G>A se asociaría con menor riesgo de gravedad en los pacientes categorizados por CURB-65 y reclasificados por evolución.

En el caso del SNP c.439A>G (rs1152888) de *irak-3*, y la expresión génica de IRAK-M, no se encontraron diferencias significativas que los asocien con gravedad ni con evolución de la NAC con ninguna de las escalas pronósticas aplicadas, por lo que se mantiene la ausencia de relación entre la gravedad de la NAC del SNP c.439A>G (rs1152888) de *irak-3* y la expresión génica de IRAK-M en el análisis en conjunto.

La asociación del genotipo GA del SNP c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4* y la expresión génica de IRAK-4 con la gravedad del adulto con NAC es independiente de la edad y el sexo, de acuerdo con los resultados de los análisis estadísticos incorporando estas variables en los casos categorizados por CURB-65 y reclasificados por evolución (**Tabla 19**).

Tabla 19. Relación entre el SNP c.1282G>A de *irak-4*, expresión génica de IRAK-4, edad y sexo con gravedad en 192 adultos con NAC

	OR	Intervalo de confianza (95%)	p
CURB-65			
c.1282G>A (rs4251545)	0,25	0,074-0,853	0,027
Expresión de IRAK-4<0,5	0,48	0,158-1,502	0,211
Expresión de IRAK-4>1,5	0,48	0,160-1,488	0,208
Edad	1,08	1,041-1,125	<0,0001
Sexo	0,55	0,238-0,066	0,181
Evolución y CURB-65			
c.1282G>A (rs4251545)	0,40	0,165-0,980	0,045
Expresión de IRAK-4<0,5	1,10	0,435-2,797	0,836
Expresión de IRAK-4>1,5	1,01	0,395-2,613	0,972
Edad	1,02	1,00-1,05	0,049
Sexo	0,46	0,226-0,959	0,038

Se utilizó una regresión logística multinomial para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0,05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

IV.4 Concentración de citoquinas y quimioquinas en adultos con NAC

IRAK-4 e IRAK-M regulan la vía que promueve la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, principalmente la vía del factor de transcripción NFκB. Por ello, en 183 adultos con NAC se determinaron los niveles plasmáticos de las citoquinas y quimioquinas RANTES, IL-1β, IL-2, IL-6, GM-CSF, IL-12 (p40 y p70), IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α, TNF-α y eotaxina, mediante tecnología múltiple de Luminex®.

IV.4.1 Según gravedad por PSI

Las concentraciones de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias obtenidas en los adultos NAC según la clasificación PSI se muestra en la **Tabla 20**. En los 96 adultos graves respecto a los 72 no graves definidos, las concentraciones de RANTES (**Figura 22**), IL-1 β (**Figura 23**), IL-2, IL-12 (p40 y p70) fueron significativamente menores, mientras que las concentraciones de IL-8, IP-10, MCP-1 y TNF- α (**Figura 24**) fueron superiores (**Tabla 20**). Al analizar los casos reclasificados por evolución y PSI, se mantuvieron menores los niveles de RANTES (**Figura 22**), IL-1 β (**Figura 23**), IL-2, GM-CSF, IL-12 (p40 y p70) y MIP-1 α en los 109 enfermos graves respecto a los 59 no graves, mientras que fueron mayores las concentraciones de TNF- α (**Figura 24**), lo que podría indicar una disminución en la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (**Tabla 20**).

Tabla 20. Concentración de citoquinas y quimioquinas en 182 adultos con NAC graves y no graves según PSI(a) y reclasificados por evolución (b)

	PSI			EVOLUCIÓN		
	No graves Mediana [rango] (pg/mL)	Graves Mediana [rango] (pg/mL)	p	No graves Mediana [rango] (pg/mL)	Graves Mediana [rango] (pg/mL)	p
RANTES	37000 [4242-219200]	26000 [1257-136400]	0,003	38900 [4242-219200]	26700 [1257-136400]	0,001
IL-1 β	1,3 [0,53-23,55]	0,74 [0,53-12,52]	0,001	1,38 [0,53-7,23]	0,74 [0,53-23,55]	0,002
IL-2	1,52 [0,83-30,34]	1,06 [0,83-15,95]	0,019	1,56 [0,83-6,8]	1,14 [0,83-30,34]	0,019
IL-6	4,86 [0,46-205]	8,55 [0,46-2478]	0,467	4,01 [0,41-205]	7,87 [0,46-2478]	0,576
GM-CSF	43,47 [2,62-401]	36,38 [2,62-5908]	0,052	45,82 [2,62-359]	36,38 [2,62-5908]	0,007
IL-12p40	7,02 [0,38-151]	0,38 [0,38-119]	0,002	7,52 [0,38-44,34]	0,38 [0,38-151]	0,002
IL-12p70	4,16 [1,92-118]	3,29 [1,92-45,52]	0,010	4,16 [1,92-34,98]	3,29 [1,92-118]	0,005
IL-8	8,13 [0,41-66,34]	11,37 [0,54-1591]	0,030	8,74 [0,41-61,23]	10,66 [0,54-1591]	0,122
IP-10	565 [123-6048]	907,5 [87,92-11057]	0,033	563 [193-6048]	867 [87,92-11057]	0,098
MCP-1	273 [12-1548]	330,5 [13,24-3978]	0,029	279 [12-1548]	307 [13,24-3978]	0,111
MIP-1 α	4,91 [1,97-34,37]	2,91 [1,97-103]	0,093	4,91 [1,97-34,37]	2,73 [1,97-103]	0,007
TNF- α	16,45 [4,55-59,27]	21,42 [3,43-194]	0,004	16,69 [5,04-59,27]	20,61 [3,43-194]	0,032
Eotaxina	74,94 [24,98-201]	79,05 [16,69-217]	0,810	77 [24,98-201]	75,42 [16,69-217]	0,877

El análisis se realizó en 72 adultos con NAC no graves y 96 graves excepto en RANTES donde se analizaron 83 casos no graves y 99 graves. Se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0,05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

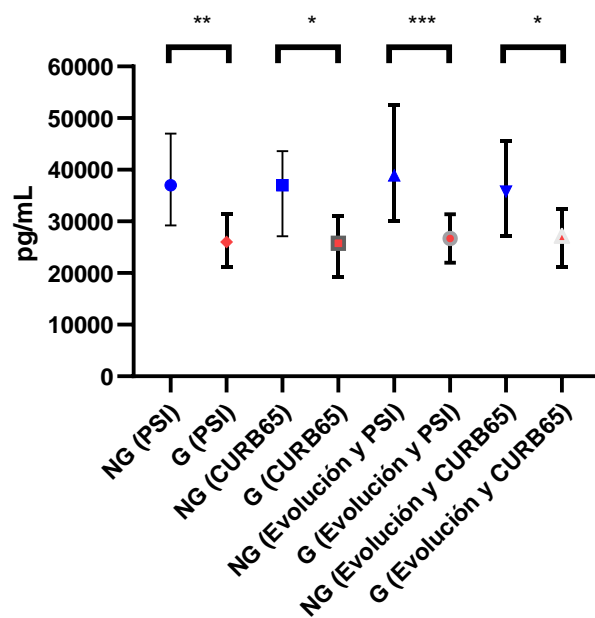


Fig. 22 Niveles de concentración de RANTES en plasma en adultos con NAC de acuerdo con la clasificación por escalas y por evolución. Se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0,05$. NG= No Graves, G= Graves. La significancia se indica con *, siendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

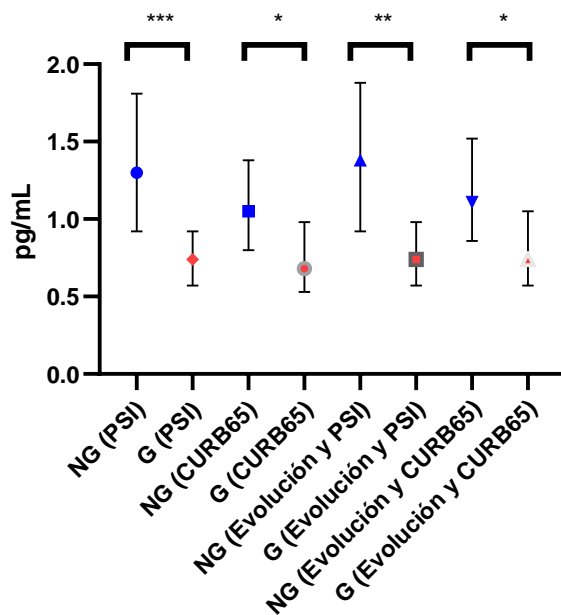


Fig. 23 Niveles de concentración de IL-1β en plasma en adultos con NAC de acuerdo con la clasificación por escalas y por evolución. Se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0,05$. NG= No Graves, G= Graves. La significancia se indica con *, siendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

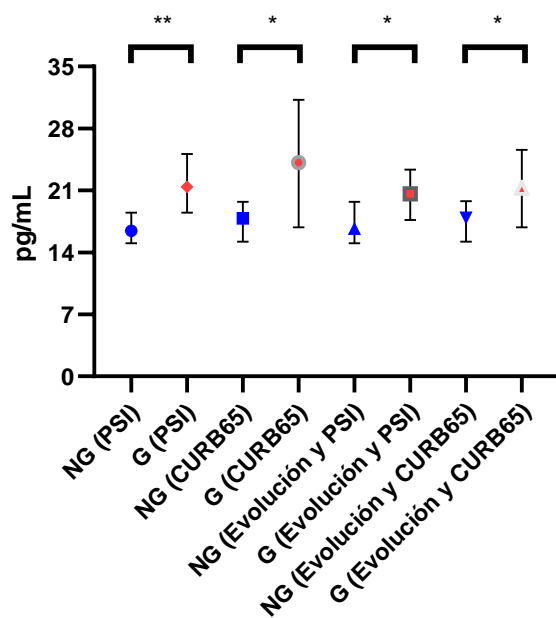


Fig. 24 Niveles de concentración de TNF- α en plasma en adultos con NAC de acuerdo con la clasificación por escalas y por evolución. Se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0,05$. NG= No Graves, G= Graves. La significancia se indica con *, siendo *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

IV.4.2 Según gravedad por CURB-65

La **Tabla 21** muestra los resultados de las concentraciones de citoquinas y quimioquinas obtenidos en los casos clasificados por CURB-65, detectándose en los graves niveles significativamente menores de RANTES (**Figura 22**) e IL-1 β (**Figura 23**), y superiores de IL-8, MCP-1 y TNF- α (**Figura 24**). Los análisis de los adultos reclasificados por evolución y CURB-65 mostraron la misma disminución de RANTES (**Figura 22**) e IL-1 β (**Figura 23**) en los casos graves, mientras que fueron superiores las concentraciones de IL-6, IL-8 y TNF- α (**Figura 24**). Así, los resultados son diferentes según la escala utilizada.

Tabla 21. Concentración de citoquinas y quimioquinas en 183 adultos con NAC graves y no graves según CURB-65 (a) y reclasificados por evolución (b)

	PSI			EVOLUCIÓN		
	No graves Mediana [rango] (pg/mL)	Graves Mediana [rango] (pg/mL)	p	No graves Mediana [rango] (pg/mL)	Graves Mediana [rango] (pg/mL)	p
RANTES	37000 [1628-219200]	25800 [1257-136400]	0,036	35800 [1628-219200]	27150 [1257-136400]	0,031
IL-1 β	1,05 [0,53-23,55]	0,68 [0,53-12,52]	0,019	1,11 [0,53-7,23]	0,74 [0,53-23,55]	0,036
IL-2	1,22 [0,83-30,34]	1,14 [0,83-15,95]	0,477	1,22 [0,83-6,8]	1,14 [0,83-30,34]	0,497
IL-6	5,41 [0,46-205]	13,4 [0,46-2478]	0,051	4,09 [0,46-205]	11,8 [0,46-2478]	0,026
GM-CSF	41,12 [2,62-401]	36,38 [6,20-5908]	0,424	41,12 [2,62-359]	35,19 [2,62-5908]	0,622
IL-12p40	0,38 [0,38-151]	0,38 [0,38-119]	0,252	0,38 [0,38-44,34]	0,38 [0,38-151]	0,175
IL-12p70	3,86 [1,92-118]	3,29 [1,92-19,05]	0,477	3,86 [1,92-45,52]	3,29 [1,92-118]	0,292
IL-8	7,88 [0,41-134]	16,04 [2,28-1591]	<0,001	7,84 [0,41-134]	13,78 [1,96-1591]	<0,001
IP-10	633 [87,92-9973]	1046 [216-11057]	0,097	625 [87,92-6048]	919 [123-11507]	0,089
MCP-1	283 [12-1548]	348 [96,64-3978]	0,028	289,5 [12-1548]	320,5 [96,64-3978]	0,076
MIP-1 α	4,02 [1,97-34,37]	3,01 [1,97-103]	0,219	4,38 [1,97-34,37]	3,06 [1,97-103]	0,212
TNF- α	17,84 [3,43-123]	24,14 [4,55-194]	0,024	17,92 [3,43-78,67]	21,25 [4,55-194]	0,028
Eotaxina	74,52 [22,46-217]	82,69 [16,69-183]	0,248	75,32 [22,46-217]	81,95 [16,69-183]	0,647

El análisis se realizó en 111 adultos con NAC no graves y 57 graves de acuerdo con la clasificación por CURB-65 excepto en RANTES donde se analizaron 121 enfermos no graves y 62 graves. Se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0.05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

IV.4.3 Entre adultos con NAC y asintomáticos

Se compararon los niveles de citoquinas y quimioquinas entre los 22 adultos asintomáticos (ASN) y los 183 adultos con NAC. La Tabla 22 muestra aumentos significativos en IL-1 β , IL-6, GM-CSF, IL-12p40, IL-8, IP-10 y TNF- α y disminución de RANTES en los enfermos.

Estos resultados indican que, exceptuando RANTES, existe un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias en pacientes con NAC respecto a adultos asintomáticos.

Tabla 22. Concentración de citoquinas y quimioquinas en 22 adultos asintomáticos y 183 adultos con NAC

	ASN Mediana [rango] (pg/mL)	NAC Mediana [rango] (pg/mL)	p
RANTES	57000 [14100-140900]	30000 [1257-219200]	0,004
IL-1 β	0,57 [0,53-2,18]	0,92 [0,53-23,55]	0,018
IL-2	0,88 [0,83-16,32]	1,18 [0,83-30,34]	0,115
IL-6	0,46 [0,46-24,27]	6,88 [0,46-2478]	<0,001
GM-CSF	10,25 [0,88-47,31]	41,12 [2,62-5908]	<0,001
IL-12p40	0,38 [0,38-15,48]	0,38 [0,38-151]	0,031
IL-12p70	2,61 [1,92-179]	3,57 [1,92-118]	0,111
IL-8	1,74 [0,41-13,47]	10,21 [0,41-1591]	<0,001
IP-10	373 [192-3567]	736,5 [87,92-11057]	0,003
MCP-1	291 [115-1862]	295 [12-3978]	0,677
MIP-1 α	2,075 [1,97-11,84]	3,56 [1,97-103]	0,072
TNF- α	9,7 [3,75-37,07]	18,49 [3,43-194]	<0,001
Eotaxina	67 [29-287]	76,87 [16,69-217]	0,303

El análisis se realizó en 22 adultos asintomáticos y 168 adultos con NAC, excepto en RANTES, en cuyo análisis se incluyeron 183 adultos con NAC. Se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney para los análisis estadísticos, siendo significativo si $p < 0.05$. En negrita se destacan las diferencias significativas.

IV.5 Asociación del genotipo GA del SNP c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4* a PSI y CURB-65 mediante curvas ROC

Respecto a los resultados obtenidos en la asociación de los SNP de *irak-4* e *irak-3*, y la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M de manera independiente con gravedad de la NAC, las asociaciones más significativas se obtuvieron con el SNP c.1282G>A de *irak-4*. Dado que el genotipo GA de este último se asoció en adultos a NAC no graves, se investigó su posible utilidad como marcador de menor riesgo de gravedad mediante curvas ROC. Como se describe en metodología, para determinar la sensibilidad y especificidad del genotipo GA del SNP c.1282G>A de *irak-4* como marcador de NAC no grave en adultos, todos los enfermos portadores del genotipo GA fueron incluidos en la categoría no grave. Se usó como referencia de clasificación la evolución de los pacientes según PSI y CURB-65. El área bajo la curva (AOC) de la escala pronóstica CURB-65 aumentó de 0,83 (**Figura 25**), a 0,88 al incluir el genotipo GA del SNP c.1282G>A (rs4251545) de *irak-4* como marcador de adultos no graves (**Figura 26**).

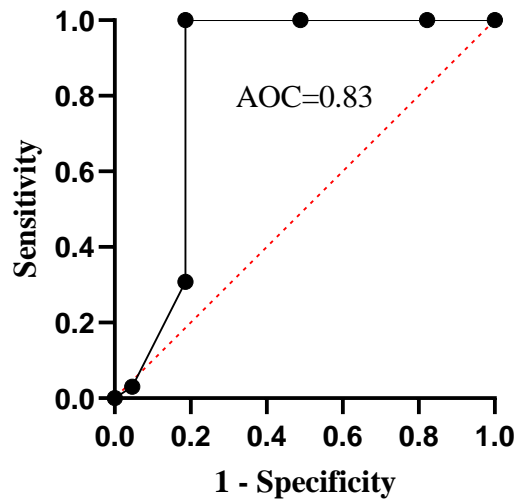


Fig. 25 Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica CURB-65. Cada punto del gráfico representa los puntos de corte

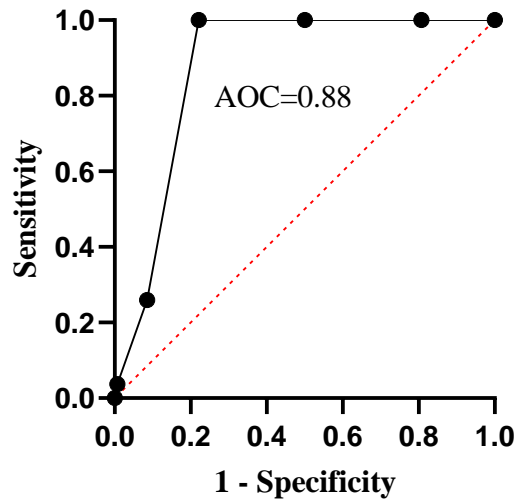


Fig. 26 Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica CURB-65 + genotipo GA. Cada punto del gráfico representa los puntos de corte

El AOC de la escala pronóstica PSI disminuyó de 0,89 (**Figura 27**), a 0,87 al incluir el genotipo GA como marcador de adultos no graves (**Figura 28**).

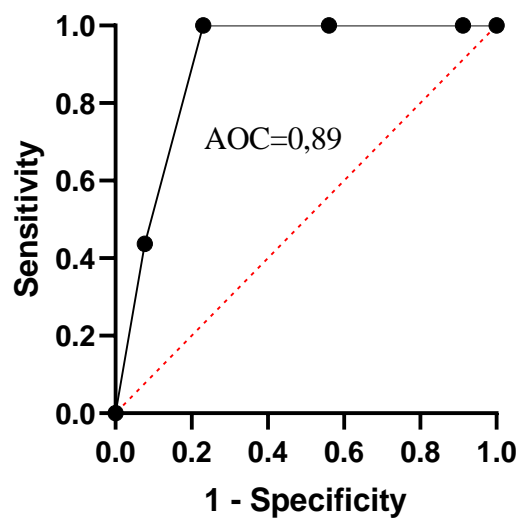


Fig. 27 Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica PSI. Cada punto del gráfico representa los puntos de corte

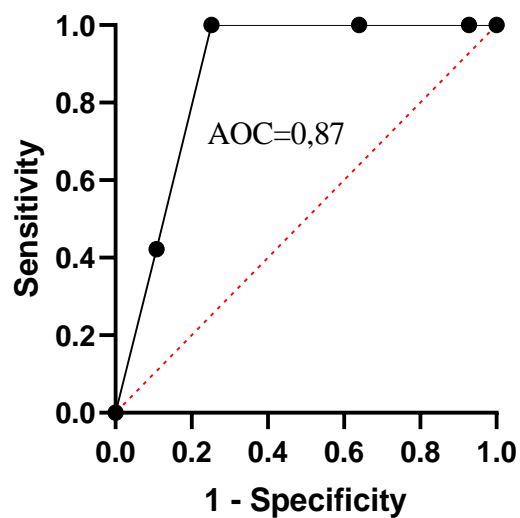


Fig. 28 Gráfico de curva ROC para la escala pronóstica PSI + genotipo GA. Cada punto del gráfico representa los puntos de corte

Pese a que existen cambios a nivel de especificidad y sensibilidad al incluir como marcador el genotipo GA del SNP c.1282G>A de *irak-4* dentro de la clasificación de CURB-65, es

importante mencionar que estos análisis son preliminares, aplicados a la misma población chilena estudiada, por lo que es necesario corroborar este resultado estudiando a una mayor población.

Finalmente, en la **Figura 29** se muestra un esquema representativo de la vía regulada por IRAK-4 e IRAK-M y los resultados significativos detectados a nivel genético, de expresión génica y los niveles de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias relacionadas a la gravedad de los adultos con NAC.

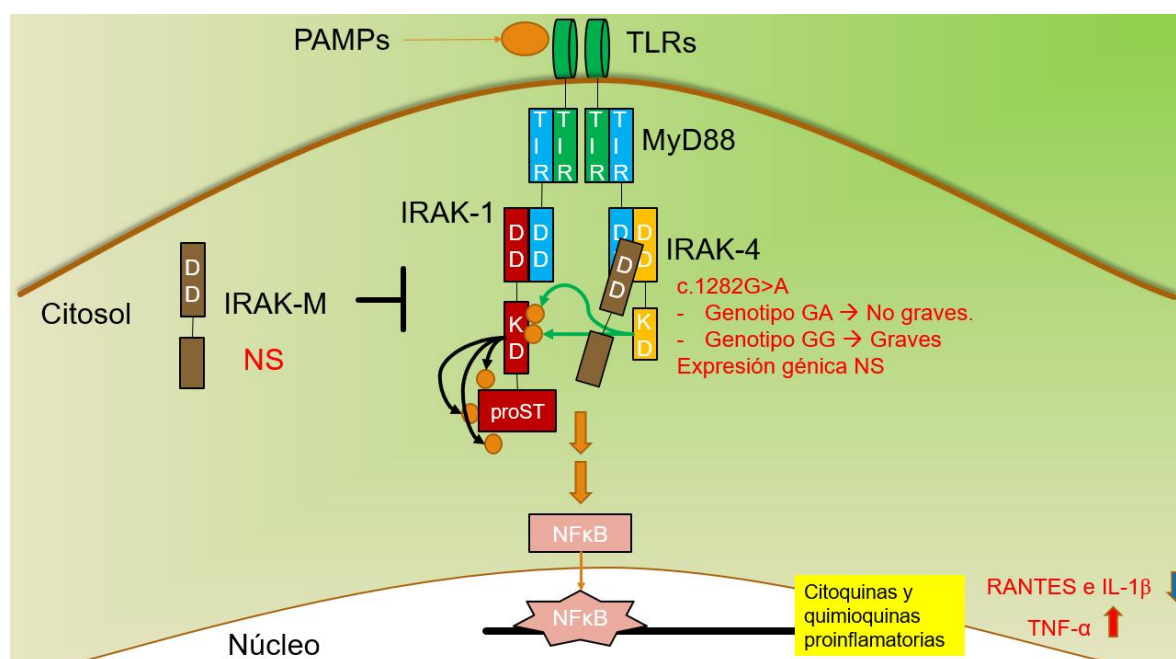


Fig. 29 Esquema representativo de los resultados obtenidos en la vía de señalización regulada por IRAK-4 e IRAK-M. Se obtuvo asociación del genotipo GG con mayor riesgo de gravedad de la NAC y GA a menor riesgo de gravedad en el SNP c.1282G>A de *irak-4*, y no se asoció a gravedad la expresión de IRAK-4. El SNP c.439A>G de *irak-3* no se encontró asociación, al igual que en el caso de la expresión génica de IRAK-M. Los niveles plasmáticos de RANTES e IL-β se encuentran disminuidos en adultos NAC graves, mientras TNF-α se encuentra aumentada. Diseño: Ariel Toledo G.

V. DISCUSIÓN

La NAC es una enfermedad con una alta morbimortalidad tanto en Chile como en el mundo, especialmente en adultos mayores. Las escalas pronósticas de uso clínico estiman el riesgo de mortalidad de un adulto con NAC; sin embargo, presentan limitaciones que generan errores en la clasificación de los enfermos, tal como ocurrió en este estudio en el 27,8% (10/36) de los pacientes catalogados como no graves por PSI y en el 52,8% (19/36) por CURB-65, quienes debieron ingresar a UCI por la gravedad de su enfermedad. Por esto, es necesario buscar nuevos biomarcadores que mejoren el valor predictor de las escalas pronósticas en estos pacientes (Blanquer *et al*, 2010; Saldías *et al*, 2014).

IRAK-4 e IRAK-M regulan la respuesta inmunológica modulando las vías de los factores de transcripción que permiten expresar citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Aunque existen antecedentes que las asocian con alteraciones en la respuesta inmune frente a infecciones (neumonía en ratones o sepsis en adultos), no se ha estudiado su rol en la NAC.

El objetivo de este estudio fue determinar si los genotipos y alelos de los SNP c.1282G>A de *irak-4*, c.439A>G de *irak-3*, y si la expresión génica de IRAK-4 y de IRAK-M están relacionados con la gravedad y evolución de los adultos con NAC.

V.1 Asociación genotípica y alélica de los SNP c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* con la gravedad de adultos con NAC

V.1.1 SNP c.1282G>A de *irak-4* como potencial uso de biomarcador

Los resultados de este estudio sustentan la hipótesis planteada respecto a la asociación del SNP rs4251545 (c.1282G>A) de *irak-4* con la gravedad de los adultos chilenos con NAC, lo

que permite plantear un potencial uso como biomarcador de la evolución de esta enfermedad en estos pacientes. Así, el AOC obtenido subió de 0,83 a 0,88 cuando se incluyó esta variable en la evaluación de la escala CURB-65 respecto a la clasificación de los pacientes por gravedad, utilizando la evolución como parámetro de referencia. En el caso de PSI, el AOC bajó de 0,89 a 0,87, lo que podría explicarse debido a que, de acuerdo con los resultados obtenidos, CURB-65 tendría menos precisión al determinar la evolución que PSI, por lo que el SNP de *irak-4* podría mejorar la predicción al momento de clasificar. Se requieren nuevos estudios sobre la eficacia de este parámetro, aplicándolo en un mayor número de casos que no incluyan a las personas en las cuales se originaron estos resultados.

Por otro lado, en este estudio, el genotipo GG y alelo G fueron más frecuentes en adultos graves con NAC, mientras que el genotipo GA y alelo A fueron más frecuentes en los casos no graves, independiente de la escala utilizada, lo que se contrapone a lo descrito por Sutherland *et al.* (2011), quienes asociaron el alelo A con mayor susceptibilidad a infecciones por bacterias Gram positivas en SIRS, y por Yin *et al.* (2012) que asoció un mayor riesgo de sepsis grave a la presencia del alelo A, y un menor riesgo al alelo G. Dado que el primer estudio se realizó en canadienses y el segundo en chinos, estos resultados indicarían que el fenotipo expresado podría depender de la población estudiada. Por esto es destacable que estos resultados permiten conocer el efecto que ocasiona en población chilena la presencia de un genotipo o alelo específico del SNP c.1282G>A de *irak-4*. Puesto que el cambio de base (G por A) provoca una sustitución aminoacídica de Alanina por Treonina en el dominio quinasa de la proteína, es importante a futuro analizar el efecto a nivel proteico de este cambio en un dominio de fosforilación.

La concordancia obtenida entre el análisis logístico de este SNP, Unphased y la prueba de Armitage, muestra la robustez de los resultados obtenidos, lo que indican la asociación entre el genotipo GA del SNP c.1282G>A de *irak-4* y el menor riesgo de desarrollar una enfermedad grave en el adulto con NAC, independiente de la edad (un factor clave en la gravedad de adultos con NAC). Este antecedente, refuerza la idea de la posible utilidad de genotipificar el SNP c.1282G>A de *irak-4* en adultos chilenos con NAC e incorporarlo como parámetro o biomarcador en las escalas pronósticas de gravedad. Es de interés continuar el estudio en el futuro aplicado en una mayor población muestral, tal como se mencionó anteriormente. Por otro lado, también es interesante analizar el efecto biológico que pueda tener la expresión del alelo A o G en el RNAm, si hay algún efecto en su regulación tanto a nivel génico como proteico que favorezca una mejor respuesta inmune.

V.1.2 SNP c.1282G>A de *irak-4* y su relación con sepsis en adultos con NAC

Una de las complicaciones más frecuentes de la NAC es el desarrollo de sepsis (Dremsizov *et al*, 2006; Cillóniz *et al*, 2019). En este estudio, un 28,4% (55) de los adultos con NAC presentó un cuadro séptico, por lo que se analizó la relación entre los SNPs estudiados, la sepsis y la gravedad. Al respecto es importante considerar que actualmente se utilizan nuevas definiciones de SIRS, sepsis y shock séptico (Singer *et al*, 2016), por lo que algunos pacientes aún con cuadro séptico son categorizados como no graves (Dremsizov *et al*, 2006; Ranzani *et al*, 2017). En este estudio, por ejemplo, un 25% de los pacientes categorizados como no grave según CURB-65 presentaron sepsis. Por ello, no sólo se analizaron aquellos pacientes con NAC sépticos vs los no sépticos, sino que además se compararon entre los adultos con NAC y sepsis graves y no graves utilizando ambas escalas. Si bien en los primeros no se encontraron diferencias, entre graves y no graves sépticos, se mantuvo la asociación del

genotipo GA y el alelo A del SNP c.1282G>A de *irak-4* a los casos no graves, y el genotipo GG y alelo G a los graves. Como estos resultados difieren de los estudios de Sutherland *et al.* (2011) y de Yin *et al.* (2012), como se mencionó anteriormente, podría explicarse por las distintas poblaciones estudiadas, la asociación obtenida en este estudio refuerza la importancia de la población analizada al comparar adultos con NAC no graves y graves que presentaron sepsis.

V.1.3 SNP c.439A>G de *irak-3* no se relaciona con la gravedad de adultos con NAC

A diferencia de los resultados obtenidos para el SNP de *irak-4*, el SNP rs1152888 (c.439A>G) de *irak-3* no se relacionó con la gravedad en adultos con NAC. Así las diferencias en la frecuencia genotípica y alélica detectadas en pacientes categorizados por gravedad según CURB-65, no permanecieron en los pacientes reclasificados por evolución, el cual es un marcador de gravedad más objetivo porque incluye el ingreso a UCI y la defunción.

V.1.4 SNP c.439A>G de *irak-3* y su relación con sepsis en adultos con NAC

Las diferencias encontradas en este estudio -mayor proporción de portadores del genotipo GA o alelo A en los casos graves y del genotipo GG y alelo G entre los no graves-, difieren de lo descrito por Dong *et al.* (2013), quienes reportaron asociación del genotipo AA y el alelo A con menor riesgo de sepsis grave, y al genotipo GG y alelo G a mayor riesgo. Al igual que lo mencionado para *irak-4*, estas diferencias pueden deberse a la población en la que se aplica el estudio y refuerza la importancia de estudiar cada grupo poblacional.

V.1.5 Frecuencias de los SNP c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* en población chilena difieren de otras poblaciones

Las frecuencias alélicas tanto para el SNP rs4251545 (c.1282G>A) de *irak-4* y rs1152888 (c.439A>G) de *irak-3* se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Esto indica que no existen variaciones genéticas significativas en la población chilena estudiada respecto a estos genes, reflejando de esta manera la distribución en la población. Al comparar esta distribución con otras etnias, la frecuencia del alelo menos común (alelo A) del SNP de *irak-4* fue similar a la encontrada en el proyecto 1000 genomas (14,7% vs 17,1%, respectivamente); sin embargo, la frecuencia del alelo A del SNP de *irak-3* fue mucho menor (5,9% vs 29,1%, respectivamente). Adicionalmente, en ningún adulto chileno se detectó el genotipo AA del SNP de *irak-3* (similar a la mexicana), lo que se debería a la amplia variación de la frecuencia del genotipo AA entre las distintas poblaciones, de acuerdo con la información contenida en la base de datos del NCBI: población mexicana: 0%, población hispana: 4%, población japonesa: 20% y poblaciones del África Subsahariana: 44%. La frecuencia del genotipo GA fue 16% en población mexicana (HAPMAP-MEX) y 51% en población japonesa (HapMap-JPT), detectándose en un 11,8% en la población chilena estudiada. Esto demuestra la variación en las frecuencias alélicas para un mismo SNP en diferentes poblaciones, y, por ende, la importancia de estudiar la genética en cada población para estimar las frecuencias alélicas y genotípicas en cada una de ellas.

V.2 Expresión génica relativa de IRAK-4 e IRAK-M no se relaciona con la gravedad de adultos con NAC

Diferentes estudios han mostrado la relación entre los niveles de IRAK-4 e IRAK-M con la respuesta frente a infecciones virales y principalmente bacterianas. Se ha descrito en niños que la deficiencia en la expresión génica de IRAK-4 incrementa la susceptibilidad a infecciones producidas por bacterias piogénicas, como por ejemplo *S. pneumoniae* (Picard *et al*, 2003; Ku *et al*, 2007), mientras que el aumento de la expresión génica de IRAK-M se ha relacionado con una supresión de la respuesta frente a infecciones por bacterias Gram positivas en ratones con sepsis o neumonía y en cultivos celulares de pacientes con sepsis (Escoll *et al*, 2003; Deng *et al*, 2007; Van't Veer *et al*, 2007; Xia *et al*, 2018). Sin embargo, no hay estudios en adultos que describan el efecto de los cambios de expresión, ni que relacionen la expresión de estos genes con NAC. En esta tesis, la expresión génica relativa sistémica (tanto de IRAK-4 como de IRAK-M) en esta población de adultos con NAC no se relacionó con la gravedad de la enfermedad. Aunque la expresión génica relativa de IRAK-4 fue menor en los casos graves, tal como se planteó en la hipótesis, la diferencia no fue significativa. En el caso del gen de IRAK-M, los resultados fueron diferentes según la escala pronóstica utilizada, con una mayor expresión en los casos graves clasificados por PSI y menor en los categorizados por CURB-65. Estas discrepancias pueden estar asociadas a los criterios por los cuales se categorizan los pacientes con NAC, lo que se refleja en diferencias en el número de pacientes categorizados como no graves y graves por cada una de ellas (96 y 135 adultos no graves clasificados por PSI y CURB-65, respectivamente). Por ello, se incorporaron parámetros de evolución más objetivos en los análisis de las escalas pronósticas.

Aun así, los niveles de expresión de estos genes fueron similares entre adultos con NAC no graves y graves.

La ausencia de diferencias significativas en la expresión génica puede deberse a la alta dispersión de los datos analizados, por lo que se requieren más estudios que permitan identificar factores que estarían involucrados en la respuesta y que ocasionan las diferencias de expresión de estos genes en los pacientes con NAC, o definir si alguna patología u otros genes se asocian a diferencias en la expresión génica o la población celular afectada. Además, es fundamental determinar si existen cambios de expresión de acuerdo con los días de evolución, ya que podrían alterar los resultados obtenidos. En el caso de la expresión génica de IRAK-4, un pequeño número de pacientes mostró diferencias significativas relacionadas con los días de evolución de la enfermedad, con lo cual fueron excluidos de los análisis de expresión génica de IRAK-4. Por este motivo, es importante conocer los días de evolución que presentan los adultos con NAC.

IRAK-M se expresa en monocitos, macrófagos y células del epitelio pulmonar, mientras que IRAK-4 se expresa en todas las células. En este estudio el análisis de expresión génica fue realizado a partir de muestras de sangre completa y no en poblaciones celulares específicas ni a nivel local pulmonar. Es importante a futuro analizar poblaciones individuales de células que permitan apreciar cambios de expresión génica particulares.

En definitiva, de acuerdo con lo obtenido en este estudio, no existiría relación entre la gravedad de los adultos con NAC y la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M, por lo que no podrían ser biomarcadores de gravedad de esta enfermedad en esta población.

V.3 Cambios a nivel de citoquinas relacionados con gravedad de la NAC

V.3.1 Diferencias en los niveles de RANTES, IL-1 β y TNF- α entre adultos con NAC graves y no graves

Los análisis de citoquinas y quimioquinas en este estudio mostraron cambios significativos en los casos graves con NAC. Las concentraciones fueron significativamente menores de RANTES e IL-1 β y mayores de TNF- α que, en los enfermos no graves, independiente de la escala utilizada y considerando la evolución (tanto PSI como CURB-65). Estas alteraciones en los niveles de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, podrían indicar una respuesta alterada del sistema inmunitario que contribuya a la gravedad de los NAC en adultos.

En los casos graves se detectó adicionalmente la disminución de IL-2, IL-12 (p40 y p70) y el aumento de IP-10, pero sólo al utilizar PSI para clasificar los casos. Por otra parte, en los enfermos definidos como graves por evolución y PSI, GM-CSF y MIP-1 α se encuentran disminuidas, en cambio en los casos graves definidos por evolución y CURB-65, se detecta aumento de IL-6 e IL-8. Estas diferencias, tal como en el caso de la expresión génica y el polimorfismo, podrían deberse a los diferentes criterios que aplican las escalas pronósticas y a los distintos tamaños muestrales de los subgrupos obtenidos con los diferentes criterios de clasificación utilizados, obteniéndose con PSI el mayor número de casos graves, y con CURB-65 el mayor número de casos no graves.

V.3.2 Diferencias entre adultos asintomáticos y adultos con NAC

De acuerdo con lo esperado, la mayoría de las citoquinas cuantificadas (IL-1 β , IL-6, GM-CSF, IL-8, IP-10, TNF- α) se encuentra aumentada en adultos con NAC comparadas con adultos asintomáticos. Esto debido a que, al existir una infección en curso, se activan las vías

que permiten el reclutamiento de células inmunitarias encargadas de eliminar a los patógenos, además de promover la inflamación de las zonas involucradas en ésta, con lo cual se produce un aumento en los niveles de las citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre asintomáticos y adultos con NAC en los niveles de IL-2, IL-12 (p40 y p70), MCP-1, MIP-1 α y eotaxina, que podría deberse al número de asintomáticos analizados en este estudio (n=22).

Así como en los casos graves los niveles de RANTES eran menores respecto a los no graves, también fueron menores los niveles de esta quimioquina en adultos con NAC respecto a los asintomáticos. Dado que esta quimioquina atrae monocitos y linfocitos T, células que participan activamente en el control de las infecciones, es posible que en ciertos pacientes se altere el reclutamiento inmunitario por una menor respuesta frente a las infecciones.

V.4 Relación entre el SNP c.1282G>A, la expresión génica de IRAK-4 y los niveles de citoquinas en los adultos con NAC

Tanto la expresión génica de IRAK-4 como los niveles de citoquinas no se relacionaron entre sí con los genotipos GG o GA del SNP c.1282G>A de *irak-4* en adultos con NAC; sin embargo, entre los pacientes no graves, clasificados con ambas escalas, portadores del genotipo GA, los niveles de RANTES, IL-2 e IL-12p70 se encontraron disminuidos respecto a los enfermos con el genotipo GG, así como IL-1 β en los pacientes clasificados por PSI. Estas diferencias no se detectaron entre los casos graves, aún más, IL-8 estuvo significativamente aumentada en los casos graves con genotipo GA comparada con los del genotipo GG. Estos resultados indican que quienes son portadores del genotipo GA del SNP c.1282G>A presentarían una respuesta acorde a la gravedad del adulto con NAC,

manteniendo o aumentando los niveles de citoquinas con el fin de eliminar la infección (datos no mostrados).

Debiese estudiarse si las diferencias entre el genotipo GG y GA del SNP c.1282G>A de *irak-4* se deben a algún efecto a nivel de proteína IRAK-4 que determina una menor activación de la vía que produce citoquinas y quimioquinas en individuos con NAC graves respecto a los no graves.

V.5 Limitaciones del estudio

Existen cambios en los niveles de las moléculas que participan en la respuesta inmune asociados al tiempo que ha transcurrido desde que se inicia la infección. Una de las principales limitantes es la subjetividad en la determinación de los días de evolución de los pacientes. Los días de evolución se determinaron en base al inicio de la sintomatología que refiere el enfermo, y dado que no existen herramientas que detecten el inicio de la infección, no es posible conocer con exactitud cuáles son los cambios que se asocian al inicio de la infección. Por otro lado, la cuantificación de la expresión génica en sangre total limita la capacidad de discriminar efectos celulares individuales porque la expresión cuantificada es sumatoria de las expresiones individuales de la variedad de células circulantes. Además, los análisis de expresión génica realizados son de RNAm, por lo que no es posible discriminar diferencias en la expresión génica de los alelos de los SNPs estudiados. Por este motivo, sería interesante realizar estudios que permitan determinar si existen diferencias de expresión génica de acuerdo con el alelo. A pesar de ser una limitante en el análisis de las funciones biológicas de los genes estudiados, es importante considerar que tener parámetros analizados en muestras de sangre tiene una aplicación más práctica si se requiere incluir en la categorización de la NAC.

Los análisis genéticos realizados en este estudio fueron en población chilena. Sin embargo, es necesario indicar que éste no es un estudio que permita determinar la ancestría genética de los individuos estudiados; la etnia sólo es indicada por la declaración del paciente al momento de su enrolamiento (auto-percibida), por lo que no se puede asociar estos resultados al grado de mestizaje que presenta esta población.

En resumen, el SNP c.1282G>A de *irak-4* se relaciona con la gravedad de los adultos con NAC, asociándose el genotipo GG a un mayor riesgo de gravedad y el genotipo GA a menor riesgo desarrollar una NAC grave. Los portadores del genotipo GG de este SNP y con NAC grave presentan menores niveles de citoquinas, mientras que la presencia del genotipo GA no afecta los niveles de citoquinas en los adultos chilenos con NAC. Finalmente, la expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M no se relaciona con la gravedad de los adultos con NAC.

Con estos resultados, es posible plantear al SNP c.1282G>A de *irak-4* como un posible biomarcador de gravedad de la NAC en adultos, que podría mejorar la clasificación por gravedad de los adultos chilenos con NAC. Para ello, se requiere estudiar su eficacia clínica y desarrollar nuevos métodos que permitan su detección de manera rápida y oportuna.

VI. CONCLUSIONES

- El genotipo GG y alelo G del SNP rs4251545 (c.1282G>A) de *irak-4* se asociaría a gravedad de la NAC en adultos chilenos.
- El genotipo GA y alelo A del SNP c.1282G>A de *irak-4* se asociaría a menor riesgo de gravedad de la NAC en adultos chilenos.
- El SNP rs1152888 (c.439A>G) de *irak-3* no se asocia a la gravedad de los adultos chilenos con NAC.
- La escala pronóstica utilizada es crucial para evaluar la asociación de las frecuencias alélicas de los SNP c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* con la gravedad de la NAC en el adulto chileno por lo que se requiere utilizar parámetros de mayor objetividad.
- La expresión génica de IRAK-4 e IRAK-M no estarían relacionadas con la gravedad de la NAC en adultos chilenos.
- En adultos graves con NAC, la concentración plasmática de RANTES e IL-1 β está disminuida y la de TNF- α está aumentada.
- El genotipo GG del SNP rs4251545 (c.1282G>A) de *irak-4* se asoció a menores niveles plasmáticos de RANTES, IL-2 e IL-12p70 en enfermos graves respecto a no graves con el mismo genotipo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Balaci, L., Spada, M. C., Olla, N., Sole, G., Loddo, L., Anedda, F., Uda, M. y cols (2007). IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *The American Journal of Human Genetics*, 80(6), 1103-1114.

Blanquer, J., & Sanz, F. (2010). Neumonía adquirida en la comunidad. *Archivos de Bronconeumología*, 46, 26-30.

Cao, Z., Henzel, W. J., & Gao, X. (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, 271(5252), 1128-1131.

Carrasco-Colom, J., Jordan, I., Alsina, L., Garcia-Garcia, J. J., Cambra-Lasaosa, F. J., Martín-Mateos, M. A., Juan, M., & Muñoz-Almagro, C. (2015). Association of Polymorphisms in IRAK1, IRAK4 and MyD88, and severe invasive pneumococcal disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(9), 1008-1013.

Castelo-Branco, C., & Soveral, I. (2014). The immune system and aging: a review. *Gynecological Endocrinology*, 30(1), 16-22.

Cillóniz, C., Dominedò, C., Magdaleno, D., Ferrer, M., Gabarrús, A., & Torres, A. (2019). Pure viral sepsis secondary to community-acquired pneumonia in adults: risk and prognostic factors. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(7), 1166-1171.

Cillóniz, C., Rodríguez-Hurtado, D., & Torres, A. (2018). Characteristics and Management of Community- Acquired Pneumonia in the Era of Global Aging. *Medical Sciences*, 6(2), 35.

Deng, J. C., Cheng, G., Newstead, M. W., Zeng, X., Kobayashi, K., Flavell, R. A., & Standiford, T. J. (2006). Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(9), 2532-2542.

Dong, G. H., Gong, J. P., Li, J. Z., Luo, Y. H., Li, Z. D., Li, P. Z., & He, K. (2013). Association between gene polymorphisms of IRAK-M and the susceptibility of sepsis. *Inflammation*, 36(5), 1087-1093.

Dremsizov, T., Clermont, G., Kellum, J. A., Kalassian, K. G., Fine, M. J., & Angus, D. C. (2006). Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do

systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course?. *Chest*, 129(4), 968-978.

Escoll, P., del Fresno, C., García, L., Vallés, G., Lendínez, M. J., Arnalich, F., & López-Collazo, E. (2003). Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(2), 465-472.

File Jr, T. M., & Marrie, T. J. (2010). Burden of community-acquired pneumonia in North American adults. *Postgraduate Medicine*, 122(2), 130-141.

Fine, M. J., Auble, T. E., Yealy, D. M., Hanusa, B. H., Weissfeld, L. A., Singer, D. E., Coley, C. M., Marrie, T. J., & Kapoor, W. N. (1997). A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 336(4), 243-250.

Flannery, S., & Bowie, A. G. (2010). The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1981-1991.

Gosu, V., Basith, S., Durai, P., & Choi, S. (2012). Molecular evolution and structural features of IRAK family members. *PLoS One*, 7(11), e49771.

Guía Técnica del Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 2011.
<http://web.minsal.cl/portal/url/item/7220fdc4341744a9e04001011f0113b9.pdf>

Hubbard, L. L., & Moore, B. B. (2010). IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis. *Infectious Disease Reports*, 2(1), 22-29.

Janssens, S., & Beyaert, R. (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Molecular Cell*, 11(2), 293-302.

Jin, P., Bo, L., Liu, Y., Lu, W., Lin, S., Bian, J., & Deng, X. (2016). Activator protein 1 promotes the transcriptional activation of IRAK-M. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 1212-1219.

Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galán, J. E., Janeway Jr, C. A., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110(2), 191-202.

Ku, C. L., Von Bernuth, H., Picard, C., Zhang, S. Y., Chang, H. H., Yang, K., *et al* (2007). Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(10), 2407-2422.

Lagler, H., Sharif, O., Haslinger, I., Matt, U., Stich, K., Furtner, T., Doninger, B., Schmid, K., Gattringer, R., de Vos, A. F., & Knapp, S. (2009). TREM-1 activation alters the dynamics of pulmonary IRAK-M expression in vivo and improves host defense during pneumococcal pneumonia. *The Journal of Immunology*, 183(3), 2027-2036.

Lim, W. S., Baudouin, S. V., George, R. C., Hill, A. T., Jamieson, C., Le Jeune, I., Macfarlane, J. T., Read, R. C., Roberts, H. J., Levy, M. L., Wani, M., & Woodhead, M. A. (2009). BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax*, 64(Suppl 3), iii1-iii55.

Luchsinger, V., Ruiz, M., Zunino, E., Martínez, M. A., Machado, C., Piedra, P. A., Fasce, R., Ulloa, M. T., Fink, M. C., Lara, P., Gebauer, M., Chávez, F., & Avendaño, L. F. (2013). Community-acquired pneumonia in Chile: the clinical relevance in the detection of viruses and atypical bacteria. *Thorax*, 68(11), 1000-1006.

Lye, E., Dhanji, S., Calzascia, T., Elford, A. R., & Ohashi, P. S. (2008). IRAK-4 kinase activity is required for IRAK-4-dependent innate and adaptive immune responses. *European Journal of Immunology*, 38(3), 870- 876.

Lyroni, K., Patsalos, A., Daskalaki, M. G., Doxaki, C., Soennichsen, B., Helms, M., Liapis, I., Zacharioudaki, V., Kampranis, S. C., & Tsatsanis, C. (2017). Epigenetic and transcriptional regulation of IRAK-M expression in macrophages. *The Journal of Immunology*, 198(3), 1297-1307.

Marcos MA, Esperatti M, Torres A. 2009. Viral pneumonia. *Current Opinion in Infectious Diseases* 22:143–147.

Medvedev, A. E., Lentschat, A., Kuhns, D. B., Blanco, J. C., Salkowski, C., Zhang, S., Arditi, M., Gallin, J. I., & Vogel, S. N. (2003). Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(4), 521-531.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., & Janeway Jr, C. A. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell*, 2(2), 253-258.

Millett, E. R., Quint, J. K., Smeeth, L., Daniel, R. M., & Thomas, S. L. (2013). Incidence of community-acquired lower respiratory tract infections and pneumonia among older adults in the United Kingdom: a population-based study. *PloS one*, 8(9), e75131.

Miyata, M., Lee, J. Y., Susuki-Miyata, S., Wang, W. Y., Xu, H., Kai, H., Kobayashi, K. S., Flavell, L. A., & Li, J. D. (2015). Glucocorticoids suppress inflammation via the upregulation of negative regulator IRAK-M. *Nature Communications*, 6, 6062.

Monneret, G., Lepape, A., Voirin, N., Bohé, J., Venet, F., Debard, A. L., Thizy, H., Bienvenu, J., Gueyffier, F., & Vanhems, P. (2006). Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Medicine*, 32(8), 1175-1183.

Motshwene, P. G., Moncrieffe, M. C., Grossmann, J. G., Kao, C., Ayaluru, M., Sandercock, A. M., Robinson, C. V., Latz, E., & Gay, N. J. (2009). An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25404-25411.

Nakashima, K., Hirota, T., Obara, K., Shimizu, M., Jodo, A., Kameda, M., Doi, S., Fujita, K., Shirakawa, T., Enomoto, T., Kishi, F., Yoshihara, S., Matsumoto, K., Saito H., Suzuki, Y., Nakamura, Y., & Tamari, M. (2006). An association study of asthma and related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway. *Journal of Human Genetics*, 51(4), 284-291.

Ochoa-Gondar, O., Vila-Córcoles, A., de Diego, C., Arija, V., Maxenchs, M., Grive, M., Martin, E., & Pinyol, J. L. (2008). The burden of community-acquired pneumonia in the elderly: the Spanish EVAN-65 study. *BMC Public Health*, 8(1), 222.

Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C. L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C. y cols (2003). Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*, 299(5615), 2076-2079.

Picard, C., Von Bernuth, H., Ghandil, P., Chrabieh, M., Levy, O., Arkwright, P. D., *et al* (2010). Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine*, 89(6), 403.

Ranzani, O. T., Prina, E., Menendez, R., Ceccato, A., Cilloniz, C., Mendez, R., *et al* (2017). New sepsis definition (Sepsis-3) and community-acquired pneumonia mortality. A validation and clinical decision-making study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 196(10), 1287-1297.

Saldías, P. F., & Díaz, P. O. (2014). Evaluación y manejo de la neumonía del adulto adquirida en la comunidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 553-564.

Saldías Peñafiel, F., Uribe Monasterio, J., Gassmann Poniachik, J., Canelo López, A., & Díaz Patiño, O. (2017). Evaluación de los índices predictores de eventos adversos en el adulto inmunocompetente hospitalizado por neumonía adquirida en la comunidad. *Revista Médica de Chile*, 145(6), 694-702.

Scotton, C. J., Martinez, F. O., Smelt, M. J., Sironi, M., Locati, M., Mantovani, A., & Sozzani, S. (2005). Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 β system by IL-13. *The Journal of Immunology*, 174(2), 834-845.

Seki, M., Kohno, S., Newstead, M. W., Zeng, X., Bhan, U., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., & Standiford, T. J. (2010). Critical role of IL-1 receptor-associated kinase-M in regulating chemokine-dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia. *The Journal of Immunology*, 184(3), 1410-1418.

Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., *et al* (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*, 315(8), 801-810.

Sode, J., Vogel, U., Bank, S., Andersen, P. S., Hetland, M. L., Loch, H., Heegaard, N. H. H., & Andersen, V. (2016). Confirmation of an IRAK3 polymorphism as a genetic marker

predicting response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics Journal*, 18(1):81-86

Su, J., Xie, Q., Wilson, I., & Li, L. (2007). Differential regulation and role of interleukin-1 receptor associated kinase-M in innate immunity signaling. *Cellular Signalling*, 19(7), 1596-1601.

Su, J., Zhang, T., Tyson, J., & Li, L. (2009). The Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase M selectively inhibits the alternative, instead of the classical NF κ B pathway. *Journal of Innate immunity*, 1(2), 164-174.

Sutherland, A. M., Walley, K. R., Nakada, T. A., Sham, A. H., Wurfel, M. M., & Russell, J. A. (2011). A nonsynonymous polymorphism of IRAK4 associated with increased prevalence of Gram-positive infection and decreased response to Toll-like receptor ligands. *Journal of Innate Immunity*, 3(5), 447-458.

Suzuki S, Suzuki GS, Duncan DG, Millar T, Wada C, Mirtsos H, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002; 416:750–6.

Suzuki, N., Suzuki, S., Millar, D. G., Unno, M., Hara, H., Calzascia, T., Yamasaki, S. y cols (2006). A critical role for the innate immune signaling molecule IRAK-4 in T cell activation. *Science*, 311(5769), 1927- 1932.

Turnis, M. E., Song, X. T., Bear, A., Foster, A. E., Gottschalk, S., Brenner, M. K., Chen, S. Y., & Rooney, C. M. (2010). IRAK-M removal counteracts dendritic cell vaccine deficits in migration and longevity. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4223-4232.

Vandesompele, J. (2008). qPCR guide. Eurogentec. EUA.

van der Windt, G. J., Blok, D. C., Hoogerwerf, J. J., Lammers, A. J., de Vos, A. F., Van't Veer, C., Florquin, S., Kobayashi, K. S., Flavell, R. A., & van der Poll, T. (2012). Interleukin 1 Receptor–Associated Kinase M Impairs Host Defense During Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(12), 1849- 1857.

van't Veer, C., van den Pangaart, P. S., van Zoelen, M. A., de Kruif, M., Birjmohun, R. S., Stroes, E. S., de Vos, A. F., & van der Poll, T. (2007). Induction of IRAK-M is associated

with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *The Journal of Immunology*, 179(10), 7110-7120.

Waitt, C. J., Peter K. Banda, N., White, S. A., Kampmann, B., Kumwenda, J., Heyderman, R. S., Pirmohamed, M., & Squire, S. B. (2011). Early deaths during tuberculosis treatment are associated with depressed innate responses, bacterial infection, and tuberculosis progression. *Journal of Infectious Diseases*, 204(3), 358-362.

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412, 346–51

Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C. J., Stark, G. R., & Cao, Z. (1999). IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19403-19410.

World Health Organization. (2018). The top 10 causes of death. WHO. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Xia, Q., Zhou, Y., Wang, X., & Fu, S. (2018). Interleukin-1 receptor-associated kinase 3 downregulation in peripheral blood mononuclear cells attenuates immunosuppression in sepsis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2), 1586-1593.

Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku CL, Casrouge A, et al. Human TLR-7- -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity* 2005; 23:465–78.

Yin, J., Yao, C. L., Liu, C. L., Song, Z. J., Tong, C. Y., & Huang, P. Z. (2012). Association of genetic variants in the IRAK-4 gene with susceptibility to severe sepsis. *World Journal of Emergency Medicine*, 3(2), 123.

Zeddou, M., Rahmouni, S., Vandamme, A., Jacobs, N., Fripiat, F., Leonard, P., Schaaf-Lafontaine, N., Vaira, D., Bonvier, J., & Moutschen, M. (2007). Downregulation of CD94/NKG2A inhibitory receptors on CD8+ T cells in HIV infection is more pronounced in subjects with detected viral load than in their aviraemic counterparts. *Retrovirology*, 4(1), 72.

Zhou, H., Yu, M., Fukuda, K., Im, J., Yao, P., Cui, W., *et al* (2013). IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NF κ B activation and cytokine production. *The EMBO Journal*, 32(4), 583-596.

VIII. ANEXOS

Anexo I. rs4251545 (c.1282G>A) de *irak-4*: género, detección de agentes y comorbilidades.

Tabla A1. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en mujeres con NAC clasificados por PSI y CURB-65

	No graves (PSI)	Graves (PSI)	P	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	P
n	40	55		45	50	
Genotipo GG (%)	65%	76,4%	0,22	62,2%	80%	0,05
Genotipo GA (%)	35%	23,6%		37,8%	20%	
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	82,5%	88,2%	0,26	81,1%	90%	0,07
Alelo A (%)	17,5%	11,8%		18,9%	10%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Tabla A2. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en hombres con NAC clasificados por PSI y CURB-65

	No graves (PSI)	Graves (PSI)	P	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	P
n	34	65		60	39	
Genotipo GG (%)	61,8%	77,0%	0,11	68,3%	76,9%	0,35
Genotipo GA (%)	35,3%	21,5%	0,13	30%	20,5%	0,29
Genotipo AA (%)	2,9%	1,5%	0,63	1,7%	2,6%	0,75
Alelo G (%)	79,4%	87,7%	0,12	87,2%	83,3%	0,46
Alelo A (%)	20,6%	12,3%		12,8%	16,7%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Tabla A3. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en adultos con NAC según detección de agente infeccioso

	Sin agente detectado	Agente detectado	p	Virus	Bacteria	p
n	76	117		66	31	
Genotipo GG (%)	65,8%	75,2%	0,15	80,3%	64,5%	0,09
Genotipo GA (%)	34,2%	23,1%	0,09	19,7%	35,5%	
Genotipo AA (%)	0%	1,7%	0,25	-	-	-
Alelo G (%)	82,9%	86,8%	0,29	90,2%	82,3%	0,11
Alelo A (%)	17,1%	13,2%		9,8%	17,7%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Tabla A4. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* según agente infeccioso detectado en adultos con NAC

	Virus	Mixto	p	Bacteria	Mixto	p
n	66	20		31	20	
Genotipo GG (%)	80,3%	75%	0,61	64,5%	75%	0,43
Genotipo GA (%)	19,7%	15%	0,63	35,5%	15%	0,11
Genotipo AA (%)	0%	10%	0,01	0%	10%	0,07
Alelo G (%)	79,4%	87,7%	0,12	87,2%	83,3%	0,46
Alelo A (%)	20,6%	12,3%		12,8%	16,7%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A5. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en adultos con NAC e HTA

	Sin HTA	HTA	p	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	109	82		66	31		53	29	
Genotipo GG (%)	73,4%	68,3%	0,44	55,9%	77,1%	0,04	60,4%	82,8%	0,03
Genotipo GA (%)	26,6%	29,3%	0,68	41,2%	20,8%	0,04	37,7%	13,8%	0,02
Genotipo AA (%)	0%	2,4%	0,10	2,9%	2,1%	0,80	1,9%	3,4%	0,66
Alelo G (%)	86,7%	82,9%	0,30	76,5%	87,5%	0,06	79,3%	89,7%	0,09
Alelo A (%)	13,3%	17,1%		23,5%	12,5%		20,8%	10,3%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A6. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en adultos con NAC y diabetes

	Sin diabetes	Diabetes	p	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	131	62		25	37		42	20	
Genotipo GG (%)	74,8%	64,5%	0,13	60%	67,6%	0,54	66,7%	60%	0,60
Genotipo GA (%)	24,4%	33,9%	0,16	40%	29,7%	0,40	33,3%	35%	0,89
Genotipo AA (%)	0,8%	1,6%	0,58	0%	2,7%	0,40	0%	5%	0,14
Alelo G (%)	87,0%	81,4%	0,14	80%	82,4%	0,73	83,3%	77,5%	0,43
Alelo A (%)	13,0%	18,6%		20%	17,6%		16,7%	22,5%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Tabla A7. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.1282G>A de *irak-4* en adultos con NAC y EPOC

	Sin EPOC	EPOC	p	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	147	47		21	26		32	15	
Genotipo GG (%)	70,1%	76,6%	0,38	61,9%	88,5%	0,03	71,9%	86,7%	0,26
Genotipo GA (%)	28,6%	23,4%	0,48	38,1%	11,5%		28,1%	13,3%	
Genotipo AA (%)	1,3%	0%	0,42	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	84,4%	88,3%	0,34	81%	94,2%	0,04	85,9%	93,3%	0,29
Alelo A (%)	15,6%	11,7%		19%	5,8%		14,1%	6,7%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$. En negrita se indican las diferencias significativas.

Anexo 2. rs1152888 (c.439A>G) de *irak-3*: género, detección de agentes y comorbilidades.

Tabla A8. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en mujeres con NAC clasificados por PSI y CURB-65

	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	40	55		45	50	
Genotipo GG (%)	90,6%	95,6%	0,33	93,3%	94%	0,89
Genotipo GA (%)	9,4%	4,4%		6,7%	6%	
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	95,3%	97,8%	0,33	96,7%	97%	0,89
Alelo A (%)	4,7%	2,2%		3,3%	3%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Tabla A9. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en hombres con NAC clasificados por PSI y CURB-65

	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	34	65		60	39	
Genotipo GG (%)	91,2%	86,1%	0,47	93,3%	79,5%	0,04
Genotipo GA (%)	8,8%	13,9%		6,7%	20,5%	
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	95,6%	93,1%	0,48	96,7%	10,3%	0,05
Alelo A (%)	4,4%	6,9%		3,3%	89,7%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A10. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en adultos con NAC según la detección de agente infeccioso

	Sin agente detectado	Agente detectado	p	Virus	Bacteria	p
n	76	117		66	31	
Genotipo GG (%)	93,4%	88,9%	0,29	90,9%	93,6%	0,66
Genotipo GA (%)	6,6%	11,1%		9,1%	6,4%	
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	96,7%	94,4%	0,30	95,5%	96,8%	0,66
Alelo A (%)	3,3%	5,6%		4,5%	3,2%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Tabla A11. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* según agente detectado en adultos con NAC

	Virus	Mixto	p	Bacteria	Mixto	p
n	66	20		31	20	
Genotipo GG (%)	90,9%	75%	0,06	93,6%	75%	0,06
Genotipo GA (%)	9,1%	25%		6,4%	25%	0,11
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	95,5%	87,5%	0,07	96,8%	87,5%	0,07
Alelo A (%)	4,5%	12,5%		3,2%	12,5%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Tabla A12. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en adultos con NAC e HTA

	Sin HTA	HTA	p	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	109	82		66	31		53	29	
Genotipo GG (%)	87,2%	95,1%	0,06	100%	91,7%	0,08	100%	86,2%	<0,01
Genotipo GA (%)	12,8%	4,9%		0%	8,3%		0%	13,8%	
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	93,6%	97,6%	0,07	100%	95,8%	0,09	100%	93,1%	<0,01
Alelo A (%)	6,4%	2,4%		0%	4,2%		0%	6,9%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A13. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en adultos con NAC y diabetes

	Sin diabetes	Diabetes	p	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	131	62		25	37		42	20	
Genotipo GG (%)	90,1%	91,9%	0,67	96%	89,2%	0,33	97,6%	80%	0,02
Genotipo GA (%)	9,9%	8,1%		4%	10,8%		2,4%	20%	
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	95%	96%	0,68	98%	94,6%	0,34	98,8%	90%	0,02
Alelo A (%)	5%	4%		2%	5,4%		1,2%	10%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A14. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo c.439A>G de *irak-3* en adultos con NAC y EPOC

	Sin EPOC	EPOC	p	No graves (PSI)	Graves (PSI)	p	No graves (CURB-65)	Graves (CURB-65)	p
n	147	47		21	26		32	15	
Genotipo GG (%)	91.8%	87.2%	0.34	81%	92.3%	0.25	87.5%	86.7%	0.94
Genotipo GA (%)	8.2%	12.8%		19%	7.7%		12.5%	13.3%	
Genotipo AA (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alelo G (%)	95.9%	93.6%	0.36	90.5%	96.2%	0.26	93.8%	93.3%	0.94
Alelo A (%)	4.1%	6.4%		9.5%	3.8%		6.2%	6.7%	

Para las frecuencias genotípicas y alélicas el análisis estadístico se realizó con el programa Unphased y la prueba de Armitage para la asociación alélica, considerándose significativo si $p < 0,05$.

Anexo 3. Haplotipos

Tabla A15. Haplotipos y frecuencia de los SNP c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* en 194 adultos con NAC según PSI, y evolución (y PSI)

	No Graves	Graves	p	No graves (Evolución)	Graves (Evolución)	p
n	91	103		71	123	
Genotipo GG-GG	57%	71%	0,04	60%	67%	0,39
Genotipo GG-GA	6%	9%	0,38	6%	8%	0,52
Genotipo GA-GG	34%	18%	0,01	30%	24%	0,36
Genotipo GA-GA	2%	1%	0,49	3%	<1%	0,28
Genotipo AA-GG	1%	0%	0,29	1%	0%	0,19
Genotipo AA-GA	0%	1%	0,34	0%	<1%	0,45
Haplotipo G-G	77%	85%	0,07	79%	83%	0,34
Haplotipo G-A	4%	5%	0,5	4%	4%	0,72
Haplotipo A-G	19%	10%	0,01	17%	13%	0,21
Haplotipo A-A	<1%	<1%	0,76	<1%	<1%	0,91

El análisis estadístico se realizó con el programa Unphased, considerándose significativo si $p < 0,05$. El primer genotipo y alelo de cada fila corresponden al SNP c.1282G>A de *irak-4*. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A16. Haplotipos y frecuencia de los SNP c.1282G>A de *irak-4* y c.439A>G de *irak-3* en 194 adultos con NAC según CURB-65, y evolución (y CURB-65)

	No Graves	Graves	p	No graves (Evolución)	Graves (Evolución)	p
n	129	65		94	100	
Genotipo GG-GG	62%	69%	0,32	62%	67%	0,47
Genotipo GG-GA	5%	12%	>0,05	5%	10%	0,22
Genotipo GA-GG	31%	15%	0,02	30%	21%	0,17
Genotipo GA-GA	2%	2%	>0,99	2%	1%	0,60
Genotipo AA-GG	<1%	0%	0,48	1%	0%	0,33
Genotipo AA-GA	0%	2%	0,16	0%	1%	0,30
Haplotipo G-G	80%	84%	0,43	80%	83%	0,49
Haplotipo G-A	3%	6%	0,06	3%	5%	0,29
Haplotipo A-G	17%	9%	0,04	17%	11%	0,15
Haplotipo A-A	<1%	1%	0,28	<1%	<1%	0,63

El análisis estadístico se realizó con el programa Unphased, considerándose significativo si $p < 0,05$. El primer genotipo y alelo de cada fila corresponden al SNP c.1282G>A de *irak-4*. En negrita se indican las diferencias significativas.

Anexo 4. Expresión génica de IRAK-4: edad, sexo, comorbilidades, sepsis y agentes detectados

Tabla A17. Expresión génica de IRAK-4 en 121 adultos con NAC de acuerdo a edad y sexo

	< 60 años	≥ 60 años	p	< 65 años	≥ 65 años	p	Mujeres	Hombres	p
n	33	88	0,35	39	82	0,45	62	57	0,03
Vc	1	0,73		1	0,72		1	1,98	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos < 60 años, <65 años y mujeres como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p < 0,05$) mediante el programa Graphpad 8. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A18. Expresión génica de IRAK-4 en adultos con NAC de acuerdo al agente detectado

Tipo de agente	n	Vc	p
Sin agente detectado	48	1	0,85
Con agente detectado	71	0,86	
Virus	47	1	0,91
Bacteria	18	0,89	
Virus	47	1	0,79
Mixto	7	2,32	
Bacteria	18	1	0,28
Mixto	7	3,8	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p < 0,05$) mediante el programa Graphpad 8

Tabla A19. Expresión génica de IRAK-4 en adultos con NAC e HTA

	Sin HTA	Con HTA	p	HTA No graves (PSI)	HTA Graves (PSI)	p	HTA No graves (CURB-65)	HTA No graves (CURB-65)	p
n	68	50	0,75	26	24	0,61	32	18	0,83
Vc	1	1,13		1	1,10		1	0,77	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin HTA, HTA no graves (PSI) y no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$) mediante el programa Graphpad 8.

Tabla A20. Expresión génica de IRAK-4 en adultos con NAC y diabetes

	Sin diabetes	Con diabetes	p	Diabetes No graves (PSI)	Diabetes Graves (PSI)	p	Diabetes No graves (CURB-65)	Diabetes No graves (CURB-65)	p
n	83	37	0,93	17	20	0,27	24	13	0,16
Vc	1	0,86		1	0,37		1	0,32	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin diabetes, diabetes no graves (PSI) y diabetes no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$) mediante el programa Graphpad 8.

Tabla A21. Expresión génica de IRAK-4 en adultos con NAC y EPOC

	Sin EPOC	Con EPOC	p	EPOC No graves (PSI)	EPOC Graves (PSI)	p	EPOC No graves (CURB-65)	EPOC No graves (CURB-65)	p
n	89	32	0,02	16	16	0,38	21	11	0,87
Vc	1	0,47		1	0,59		1	0,84	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin EPOC, EPOC no graves (PSI) y EPOC no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$) mediante el programa Graphpad 8. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A22. Expresión génica de IRAK-4 en adultos con NAC y sepsis

	Sin Sepsis	Con Sepsis	p	Sepsis No graves (PSI)	Sepsis Graves (PSI)	p	Sepsis No graves (CURB-65)	Sepsis No graves (CURB-65)	p
n	97	26	0,07	13	13	0,79	16	10	0,79
Vc	1	2,36		1	2,38		1	2,76	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin Sepsis, Sepsis no graves (PSI) y Sepsis no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$) mediante el programa Graphpad 8.

Anexo 5. Expresión génica de IRAK-M: edad, sexo, comorbilidades, sepsis y agentes detectados

Tabla A23. Expresión génica de IRAK-M en 170 adultos con NAC de acuerdo a edad y sexo

	< 60 años	\geq 60 años	p	< 65 años	\geq 65 años	p	Mujeres	Hombres	p
n	45	125	0,99	58	112	0,59	83	86	0,04
Vc	1	1,05		1	1,21		1	1,81	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos < 60 años, <65 años y mujeres como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p<0,05$) mediante el programa Graphpad 8. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A24. Expresión génica de IRAK-M en adultos con NAC de acuerdo al agente detectado

Tipo de agente	n	Vc	p
Sin agente detectado	67	1	0,61
Con agente detectado	101	0,75	
Virus	61	1	0,58
Bacteria	26	0,80	
Virus	61	1	0,36
Mixto	14	1	
Bacteria	26	1	0,34
Mixto	14	1,3	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p < 0,05$) mediante el programa Graphpad 8

Tabla A25. Expresión génica de IRAK-M en adultos con NAC e HTA

	Sin HTA	Con HTA	p	HTA No graves (PSI)	HTA Graves (PSI)	p	HTA No graves (CURB-65)	HTA No graves (CURB-65)	p
n	97	70	0,75	26	24	0,61	32	18	0,83
Vc	1	1,74		1	1,10		1	0,77	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin HTA, HTA no graves (PSI) y no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$) mediante el programa Graphpad 8.

Tabla A26. Expresión génica de IRAK-M en adultos con NAC y diabetes

	Sin diabetes	Con diabetes	p	Diabetes No graves (PSI)	Diabetes Graves (PSI)	p	Diabetes No graves (CURB-65)	Diabetes No graves (CURB-65)	p
n	122	52	0,33	23	29	0,87	37	15	0,88
Vc	1	0,6		1	1,15		1	1,15	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin diabetes, diabetes no graves (PSI) y diabetes no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p > 0,05$) mediante el programa Graphpad 8.

Tabla A27. Expresión génica de IRAK-M en adultos con NAC y EPOC

	Sin EPOC	Con EPOC	p	EPOC No graves (PSI)	EPOC Graves (PSI)	p	EPOC No graves (CURB-65)	EPOC No graves (CURB-65)	p
n	129	46	0,04	20	24	0,28	29	15	0,42
Vc	1	0,44		1	1,44		1	1,29	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin EPOC, EPOC no graves (PSI) y EPOC no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$) mediante el programa Graphpad 8. En negrita se indican las diferencias significativas.

Tabla A28. Expresión génica de IRAK-M en adultos con NAC y sepsis

	Sin Sepsis	Con Sepsis	p	Sepsis No graves (PSI)	Sepsis Graves (PSI)	p	Sepsis No graves (CURB-65)	Sepsis No graves (CURB-65)	p
n	132	42	0,45	17	25	0,46	30	12	0,69
Vc	1	1,37		1	1,15		1	0,59	

Se utilizó β -tubulina como gen normalizador y los grupos: sin Sepsis, Sepsis no graves (PSI) y Sepsis no graves (CURB-65) como grupos control, respectivamente. Las veces de cambio se obtuvo con el valor de mediana del grupo control, siendo la mediana de estos grupos= 1. Se utilizó la prueba Mann Whitney ($p>0,05$) mediante el programa Graphpad 8.

Anexo 6. Aprobación comités de ética y consentimiento informado



11 ABR. 2017

ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 11 de Abril de 2017, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria Ejecutiva
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular
Dra. María Angela Delucchi Bicocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Infectólogo

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"NEW CLINICAL BIOMARKERS OF IMMUNODEFICIENCY AND SEVERITY IN ADULTS WITH COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA"**. Y cuyo investigador responsable es la Dra. Vivian Luchsinger, quien desempeña funciones en Programa de Virología, ICBM, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso.*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores.*
- *Carta de aceptación de las autoridades de las instituciones en que se realizará el estudio.*
- *Consentimiento Informado.*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:



- a) Carácter de la población estudiada: Cautiva / no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Encontrar biomarcadores de severidad de NAC en población adulta.
- c) Riesgos y Beneficios: Riesgo mínimo (dos muestras de sangre)
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Adecuado
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: No corresponde
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto. Sí.

11 ABR. 2017

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó los correspondientes documentos de Consentimiento Informado en su versión original recibida el 27 de Marzo de 2017, que se adjunta firmado, fechado y timbrados por este CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio:

1. PROGRAMA DE VIROLOGÍA, ICBM, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

Santiago, 11 de Abril de 2017.



Prof. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

c.c: - Archivo Proyecto N° 030-2017.
- Acta N° 009

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
ADULTOS ASINTOMÁTICOS

Versión 1 17 de Marzo 2017



11 ABR. 2017

TITULO DEL PROYECTO

NUEVOS BIOMARCADORES CLÍNICOS DE INMUNODEFICIENCIA Y GRAVEDAD EN ADULTOS CON NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

Nombre del Investigador Responsable: Dra. Vivian Luchsinger F.
Institución: Programa de Virología, ICBM; Facultad de Medicina, U. de Chile.
Teléfonos: 229786319

Financiado por Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología FONDECYT de Chile

Nº Registro:

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación “Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad” debido a que usted no presenta síntomas de infección respiratoria ni neumonía.

La neumonía es una infección del pulmón frecuente en el adulto, producida generalmente por bacterias y/o por virus, que puede ser más o menos grave, siendo necesario identificar elementos que indiquen la evolución de esta enfermedad para mejorar el tratamiento de cada paciente.

Antes de tomar la decisión de participar lea atentamente este documento.

Esta investigación tiene por objetivo determinar marcadores de la respuesta inmune (respuesta de defensa) que predigan la evolución de la neumonía adquirida en la comunidad producida por virus y/o bacterias en el adulto, para lo cual se estudiarán variaciones en algunos genes, su expresión y si los productos de estos tienen actividad biológica.

El estudio incluirá a un número total de 20 adultos sin síntomas de enfermedades respiratorias y 470 adultos ingresados al hospital Dr. Lucio Córdova, al hospital Clínico de la U. de Chile, y al Complejo Hospitalario San José, de Santiago, que voluntariamente acepten participar.

Si Ud. acepta participar se le tomará una muestra respiratoria, una de orina y sangre por una vez al ingresar al estudio. Se tomarán:

- a) una muestra respiratoria para estudiar la presencia de bacterias y virus. Esta muestra se obtiene con un cepillo sintético muy pequeño que se introduce en cada uno de los orificios de la nariz por una vez.
- b) una muestra de orina para detectar la presencia de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Para esto usted debe depositar 5 ml de su orina en un frasco de plástico.

11 ABR. 2017



- c) una muestra de 10 ml de sangre (2 cucharaditas de té) para estudiar las concentraciones de anticuerpos, las células de la respuesta defensiva y la expresión de algunos genes relacionados con esta respuesta de defensa. Para obtener esta muestra con una aguja muy fina se pincha una vena, generalmente la de un brazo.

Las muestras serán tomadas en el Programa de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago.

La participación en este estudio no constituye ningún riesgo extraordinario, puesto que el procedimiento para obtener la muestra de sangre es el mismo que se realiza para otros exámenes de sangre. Es habitual que este procedimiento cause dolor, pero es de corta duración. La obtención de la muestra de orina y de secreción respiratoria no tiene riesgos, aunque es posible que sienta deseos de estornudar o toser con la toma de la muestra respiratoria. Cualquier efecto que Ud. considere que pueda derivarse de estos procedimientos, deberá comunicarlo a la Dra. Vivian Luchsinger, investigadora responsable del estudio, en el teléfono 229786319.

Los elementos necesarios para tomar las muestras y realizar las técnicas serán aportados por este proyecto que es financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), por lo que son sin costo alguno para Ud., por lo que su participación no representa gastos adicionales ni para usted.

Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, por su participación en este proyecto el resultado del estudio de virus y bacterias de sus muestras se le comunicará a usted mediante una carta entregada en persona.

Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Su privacidad será protegida porque sus datos y muestras no serán identificados con su nombre, sólo con un código.

Las muestras solicitadas para este proyecto sólo serán utilizadas en este estudio. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento, incluso después que la muestra haya sido tomada. En este caso, la muestra será destruida y no podrá ser utilizada en este ni en ningún otro estudio. Si usted no desea participar en este estudio, no habrá ninguna consecuencia para usted.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador. De igual manera el investigador podrá determinar su retiro del estudio si considera que esa decisión va en su beneficio.

Usted recibirá una copia de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con: Investigador: Dra. Vivian Luchsinger F. Teléfono: 229786319. En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca

Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

De acuerdo al artículo 13, de la Ley N° 19.628, en ningún caso las personas pierden el derecho a la información, modificación, cancelación, o bloqueo de sus datos personales por entrega de muestras biológicas.

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto " Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad".



11 ABR. 2017

Nombre del sujeto
Rut.

Firma

Nombre del Informante
Rut.

Firma

Nombre del Investigador
Rut.

Firma

Fecha:

ACTA DE APROBACION N° 12

Santiago, 12 abril de 2017.

El Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Antonio Morales Barría. Médico Gastroenterólogo. Presidente
Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Vicepresidente
Prof. Verónica Anguita Mackay. Académico. Secretaria de Acta
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Gineco-Obstetra
Dr. Juan Carlos Prieto D. Médico Farmacología Clínica
Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado.
Dra. Gloria López Stewart. Médico Endocrinóloga.
Dra. Teresa Massardo Vega. Médico Cirujano.
Dr. Juan Jorge Silva. Médico Cirujano.

Ha analizado el Proyecto "**Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad**", cuya investigadora principal es la **Dra. Viviana Luchsinger Farías de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Participa como investigador responsable en nuestra institución, el Dr. Mauricio Ruiz Carmona de la Sección de Neumología, quienes realizarán el proyecto en este mismo departamento del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.**

Para estos efectos se tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Carta de presentación a Comité.
- Formulario de Solicitud de Evaluación de Proyecto de Investigación por Comité.
- Carta de compromiso de la investigadora.
- Curriculum vitae de la investigadora.
- Protocolo de proyecto.
- Resumen de proyecto.
- Consentimiento Informado Versión 1 de marzo de 2017.

El Proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres humanos CIOMS 2002, de las Guías de Buenas Prácticas Clínicas de ICH y Normativa Nacional Vigente.



Comité Ético Científico - Teléfono: (+56) 22978 9008 - Email: comiteetica@hcuch.cl
www.redclinica.cl - mesa central (+56) 22978 8000 - Santos Dumont 999, Independencia - RM



a) Carácter de la población estudiada

No cautiva, no terapéutica.

b) Utilidad del Proyecto

Buena.

c) Riesgos

Controlados.

d) Beneficios

Adecuados.

e) Confidencialidad del Estudio

La investigadora principal asegura la confidencialidad de todos los datos.

Por lo tanto, el Comité estima que el Estudio propuesto estuvo bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores.
El consentimiento informado es adecuado en forma y fondo.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la Aprobación Ética para la realización del Estudio propuesto, en sesión del día 12 de abril de 2017, la que se extiende por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. Se adjunta nómina de los integrantes del Comité presentes en la sesión y Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

Se debe tener presente que se debe realizar:

- Envío para aprobación o toma de conocimiento de nueva documentación relacionada al estudio.
- Cambio en los Delegados del Director de la Institución.
- Notificación de reacciones adversas serias o no serias, en que las serias deben ser notificadas en un plazo de 72 horas hábiles de ocurrido el evento.
- Enviar Semestralmente avances del Proyecto.
- Solicitud de Extensión de plazo de aprobación.
- Enviar Informe Final del Proyecto.

Los ítems mínimos que deben contener los informes semestrales y finales, son los siguientes:

- Cumplimiento de los objetivos
- Numero de Sujetos enrolados
- Número y motivo de los sujetos que abandonan o se retiran

Saluda atentamente a Ud.



DRA. ANA MARIA MADRID
PRESIDENTE (S) DEL COMITE ETICO CIENTIFICO
HOSPITAL CLINICO U. DE CHILE



Comité Ético Científico - Teléfono: (+56) 22978 9008 - Email: comiteetica@hcuch.cl
www.redclinica.cl - mesa central (+56) 22978 8000 - Santos Dumont 999, Independencia - RM





DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Versión 1 Marzo 2017

TITULO DEL PROYECTO

NUEVOS BIOMARCADORES CLÍNICOS DE INMUNODEFICIENCIA Y GRAVEDAD EN ADULTOS CON NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

Nombre del Investigador: Dr. Mauricio Ruiz C, Jefe Sección de Enfermedades Respiratorias

Institución: Hospital Clínico U. de Chile

Teléfonos: 229788409

Departamento: de Medicina Norte

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad" debido a que a usted se le ha diagnosticado una neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Esta es una infección del pulmón frecuente en el adulto, producida generalmente por bacterias y/o por virus, que puede ser más o menos grave, siendo necesario identificar elementos que indiquen como evolucionará la enfermedad para mejorar el tratamiento de cada paciente.

Esta invitación está dirigida al Tutor legal/familiar directo en aquellos casos que el representado no pueda manifestarse por presentar compromiso de conciencia.

Antes de tomar la decisión de participar lea atentamente este documento.

Objetivo: Esta investigación tiene por objetivo determinar marcadores de la respuesta inmune (respuesta de defensa) que predigan la evolución de la neumonía adquirida en la comunidad producida por virus y/o bacterias en el adulto, para lo cual se estudiarán variaciones en algunos genes, su expresión y si los productos de estos tienen actividad biológica.

El estudio incluirá a un número total de 470 adultos ingresados al hospital Clínico de la U. de Chile, al hospital Dr. Lucio Córdova y al Complejo Hospitalario San José, de Santiago. También se estudiarán 20 adultos sin síntomas ni enfermedades respiratorias, que voluntariamente deseen participar.

Procedimientos: Si Ud. acepta participar se le tomará una muestra respiratoria, una de orina y sangre al ingresar al estudio, y otra de sangre al mes de haber sido dado de alta del hospital. Se tomarán:

a) una muestra respiratoria para estudiar la presencia de bacterias y virus. Esta muestra se obtiene con un cepillo muy pequeño con una sonda de plástico muy delgada que se introduce en cada uno de los orificios de la nariz por una vez. Si su médico tratante considera necesario tomar otro tipo de muestra respiratoria, como el lavado bronquioalveolar, le solicitamos su consentimiento para utilizar parte de esta muestra en este estudio.

b) una muestra de orina para detectar la presencia de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Para esto usted debe depositar 5 ml de su orina en un frasco de plástico.



- c) una muestra de 10 ml de sangre (2 cucharaditas de té) para estudiar las concentraciones de citoquinas, las células de la respuesta defensiva y la expresión de algunos genes relacionados con esta respuesta de defensa. Para obtener esta muestra con una aguja muy fina se pincha una vena, generalmente la de un brazo.

Las muestras serán tomadas por una enfermera del hospital contratada por el proyecto para este fin y después de obtenidas se trasladarán para su estudio al Programa de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago.

Riesgos: La participación en este estudio no constituye ningún riesgo extraordinario, puesto que el procedimiento para obtener la muestra de sangre es el mismo que se realiza para otros exámenes de sangre. Es habitual que este procedimiento cause dolor, pero es de corta duración. La obtención de la muestra de orina y de secreción respiratoria no tiene riesgos, aunque es posible que sienta deseos de estornudar o toser con la toma de la muestra respiratoria. Cualquier efecto que Ud. considere que pueda derivarse de estos procedimientos, deberá comunicarlo a la Dra. Vivian Luchsinger, investigadora responsable del estudio, en el teléfono 229786102 o al celular 92514968, o al Dr. Mauricio Ruiz, en el teléfono 229788409, Departamento: de Medicina Norte del Hospital Clínico U. de Chile.

Costos: Los elementos necesarios para tomar las muestras y realizar las técnicas serán aportados por este proyecto que es financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), por lo que son sin costo alguno para Ud., por lo que su participación no representa gastos adicionales ni para usted ni para el hospital.

Beneficios: Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, por su participación en este proyecto el resultado del estudio de virus y bacterias de sus muestras se comunicará a su médico tratante.

Compensación: Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Su privacidad será protegida porque sus datos y muestras no serán identificados con su nombre, sólo con un código.

Las muestras solicitadas para este proyecto sólo serán utilizadas en este estudio y serán eliminadas después del término del estudio. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento, incluso después que la muestra haya sido tomada. En este caso, la muestra será destruida y no podrá ser utilizada en este ni en ningún otro estudio. Si usted no desea participar en este estudio, no habrá ninguna consecuencia para usted.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.



Derechos del participante: Usted recibirá una copia de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con: Investigador: Dra. Vivian Luchsinger F. Teléfono: 229786102 o con el Dr. Mauricio Ruiz, en el teléfono 229788409, del Departamento: de Medicina Norte del Hospital Clínico U. de Chile.

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos comunicarse con el Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico Universidad de Chile, Teléfono: 29789008, Email: comiteetica@hcuch.cl, ubicado en Santos Dumont N° 999, 4 Piso Sector D, Comuna de Independencia, Santiago.

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad".

Nombre del sujeto
Rut.

Firma

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, como Tutor legal/familiar directo, otorgo mi consentimiento para la participación de mi representado en el proyecto "Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad".

Nombre del Tutor
Rut.

Firma

Nombre del Investigador
Rut.

Firma

Nombre del Director o Delegado
Rut:

Firma

Fecha/Hora:



3 de 3



Dirección
Comité de Ética de la Investigación
Carta N° 075/2017
Dr. CNC/lcc

Santiago, abril 21 de 2017

Dra. Vivian Luchsinger
Investigadora Responsable
Programa de Virología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Presente

Proyecto FONDECYT REGULAR 2017

Ref.: Título del Estudio: "Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad".

Estimada Dra. Luchsinger:

Por medio de la presente acuso recibo de su carta de fecha 11 de abril de 2017 por la cual solicita autorizar el desarrollo del proyecto de la referencia que incluye pacientes atendidos en el Hospital San José donde participa como colaborador el Dr. Patricio Rossi, médico del Servicio de Medicina, proyecto que ha sido Aprobado por el Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Sur.

A continuación le incluyo el Artículo 10 del Reglamento de la Ley 20.120, en el cual queda establecido que la aprobación por parte de un Comité Acreditado permite la realización de un estudio en todo el territorio nacional, por lo que una aprobación por este Comité sería redundante.

Artículo 10.- Toda investigación científica en seres humanos a realizarse en el país sólo podrá llevarse a cabo si cuenta con una revisión e informe favorable de un Comité Ético Científico acreditado por la Autoridad Sanitaria e independiente del equipo de investigación.

En los casos de los estudios multicéntrico, la revisión científica y ética se realizará por un solo comité acreditado, debiendo ser complementada por una evaluación local relacionada con los investigadores e instituciones que participan en ese nivel para verificar la factibilidad del estudio en sus comunidades, incluyendo la infraestructura, el nivel de capacitación y las consideraciones éticas locales significativas.

La saluda atentamente,

CEI-SSM.NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte


DR. CARLOS NAVARRO COX
PRESIDENTE - CEI-SSMN

Calle San José 1053,
Independencia, Santiago, Chile
Fono (56-2) 2575 8506
lorena.carrasco@redsalud.gov.cl
www.ssmn.cl



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Versión 1 17 de Marzo 2017

TITULO DEL PROYECTO

NUEVOS BIOMARCADORES CLÍNICOS DE INMUNODEFICIENCIA Y GRAVEDAD EN ADULTOS CON NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

Nombre del Investigador Responsable: Dra. Vivian Luchsinger F.
Institución: Programa de Virología, ICBM; Facultad de Medicina, U. de Chile.
Teléfonos: 229786319

Financiado por Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología FONDECYT de Chile

Nº Registro:

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación “Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad” debido a que a usted se le ha diagnosticado una neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Esta es una infección del pulmón frecuente en el adulto, producida generalmente por bacterias y/o por virus, que puede ser más o menos grave, siendo necesario identificar elementos que indiquen como evolucionará la enfermedad para mejorar el tratamiento de cada paciente.

Esta invitación está dirigida al Tutor legal/familiar directo en aquellos casos que el representado no pueda manifestarse por presentar compromiso de conciencia.

Antes de tomar la decisión de participar lea atentamente este documento.

Esta investigación tiene por objetivo determinar marcadores de la respuesta inmune (respuesta de defensa) que predigan la evolución de la neumonía adquirida en la comunidad producida por virus y/o bacterias en el adulto, para lo cual se estudiarán variaciones en algunos genes, su expresión y si los productos de estos tienen actividad biológica.

El estudio incluirá a un número total de 470 adultos ingresados al hospital Dr. Lucio Córdova, al hospital Clínico de la U. de Chile, y al Complejo Hospitalario San José, de Santiago. También se estudiarán 20 adultos sin síntomas ni enfermedades respiratorias, que voluntariamente deseen participar.

Si Ud. acepta participar se le tomará una muestra respiratoria, una de orina y sangre al ingresar al estudio, y otra de sangre al mes de haber sido dado de alta del hospital. Se tomarán:

- a) una muestra respiratoria para estudiar la presencia de bacterias y virus. Esta muestra se obtiene con un cepillo muy pequeño con una sonda de plástico muy delgada que se introduce en cada uno de los orificios de la nariz por una vez. Si su médico tratante considera necesario tomar otro tipo de muestra respiratoria, como el lavado bronquioalveolar, le solicitamos su consentimiento para utilizar parte de esta muestra en este estudio.
- b) una muestra de orina para detectar la presencia de la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Para esto usted debe depositar 5 ml de su orina en un frasco de plástico.
- c) una muestra de 10 ml de sangre (2 cucharaditas de té) para estudiar las concentraciones de citoquinas, las células de la respuesta defensiva y la expresión de algunos genes relacionados con esta respuesta de

defensa. Para obtener esta muestra con una aguja muy fina se pincha una vena, generalmente la de un brazo.

Las muestras serán tomadas por una enfermera del hospital contratada por el proyecto para este fin y después de obtenidas se trasladarán para su estudio al Programa de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago.

La participación en este estudio no constituye ningún riesgo extraordinario, puesto que el procedimiento para obtener la muestra de sangre es el mismo que se realiza para otros exámenes de sangre. Es habitual que este procedimiento cause dolor, pero es de corta duración. La obtención de la muestra de orina y de secreción respiratoria no tiene riesgos, aunque es posible que sienta deseos de estornudar o toser con la toma de la muestra respiratoria. Cualquier efecto que Ud. considere que pueda derivarse de estos procedimientos, deberá comunicarlo a la Dra. Vivian Luchsinger, investigadora responsable del estudio, en el teléfono 229786102 o al celular 92514968.

Los elementos necesarios para tomar las muestras y realizar las técnicas serán aportados por este proyecto que es financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), por lo que son sin costo alguno para Ud., por lo que su participación no representa gastos adicionales ni para usted ni para el hospital.

Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, por su participación en este proyecto el resultado del estudio de virus y bacterias de sus muestras se comunicará a su médico tratante.

Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Su privacidad será protegida porque sus datos y muestras no serán identificados con su nombre, sólo con un código.

Las muestras solicitadas para este proyecto sólo serán utilizadas en este estudio. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento, incluso después que la muestra haya sido tomada. En este caso, la muestra será destruida y no podrá ser utilizada en este ni en ningún otro estudio. Si usted no desea participar en este estudio, no habrá ninguna consecuencia para usted.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

Usted recibirá una copia de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con: Investigador: Dra. Vivian Luchsinger F. Teléfono: 229786319 o al Comité de Ética Científica del Servicio de Salud Metropolitano Sur, Sra. Verónica Rivera, fonos: 225763736. Esta consulta será absolutamente gratuita.

De acuerdo al artículo 13, de la Ley N° 19.628, en ningún caso las personas pierden el derecho a la información, modificación, cancelación, o bloqueo de sus datos personales por entrega de muestras biológicas.

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto” Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad”.

Nombre del sujeto
Rut.

Firma

Fecha

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, como Tutor legal/familiar directo, otorgo mi consentimiento para la participación de mi representado en el proyecto” Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad”.

Nombre del Tutor
Rut.

Firma

Nombre del Informante
Rut.

Firma

Nombre del Investigador
Rut.

Firma

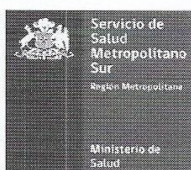
Nombre del Director o Delegado
Rut:

Firma

Nombre del Ministro de Fe
Rut:

Firma

Fecha:



COMITÉ ETICO CIENTIFICO

Q.F.VRS/cml

MEMORANDUM Nº 142/2017

MAT.: Resultado de evaluación de estudio.

SANTIAGO, 04 de abril de 2017

DE : Q.F. VERONICA RIVERA SCIARAFFIA
PRESIDENTA
COMITÉ ETICO CIENTIFICO
S.S.M.S.

A : **DRA. VIVIAN LUCHSINGER FARIAS**
INVESTIGADORA RESPONSABLE
HOSPITAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
DR. LUCIO CORDOVA

Informamos a Ud. que los miembros del Comité Ético Científico (CEC) del Servicio de Salud Metropolitano Sur (SSMS), en sesión del 28/03/2017, tomaron conocimiento de los siguientes antecedentes, correspondientes del Estudio de Investigación "Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad", remitidos mediante carta recepcionada el 24/03/2017:

- I. **Antecedentes revisados y evaluados por Directiva del CEC S.S.M.S en reunión del 28/03/2017:** (se adjunta asistencia)
1. Carta de Investigadora Responsable, fechada 16/03/2017, dirigida a la Pdta. CEC. S.S.M.S., solicitando evaluación de Estudio de Investigación.
 2. Carta Conocimiento, Eventual Autorización y Respaldo del Estudio "Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad", dirigida a la Pdta. C.E.C. S.S.M.S., firmada por la Dr. Mariano Moreno Boza, Director (S) del Hospital de Enfermedades Infecciosas Dr. Lucio Cordova, fechada el 20/03/17.
 3. Estudio "Nuevos biomarcadores clínicos de inmunodeficiencia y gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad". (2 copias)
 4. Consentimiento Informado, versión 1, 17 de marzo 2017. (copias)
 5. Solicitud de Liberación de Pago, fechada 17/03/2017, dirigida al Director S.S.M.S., Dr. Osvaldo Salgado Zepeda, firmada por el Investigadora Principal/Responsable, Dra. Vivian Luchsinger Farias.
 6. Curriculum Vitae de Investigadora Principal/Responsable, Dra. Vivian Luchsinger Farias.
 7. Curriculum Vitae de Co- investigadores y colaboradores del estudio indicado.
 8. Certificado que indica formación en Bioética de Investigadora Principal/Responsable. (Serial:010375 date: 06/01/09).
 9. Certificado Investigador Responsable/Principal con fecha 17/03/17, que indica que el estudio financiará todos los costos correspondientes a insumos requeridos para la toma de muestras de los pacientes y personal de salud que se contrate para los fines del estudio.
 10. Cartas compromisos cumplimiento de Buenas Prácticas Clínicas de Investigadora Principal/Responsable Dra. Vivian Luchsinger Farias y Co-Investigador Dr. Rolando Pizarro Prado.

II. Por lo anterior, los miembros del CEC S.S.M.S., determinan, con fecha **28/03/2017**, que **el Estudio no presenta reparos Éticos y lo aprueban**, se remite **firmado, timbrado y fechado**:

- Consentimiento Informado, versión 1, 17 de marzo 2017

III. Además, se adjuntan los siguientes documentos:

- Asistencia de la Reunión del Comité Ético Científico del S.S.M.S.
- Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas, Versión 2.0, actualizada el 21/10/14, en Sesión del CEC del S.S.M. Sur.
- Anexo.

Solicitamos a Ud. lo siguiente:

1. Usar los Consentimientos Informados validados por este Comité, si corresponde.
2. La validez de esta aprobación es por un año, al cabo del cual con el Informe correspondiente debe solicitar su renovación y conservar toda la documentación en su poder, por lo menos, hasta cinco años cerrado el estudio.

Además, debe comunicar a este Comité lo siguiente:

1. Eventos observados asociados y no asociados con el estudio.
2. Cualquier antecedente importante que se observe durante la ejecución de la investigación.
3. Finalizado el estudio, remitir informe, que incluya el número de sujetos enrolados y el número de los que rechazaron, entre otros.

Saludan atentamente,

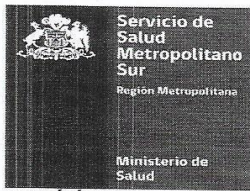


Q.F. VERÓNICA RIVERA SCIARAFFIA
PRESIDENTA
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
S.S.M.S.

DR. HECTOR JORQUERA VERGARA
SECRETARIO
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
S.S.M.S.

C./c.:

- Director: Hospital de Enfermedades Infecciosas DR. Lucio Cordova.
- **Archivo Memos C.E.C. S.S.M.S.**
- Archivo Protocolo.



COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
Q.F.VRS/ero.-

**SESION AMPLIADA DEL COMITÉ ETICO CIENTIFICO
SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO SUR**

FECHA: 28/03/2017

(Según Resolución Exenta N° 1974 del 14-10-15)

ASISTENCIA INTEGRANTES DE LA DIRECTIVA C.E.C.

1. Q.F. C. Verónica Rivera Sciaraffia Presidenta	
2. Dra. Eliana Cortéz Quezada Vice-Presidenta	—
3. Dr. Héctor Jorquera Vergara Secretario	
4. Nut. María Galleguillos Guerra Vice-Presidenta (S)	
5. Q.F. Cecilia Toro Martínez Secretaria (S)	

ASISTENCIA INTEGRANTES C.E.C.

<u>NOMBRE</u>	<u>FIRMA</u>
1. Proc. Wilto Ahumada Arias	
2. Sra. Verónica Arancibia Lucero	
3. Dr. Rogelio Aravena Bermúdez	
4. Q.F. María Angélica Lagos Valdivia	
5. T.S. Mireya Muñoz Acevedo	
6. Sr. Jaime Valenzuela Méndez	
7. Dra. Pilar Zárraga Olavarría	