

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***ASOCIACIÓN DEL EJE IL-7/IL-7R CON LA GRAVEDAD  
EN ADULTOS CON NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA  
COMUNIDAD***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Clínica Aplicada y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***GUILLERMO ANDRÉS BAHAMONDE ARAVENA***

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

**Santiago-CHILE**

**Mayo 2021**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

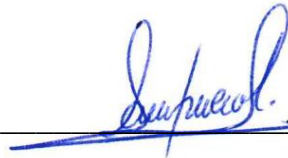
Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**Guillermo Andrés Bahamonde Aravena**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Clínica Aplicada y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Directora de Tesis:

Dra. Sandra Ampuero Llanos



---

Directora de Tesis:

Dra. Vivian Luchsinger Farias



---

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lorena García

---

Dr. Javier Puente

---

Dr. Sergio Vargas

---

# FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el proyecto de FONDECYT regular 1171643.

## PRESENTACIONES A CONGRESOS

Vivian Luchsinger, **Guillermo Bahamonde**, Luis Lizama, Ariel Toledo, Alfonso Warnken, Mauricio Ruiz, Rolando Pizarro, Patricio Rossi, Lucía Huenchur, Sandra Ampuero. Caracterización genética y expresión de IL-7R como indicador de gravedad en adultos con neumonía adquirida en la comunidad viral y/o bacteriana. XLI Reunión Anual de la Sociedad de Microbiología de Chile. Noviembre, 05-08, 2019. Puerto Varas, Chile.

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Sandra Ampuero, **Guillermo Bahamonde**, Fabian Tempio, Maria Luisa Garmendia, Mauricio Ruiz, Rolando Pizarro, Patricio Rossi, Lucía Huenchur, Luis Lizama, Mercedes López, Luis Fidel Avendaño, Vivian Luchsinger. IL-7/IL-7R axis dysfunction in adults with severe community acquired pneumonia (CAP): cross sectional study. Artículo en proceso de publicación.

## INDICE DE CONTENIDOS

FINANCIAMIENTO .....	II
PRESENTACIONES A CONGRESOS .....	II
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	II
INDICE DE CONTENIDOS.....	III
INDICE DE FIGURAS .....	VI
INDICE DE TABLAS .....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN .....	XI
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	1
Neumonía adquirida en la comunidad.....	1
Epidemiología.....	1
Etiología .....	1
Gravedad de la enfermedad .....	2
Receptor de IL-7 .....	6
Polimorfismos de un nucleótido (SNP).....	7
Vía de señalización IL-7/IL-7R .....	8
Isoforma soluble de IL-7R $\alpha$ .....	10
IL-7R $\alpha$ como biomarcador para evolución de NAC.....	11
HIPOTESIS .....	12
OBJETIVO GENERAL .....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
METODOLOGÍA .....	13
Tipo de estudio.....	13
Población estudiada.....	13
Criterios de inclusión para adultos NAC.....	13
Criterios de exclusión.....	13
Financiamiento y Aprobación.....	14
Tamaño muestral.....	14
Muestras biológicas estudiadas.....	14
Muestra de orina.....	14



Muestra de secreción respiratoria .....	14
Muestra de sangre venosa periférica .....	15
Detección de agentes infecciosos.....	15
1. Inmunocromatografía .....	15
2. Transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR-tr) .....	15
Análisis de polimorfismos.....	16
1. Extracción de ADN genómico .....	16
2. Genotipificación .....	16
Expresión relativa del gen <i>Il7r</i> .....	22
1. Extracción de ARN total en muestras de sangre.....	22
2. Transcripción inversa .....	23
3. PCRtr para los genes <i>TUBB</i> e <i>Il7r</i> .....	23
4. Cálculo de expresión relativa.....	25
Recuento Hematológico .....	25
Recuento de linfocitos CD127+.....	25
Cuantificación de sIL-7R $\alpha$ en plasma .....	26
Cuantificación de IL-7 en plasma .....	26
Análisis estadístico.....	27
RESULTADOS. ....	28
Características demográficas de adultos con neumonía adquirida en la comunidad estudiados .....	28
Objetivo específico 1: Caracterizar los genotipos de los polimorfismos c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G del gen <i>Il7r</i> con PCRtr en ADN <sub>g</sub> obtenido de muestras sanguíneas sistémica de adultos con NAC y evaluar diferencias según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad clínica.....	30
SNP c.731 C>T en adultos con NAC.....	30
SNP c.801-21 A>T en adultos con NAC.....	34
SNP c.1066 A>G en adultos con NAC .....	38
haplotipos de los SNPs en adultos con NAC.....	42
Objetivo específico 2: Comparar la expresión relativa del gen <i>Il7r</i> en sangre de adultos con NAC mediante PCRtr según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad clínica. ....	44

Objetivo específico 3: Relacionar la proporción de linfocitos sanguíneos que expresan IL-7R determinada por citometría de flujo con gravedad clínica, datos demográficos y comorbilidades de adultos con NAC.....	46
Objetivo específico 4: Comparar la concentración plasmática de IL-7Rs e IL-7 determinada por inmunoensayos, según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad de adultos con NAC. ....	50
IL-7Rs en adultos con NAC .....	50
IL-7 en adultos con NAC.....	52
DISCUSION.....	54
CONCLUSIONES .....	59
BIBLIOGRAFIA .....	60
ANEXO .....	63

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del receptor de Interleuquina 7 (IL-7R).....	6
Figura 2. Representación del gen y los dominios proteicos de IL-7R $\alpha$ .....	7
Figura 3. Vía de señalización de IL-7/IL-7R.....	9
Figura 4. Representación de la formación de IL-7Rs.....	10
Figura 5. Curva de fusión de alta resolución del polimorfismo c.731 C>T.....	18
Figura 6. Curva de fusión de alta resolución del polimorfismo c.801-21 A>T.....	19
Figura 7. Curva de fusión de alta resolución del polimorfismo c.1066 A>G.....	20
Figura 8. Frecuencia alélica del polimorfismo c.731 C>T.....	30-31
Figura 9. Frecuencia genotípica del polimorfismo c.731 C>T.....	32-33
Figura 10. Frecuencia alélica del polimorfismo c.801-21 A>T.....	34-35
Figura 11. Frecuencia genotípica del polimorfismo c.801-21 A>T.....	36-37
Figura 12. Frecuencia alélica del polimorfismo c.1066 A>G.....	38-39
Figura 13. Frecuencia genotípica del polimorfismo c.1066 A>G.....	40-41
Figura 14. Expresión relativa del gen <i>IL7r</i> en adultos con NAC.....	44-45
Figura 15. Recuento linfocitario en adultos con NAC.....	46-47
Figura 16. Recuento de linfocitos con IL-7R de membrana en adultos con NAC.....	48-49
Figura 17. Concentración plasmática de IL-7Rs en adultos con NAC.....	50-51
Figura 18. Concentración de IL-7 plasmático en adultos con NAC.....	52-53

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de gravedad de la NAC de la Sociedad Británica del Tórax.....	3
Tabla 2. Criterios de gravedad de la NAC indicados por Fine y cols.....	3
Tabla 3. Categorización de gravedad según puntaje CURB-65.....	4
Tabla 4. Categorización de gravedad según puntaje PSI.....	4
Tabla 5. Partidores utilizados en la PCRtr-HRM para realizar la genotipificación de polimorfismos en el gen <i>IL7r</i> .....	17
Tabla 6. Mezcla de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación de polimorfismos en el gen <i>IL7r</i> .....	17
Tabla 7. Protocolo de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación del SNP c.731 C>T.....	18
Tabla 8. Protocolo de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación del SNP c.801-21 A>T.....	19
Tabla 9. Protocolo de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación del SNP c.1066 A>G.....	20
Tabla 10. Partidores para PCRtr alelo específico para genotipificación del SNP c.801-21 A>T.....	21
Tabla 11. Mezcla de reacción para PCRtr alelo específico para genotipificación de c.801-21 A>T.....	21
Tabla 12. Protocolo de reacción de la PCRtr alelo específico para genotipificar el SNP c.801-21 A>T.....	22
Tabla 13. Partidores para PCRtr para evaluar la expresión génica de <i>IL7r</i> .....	23
Tabla 14. Mezcla de reacción utilizada en la PCRtr para amplificar el gen de referencia <i>TUBB</i> .....	24
Tabla 15. Mezcla de reacción utilizada en la PCRtr para amplificar el gen <i>IL7r</i> .....	24
Tabla 16. Protocolo de reacción de la PCRtr para amplificar el gen de referencia de <i>TUBB</i> .....	24
Tabla 17. Protocolo de reacción de la PCRtr para evaluar la expresión génica de <i>IL7r</i> .....	25
Tabla 18. Características demográficas de adultos con neumonía adquirida en la comunidad estudiados, Santiago, 2017-2019.....	29

Tabla 19. Características clínicas de adultos con neumonía adquirida en la comunidad estudiados, Santiago, 2017-2019.....	29
Tabla 20. Haplotipos de <i>Il7r</i> en adultos con NAC.....	42

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ANDg: ácido desoxirribonucleico genómico

AdV: adenovirus

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BoVH: bocavirus humano

c $\gamma$ : cadena común gamma (CD132)

CoVH: coronavirus humano

CT: *cycle threshold* (*trd-esp.* ciclo umbral)

CRP: *C reactive protein* (*trd-esp.* Proteína C reactiva)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (*trd-esp.* Ensayo inmunoenzimático)

Flu: virus influenza

HRM: *high resolution melt* (*trd-esp.* fusión de alta resolución)

JAK: proteína Janus quinasa

Kb: kilo bases

kDa: kilo Dalton

IL-7: interleuquina 7

IL-7R $\alpha$ : subunidad alfa del receptor de interleuquina 7 (CD127)

IL-7Rs: isoforma soluble de la subunidad alfa del receptor de interleuquina 7

INE: Instituto Nacional de Estadísticas

MPVh: metapneumovirus humano

MTU: medio de transporte universal

NAC: neumonía adquirida en la comunidad

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (*trd-esp.* Centro Nacional de Información Biotecnológica)

LT: linfocitos T

Pb: pares de bases

PCR: *polymerase chain reaction* (*trd-esp.* reacción en cadena de polimerasa)

PCT: procalcitonina

Pro-ADM: pro-adrenomodulina

Pro-ANP: *pro-atrial natriuretic peptide* (*trd-esp.* pro-péptido natriurético atrial)

PSI: *Pneumonia Severity Index* (*trd-esp.* índice de gravedad de neumonía)

Rpm: revoluciones por minuto

RT: *reverse transcription* (*trd-esp.* transcripción inversa)

RV: rinovirus

sIL-7R $\alpha$ : isoforma soluble de la subunidad alfa del receptor de interleuquina 7

SNP: *single nucleotide polymorphism* (*trd-esp.* Polimorfismo de un nucleotido)

STAT5: *Signal transducer and activator of transcription 5* (*trd-esp.* traductor de señales y activador transcripcional 5)

trd-esp: traducción al español

UCI: unidad de cuidados intensivos

UTR: *untranslated región* (*trd-esp* región no traducida)

VHC: virus hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VPIF: virus parainfluenza

VRS: virus respiratorio sincicial

## RESUMEN

**Introducción:** La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es un proceso inflamatorio pulmonar agudo generado por bacterias y/o virus adquiridos en el medio comunitario con una importante tasa de morbilidad y mortalidad. Hay escalas clínicas de gravedad, como PSI o CURB-65, que predicen el riesgo de mortalidad y orientan el tratamiento clínico del paciente. Estas escalas tienen limitaciones, por lo que se han investigado biomarcadores que predigan la evolución de esta enfermedad, la cual depende más de la respuesta inmune del hospedero que del agente infeccioso en adultos. Estudios previos en adultos con NAC y sin inmunodeficiencia conocida mostraron una disminución en el recuento de linfocitos T (LT) CD4+ y en la expresión génica de *Il7r* (subunidad alfa del receptor de interleuquina 7, IL-7R $\alpha$ ) en los enfermos graves respecto a los leves. IL-7R es un receptor crucial en el desarrollo, supervivencia y proliferación de LT. Polimorfismos de un nucleótido (SNPs: c.731C>T, c.801-21A>T, c.1066A>G) de este receptor están relacionados con enfermedades infecciosas y autoinmunes, mediante la generación de la isoforma soluble de este receptor (IL-7Rs), que regula la vía de señalización del eje IL-7/IL-7R. Esta vía no ha sido estudiada en NAC.

**Objetivo:** Evaluar si la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G; la expresión génica de *Il7r*; el porcentaje de células que expresan IL-7R; la concentración plasmática de IL-7R soluble y su ligando IL-7 difieren entre adultos con neumonía adquirida en la comunidad con distinta evolución clínica.

**Metodología:** Se enrolaron 202 adultos hospitalizados con NAC en tres hospitales de Santiago (Hospital Clínico de la Universidad de Chile, de Enfermedades Infecciosas Dr. Lucio Córdova y Complejo Hospitalario San José) entre mayo 2017 y agosto 2019. Se pesquisaron antígenos de *S. pneumoniae* y *Legionella* en orina mediante Binax®, así como genoma de virus y bacterias atípicas en muestras respiratorias por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-tr) (Argene®). En muestras de sangre venosa periférica se hicieron los análisis de IL-7R y su eje de señalización. La genotipificación de los SNPs c.731 C>T y c.1066 A>G se realizó mediante PCR-tr con curva de fusión de alta resolución, mientras que para c-801-21 A>T se utilizó PCR-tr alelo específico. La expresión relativa (veces de cambio: Vc) del gen *Il7r* en ARN de sangre se determinó mediante transcripción inversa y PCR-tr. Los recuentos de LT (CD3+) y los que expresan IL-7R $\alpha$  (CD3+CD127+)



se determinaron mediante citometría de flujo. La concentración plasmática de IL-7Rs se cuantificó por ensayo inmunoenzimático (RayBio®) y de IL-7 con MILLIPLEX MAP. Los datos obtenidos se analizaron según características clínicas demográficas, clasificación de gravedad por escalas pronósticas (PSI y CURB-65), y evolución de la NAC (ingreso a UCI, fallecimiento, entre otros). Los análisis estadísticos utilizados fueron chi cuadrado y prueba de Mann-Whitney (GraphPad Prism®), considerando significativa la diferencia si  $p < 0,05$ .

**Resultados:** La mediana de edad de los 202 adultos con NAC estudiados es 73 años (RIQ: 60-84 años); 100 son mujeres (49%) y 162 presentan comorbilidades (81%). Según PSI, 48 casos eran leves (24%), 44 moderados (22%) y 110 graves (54%). Según CURB-65, 77 paciente eran leves (38%), 57 moderados (28%) y 68 graves (34%). Respecto a la evolución de la NAC, 117 pacientes requirieron oxigenoterapia (58%), 45 ingresaron a UCI (22%) y 32 fallecieron (16%), siendo mayores las proporciones en adultos  $\geq 65$  años ( $p < 0,05$ ). En el SNP c.731 C>T, el alelo C y el genotipo CC fueron más frecuentes en pacientes graves que en leves según CURB-65 ( $p < 0,05$ ): el genotipo CT fue más frecuente en casos moderados que en leves y graves ( $p < 0,02$ ) y el genotipo TT fue más frecuente en los leves que moderados según PSI ( $p = 0,02$ ) y no se relacionó con la evolución de la NAC. En el SNP c.801-21 A>T, el genotipo AT fue más frecuente en casos moderados que en leves ( $p < 0,001$ ) y graves ( $p < 0,02$ ), mientras que el genotipo TT fue más frecuente en leves y graves que en moderados ( $p < 0,01$ ) según PSI; el alelo T y el genotipo TT fueron más frecuentes del SNP c.801-21 A>T fueron más frecuente en los enfermos que ingresaron a UCI que en los que no ingresaron ( $p < 0,05$ ). En el SNP c.1066 A>G, el genotipo GG fue más frecuente en pacientes graves que en leves según CURB-65 ( $p = 0,03$ ); el alelo G y los genotipos AG y GG fueron más frecuentes en quienes ingresaron a UCI que en los que no ingresaron ( $p < 0,02$ ); el genotipo AA fue más frecuente en quienes no ingresaron a UCI ( $p < 0,001$ ), y el genotipo GG fue más frecuente en los fallecidos ( $p < 0,02$ ). La expresión relativa del gen *Il7r* está disminuida en los pacientes clasificados como moderados ( $p = 0,03$ ) y graves ( $p < 0,01$ ) respecto a los leves según PSI; en fallecidos respecto a no fallecidos ( $p < 0,02$ ), y en pacientes con enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPOC) que en los que no tienen EPOC ( $p = 0,002$ ). El recuento de CD3+ y de CD3+CD127+ están disminuidos en adultos con NAC  $\geq 65$  años respecto a  $< 65$  años ( $p < 0,03$ ) y en los casos moderados y graves respecto a los leves según PSI ( $p < 0,05$ ). De acuerdo con CURB-65, solo hay disminución del recuento CD3+CD127+ en pacientes graves respecto a

leves ( $p < 0,03$ ). La concentración plasmática de IL-7Rs está aumentada  $\geq 65$  años vs  $< 65$  años, en quienes tienen una evolución de la enfermedad  $< 7$  días vs  $\geq 7$  días, en los casos moderados y graves que leves según PSI, en pacientes graves que no graves según CURB-65 y en fallecidos respecto a sobrevivientes ( $p < 0,02$ ). El área bajo la curva para los niveles plasmáticos de IL-7Rs fue 0,71 (95% CI: 0,60-0,81) para la predicción de mortalidad dentro de los 30 días post alta. La concentración plasmática de IL-7 está disminuida en adultos con NAC bacteriano respecto a casos virales, en quienes recibieron oxigenoterapia vs los que no y en quienes ingresaron a UCI respecto a los no admitidos en UCI ( $p < 0,03$ ). Los genotipos CC (c.731 C>T), AA (c.801-21 A>T) y GG (c.1066 A>G) están asociados a mayor concentración plasmática de IL-7Rs. No se detectó asociación entre los SNPs y la concentración plasmática de IL-7.

**Conclusión:** Los SNPs c.801-21 A>T y c.1066 A>G de *Il7r* podrían estar relacionados con la gravedad de la NAC, donde los genotipos TT y GG están asociados con peor pronóstico de la enfermedad. Este es el primer estudio que relaciona estos SNPs con la concentración plasmática de sIL-7R $\alpha$  en adultos con NAC. El incremento en la concentración plasmática de sIL-7R $\alpha$  podría ser un biomarcador temprano de riesgo de muerte en adultos con NAC.

## ABSTRACT

**Introduction:** Community-Acquired Pneumonia (CAP) is an acute lung inflammatory process triggered by bacteria and/or viruses acquired in the community medium with an important rate of morbidity and mortality. There are clinical severity scales, such as PSI or CURB-65, that predict the risk of mortality and provide orientation in the clinical management of the patient. Despite their usefulness, these scales have limitations, due to this, studies have focused on investigating biomarkers that allow forecasting the evolution of this illness, which depends more on the immune response of the host than on the infectious agent in adults. Prior studies on adults with CAP and without any known immunodeficiency have shown a decrease in the CD4+ T Lymphocyte (TL) count and the genetic expression of *Il7r* (alpha subunit of the interleukin-7 receptor, IL-7R $\alpha$ ) in patients severe respect to the mild cases. IL-7R is a crucial receptor in the evolution, survival, and proliferation of TL. Single nucleotide polymorphisms (SNPs: c.731C>T, c.801-21A>T, c.1066A>G) of this receptor are related to infectious and autoimmune diseases, through the generation of the soluble isoform of this receptor (sIL-7R), that regulates the signaling pathway of the axis IL-7/IL-7R. This pathway has not been studied for CAP.

**Objective:** To evaluate if the allele and genotype frequency of the c.731 C>T, c.801-21 A>T and c.1066 A>G polymorphisms; the genetic expression of *Il7r*; the percentage of cells that express IL7R; the plasma concentration of soluble IL7R and the IL7 ligation; differ among adults with community-acquired pneumonia with different clinical evolution.

**Methodology:** This study analyzed 202 cases of adults who were hospitalized with CAP in three hospitals in Santiago (Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Hospital de Enfermedades Infecciosas Dr. Lucio Córdova and Complejo Hospitalario San José) between May 2017 and August 2019. The presence of *S. pneumoniae* and *Legionella* antigens in urine was investigated using Binax®, while the presence of the genome of atypical viruses and bacteria in respiratory samples was investigated using real-time polymerase chain reaction (qPCR) (Argene®). Analyses of IL-7R and its signaling axis were performed in samples of peripheral venous blood. The genotyping of the c.731 C>T and c.1066 A>G SNPs was carried out through qPCR with a high-resolution melt curve (HRM), while for c-801-21 A>T an allele-specific qPCR was used. The relative expression (fold change) of the gene *Il7r* in the RNA of blood samples was established through reverse transcription and qPCR. The TL

counts (CD3+) and those that express IL7R $\alpha$  (CD3+CD127+) were determined through flow cytometry. The plasma concentration of sIL-7R was quantified by immunoenzymatic assay (RayBio®) and IL-7 was quantified by MILLIPLEX MAP. The obtained data was analyzed according to clinical demographic characteristics, severity classification by prognostic scale (PSI and CURB-65), and the CAP evolution (ICU admission, death, among others). The statistical analyses used were the chi-square and the Mann-Whitney tests (GraphPad Prism®), considering the difference significant  $p < 0.05$ .

**Results:** The 202 adults with CAP studied have a median age of 73 years (IQR: 60-84 years); 100 are women (49%) and 162 present comorbidities (81%). According to PSI, 48 cases were mild (24%), 44 moderates (22%), and 110 severe (54%). According to CURB-65, 77 patients were mild cases (38%), 57 moderates (28%), and 68 severe (34%). Regarding the CAP evolution, 117 patients required oxygen therapy (58%), 45 were admitted to an ICU (22%), and 32 died (16%); these clinical characteristics were more frequent in adults  $\geq 65$  years ( $p < 0.05$ ). In c.731 C>T SNP, the allele C and the CC genotype were more frequent in severe patients than in mild ones according to CURB-65 ( $p < 0.05$ ), the CT genotype was more frequent in moderate cases than in mild or severe according to PSI ( $p < 0.02$ ), TT genotype was more frequent in mild patients than in moderate ones according to PSI ( $p = 0.02$ ) and no relation was found in the CAP evolution. In c-801-21 A>T SNP c.801-21, AT genotype was more frequent in moderate cases than in mild ( $p < 0.001$ ) and severe ( $p < 0.02$ ), while the TT genotype was more frequent in mild and severe cases with respect to moderate according to PSI ( $p < 0.01$ ); The T allele and TT genotype were more frequent in sick adults who were admitted to an ICU than to those who were not admitted ( $p < 0.05$ ). In the c.1066 A> SNP, GG genotype was more frequent in severe patients than in mild ones according to CURB-65 ( $p = 0.03$ ); the G allele and, AG and GG genotypes were more frequent in those who were admitted to an ICU than to those who were not admitted ( $p < 0.02$ ); the AA genotype was more frequent in those who were not admitted to an ICU ( $p < 0.001$ ), and the GG genotype was more frequent in who died ( $p < 0.02$ ). The relative expression of the *Il7r* gene is diminished in patients classified as moderate ( $p = 0.03$ ) and severe ( $p < 0.01$ ) with respect to mild ones according to PSI; in dead patients with respect to non-dead ones ( $p < 0.02$ ); in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with respect to those who do not have COPD ( $p = 0.002$ ). The lymphocyte count of CD3+ as well as of CD3+CD127+ is

diminished in adults  $\geq 65$  years with respect to  $< 65$  years ( $p < 0.03$ ), and in cases moderate and severe in comparison with mild cases according to PSI ( $p < 0.05$ ). In terms of CURB-65, there is a decrease in the count of CD3+CD127+ only in severe patients with respect to non-severe ones ( $p < 0.03$ ). The plasma concentration of sIL-7R is increased in  $\geq 65$  years vs  $< 65$  years, in those who have an illness evolution  $< 7$  days vs  $\geq 7$  days, in the moderate and severe cases than mild cases according to PSI, in severe patients than mild according to CURB-65 and in dead patients respect to survivors ( $p < 0.02$ ). The area under the curve for the plasma levels of sIL-7R was 0.71 (95% CI: 0.60-0.81) for the mortality prediction within 30 days after medical clearance. The plasma concentration of IL-7 is diminished in adults with bacterial CAP with respect to viral cases, in those who received oxygen therapy treatment vs those who didn't and those who were admitted in an ICU respect those not admitted to ICU ( $p < 0.03$ ). The CC (c.731 C>T), AA (c.801-21 A>T), and GG (c.1066 A>G) genotypes are associated with a larger plasma concentration of sIL-7R. No association was found between these SNPs and the plasma concentration of IL-7.

**Conclusion:** The SNPs c.801-21 A>T and c.1066 A>G of *IL7r* are related to the severity of CAP, where the genotypes TT and GG are associated with the worst prognosis for the disease. This is the first study that relates these SNPs with the plasma concentration of sIL-7R $\alpha$  in adults with CAP. The increase in the plasma concentration of sIL-7R $\alpha$  might be an early biomarker for the risk of death in adults with CAP.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Neumonía adquirida en la comunidad**

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es un proceso infeccioso inflamatorio agudo que afecta al parénquima pulmonar, causado por la invasión de microorganismos patógenos adquiridos en el medio comunitario (fuera del ambiente hospitalario). La NAC es considerado un problema de salud pública, por su alta demanda en recursos de salud, alta morbilidad y mortalidad en la población adulta. El cuadro clínico de la NAC se caracteriza por presentar tos, fiebre, expectoración mucopurulenta, dolor torácico y dificultad respiratoria. El diagnóstico de neumonía es clínico y se confirma con la presencia de infiltrados pulmonares en una radiografía de tórax [Peñañiel y cols., 2003; Mandell y cols., 2007; Blanquer y cols., 2010; MINSAL, Gob De Chile, 2011].

### **Epidemiología**

La NAC se caracteriza por presentar cuadros más graves en adultos mayores, debido a una menor capacidad de defensa contra distintos agentes infecciosos asociada al envejecimiento [Peñañiel y cols., 2003; Mandell y cols. 2007, Saldias y cols. 2014]. La incidencia anual de NAC en el adulto fluctúa entre 1,07 y 1,2 casos por cada 1000 personas-año, elevándose en el adulto mayor de 65 años a 12,7 y 15,3 casos por cada 1000 personas-año [diprece.minsal.cl]. Entre 10-20% de los enfermos con NAC requiere ingresar a una unidad de cuidados intensivos (UCI). La mortalidad mundial de NAC es de 5 – 10%. En Chile la tasa de mortalidad de NAC es 20,8 por cada 100000 enfermos. En mayores de 65 años el índice llega a 199,8 por cada 100.000 enfermos [MINSAL, Gob. de Chile, 2011].

### **Etiología**

La NAC puede ser causada por diversos agentes infecciosos, ya sean bacterianos y/o virales. El agente etiológico único detectado con mayor frecuencia en el adulto es *Streptococcus pneumoniae*, una bacteria gram positiva [MINSAL, Gob. de Chile, 2011; Saldias y cols., 2014]. En un estudio realizado por Luchsinger y colaboradores en adultos chilenos con NAC, se detectó *S. pneumoniae* en el 39% de los casos, y el 50% de ellos estaba coinfectado con otros agentes [Luchsinger y cols. 2013]. Otras bacterias detectadas en adultos con NAC son

*Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, y *Staphylococcus aureus* [Luchsinger y cols. 2013; Saldias y cols. 2014]. Entre los virus asociados a NAC se incluye influenza (Flu), virus respiratorio sincicial (VRS), rinovirus (RV), coronavirus humano (CoVH), adenovirus (AdV), virus parainfluenza (VPIF) y metapneumovirus humano (MPVh) [Blanquer y cols., 2010; Johansson y cols., 2010; Luchsinger y cols. 2013], los que se pueden encontrar como agentes únicos o en infección mixta entre virus y/o bacterias. Debido a la mayor sensibilidad de las técnicas de detección de ácidos nucleicos utilizadas en el diagnóstico, ha aumentado la detección de agentes infecciosos, pero aún hay un importante porcentaje de pacientes en los que no se detecta agente etiológico (35 – 50%) [Johansson y cols., 2010; Luchsinger y cols. 2013; Luchsinger y cols., 2016].

### **Gravedad de la enfermedad**

Debido a las distintas condiciones y evolución que presentan los pacientes con NAC, se han diseñado escalas clínicas para clasificar y predecir el riesgo de mortalidad de cada paciente y mejorar el manejo clínico [Mandell y cols., 2007; Bantar y cols., 2010; Torres y cols., 2013]. Uno de ellos, desarrollado por el comité de investigación de la Sociedad Británica del Tórax [Neill y cols., 1996], incorpora el estado confusional (C), la uremia (U), la frecuencia respiratoria (R) y la presión arterial (B) y se denomina CURB (por sus siglas en inglés). Esta escala se utiliza para poder identificar pacientes con alto riesgo de mortalidad que requieren de una admisión a UCI. En el año 2003 se añade a la clasificación la edad del paciente, considerando como riesgo tener  $\geq 65$  años. Esta escala se denomina CURB-65 [Tabla 1] [Neill y cols., 1996; Lim y cols., 2003]. Otra escala de clasificación es el índice de gravedad de neumonía (PSI) desarrollado por el equipo del Dr. Fine. Esta escala permite reconocer con mayor precisión a los pacientes de bajo riesgo para definir si el tratamiento se realiza de manera ambulatoria, reduciendo los costos de hospitalización. El PSI considera 20 variables como la edad, sexo, comorbilidades, signos vitales, hallazgos radiológicos y de laboratorio [Tabla 2] [Fine y cols., 1997]. Ambos índices se utilizan en la actualidad de forma complementaria en algunos centros. Con cada uno se obtiene un puntaje que se asocia a una categoría de riesgo con su correspondiente recomendación clínica de manejo [Tabla 3 y 4]. Con estas escalas se pueden clasificar a los pacientes en tres grandes grupos: de bajo riesgo:

grupo I según CURB-65 y grupos I y II por PSI, para quienes recomienda un manejo ambulatorio; de riesgo moderado: grupo II de CURB-65 y III de PSI, quienes probablemente requieran de hospitalización; y de alto riesgo: grupos III de CURB-65 y IV y V de PSI, los que deben ser hospitalizados y probablemente deban ingresar a unidades críticas [Tabla 2 y 4].

Tabla 1. *Criterios de gravedad de la NAC de la Sociedad Británica del Tórax.*

<b>CURB-65</b>
Confusión mental
BUN > 7 mmol/L o 20 mg/dL
Frecuencia respiratoria $\geq$ 30 resp/min
PA Sistólica < 90 mmHg o Diastólica $\leq$ 60 mmHg
Edad $\geq$ 65 años

**CURB-65**, siglas en inglés de las cinco características de riesgo que utiliza este índice; **BUN**, *Blood urea nitrogen* (*trd-esp.* nitrógeno ureico en sangre); **PA**, presión arterial. [Neill y cols., 1996; Lim y cols., 2003]

Tabla 2. *Criterios de gravedad de la NAC indicados por Fine y cols.*

<b>Índice de Gravedad de la Neumonía (PSI)</b>					
<b>Características</b>		<b>Puntaje</b>	<b>Características</b>		<b>Puntaje</b>
<b>Factores demográficos</b>			Frecuencia respiratoria $\geq$ 30 resp/min	20	
Edad (años)	Masculino	Edad	Presión arterial sistólica < 90 mmHg	20	
	Femenino	Edad - 10	Temperatura < 35°C o $\geq$ 40°C	15	
Residente centro geriátrico		10	Frecuencia cardiaca $\geq$ 125 latidos/min	10	
<b>Enfermedades preexistentes</b>			<b>Exámenes de laboratorio</b>		
Neoplasia		30	pH < 7,35	30	
Enfermedad hepática		20	BUN > 30 mg/dL	20	
Insuficiencia cardiaca congestiva		10	Sodio plasmático < 130 mEq/L	20	
Enfermedad cerebrovascular		10	Glicemia $\geq$ 250 mg/dL	10	
Enfermedad renal		10	Hematocrito < 30%	10	
<b>Examen físico</b>			PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg o SaO <sub>2</sub> < 90%	10	

**BUN**, *Blood urea nitrogen* (*trd-esp.* nitrógeno ureico en sangre); PaO<sub>2</sub>, Presión alveolar de oxígeno; SaO<sub>2</sub>, Saturación de oxígeno. [Fine y cols., 1997]



*Tabla 3. Categorización de gravedad según puntaje CURB-65.*

<b>Categorías de Riesgo</b>	<b>Puntaje</b>	<b>Mortalidad</b>	<b>Recomendación</b>
I	0 - 1	1,50%	Manejo ambulatorio
II	2	9,2%	Manejo en el hospital
III	≥ 3	22%	Admisión a UCI

UCI, Unidad de cuidados intensivos.

El puntaje corresponde a la suma de 1 punto por cada criterio de gravedad que posee el paciente con NAC mencionados en la Tabla 1. [Neill y cols., 1996; Lim y cols., 2003]

*Tabla 2. Categorización de gravedad según puntaje PSI.*

<b>Categorías de Riesgo</b>	<b>Puntaje</b>	<b>Mortalidad</b>	<b>Recomendación</b>
I	≤ 50	0,1 - 0,4%	Manejo ambulatorio
II	51 - 70	0,6 - 0,7%	Manejo ambulatorio
III	71 - 90	0,9 - 2,8%	Hospitalización abreviada
IV	91 - 130	8,2 - 12,5%	Manejo en el hospital
V	> 130	27,1 - 31,1%	Manejo en el hospital

El puntaje corresponde a la suma de los puntos asignados a cada característica que posee el paciente con NAC, mencionados en la Tabla 2. [Fine y cols., 1997]

A pesar de la utilidad de estas escalas clínicas (CURB-65 y PSI) para predecir la gravedad de la NAC y orientar el manejo adecuado para cada paciente, estas tienen limitaciones como: la complejidad de aplicar PSI por las numerosas variables de laboratorio que utiliza y, la subestimación o sobrestimación del riesgo de mortalidad o de necesidad de ingreso a UCI [Viasus y cols., 2016]. Por esto, distintas investigaciones, se han enfocado a mejorar la predicción de la evolución de la NAC para responder a la necesidad de la detección temprana de pacientes de alto riesgo.

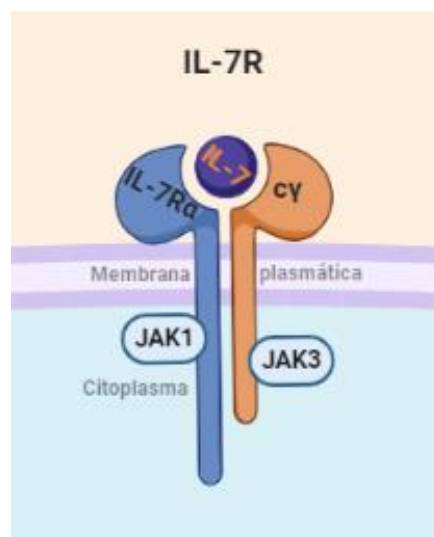
Uno de estos estudios es el de Luchsinger y colaboradores, en el que se evidenció que la gravedad de la NAC no dependería del agente infeccioso detectado, ya sea viral, bacteriano o mixto, por lo que habría que buscar en la respuesta inmunológica del hospedero [Luchsinger y cols. 2013]. Diversos estudios se han enfocado en esta respuesta, identificando potenciales biomarcadores para predecir la evolución de esta enfermedad, como la procalcitonina (PCT), la proteína C reactiva (CRP), pro-adrenomodulina (pro-ADM), pro-peptido natriurético atrial (pre-ANP), cortisol y copeptina [Falk y col., 2008; Seligman y cols., 2012; Viasus y cols., 2016]. Si bien algunos de estos son precisos al predecir la

mortalidad y la evolución de la NAC, no superan a los puntajes clínicos ya mencionados (PSI y CURB-65) [Seligman 2012, Torres 2012, Viasus 2016], por lo que es necesario investigar otros marcadores, que mejoren la predicción de la evolución de la NAC.

En estudios previos para la búsqueda de nuevos biomarcadores en adultos con NAC sin inmunodeficiencia conocida realizados en el laboratorio de virus respiratorios del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se detectaron cambios en los perfiles de expresión de genes asociados a la respuesta inmune mediante micro-arreglos en muestras sistémicas, con disminución significativa de la expresión del gen *Il7r* en los casos graves respecto a los no graves. Además, se observó que los adultos graves tenían un recuento de células T CD4+ significativamente menor que los no graves (comunicación personal, resultados proyecto Fondecyt Regular 1121025). Estos resultados podrían relacionarse dado que el gen *Il7r* codifica para la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-7 que está involucrado directamente en el desarrollo y supervivencia de los LT.

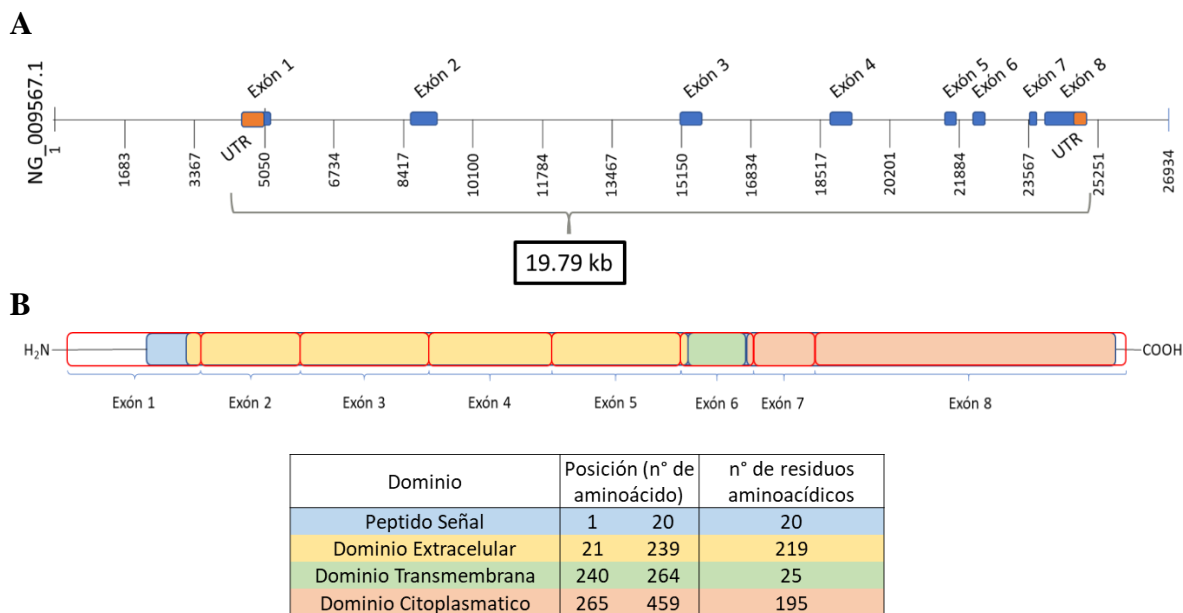
## Receptor de IL-7

El receptor de la citoquina IL-7 es un receptor de membrana que consta de dos componentes: la cadena común gamma ( $\gamma$  o CD132) [Figura 1], presente también en los receptores de IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21 y la cadena alfa (IL-7R $\alpha$  o CD127) que se une directamente con IL-7, la cual se encuentra también en el receptor de linfopoyetina del estroma del timo (TSLPR) [Jiang y cols., 2005; Murphy y col., 2016].



**Figura 1. Representación del receptor de Interleuquina 7 (IL-7R).** En azul se presenta la subunidad alfa (IL-7R $\alpha$ ), que en su dominio intracelular tiene asociada la proteína Janus quinasa 1 (JAK1). En naranja se muestra a la cadena común gamma ( $\gamma$ ) que en su dominio intracelular tiene asociada la proteína Janus quinasa 3 (JAK3). En morado se representa el ligando IL-7. [Murphy y col., 2016]. Elaboración propia con el programa BioRender©

IL-7R $\alpha$  está codificado por el gen *Il7r*, en el cromosoma 5 p13.2. Su tamaño es 19,79 kb y está compuesto por 8 exones y 7 intrones [Figura 2A]. En humanos, se han detectado mutaciones aberrantes de este gen que generan una inmunodeficiencia combinada grave por deficiencia del linfocito T [Puel y cols., 1998]. IL-7R $\alpha$  es una glicoproteína de membrana con un peso molecular de 49 kDa perteneciente a la familia de receptores de citoquinas de clase I. La proteína consta de cuatro dominios, un péptido señal, un dominio extracelular que une a IL-7, un dominio corto de transmembrana y una sección citoplasmática encargada de la señalización intracelular [Figura 2B] [Zaunders y cols., 2014; Murphy y col., 2016]. También existen isoformas solubles de este receptor que regulan la vía de señalización de IL-7 [Zaunders y cols., 2014].



**Figura 2. Representación del gen y los dominios proteicos de IL-7R $\alpha$ .** **A.** Representación estructural del gen *IL7r*, realizado a partir de la secuencia NG\_009567.1 obtenida de la base de datos del NCBI (*trd-esp*. Centro Nacional de Información Biotecnológica). Los números indican la posición aproximada de la base correspondiente, siendo 1 el extremo 5' y 26934 el extremo 3' de la secuencia de la base de datos. En naranja se muestran los extremos UTR del gen, y en azul se representan los exones enumerados del 1 al 8. **B.** Representación estructural de los cuatro dominios de la proteína IL-7R $\alpha$  indicado con cada color, además de la posición aminoacídica y el largo. La línea roja indica la posición de los exones. Elaboración propia en PowerPoint (Microsoft©).

### Polimorfismos de un nucleótido (SNP)

Se han descrito polimorfismos de un nucleótido (*single-nucleotide polymorphism* (SNP)) en el gen *IL7r* asociados a enfermedades autoinmunes e infecciosas. Distintos estudios han relacionado a los polimorfismos c.731 C>T (rs6897932, T244I) ubicado en el exón 6 (dominio transmembrana), c.801-21 A>T (rs987106) ubicado en el intrón 6 (entre exón 6 y 7) y c.1066 A>G (rs3194051, I356V) ubicado en el exón 8 (dominio intracelular), con distinta evolución clínica en diferentes condiciones, como esclerosis múltiple [Gregory y cols., 2007], diabetes tipo 1 [Santiago y cols., 2008] e infecciones con virus hepatitis C (VHC) y/o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [Guzmán-Fulgencio y cols., 2015]. Los alelos C, T y A de los SNPs rs6897932, rs987106, rs3194051 respectivamente, se han relacionado con peor pronóstico en las enfermedades analizadas. El mecanismo más aceptado para el efecto observable de estos polimorfismos es la disminución de la expresión de la isoforma de

membrana de IL-7R $\alpha$  y aumento de los niveles de la isoforma soluble, alterando así la biodisponibilidad de IL-7 y en consecuencia también su señalización [Crawley y cols, 2010].

### **Vía de señalización IL-7/IL-7R**

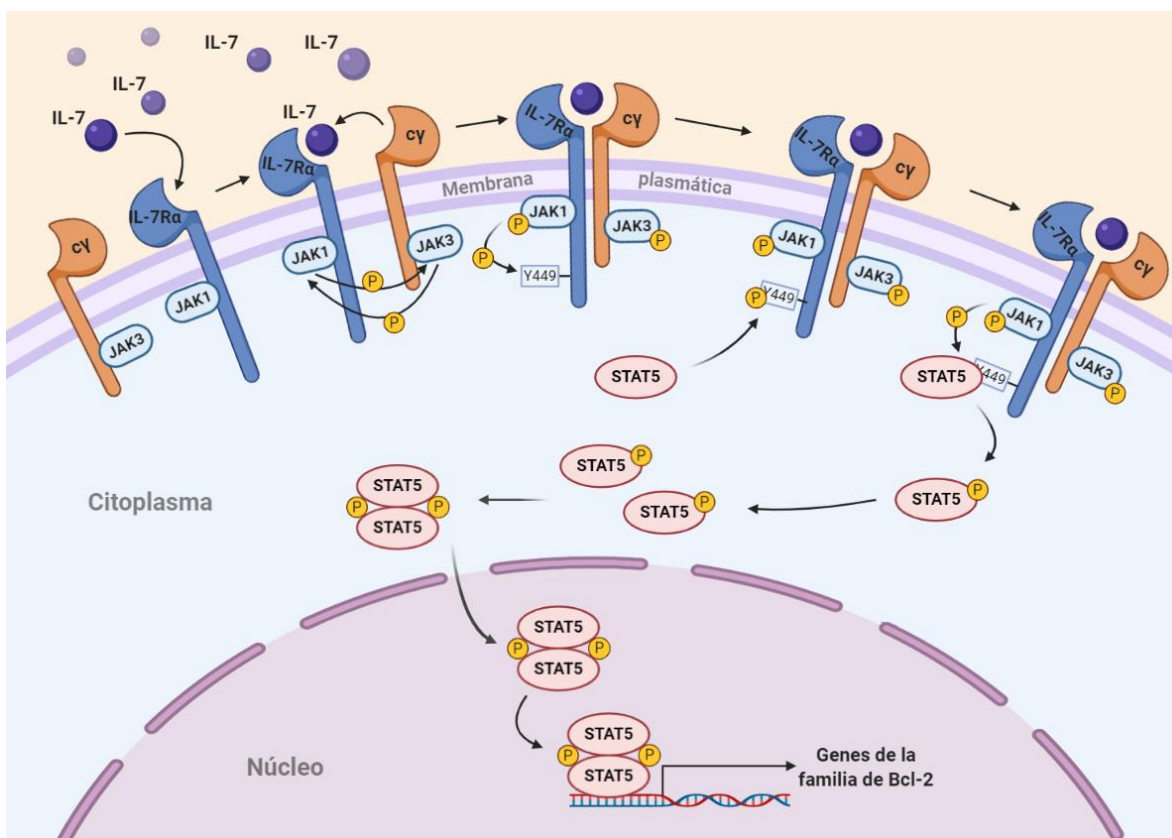
IL-7 es una citoquina denominada inicialmente como linfopoyetina 1 y se describió como un promotor del crecimiento de precursores de células B murinas. Posteriormente, se determinó que es esencial en el desarrollo de linfocitos T y B en ratones, mientras que en humanos es necesaria en el desarrollo de LT y para la supervivencia y proliferación de LT CD4<sup>+</sup> periféricos maduros y vírgenes [Jiang y cols., 2005; Zaunders y cols., 2014].

IL-7 es constitutivamente producida y liberada por células no hematopoyéticas especializadas del estroma del timo, médula ósea, hígado, bazo y riñones [Zaunders y cols., 2014]. Esta citoquina se encuentra localmente unida a proteoglicanos heparán sulfatos, ya sea en la superficie de células estromales o en la matriz extracelular, por esto los niveles de IL-7 en el plasma humano son bajos. En adultos sanos es común detectar menos de 10 pg/ml [Lundstrom y cols., 2012].

La señalización IL-7/IL-7R cumple un rol esencial en la linfopoyesis, específicamente en los LT humanos. También es importante en la homeostasis y mantención de los LT vírgenes completamente diferenciados [Jiang y cols., 2005; Zaunders y cols., 2014].

La vía de señalización es mediada por las proteínas JAK 1 y 3, y STAT5a/b. El complejo formado por IL-7R $\alpha$  y la cadena  $\gamma$ , en sus dominios intracelulares acoplan enzimas tirosinas quinasas: JAK1 asociada a IL7R $\alpha$  y JAK3 a la cadena  $\gamma$ . La unión de IL-7 con IL-7R $\alpha$  induce la dimerización con  $c\gamma$ , aproximando los dominios intracelulares, permitiendo la fosforilación de las proteínas JAK1 y JAK3. Posteriormente se fosforila la tirosina 449 de la cadena  $\alpha$  lo que permite la unión de STAT5, el cual al ser fosforilado, dimeriza con otro STAT5 y el complejo que se forma es translocado al núcleo, donde activa genes miembros de la familia anti-apoptótica Bcl-2, involucrados en la supervivencia de LT [Figura 3]. Otra vía de señalización que se ha visto involucrada es la vía PI3K/Akt, pero solo se ha demostrado

en líneas celulares transformadas y en células B de murinos, por lo que su rol en LT humanos no está definido [Jiang y cols., 2005; Zaunders y cols., 2014].

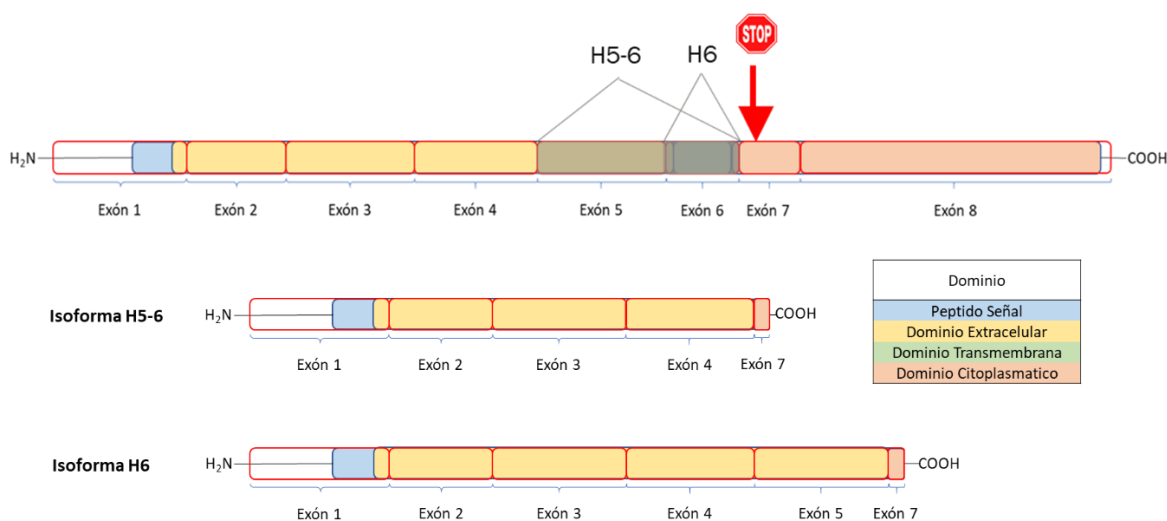


**Figura 3. Vía de señalización de IL-7/IL-7R.** La unión de IL-7 a IL-7Rα permite la dimerización de este último con la cadena γ, lo que produce el acercamiento de las proteínas quinasas JAK. Ambas quinasas tienen baja actividad enzimática intrínseca, la mutua fosforilación que se produce entre ambas aumenta su actividad. Esto genera la fosforilación de la tirosina 449 (Y449), la cual será reconocida por el dominio SH2 de STAT5, produciendo el acercamiento de STAT5 a las quinasas para ser fosforilado. Una vez fosforilado STAT5 (STAT5-P), este dimeriza con otro STAT5-P para luego ser traslocado al núcleo, donde participa como factor de transcripción de genes de la familia de Bcl-2 [Jiang y cols., 2005; Zaunders y cols., 2014]. Elaboración propia en el programa BioRender©.

Según antecedentes actuales, como la expresión de IL-7 es constitutiva, la homeostasis de los LT CD4+ dependería de la expresión del receptor IL-7Rα, por lo que una expresión alterada en el receptor repercute directamente en la biodisponibilidad de los LT CD4+ y en el efecto protector que estos generan.

### Isoforma soluble de IL-7R $\alpha$

Se han descrito isoformas solubles de IL-7R $\alpha$  (sIL-7R $\alpha$ ) que se generan a partir de corte y empalme (*splicing*) alternativo del mensajero de IL-7R $\alpha$  [Figura 4]. Estas isoformas regulan la biodisponibilidad extracelular de IL-7, y tienen un importante rol en la inflamación, la proliferación celular y la apoptosis [Lundstrom y cols., 2012]. Este receptor actúa principalmente como un inhibidor de la vía de señalización IL-7/IL-7R. La función fisiológica de los receptores solubles sería la regulación de la actividad de las citoquinas, sintetizándose en paralelo con los ligandos [Lundstrom y cols., 2012]. Altos niveles plasmáticos de sIL-7R $\alpha$  se han asociado con letalidad en sepsis [Demaret y cols., 2014]. También es importante en la inmunopatogénesis de diferentes enfermedades como shock séptico, infecciones por VIH y en la enfermedad injerto contra huésped [Demaret y cols., 2014; Guzman-Fulgencio y Cols. 2015; Kielsen y cols., 2017].



**Figura 4. Representación de la formación de IL-7Rs.** Representación estructural de los dominios de la proteína IL-7R $\alpha$  y cómo se genera la isoforma soluble mediante el corte y empalme alternativo. La línea roja indica la posición de los exones, las líneas grises muestran los corte y empalme alternativos que producen la pérdida del exón 6 (isoforma H6) o de los exones 5 y 6 en conjunto (isoforma H5-6). El signo de STOP indica la posición en el que se genera un codón de término por el cambio en el marco de lectura. Información obtenida de Uniprot. Imagen elaborada en PowerPoint (Microsoft©).

En el caso de enfermedades infecciosas asociadas al tracto respiratorio como NAC, no existen antecedentes sobre los niveles de sIL-7R $\alpha$  ni del receptor funcional de membrana.

### **IL-7R $\alpha$ como biomarcador para evolución de NAC**

Considerando que la evolución de la gravedad de los adultos con NAC no dependería del agente detectado, sino de su respuesta inmunológica; que en los pacientes graves está significativamente disminuida la expresión del gen *Il7r*, cuya función está directamente relacionada al desarrollo y homeostasis de los linfocitos T, y el recuento de linfocitos T CD4+; que la isoforma soluble del receptor de IL-7R $\alpha$  y los alelos C, T y A de los polimorfismos c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G están asociados a gravedad de algunas enfermedades autoinmunes e infecciosas, es posible que IL-7R cumpla un rol clave en la neumonía adquirida en la comunidad en adultos inmunocompetentes.



## **HIPOTESIS**

Los alelos C, T y A de los polimorfismos c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G, respectivamente; la disminución de la expresión de IL-7R, el aumento de IL-7R soluble y la disminución de IL-7 en circulación se relacionan con evolución grave de adultos con neumonía adquirida en la comunidad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G; la expresión génica de *IL7r*; el porcentaje de células que expresan IL-7R; la concentración plasmática de IL-7R soluble y su ligando IL-7 difieren entre adultos con neumonía adquirida en la comunidad con distinta evolución clínica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Caracterizar los genotipos de los polimorfismos c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G del gen *IL7r* con PCRtr en ADNg obtenido de muestras sanguíneas sistémica de adultos con NAC y evaluar diferencias según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad clínica.
- 2) Comparar la expresión relativa del gen *IL7r* en sangre de adultos con NAC mediante PCRtr según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad clínica.
- 3) Relacionar la proporción de linfocitos sanguíneos que expresan IL-7R determinada por citometría de flujo con gravedad clínica, datos demográficos y comorbilidades de adultos con NAC.
- 4) Comparar la concentración plasmática de IL-7Rs e IL-7 determinada por inmunoensayos, según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad de adultos con NAC.

## **METODOLOGÍA**

### **Tipo de estudio**

Estudio observacional transversal analítico.

### **Población estudiada**

Se evaluaron pacientes chilenos mayores de 18 años con NAC provenientes de: Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCh), Hospital Lucio Córdova y Complejo Hospitalario San José, todos ubicados en Santiago, región Metropolitana, entre mayo del 2017 y agosto del 2019. La NAC se estableció según la definición contenida en la guía clínica del Ministerio de Salud [MINSAL, Gob. De Chile, 2011]: tos, expectoración, fiebre y dolor torácico y confirmado con la presencia de nuevos infiltrados pulmonares en radiografía de tórax. El equipo de salud asociado al proyecto compuesto por personal médico y de enfermería identificaron los casos que cumplían con los criterios de inclusión y de exclusión. A estos pacientes se les invitó a participar del estudio y se les informó a ellos o sus representantes legales sobre el proyecto. Todos aquellos que voluntariamente aceptaron participar, manifestaron su acuerdo mediante la firma de un consentimiento informado.

### Criterios de inclusión para adultos NAC

- Adultos ( $\geq 18$  años) hospitalizados en cualquier época del año por neumonía adquirida en la comunidad.

### Criterios de exclusión

- Hospitalización previa dentro de los últimos 30 días.
- Neumonía asociada a la atención de salud.
- Inmunosupresión por: VIH/SIDA, quimioterapia, tratamiento con esteroides y otros productos biológicos.
- Diálisis crónica.

De cada paciente enrolado, se registraron los datos demográficos como edad y sexo, y clínicos como días de enfermedad, comorbilidades, tratamientos, evolución y exámenes de laboratorio. Los adultos con NAC se clasificaron en graves y no graves según PSI y CURB-65.

## **Financiamiento y Aprobación**

Este estudio se enmarca en el proyecto FONDECYT 1171643 y fue aprobado por los comités de ética de los servicios de salud metropolitanos Norte y Sur, por el comité de ética del HCUCh y por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile [Anexo].

## **Tamaño muestral**

Utilizando el programa Quanto (University of Southern California) y basados en la frecuencia del alelo del SNP que presentaba una menor frecuencia en la base de datos de SNP del NCBI, se estimó un tamaño muestral de 174 adultos con NAC, siendo el 50% pacientes con NAC grave. Se consideró un poder estadístico de 80% con 85% de confianza, un riesgo genotípico igual o mayor a dos y una frecuencia alélica de 20% correspondiente a la menor frecuencia alélica descrita en los SNPs del gen *IL7r* que se analizaron.

En esta tesis se estudiaron 202 adultos con NAC, 110 de los cuales se clasificaron como graves y 92 como no graves según PSI, y 68 graves y 134 no graves según CURB-65.

## **Muestras biológicas estudiadas**

Las muestras fueron obtenidas durante las primeras 24 horas de hospitalización, al momento del enrolamiento de los adultos hospitalizados por NAC, por personal de enfermería y kinesiología de los hospitales.

### Muestra de orina

De cada adulto se obtuvieron 5 ml de primer chorro en un frasco plástico con tapa rosca estéril, para la detección de agentes bacterianos.

### Muestra de secreción respiratoria

Se obtuvo aspirado y/o torulado nasofaríngeo en los pacientes hospitalizados (adultos con NAC) para la detección de agentes infecciosos. El aspirado nasofaríngeo se obtuvo insertando una sonda por la fosa nasal del paciente hasta la nasofaringe, aspirando al vacío durante unos segundos, y retirando la sonda con suavidad. La muestra obtenida es depositada en un tubo colector estéril con medio de transporte universal (MTU). El torulado nasofaríngeo se obtuvo introduciendo el hisopo estéril con suavidad a través de la fosa nasal hasta la nasofaringe, donde se rota este cepillo, repitiendo el proceso en la otra fosa nasal. La

tórula se deposita en un tubo estéril con MTU. La muestra respiratoria se utilizó para la detección de agentes virales y bacterianos.

#### Muestra de sangre venosa periférica

Se dividieron aproximadamente 12 ml de muestra de sangre venosa periférica de cada adulto enrolado en dos tubos con anticoagulante (EDTA). La muestra sanguínea se utilizó para diversos análisis incluyendo los análisis de IL-7R $\alpha$ .

### **Detección de agentes infecciosos**

#### 1. Inmunocromatografía

Se detectaron los antígenos de *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella* en muestras de orina mediante una prueba rápida cualitativa de inmunocromatografía comercial (Binax Now®). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante.

#### 2. Transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR-tr)

De la muestra respiratoria se extrajeron los ácidos nucleicos utilizando el kit comercial FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction Kit I (Favorgen®) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se utilizó un kit comercial de RT-PCRtr (Argene®) para la detección múltiple de agentes respiratorios que incluye Flu A/B, VRS, MPVh, RV y enterovirus, AdV, Bocavirus humano (BoVh), CoVH, VPIF, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* en muestra respiratoria. Para el RT-PCRtr se siguió el protocolo indicado por el fabricante, y la reacción se realizó en el termociclador MIC (Bio Molecular Systems©).

## **Análisis de polimorfismos**

### 1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de cada muestra se extrajo a partir de una alícuota de 250 µl de sangre total con EDTA utilizando el kit Exgene™ Blood SV (GeneAll®) y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Se cuantificó la concentración de ADN en el espectrofotómetro Epoch (BioTek®) y se hicieron alícuotas de 5 ng/µl diluidas con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, guardadas a -20°C hasta su uso.

### 2. Genotipificación

#### *PCR-tr con fusión de alta resolución (HRM)*

Para cada polimorfismo se diseñaron los partidores [Tabla 5] con el programa Beacon designer (Premier Biosoft int.®) de acuerdo a la secuencia descrita en Genbank NG\_009567.1 y la posición del SNPs publicada en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, EEUU). Para las reacciones de PCRtr-HRM se utilizó el kit qPCR KAPA HRM FAST (KAPABIOSYSTEMS©), preparando la mezcla de reacción de acuerdo con lo indicado por el fabricante [Tabla 6]. Todas las reacciones se realizaron en el equipo ECO™ Real-Time PCR System (Illumina®) en un volumen final de 10 µl utilizando 10 ng de ADN purificado.

*Tabla 3. Partidores utilizados en la PCRtr-HRM para realizar la genotipificación de polimorfismos en el gen Il7r.*

<b>Polimorfismo</b>	<b>Partidor</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>	<b>Tamaño de amplicón</b>
c.731 C>T	Directo	CCACAATCTATTCTTGCTTTCCA	87 pb
	Reverso	CCAACAGCGCGACAGAGA	
c.1066 A>G	Directo	ACTGCCCATCTGAGGAT	66 pb
	Reverso	GCATGTGAGGGATGAATCT	
c.801-21 A>T	Directo	CTGTGCCCTCTGCCATTC	67 pb
	Reverso	CCATACGATAGGCTTAATCCTGAA	

**pb**, pares de bases. Partidores diseñados con programa Beacon designer (Premier Biosoft int.).

*Tabla 4. Mezcla de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación de polimorfismos en el gen Il7r.*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	1 µl
Partidor directo	10 µM	0,25 µM	0,25 µl
Partidor reverso	10 µM	0,25 µM	0,25 µl
KAPA HRM FAST	2X	1X	5 µl
H <sub>2</sub> O	-	-	1,5 µl
ADN genómico	5 ng/µl	1 ng/µl	2 µl
Total			10 µl

A continuación, se describen las reacciones estandarizadas para la genotipificación de cada polimorfismo.

*Polimorfismo c.731 C>T (rs6897932)*

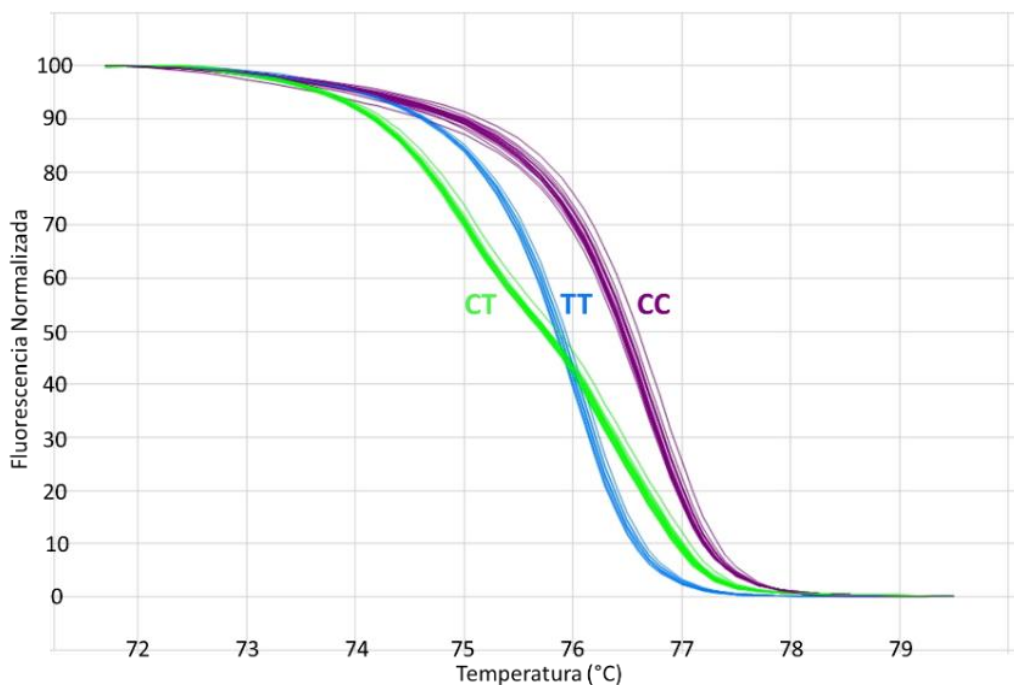
La reacción de amplificación utilizada se muestra en la Tabla 7.

*Tabla 7. Protocolo de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación del SNP c.731 C>T.*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	n° de ciclos
Activación de polimerasa	95	120	1
Denaturación	95	5	45
Hibridación/Extensión	56	15	
Curva de fusión de alta resolución	55 a 95	-	1

s, segundos

La identificación de cada genotipo se realizó posterior a la reacción PCRtr con la curva de HRM [Figura 5].



**Figura 5. Curva de fusión de alta resolución del polimorfismo c.731 C>T.** Gráfico representativo de una curva HRM posterior a PCRtr. El eje “x” grafica la temperatura (°C) y el eje “y” la fluorescencia normalizada. El equipo de tiempo real realiza la detección de fluorescencia cada 0,1°C. Se observan tres tipos de curvas características, las azules corresponden al genotipo TT, las moradas a CC y las verdes a CT.

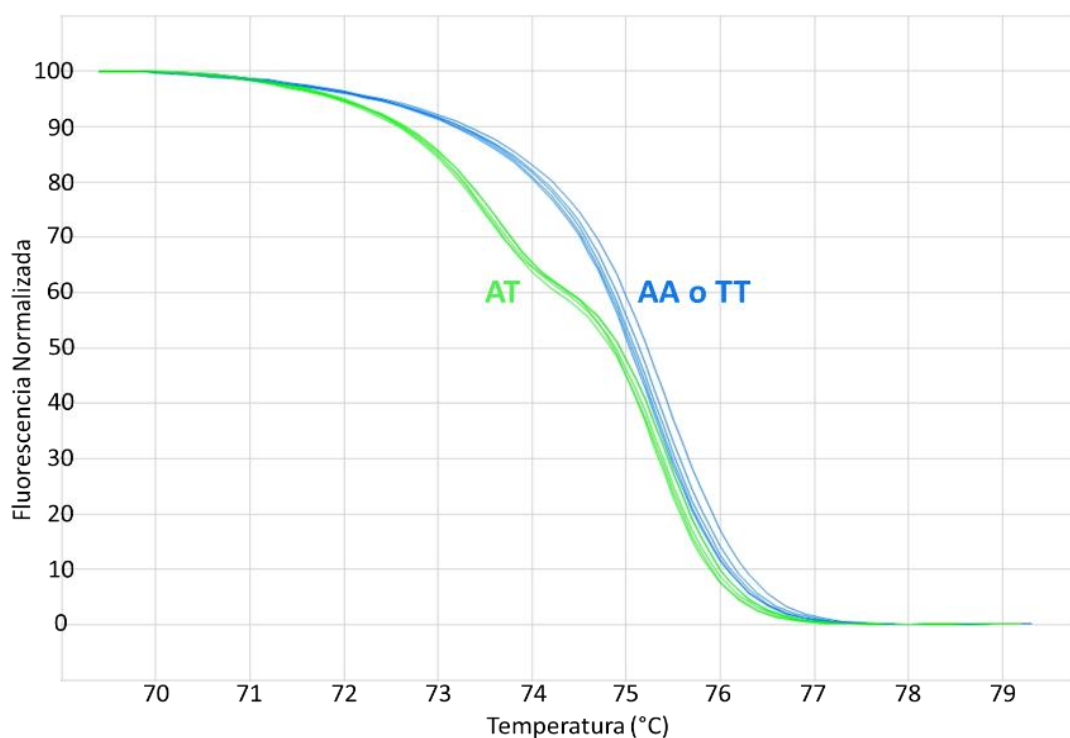
*Polimorfismo c.801-21 A>T (rs987106)*

La reacción de amplificación utilizada se muestra en la Tabla 8.

*Tabla 8. Protocolo de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación del SNP c.801-21 A>T.*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	n° de ciclos
Activación de polimerasa	95	120	1
Denaturación	95	5	45
Hibridación/Extensión	56	15	
Curva de fusión de alta resolución	55 a 95	-	1

s, segundos



**Figura 6. Curva de fusión de alta resolución del polimorfismo c.801-21 A>T.** Gráfico representativo de curva HRM posterior al PCRtr. En el eje “x” se grafica la temperatura (°C) y en el eje “y” la fluorescencia normalizada. La detección de fluorescencia se realiza cada 0,1°C. Se observan dos grupos con curvas características, las azules corresponden a los homocigotos AA o TT, y las verdes a heterocigotos AT.



Con la curva HRM [Figura 6] se puede diferenciar entre homocigoto y heterocigoto, pero no es posible discriminar el homocigoto. Debido a esto, se diseñó un PCRtr alelo específico para poder realizar la genotipificación de este SNP que se describe posteriormente.

*Polimorfismo c.1066 A>G (rs3194051)*

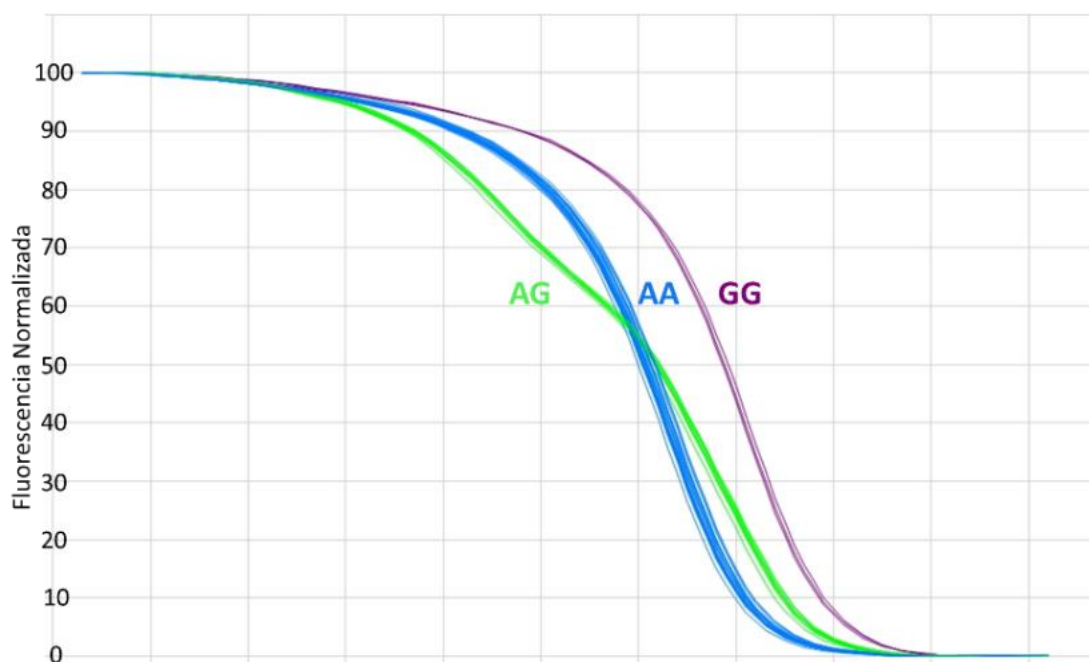
La reacción de amplificación utilizada se muestra en la Tabla 9.

*Tabla 9. Protocolo de reacción de la PCRtr-HRM para la genotipificación del SNP c.1066 A>G.*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	n° de ciclos
Activación de polimerasa	95	120	1
Denaturación	95	5	45
Hibridación/Extensión	55	20	
Curva de fusión de alta resolución	55 a 95	-	1

s, segundos

La identificación de cada genotipo se realizó con la curva HRM [Figura 7].



**Figura 7. Curva de fusión de alta resolución del polimorfismo c.1066 A>G.** Gráfico representativo de curva HRM posterior a PCRtr. En el eje “x” se grafica la temperatura (°C) y en el eje “y” la fluorescencia normalizada. La detección de fluorescencia se realiza cada 0,1°C. Se observan tres tipos de curvas características, las azules corresponden al genotipo AA, las moradas al genotipo GG y las verdes a AG.

*PCRtr alelo específico para la genotipificación del SNP c.801-21 A>T (rs987106)*

Con el programa Beacon designer (Premier Biosoft int.®), se diseñaron dos partidores directos, uno para cada alelo (A y T) y un partidor reverso [Tabla 10]. La mezcla de reacción se indica en la Tabla 11 y el protocolo de reacción utilizado en el equipo ECO™ Real-Time PCR System (Illumina®) se indica en la Tabla 12. Se realizan dos reacciones por cada muestra, correspondiente al alelo A y al alelo T.

*Tabla 10. Partidores para PCRtr alelo específico para genotipificación del SNP c.801-21 A>T.*

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>	<b>Tamaño de amplicón</b>
Directo A	CTGCCATTCACTTCATCTAT	94 pb
Directo T	CTGCCATTCACTTCATCTTT	
Reverso	ATGTTCCAGAGTCTTCTTATG	

**pb**, pares de bases. Partidores diseñados con programa Beacon designer (Premier Biosoft int.)

*Tabla 11. Mezcla de reacción para PCRtr alelo específico para genotipificación de c.801-21 A>T.*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
Partidor directo (A o T)	10 µM	0,2 µM	0,2 µl
Partidor reverso	10 µM	0,2 µM	0,2 µl
KAPA SYBR FAST	2X	1X	5 µl
H2O	-		2,6 µl
ADN genómico	5 ng/µl	10 ng total	2 µl
Total			10 µl

Mezcla de reacción para PCRtr alelo específico utilizado para genotipificar el polimorfismo 801-21 A>T. Para cada reacción se utiliza un solo partidor directo, ya sea A o T, nunca en conjunto.

Tabla 12. Protocolo de reacción de la PCRtr alelo específico para genotipificar el SNP c.801-21 A>T.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	n° de ciclos
Activación de polimerasa	95	180	1
Denaturación	95	3	45
Hibridación	61	15	
Extensión	72	3	
Curva de fusión	55 a 95	-	1

s, segundos.

Para determinar el genotipo se utiliza el valor del ciclo umbral (*cycle threshold*, Ct) de cada reacción (partidor directo A y partidor directo T), los que varían según el genotipo. El Ct para las muestras heterocigotas (AT) son similares ( $\Delta < 2$ ); para las muestras homocigotas AA, el valor de Ct con el partidor A es menor que el valor de Ct obtenido con el partidor T y en las muestras homocigotas TT, el valor Ct obtenido con el partidor T es menor que el valor Ct obtenido con el partidor A.

### Expresión relativa del gen *IL7r*

#### 1. Extracción de ARN total en muestras de sangre

Aproximadamente 6 ml de cada muestra sanguínea con EDTA se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos en centrífuga U-32R (BOECO©) y de la fracción precipitada se transfirieron dos alícuotas de 400 µl cada una a tubos microcentrífuga de 2 ml. Se adicionó 1 ml de reactivo de TRIzol™ a cada tubo, y se siguió el protocolo de extracción según lo indicado por el fabricante. Una vez obtenido el ARN total se cuantificó por espectrofotometría en el equipo lector de microplacas EPOCH (BioTek®) y se realizó el tratamiento con DNasa utilizando el kit TURBO DNA-free™ (Ambion®). Se volvió a cuantificar la concentración de ARN y se prepararon alícuotas de 2 µg de ARN total, para la transcripción inversa que se realizó de inmediato. Se guardaron alícuotas de respaldo a -80 °C.

## 2. Transcripción inversa

La transcripción inversa se realizó con 2 µg de ARN total tratado con DNasa, 200 unidades de la transcriptasa inversa del Virus Moloney de Leucemia Murina (RT-MMLV, Promega©) y 26 µg/ml de partidores al azar (*Random primers*, Promega©) en un volumen final de 25 µl. Se siguió el protocolo indicado por el fabricante.

## 3. PCRtr para los genes *TUBB* e *Il7r*

Para el cálculo de la expresión relativa se utilizó *TUBB* como gen de referencia, cuya expresión no varía durante una infección e inflamación y para el cual ya había partidores publicados [Zhang y cols., 2005]. Para *Il7r* se diseñó un par de partidores [Tabla 13] con el programa Beacon designer (Premier Biosoft int.®) basados en la secuencia descrita en Genbank NM\_002185.4. Las concentraciones de los reactivos se indican en las tablas 14 y 15 para los genes *TUBB* e *Il7r* respectivamente. Los protocolos de reacción utilizados en el equipo ECO™ Real-Time PCR System (Illumina®) se indican en las tablas 16 y 17.

*Tabla 13. Partidores para PCRtr para evaluar la expresión génica de Il7r.*

<b>Gen</b>	<b>Partidor</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>	<b>Tamaño de amplicón</b>
<i>TUBB</i>	Directo	CTTCGGCCAGATCTTCAGAC	177 pb
	Reverso	AGAGAGTGGGTCAGCTGGAA	
<i>Il7r</i>	Directo	CAGCAATGTATGAGATTA	142 pb
	Reverso	ATGGTTAGTAAGATAGGAT	

**pb**, pares de bases. Los partidores para el gen *TUBB* se sintetizaron a partir de las secuencias ya descritas por Zhang y cols. (2005). Partidores para el gen *Il7r* diseñados con programa Beacon designer (Premier Biosoft int.®)

*Tabla 14. Mezcla de reacción utilizada en la PCRtr para amplificar el gen de referencia TUBB.*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
Partidor directo	10 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
Partidor reverso	10 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
KAPA SYBR FAST	2X	1X	5 $\mu$ l
H2O	-	-	2,4 $\mu$ l
ADN genómico	5 ng/ $\mu$ l	10 ng total	2 $\mu$ l
Total			10 $\mu$ l

El Ct obtenido se utilizó para el cálculo de expresión relativa de *Il7r*.

*Tabla 15. Mezcla de reacción utilizada en la PCRtr para amplificar el gen Il7r.*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
Partidor directo	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l
Partidor reverso	10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l
KAPA SYBR FAST	2X	1X	5 $\mu$ l
H2O	-	-	2,6 $\mu$ l
ADN genómico	5 ng/ $\mu$ l	10 ng total	2 $\mu$ l
Total			10 $\mu$ l

El Ct obtenido se utilizó para el cálculo de la expresión relativa.

*Tabla 16. Protocolo de reacción la PCRtr para amplificar el gen de referencia TUBB.*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>n<math>^{\circ}</math> de ciclos</b>
Activación de polimerasa	95	180	1
Denaturación	95	3	45
Hibridación	60	15	
Extensión	72	3	
Curva de fusión	55 a 95	-	1

s, segundos.

Tabla 17. Protocolo de reacción de la PCRtr para evaluar la expresión génica de *I17r*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	n° de ciclos
Activación de polimerasa	95	180	1
Denaturación	95	3	45
Hibridación	53	15	
Extensión	72	3	
Curva de fusión	55 a 95	-	1

s, segundos.

#### 4. Cálculo de expresión relativa

La expresión relativa de *I17r* se calculó con la fórmula de  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  [Pfaffl y cols., 2002], utilizando como gen normalizador a *TUBB*.

#### Recuento Hematológico

De la muestra de sangre total con anticoagulante, se tomó una alícuota de 200  $\mu$ l para el hemograma, utilizando el equipo BCC-3000B Hematology Analyzer (DIRUI©).

#### Recuento de linfocitos CD127+

Se cuantificaron los linfocitos que expresan CD127 mediante citometría de flujo en muestras sanguíneas de adultos con NAC con agente detectado.

A partir del resultado obtenido en el recuento hematológico de sangre con anticoagulante, se calculó el volumen necesario para hacer dos alícuotas con  $10 \times 10^6$  y  $10 \times 10^5$  de células blancas. Las alícuotas se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 500  $\mu$ l de DPBS 1X a 3500 rpm por 5 minutos. Ambos tubos se resuspendieron en 1 ml de DPBS 1X, agregándose 1  $\mu$ l de tinción de viabilidad celular FSV 780 1/100 al tubo de  $10 \times 10^6$  células. Se incubaron por 15 minutos a T° ambiente en oscuridad, y posteriormente se hicieron dos lavados consecutivos con 2 ml de cPBS 1X (3500 rpm por 5 minutos) y se descartó el sobrenadante. Al tubo de  $10 \times 10^6$  células se añadieron 50  $\mu$ l BD Horizon Brilliant Stain Buffer y se completó a 1 ml con FBS y al de control celular sin tinción (el de  $10 \times 10^5$  células), se agregaron 5  $\mu$ l de BD Horizon Brilliant Stain Buffer y se completaron 100  $\mu$ l con FBS. En total se prepararon 4 tubos con 100  $\mu$ l de células cada uno: tres contenían células con tinción de vitalidad y uno sin la tinción. A uno de los tubos con

tinción vital se le agregaron los anticuerpos CD127-BV421 (cod.562436) 1:200 dilución final y CD3-APC (cod.555342) 1:5 dilución final. Al segundo tubo con tinción vital se le agregaron los controles de isotipo IgG1k-BV421 (cod.562438) 1:200 dilución final e IgG2ak-APC (cod.555576) 1:5 dilución final. El tercer y cuarto tubo, con y sin tinción vital, son controles por lo que no se agregaron anticuerpos. Posteriormente los tubos se incubaron por 30 minutos a T° ambiente en oscuridad. Luego a cada tubo se agregaron 2 ml de solución de lisis BD FACS Lysing Solution 1X y se incubaron por 15 a 20 minutos en oscuridad. Finalizada la incubación se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces consecutivas con 1 ml de cPBS 1X a 2500 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 200 µl de cPBS y se llevaron en oscuridad hasta el servicio de Inmunología del HCUCh, para las detecciones en el citómetro de flujo BD FACSCanto II.

#### **Cuantificación de sIL-7R $\alpha$ en plasma**

Se cuantificó la concentración de sIL-7R $\alpha$  en plasma obtenido por centrifugación de la sangre de adultos con NAC a 2000 rpm por 5 minutos. Se utilizó el ensayo inmunoenzimático Human IL-7 alpha ELISA (RayBiotech®) con 100 µl de las muestras de plasma diluidas 1/10 con el diluyente de ensayo, según el protocolo indicado por el fabricante.

#### **Cuantificación de IL-7 en plasma**

Se cuantificó la concentración de IL-7 en 25 µl de plasma con el kit multiplex, panel de MILLIPLEX MAP de esferas magnéticas para Citoquinas y Quimioquinas Humanas, HCYTOMAG-60K (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel MILLIPLEX, MERCK®) en el equipo MAGPIX® (Luminex®), según el protocolo indicado por el fabricante.

### **Análisis estadístico**

Las variables cualitativas se describieron como proporciones y porcentajes, y las cuantitativas como medianas y el rango Inter-cuartílico. Las frecuencias alélicas, genotípicas y de haplotipos se analizaron con el programa Unphased [Dudbridge F, 2003].

Para evaluar la distribución normal en los grupos con  $n \geq 30$  se utilizaron las pruebas de Anderson-Darling y Shapiro-Wilk en el programa Prisma 8 (GraphPad Software©). Para las variables cuantitativas no paramétricas se utilizó la prueba de Mann-Whitney y para las variables cualitativas se utilizó chi cuadrado en el programa Prisma 8 (GraphPad Software©).



## **RESULTADOS.**

### **Características demográficas de adultos con neumonía adquirida en la comunidad estudiados**

Las características de los 202 adultos hospitalizados con NAC se describen en las Tablas 18 y 19. La mediana de edad fue 73 años (RIQ: 60-84) en el total de adultos enrolados. Al subdividirlo por edad, en el grupo < 65 años, la mediana fue de 52 años y en los  $\geq 65$  años fue 79 años. En este último grupo prevaleció la presencia de hipertensión arterial (HTA), insuficiencia cardíaca y enfermedades neurológicas. Según los puntajes clínicos de clasificación de gravedad, la proporción de casos graves fue mayor en el grupo  $\geq 65$  (67% según PSI y 46% según CURB-65) que en el grupo < 65 años (55% según PSI y 80% según CURB-65). El porcentaje de casos moderados según PSI fue similar entre ambos grupos etarios; en cambio, por CURB-65 fue mayor en el grupo  $\geq 65$  años (35%). Comparando la evolución de la NAC, en los adultos  $\geq 65$  años el 63% requirió oxigenoterapia vs 47% en < 65 años y un 22% falleció dentro de los 30 días posterior a la enfermedad vs un 2% en < 65 años. Sin embargo, solo el 17% del grupo  $\geq 65$  años ingresó a UCI en contraste al 33% de <65 años. Comparando los datos clínicos según sexo, se observa en las mujeres respecto a los hombres, una proporción significativamente superior de asmáticas (13% vs 5%), y menor de casos graves según PSI (48% vs 61%).

*Tabla 18. Características demográficas de adultos con neumonía adquirida en la comunidad estudiados, Santiago, 2017-2019.*

Variables		Total	< 65 años	≥ 65 años	p	Mujer	Hombre	p
Demográficos	n° casos	202	64 (32%)	138 (68%)	-	100	102	-
	Edad (años)	73 (60-84)	54 (48-60)	79 (72-86)	< 0,0001	74 (61-84)	70 (60-81)	0,21
	< 65 años	64/202 (32%)	-	-	-	28/100 (28%)	36/102 (35%)	0,26
	Mujer	100/202 (49%)	28/64 (44%)	72/138 (52%)	0,26	-	-	-
	Hombre	102/202 (51%)	36/64 (56%)	66/138 (48%)	0,26	-	-	-
	Días de evolución < 7 días	5 (3-7)	6 (4-7)	5 (3-7)	0,02	5 (3-7)	5 (3-7)	0,56
		123/200 (62%)	32/64 (50%)	91/136 (67%)	0,02	61/100 (61%)	62/100 (62%)	0,88
Comorbilidades	Comorbilidades	162/200 (81%)	44/63 (70%)	118/137 (86%)	0,006	82/99 (83%)	80/101 (79%)	0,51
	HTA	84/199 (42%)	16/62 (26%)	68/137 (50%)	0,002	44/99 (44%)	40/100 (40%)	0,53
	Diabetes	64/201 (32%)	21/64 (33%)	43/137 (32%)	0,84	28/99 (29%)	36/102 (35%)	0,29
	Asma	18/202 (9%)	7/64 (11%)	11/138 (8%)	0,49	13/100 (13%)	5/102 (5%)	0,04
	EPOC	51/202 (25%)	13/64 (20%)	38/138 (28%)	0,27	27/100 (27%)	24/102 (24%)	0,57
	Insuficiencia Cardíaca	37/202 (18%)	6/64 (9%)	31/138 (22%)	0,03	19/100 (19%)	18/102 (18%)	0,80
	Daño Hepático	7/202 (3%)	0/64 (0%)	7/138 (5%)	0,07	4/100 (4%)	3/102 (3%)	0,68
	Insuficiencia Renal	18/201 (9%)	6/64 (9%)	12/137 (9%)	0,89	7/99 (7%)	11/102 (11%)	0,36
	Neoplasia	12/201 (6%)	5/63 (8%)	7/138 (5%)	0,43	4/99 (4%)	8/102 (8%)	0,26
	Enfermedad Neurológica	34/200 (17%)	4/63 (6%)	30/137 (22%)	0,006	19/99 (19%)	15/101 (15%)	0,41
Agentes	Con detección de agentes	123/202 (61%)	37/64 (58%)	86/138 (62%)	0,54	65/100 (65%)	58/102 (57%)	0,24
	Virus	68/123 (55%)	19/37 (51%)	49/86 (57%)	0,56	36/65 (55%)	32/58 (55%)	0,98
	Bacterias	32/123 (26%)	11/37 (30%)	21/86 (24%)	0,54	18/65 (28%)	14/58 (24%)	0,65
	Mixto	23/123 (19%)	7/37 (19%)	16/86 (19%)	0,97	11/65 (17%)	12/58 (21%)	0,59

HTA, hipertensión arterial; EPOC, enfermedad pulmonar crónica obstructiva. El valor p para las variables cuantitativas se obtuvo con la prueba estadística de Mann-Whitney, el resultado se expresa en la mediana con su rango intercuartil entre parentesis, para las variables cualitativas se utilizó la prueba de chi cuadrado, el valor se expresa en proporción y porcentaje. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Prisma 8 (GraphPad Software©).

*Tabla 19. Características clínicas de adultos con neumonía adquirida en la comunidad estudiados, Santiago, 2017-2019.*

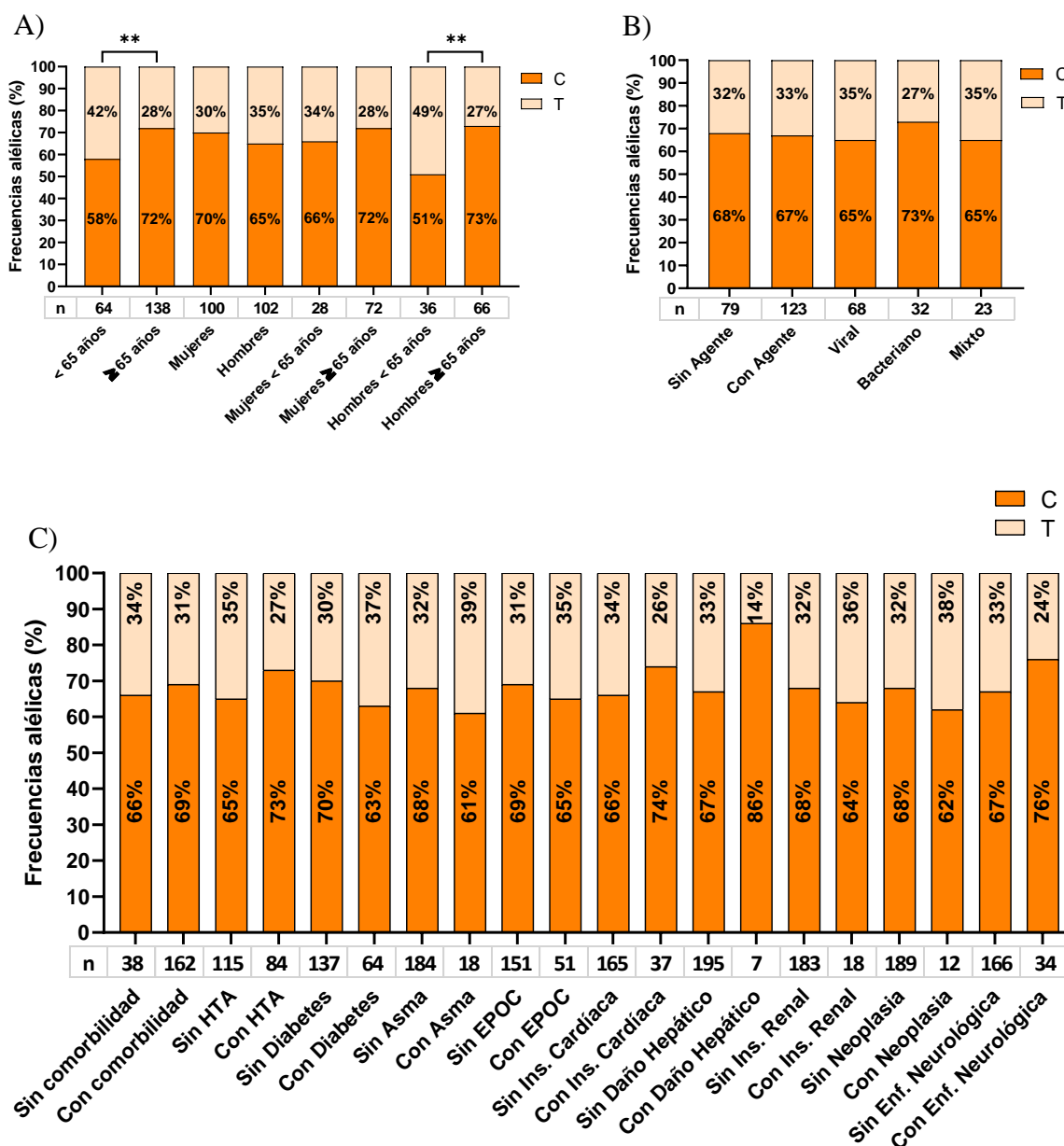
Variables		Total	< 65 años	≥ 65 años	p	Mujer	Hombre	p
Categoría de Gravedad	Clasificación PSI							
	Grupo I y II	48/202 (24%)	35/64 (55%)	13/138 (9%)	< 0,0001	30/100 (30%)	18/102 (18%)	0,04
	Grupo III	44/202 (22%)	11/64 (17%)	33/138 (24%)	0,28	22/100 (22%)	22/102 (22%)	0,94
	Grupo IV y V	110/202 (54%)	18/64 (28%)	92/138 (67%)	< 0,0001	48/100 (48%)	62/102 (61%)	0,07
	Clasificación CURB-65							
	Grupo I	77/202 (38%)	51/64 (80%)	26/138 (19%)	< 0,0001	35/100 (35%)	42/102 (55%)	0,37
Grupo II	57/202 (28%)	8/64 (12%)	49/138 (35%)	0,0007	27/200 (7%)	30/102 (29%)	0,70	
Grupo III	68/202 (34%)	5/64 (8%)	63/138 (46%)	< 0,0001	38/100 (38%)	30/102 (29%)	0,20	
Evolución	Requerimiento de Oxigenoterapia	117/202 (58%)	30/64 (47%)	87/138 (63%)	0,03	59/100 (59%)	58/102 (57%)	0,76
	Ingreso a Intermedio/UCI	45/202 (22%)	21/64 (33%)	24/138 (17%)	0,01	25/100 (25%)	20/102 (20%)	0,36
	Mortalidad hasta 30 días post alta	32/197 (16%)	2/62 (3%)	30/135 (22%)	0,0008	18/99 (18%)	14/98 (14%)	0,46
	Evolución grave	69/197 (35%)	20/62 (32%)	49/135 (36%)	0,58	39/99 (39%)	30/98 (31%)	0,20

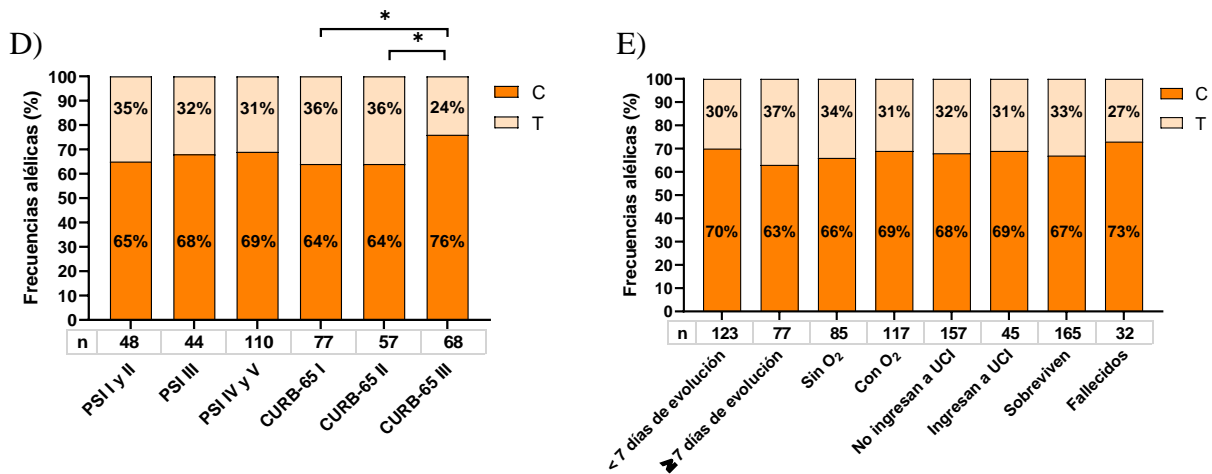
PSI, siglas en inglés de índice de gravedad de neumonía; CURB-65, siglas en inglés de las cinco características de riesgo que utiliza este índice; BUN, Blood urea nitrogen (trd-esp. nitrógeno ureico en sangre); PA, presión arterial; evolución grave corresponde a pacientes que ingresaron a UCI y/o fallecieron. El valor p se obtuvo con la prueba de chi cuadrado, el resultado está expresado en proporción y porcentaje. Los cálculos se realizaron en el programa Prisma 8 (GraphPad Software©).

**Objetivo específico 1: Caracterizar los genotipos de los polimorfismos c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G del gen IL7r con PCRtr en ADNg obtenido de muestras sanguíneas sistémica de adultos con NAC y evaluar diferencias según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad clínica.**

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de los SNPs obtenidas en el estudio en los 202 adultos con NAC enrolados, para determinar si se asocian con la gravedad de la NAC y/o su evolución.

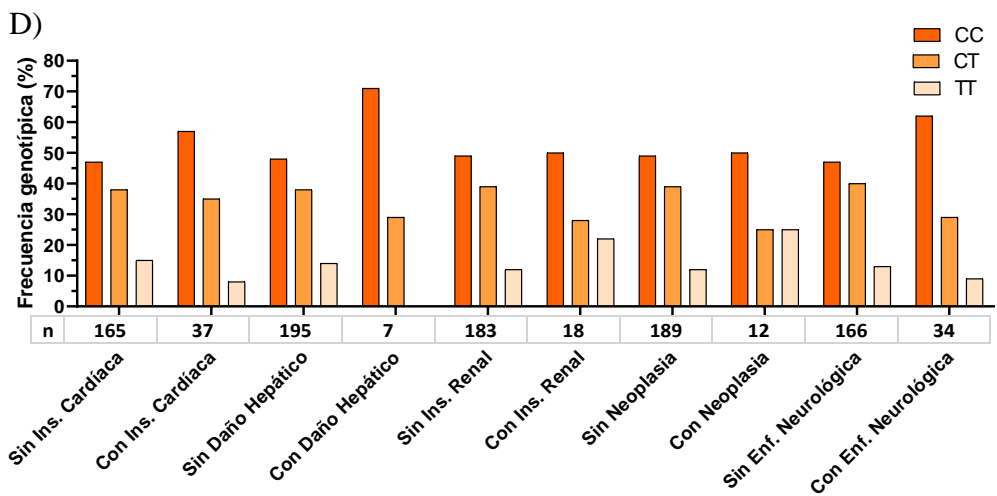
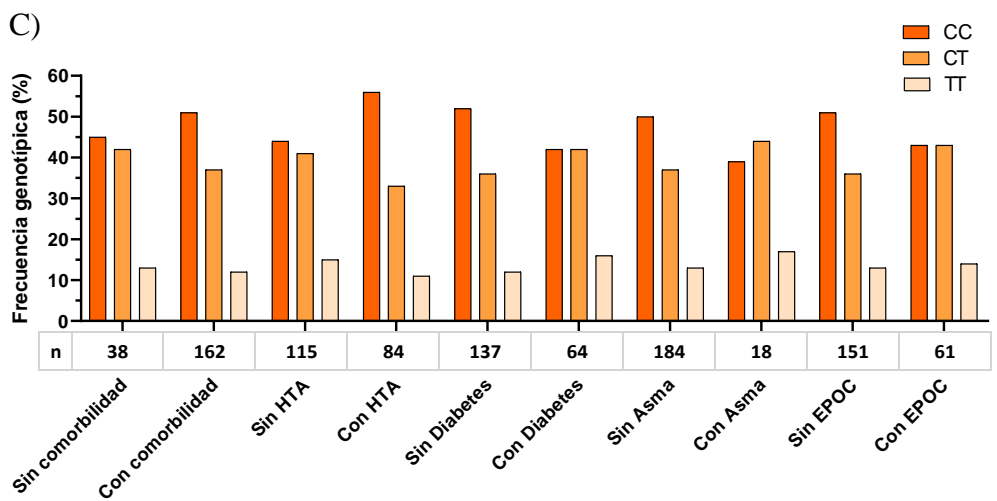
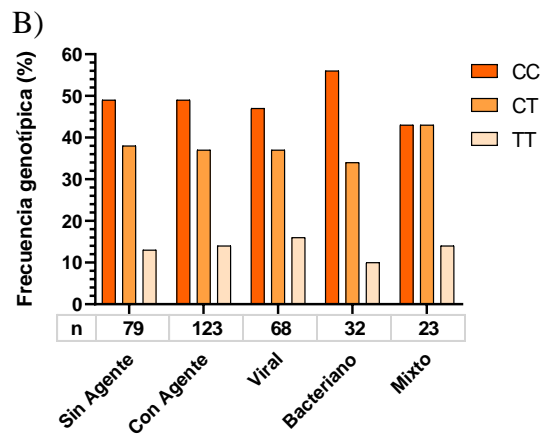
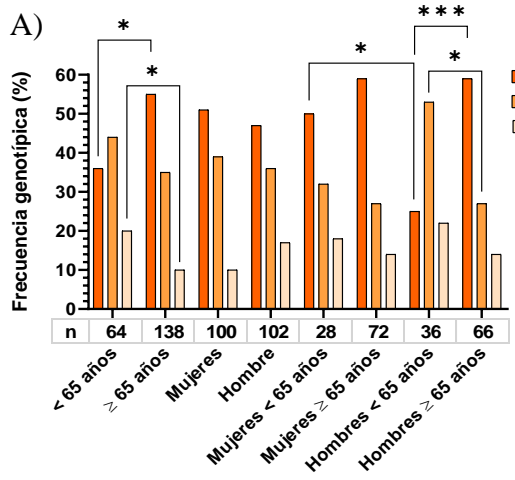
SNP c.731 C>T en adultos con NAC

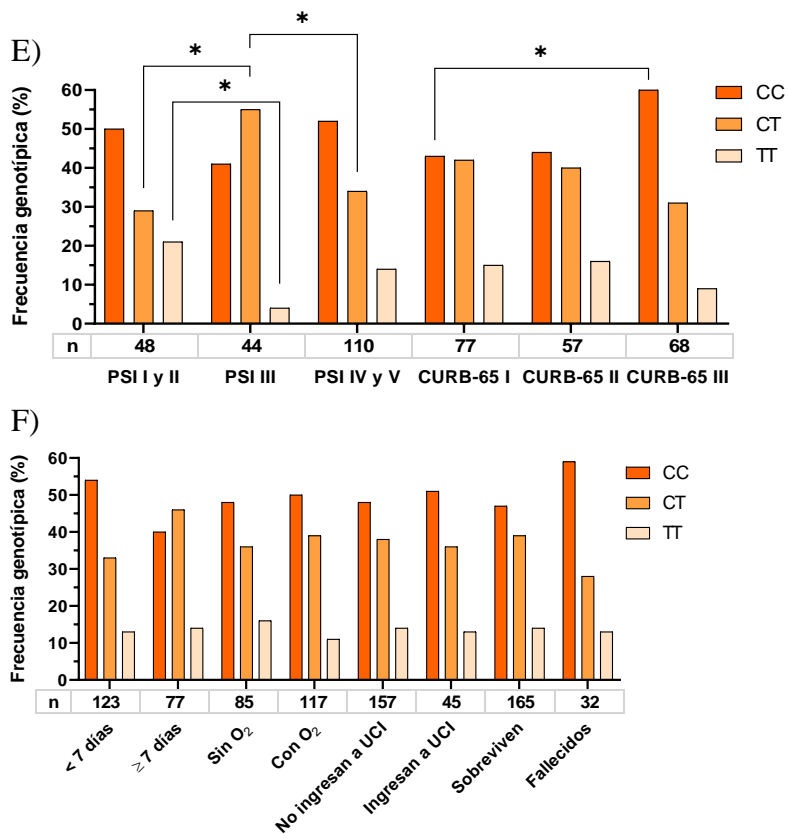




**Figura 8. Frecuencia alélica del polimorfismo c.731 C>T.** Frecuencia alélica (%) del polimorfismo c.731 C>T en el gen *IL7r* en 202 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). El valor de p se calculó usando la prueba del índice de probabilidad de Chi cuadrado para la frecuencia en cada grupo en el programa Unphased. (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,01. HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

En el análisis de frecuencia alélica del polimorfismo c.731 C>T según datos demográficos [Figura 8A], se encontró una mayor frecuencia del alelo C en adultos  $\geq 65$  años que en  $< 65$  años (p=0,003), lo que se mantuvo entre los hombres (p=0,002), pero no en mujeres. Las frecuencias fueron similares entre ambos sexos (p>0,05), entre los distintos agentes detectados [Figura 8B], en las comorbilidades asociadas [Figura 8C] y por evolución [Figura 8E] (p>0,05). Se observó diferencia en la clasificación de gravedad según CURB-65, donde el alelo C es más frecuente en adultos con NAC clasificados como graves respecto a los clasificados como no graves (p=0,02) y como moderados (p=0,04), pero no se detectó diferencia según PSI [Figura 8D].





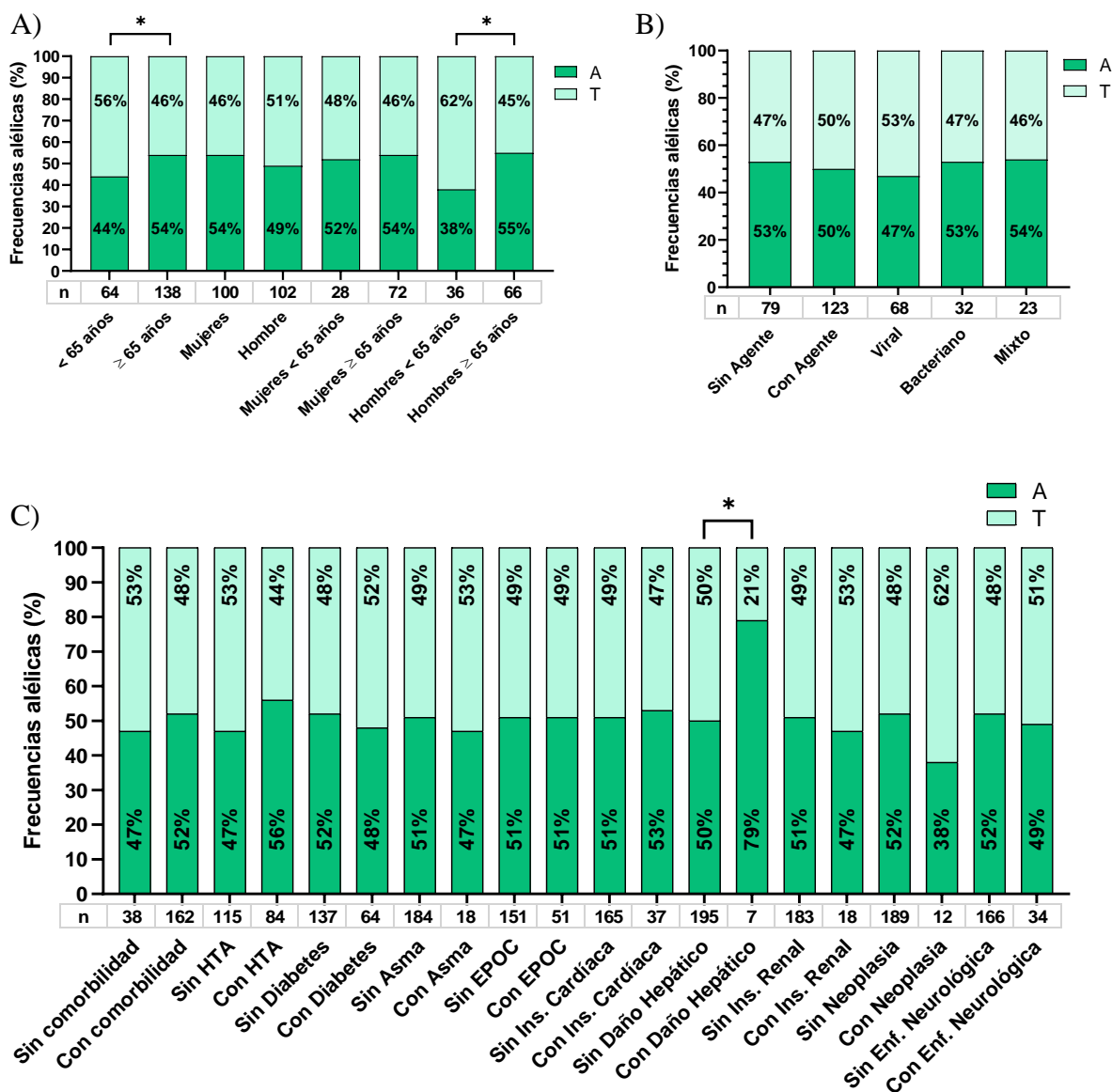
**Figura 9. Frecuencia genotípica del polimorfismo c.731 C>T.** Frecuencia (%) genotípica del polimorfismo c.731 C>T en el gen *IL7r* en 202 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). El valor de p se calculó usando la prueba del índice de probabilidad de Chi cuadrado para la frecuencia en cada grupo en el programa Unphased. (\*) p <0,05; (\*\*) p <0,01; (\*\*\*) p <0,001.

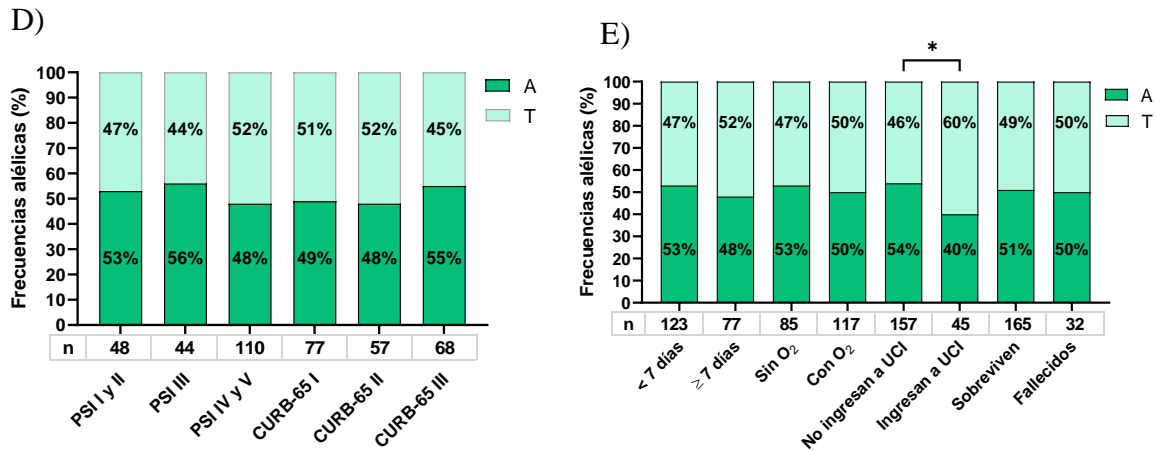
HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

En el análisis de la frecuencia genotípica de c.731 C>T se observó diferencia estadísticamente significativa según edad, siendo más frecuente el genotipo CC en ≥65 años (p=0,01) y el genotipo TT en <65 años (p=0,04). En hombres ≥65 años fue más frecuente el genotipo CC (p=0,0009), mientras que en hombres <65 años es más frecuente el genotipo CT (p=0,01). Hay diferencia estadísticamente significativa según sexo solo en <65 años, siendo en mujeres más frecuente el genotipo CC que en hombres (p=0,03) [Figura 9A]. La frecuencia genotípica de c.731 C>T muestra que el genotipo CC fue más frecuente entre los casos graves que en los no graves según CURB-65 (p=0,03), pero no en los clasificados por PSI. No hubo diferencia estadísticamente significativa según la detección de agente [Figura

9B], según comorbilidades asociadas [Figura 9C y D] y según la evolución de los adultos con NAC [Figura 9F].

### SNP c.801-21 A>T en adultos con NAC

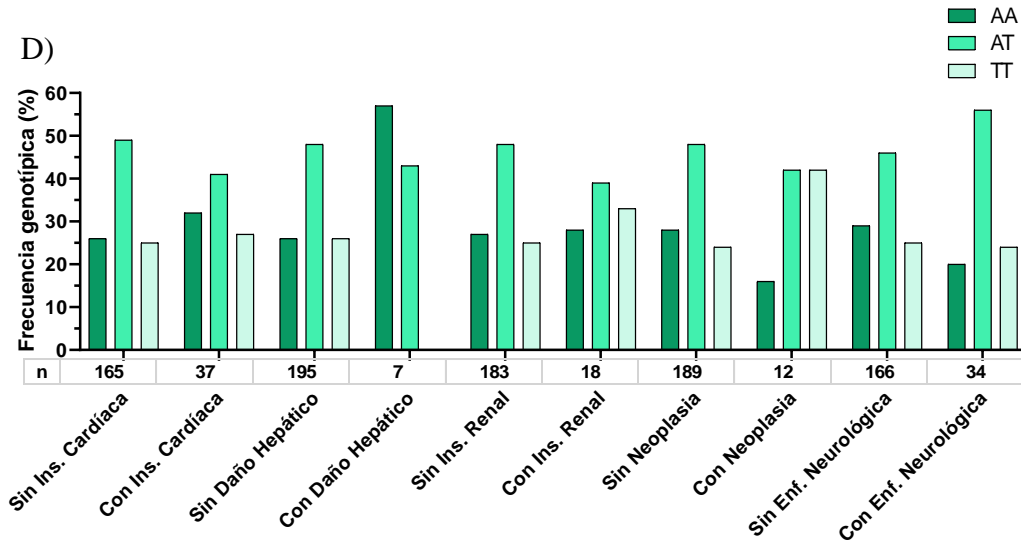
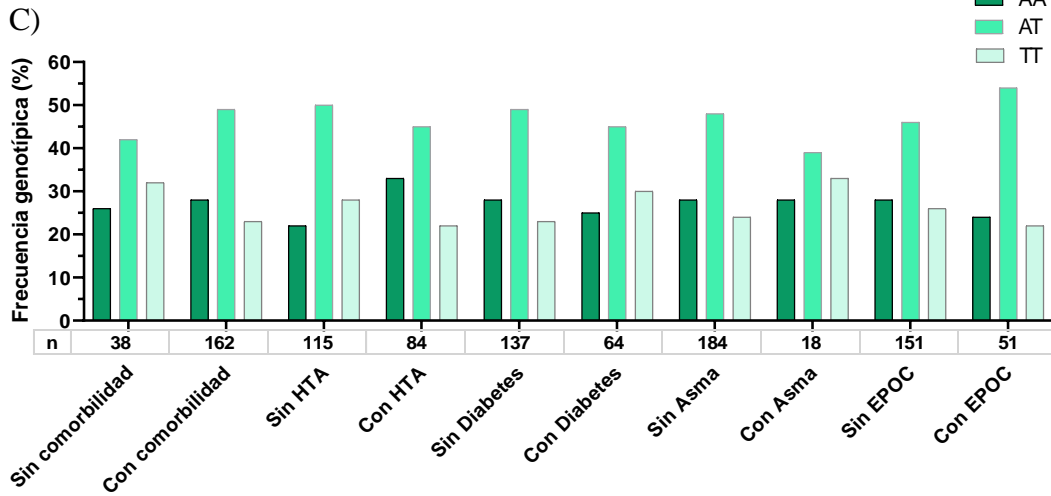
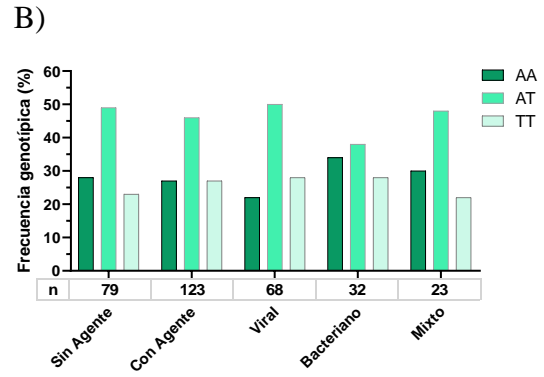
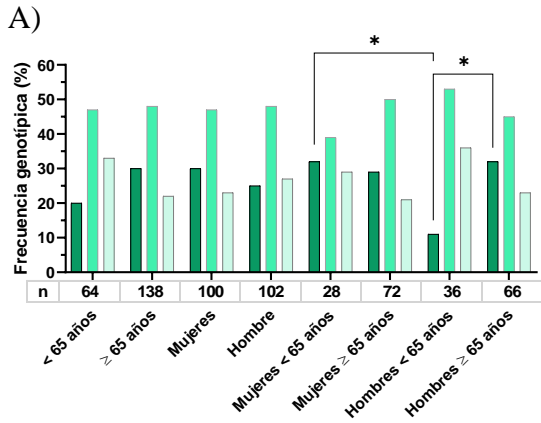


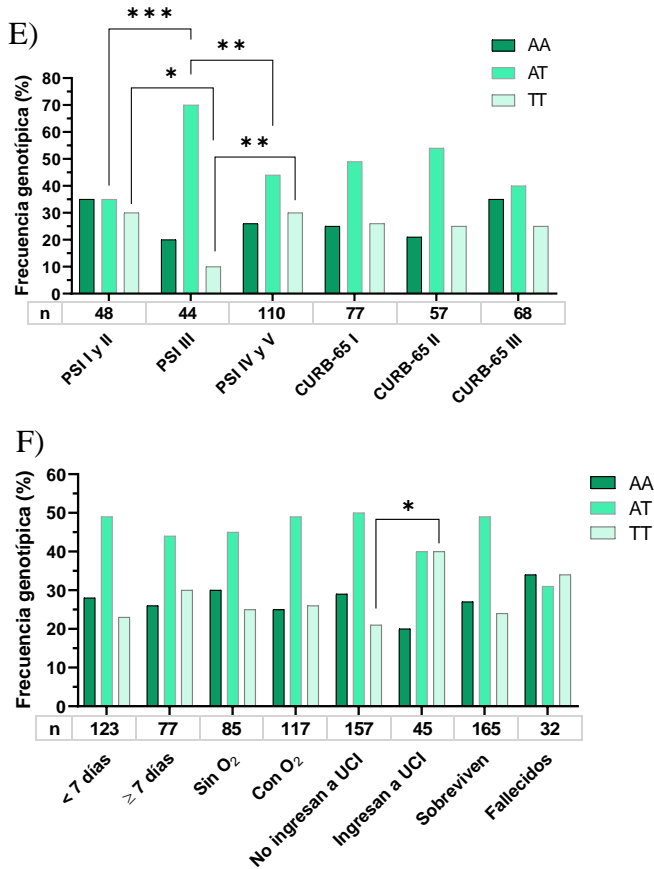


**Figura 10. Frecuencia alélica del polimorfismo c.801-21 A>T.** Frecuencia (%) alélica del polimorfismo c.801-21 A>T en el gen *IL7r* en 202 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). El valor de p se calculó usando la prueba del índice de probabilidad de Chi cuadrado para la frecuencia en cada grupo en el programa Unphased. (\*) p < 0,05. HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

En el análisis de frecuencia alélica del polimorfismo c.801-21 A>T según datos demográficos [Figura 10A], se observó una mayor frecuencia del alelo A en adultos ≥65 años que en <65 años (p=0,04), lo que se mantuvo entre los hombres (p=0,02), pero no entre las mujeres. Las frecuencias fueron similares entre ambos sexos, por agente detectado [Figura 10B] y por gravedad definida con ambas escalas pronósticas [Figura 10D] (p>0,05). Según comorbilidad asociada, es más frecuente el alelo A en pacientes con daño hepático que en los sin este daño (p=0,03) [Figura 10C]. Según la evolución, se observó mayor frecuencia del alelo A en adultos que no ingresaron a UCI respecto a los que si ingresaron (p=0,01) [Figura 10E].







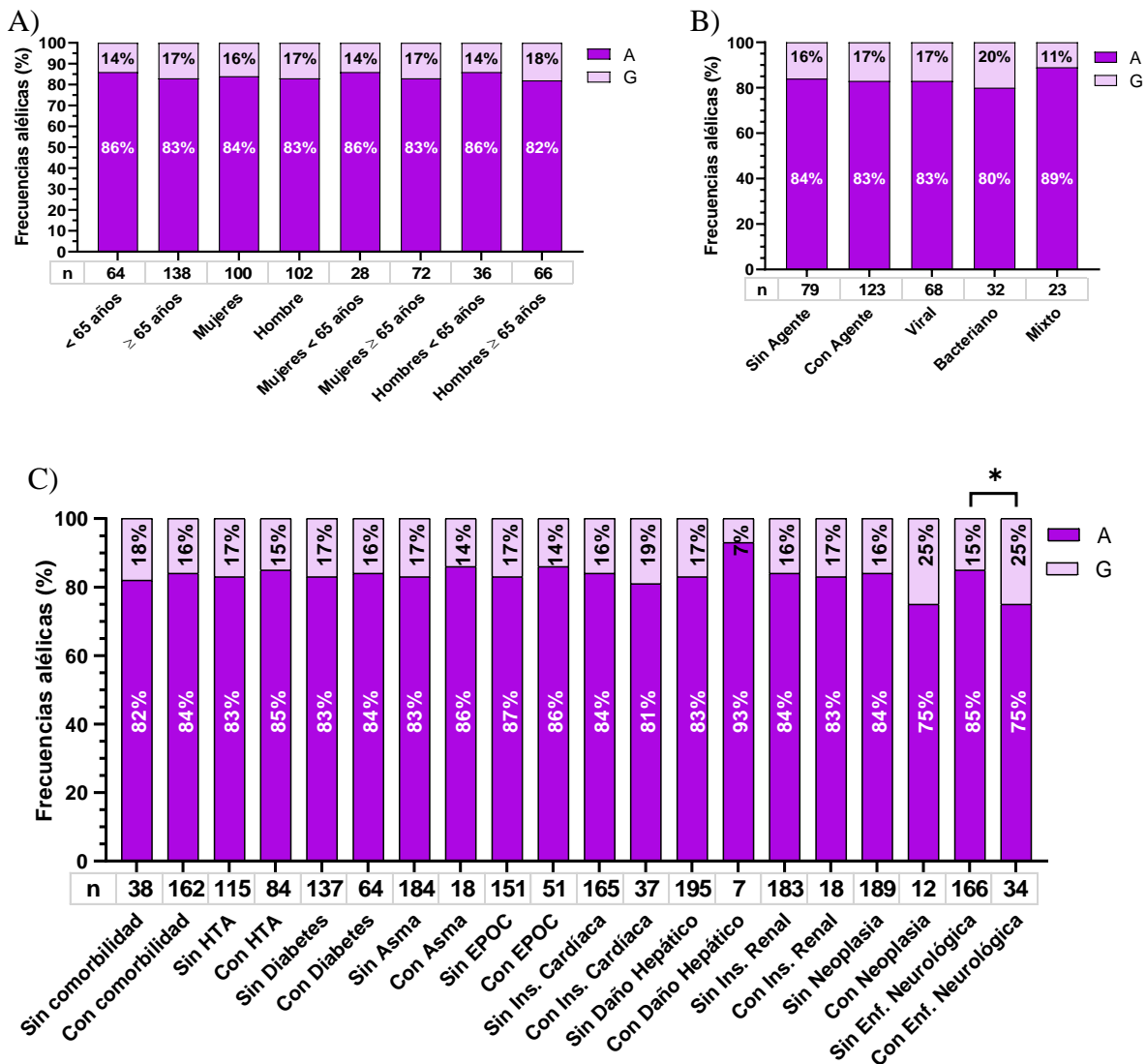
**Figura 11. Frecuencia genotípica del polimorfismo c.801-21 A>T.** Frecuencia (%) genotípica del polimorfismo c.801-21 A>T en el gen *IL7r* en 202 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). El valor de p se calculó usando la prueba del índice de probabilidad de Chi cuadrado para la frecuencia en cada grupo en el programa Unphased. (\*) p <0,05; (\*\*) p <0,01; (\*\*\*) p <0,001.

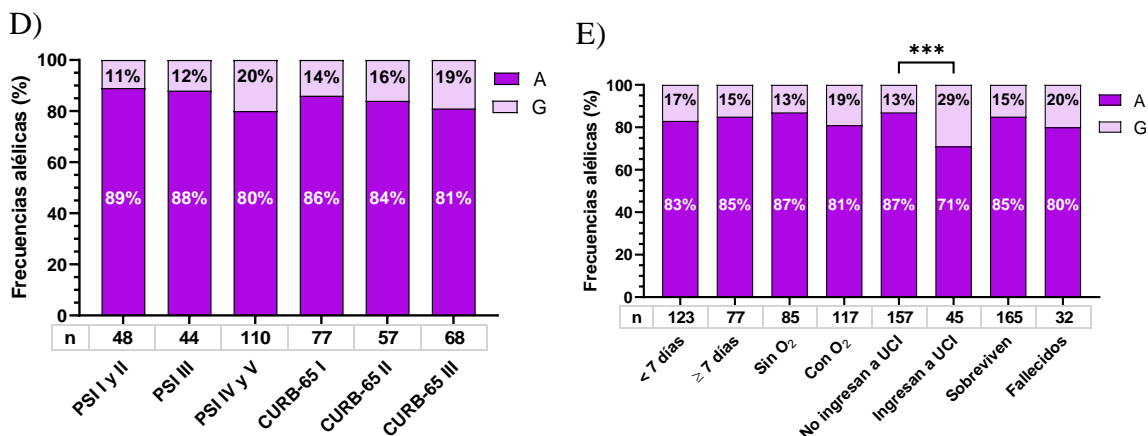
HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

En el análisis de la frecuencia genotípica de c.801-21 A>T, el genotipo AA se detectó con mayor frecuencia en las mujeres <65 años que en ≥65 años (p=0,03), mientras que entre los hombres fue más frecuente en ≥65 años (p=0,02) [Figura 11A]. Según la clasificación de gravedad por PSI, el genotipo AT es más frecuente en los casos moderados que no graves (p=0,0007) y graves (p=0,003), mientras que el genotipo TT es más frecuente en adultos graves y no graves que en moderados (p=0,01 y p=0,006, respectivamente) [Figura 11E]. También este genotipo TT fue más frecuente en adultos que ingresaron a UCI respecto a los que no ingresaron (p=0,01) [Figura 11F]. No hubo diferencia estadísticamente significativa

según la detección de agente [Figura 11B] ni según comorbilidades asociadas [Figura 11C y D].

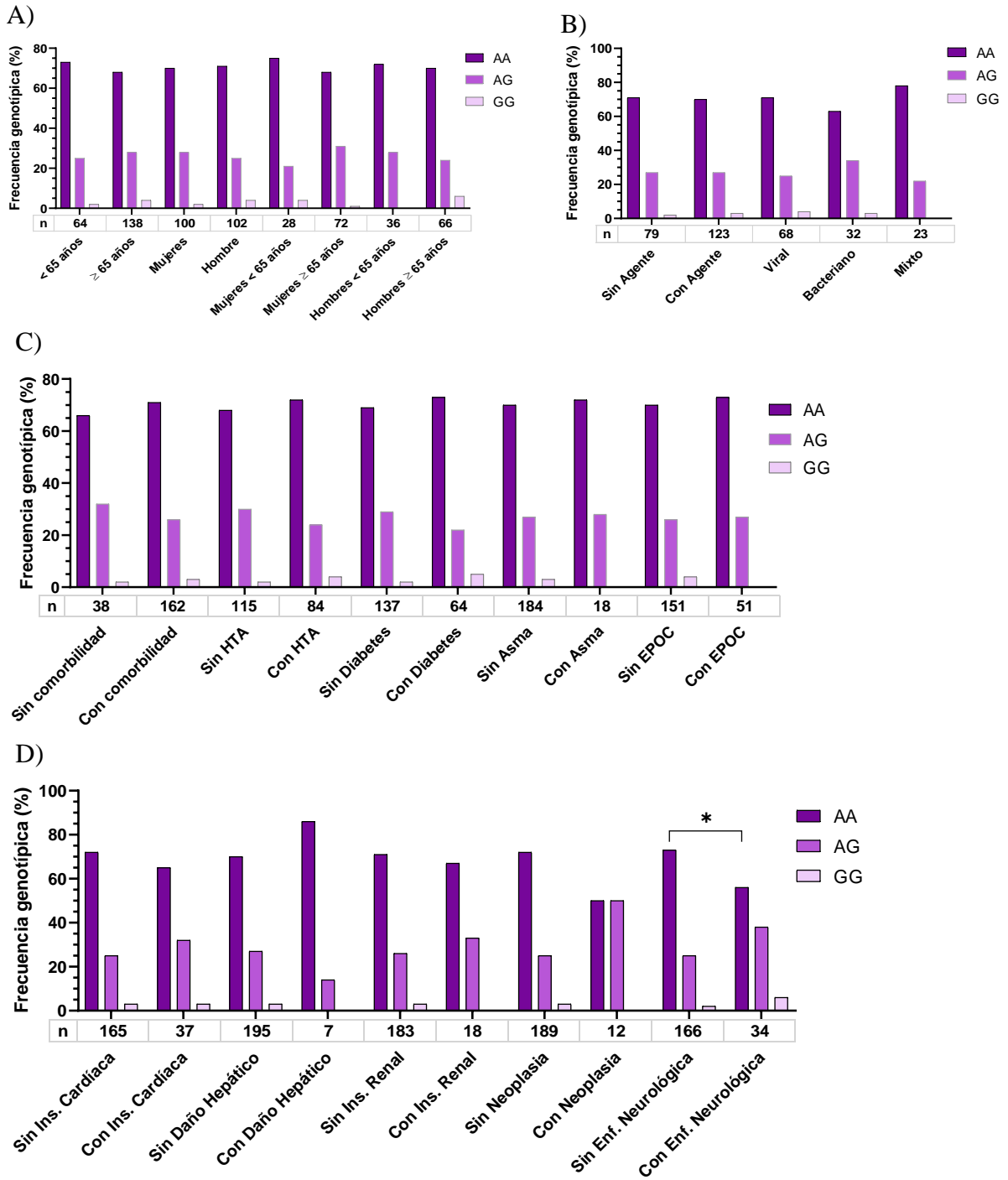
### SNP c.1066 A>G en adultos con NAC

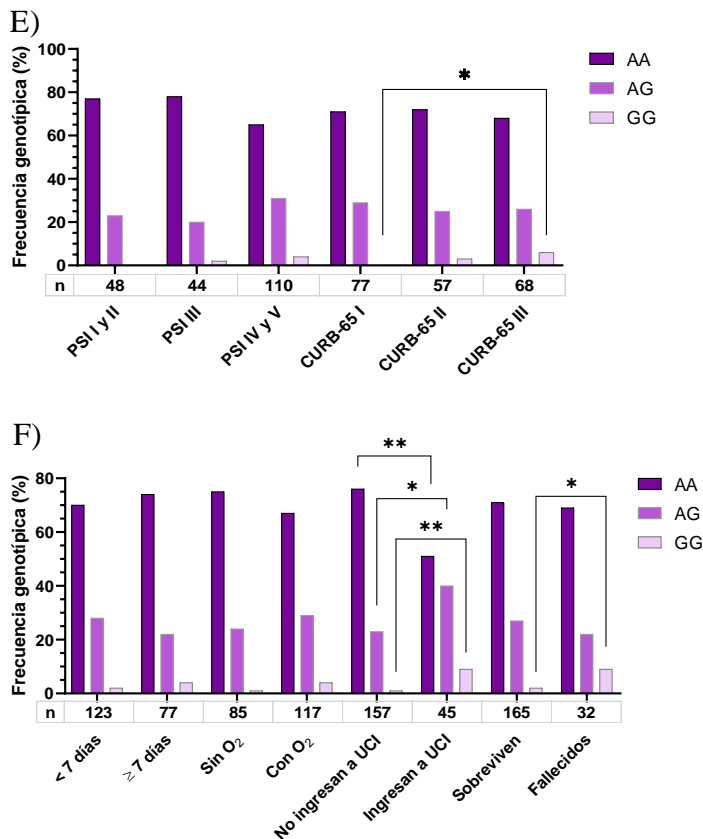




**Figura 12. Frecuencia alélica del polimorfismo c.1066 A>G.** Frecuencia (%) alélica del polimorfismo c.1066 A>G en el gen *IL7r* en 202 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). El valor de p se calculó usando la prueba del índice de probabilidad de Chi cuadrado para la frecuencia en cada grupo en el programa Unphased. (\*) p < 0,05; (\*\*\*) p < 0,001. HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

En el análisis de la frecuencia alélica del polimorfismo c.1066 A>G no se detectaron diferencias en las comparaciones por datos demográficos [Figura 12A], según detección de agente [Figura 12B] ni clasificación de gravedad por PSI y CURB-65 [Figura 12D]. En el análisis de la frecuencia alélica según comorbilidad se observa mayor frecuencia del alelo G en adultos con enfermedad neurológica (p=0,03) [Figura 12C] y según evolución en los pacientes que ingresaron a UCI frente a los que no ingresaron (p=0,0002) [Figura 12E].





**Figura 13. Frecuencia genotípica del polimorfismo c.1066 A>G.** Frecuencia (%) genotípica del polimorfismo c.1066 A>G en el gen *IL7r* en 202 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). El valor de p se calculó usando la prueba del índice de probabilidad de Chi cuadrado para la frecuencia en cada grupo en el programa Unphased. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

En el análisis de las frecuencias genotípicas del polimorfismo c.1066 A>G no hay diferencia según los datos demográficos analizados [Figura 13A], detección de agente [Figura 13B], ni gravedad por PSI [Figura 13E]; sin embargo, el genotipo GG es más frecuente en adultos clasificados como graves respecto a los no graves por CURB-65 ( $p=0,03$ ) [Figura 13E] y en fallecidos respecto a los que sobreviven ( $p=0,02$ ) [Figura 13F]. También fue más frecuente, junto con el genotipo AG, en los enfermos que ingresaron a UCI ( $p < 0,02$ ). El genotipo AA fue más frecuente en los que no ingresaron a UCI ( $p=0,001$ ) [Figura 13] y en los pacientes sin enfermedad neurológica comparado con los que tienen enfermedad neurológica ( $p=0,04$ ) [Figura 13D].

### haplotipos de los SNPs en adultos con NAC

En la tabla 19 se muestran todos los haplotipos alélicos y genotípicos que presentaron diferencia estadísticamente significativa en los grupos analizados con sus respectivas frecuencias y valor de p.

*Tabla 20. Haplotipos de Il7r en adultos con NAC.*

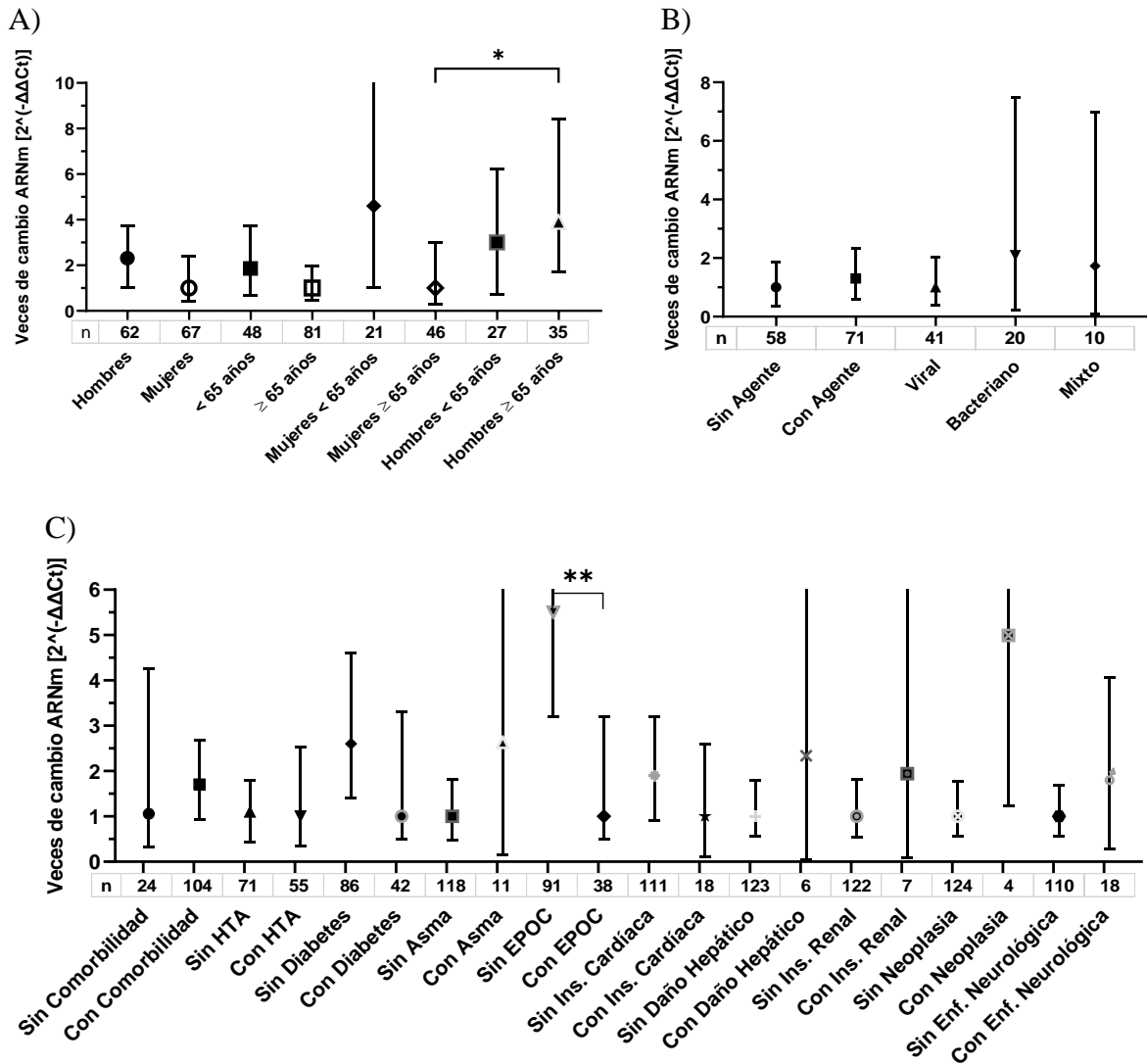
SNPs			Grupos	Frecuencia (n haplotipo/ n total haplotipo)	Valor p
c.731 C>T	c.801-21 A>T	c.1066 A>G			
<b>Alelos</b>					
<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	≥ 65 años	54.4% (150/276)	0.04
			< 65 años	43.8% (56/128)	
			Ingresan a UCI	40.0% (36/90)	0.01
			No ingresan a UCI	54.1% (170/314)	
			Con daño hepático	78.6% (11/14)	0.03
			Sin daño hepático	50.0% (195/390)	
			Hombres ≥ 65 años	54.6% (72/132)	0.01
			Hombres < 65 años	37.5% (27/72)	
<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	Fallecidos	3.1% (2/64)	0.001
			Sobreviven	0% (0/330)	
			Con insuficiencia cardíaca	2.7% (2/74)	0.002
			Sin insuficiencia cardíaca	0% (0/330)	
			Con enfermedad neurológica	2.9% (2/68)	0.001
			Sin enfermedad neurológica	0% (0/332)	
<b>C</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	Ingresan a UCI	28.9% (26/90)	0.0002
			No ingresan a UCI	12.7% (40/314)	
			Con enfermedad neurológica	25.0% (17/68)	0.03
			Sin enfermedad neurológica	14.8% (49/332)	
<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	< 65 años	42.2% (54/128)	0.003
			≥ 65 años	27.5% (76/276)	
			Leve por CURB-65	36.4% (56/154)	0.02
			Grave por CURB-65	24.3% (33/136)	
			Hombres < 65 años	48.6% (35/72)	0.002
			Hombres ≥ 65 años	27.3% (36/132)	
<b>Genotipos</b>					
<b>C/C</b>	<b>A/A</b>	<b>A/A</b>	Hombres ≥ 65 años	31.8% (21/66)	0.02
			Hombres < 65 años	11.1% (4/36)	
			Mujeres < 65 años	32.1% (9/28)	0.03
			Hombres < 65 años	11.1% (4/36)	
<b>C/C</b>	<b>A/T</b>	<b>A/G</b>	< 7 días de evolución	22.0% (27/123)	0.03
			≥ 7 días de evolución	10.4% (8/77)	
			Con enfermedad neurológica	32.4% (11/34)	0.02
			Sin enfermedad neurológica	15.7% (26/166)	
<b>C/C</b>	<b>T/T</b>	<b>G/G</b>	Graves por CURB-65	5.9% (4/68)	0.03
			Leves por CURB-65	0% (0/77)	
			Ingresan a UCI	8.9% (4/45)	0.008
			No ingresan a UCI	1.3% (2/157)	
			Fallecidos	9.4% (3/32)	0.02
			Sobreviven	1.8% (3/165)	
<b>C/T</b>	<b>T/T</b>	<b>A/G</b>	Ingresan a UCI	17.8% (8/45)	0.01
			No ingresan a UCI	5.7% (9/157)	
			Hombres < 65 años	13.9% (5/36)	0.03
			Hombres ≥ 65 años	3.0% (2/66)	
			<b>T/T</b>	<b>T/T</b>	<b>A/A</b>
≥ 65 años	10.1% (14/138)				

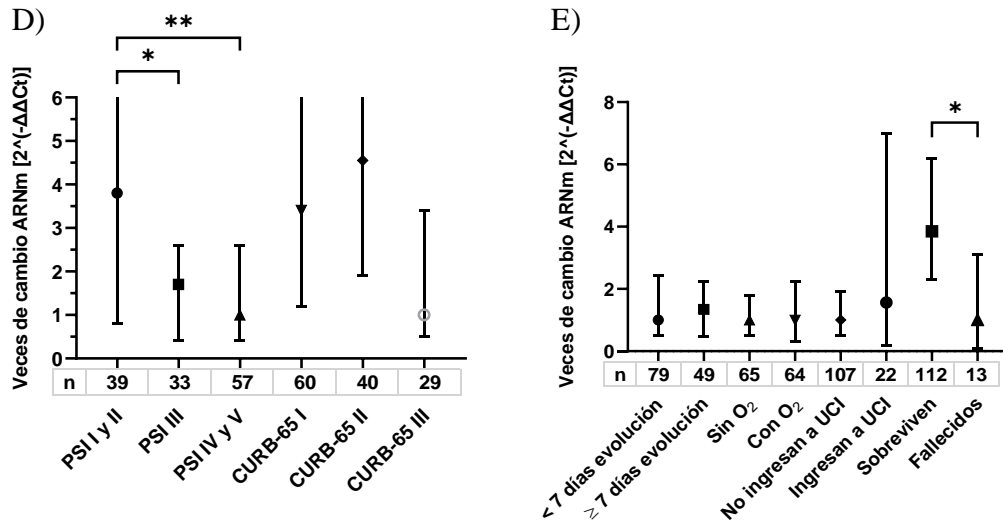
UCI, unidad de cuidados intensivos; CURB-65, siglas en inglés de las cinco características de riesgo que utiliza este índice; BUN, Blood urea nitrogen (trd-esp. nitrógeno ureico en sangre); PA, presión arterial. El valor de p se calculó usando la prueba del índice de probabilidad de Chi cuadrado para la frecuencia en cada grupo en el programa Unphased.

Ciertos haplotipos se relacionaron con la edad, el sexo, las comorbilidades, la clasificación de gravedad y evolución de la NAC. En los fallecidos fueron más frecuentes los haplotipos CTA ( $p=0,001$ ) y CC/TT/GG ( $p=0,02$ ), y en los pacientes que ingresaron a UCI, fueron más frecuentes los haplotipos CTG ( $p=0,0002$ ), CT/TT/AG ( $p=0,01$ ) y CC/TT/GG ( $p=0,008$ ). Este último también fue más frecuente en los casos graves según CURB-65 ( $p=0,03$ ). Por el contrario, en quienes no ingresaron a UCI, fue más frecuente el haplotipo CAA que en quienes si ingresaron ( $p=0,01$ ).



**Objetivo específico 2: Comparar la expresión relativa del gen *Il7r* en sangre de adultos con NAC mediante PCRtr según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad clínica.**



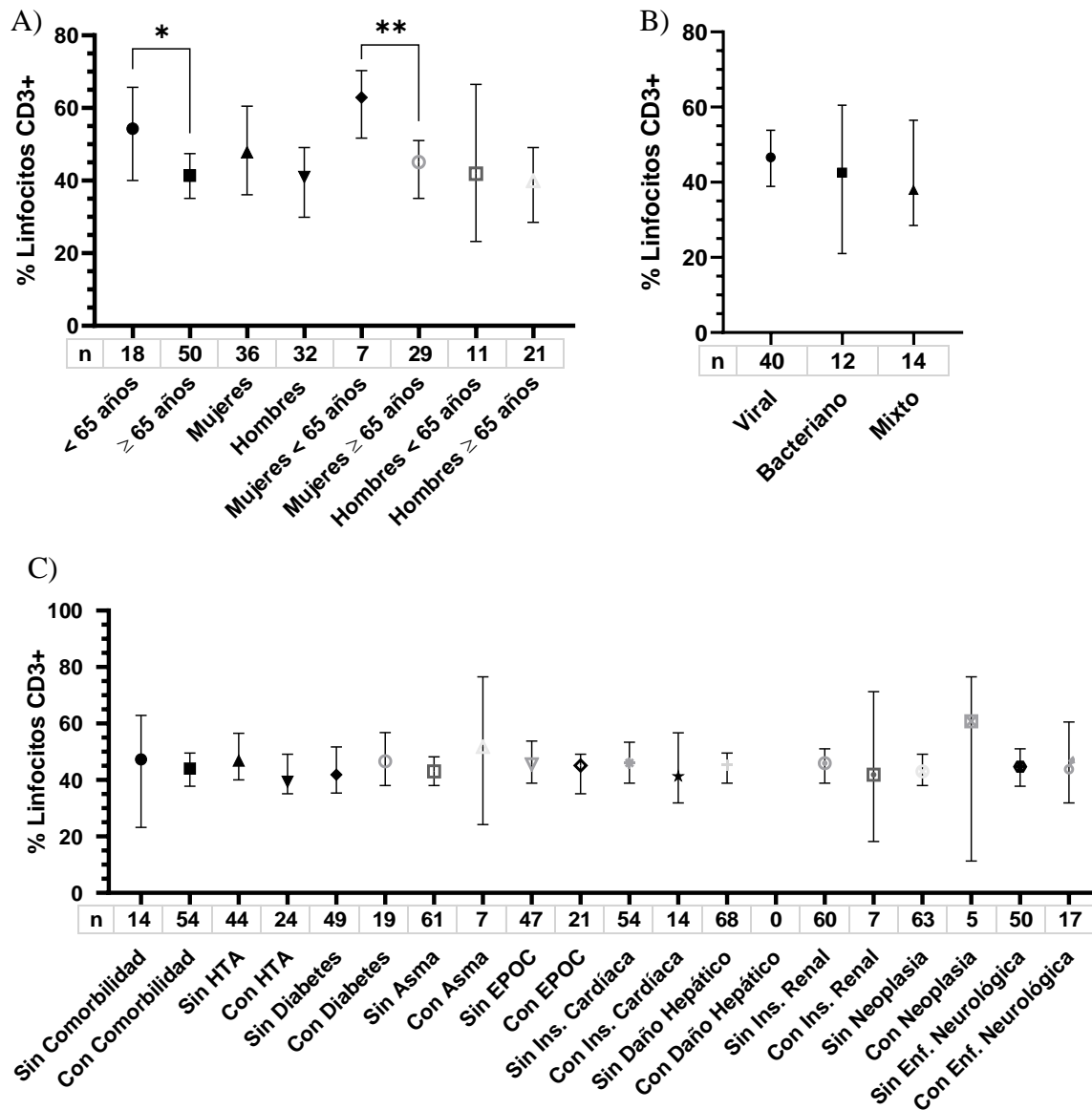


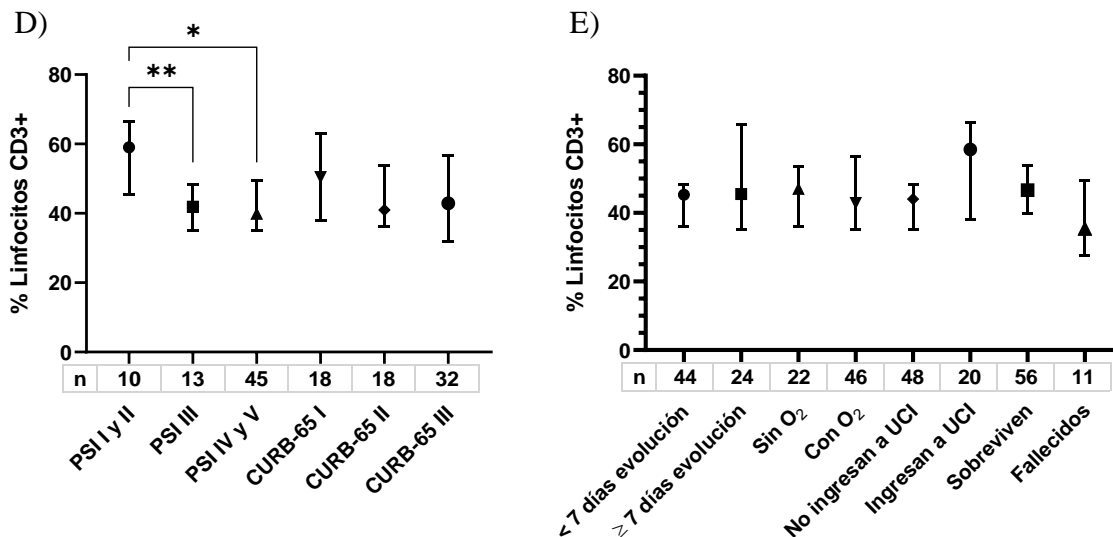
**Figura 14. Expresión relativa del gen *Il7r* en adultos con NAC.** Análisis de la expresión relativa del gen *Il7r* en 129 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). Los datos están representados con la mediana y el 95% de intervalo de confianza. El valor de p se obtuvo con la prueba estadística de Mann-Whitney. (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,01.

HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

El análisis de expresión relativa de *Il7r* se realizó en 129 adultos enrolados, detectándose 3,9 veces mayor expresión entre los sobrevivientes respecto a los que fallecieron (p=0,01) [Figura 14E]; 2,3 veces más expresado en no graves respecto a moderados clasificados por PSI (p=0,03) y 3,7 veces respecto a graves (p=0,009) [Figura 14D]; 3,8 veces más expresado en hombres que en mujeres ≥65 años (p=0,02) [Figura 14A]; 5,5 más expresado en adultos sin EPOC respecto a los que tienen esta enfermedad (p=0,002) [Figura 14C]. No se observaron cambios significativos en la expresión relativa del gen según el agente detectado (p>0,05) [Figura 14B].

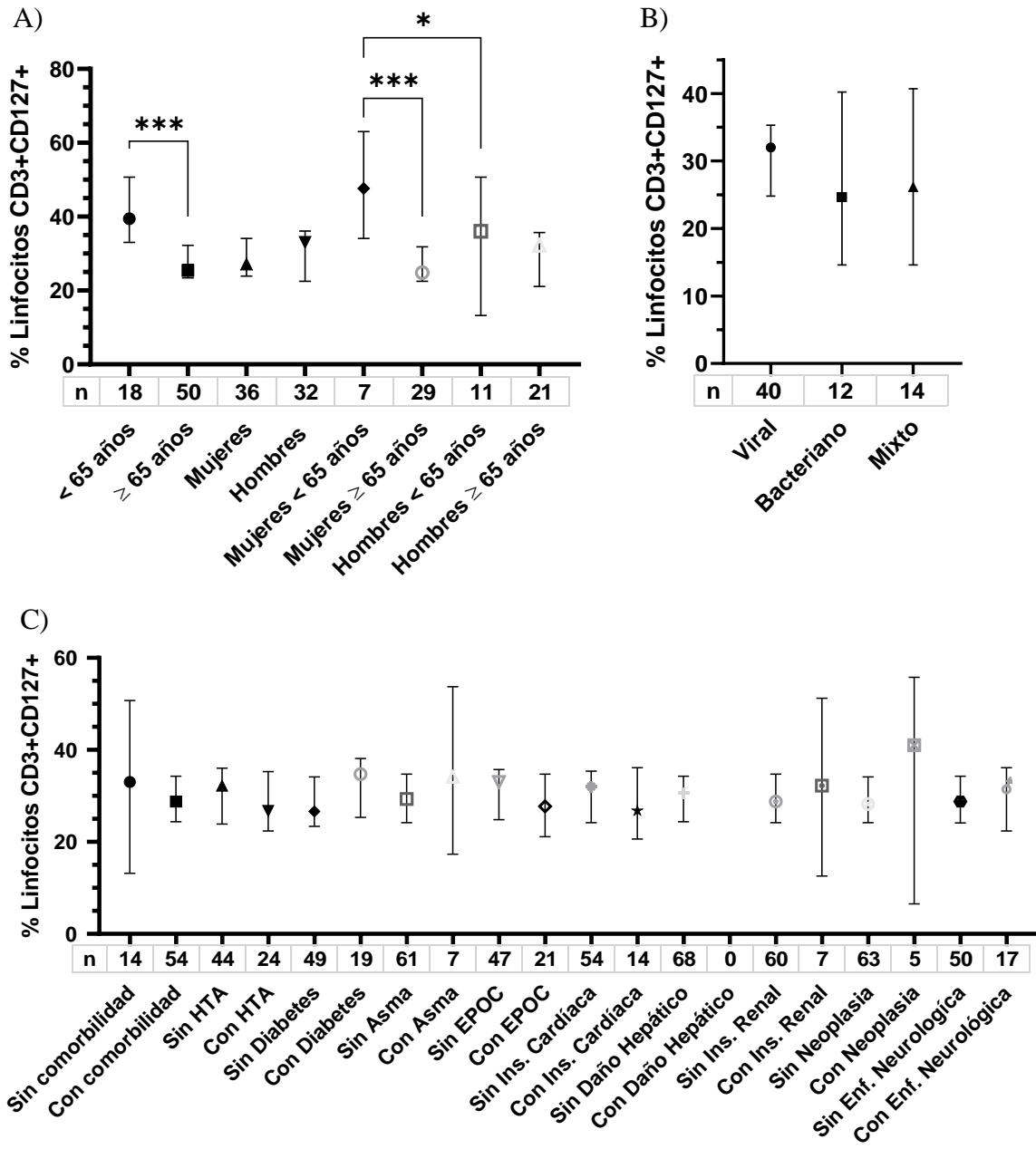
**Objetivo específico 3: Relacionar la proporción de linfocitos sanguíneos que expresan IL-7R determinada por citometría de flujo con gravedad clínica, datos demográficos y comorbilidades de adultos con NAC.**

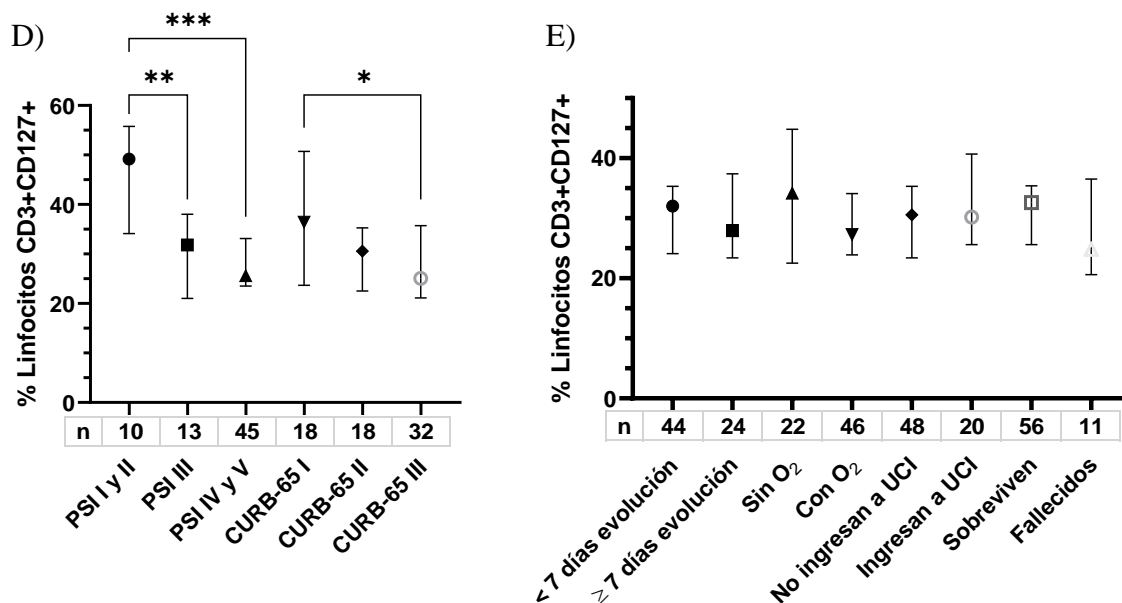




**Figura 15. Recuento linfocitario en adultos con NAC.** Análisis del recuento de linfocitos (CD3+) en sangre venosa periférica de 68 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). Los datos están representados con la mediana y el 95% de intervalo de confianza. El valor de p se obtuvo con la prueba estadística de Mann-Whitney. (\*) p < 0,05; (\*\*) p < 0,01. HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

El porcentaje de linfocitos CD3+ [Figura 15A] está disminuido en adultos  $\geq 65$  años respecto al grupo < 65 años (41,3% vs 54,3%; p=0,03), diferencia que se mantiene en las mujeres según grupo etario (45,1% vs 62,9%; p=0,007), pero no en hombres. Así mismo, la proporción es menor en los casos moderados (41,9%) y graves (39,9%) respecto a los leves (59%) según PSI (p<0,004) [Figura 15D]. La proporción fue similar por agente detectado [Figura 15B], comorbilidades asociadas [Figura 15C], evolución [Figura 15E] y gravedad según la clasificación por CURB-65 [Figura 15D].





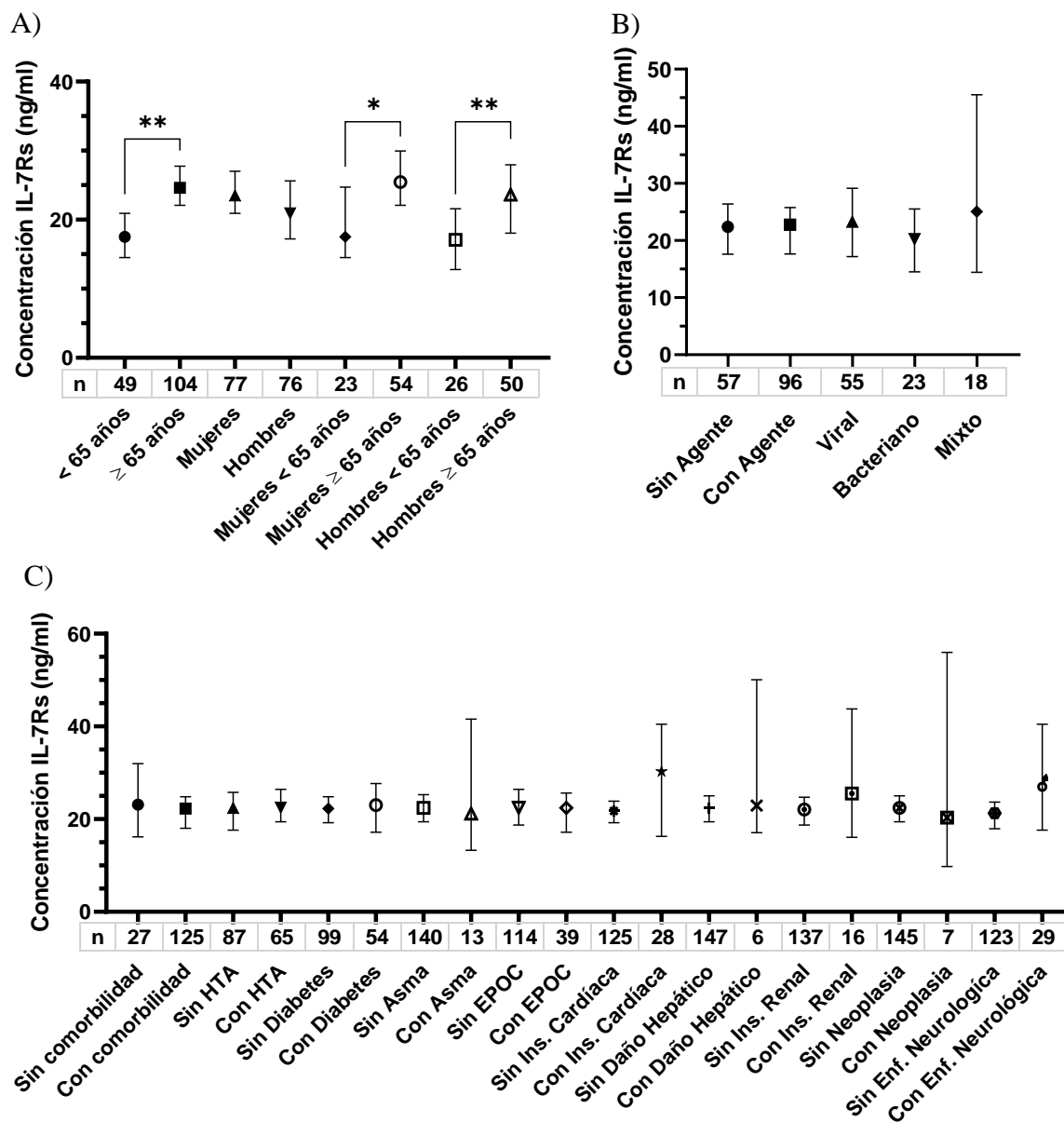
**Figura 16. Recuento de linfocitos con IL-7R de membrana en adultos con NAC.** Análisis del recuento de linfocitos (CD3+) con expresión del IL-7R de membrana (CD127+) en sangre venosa periférica de 68 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). Los datos están representados con la mediana y el 95% de intervalo de confianza. El valor de p se obtuvo con la prueba estadística de Mann-Whitney. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ . HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

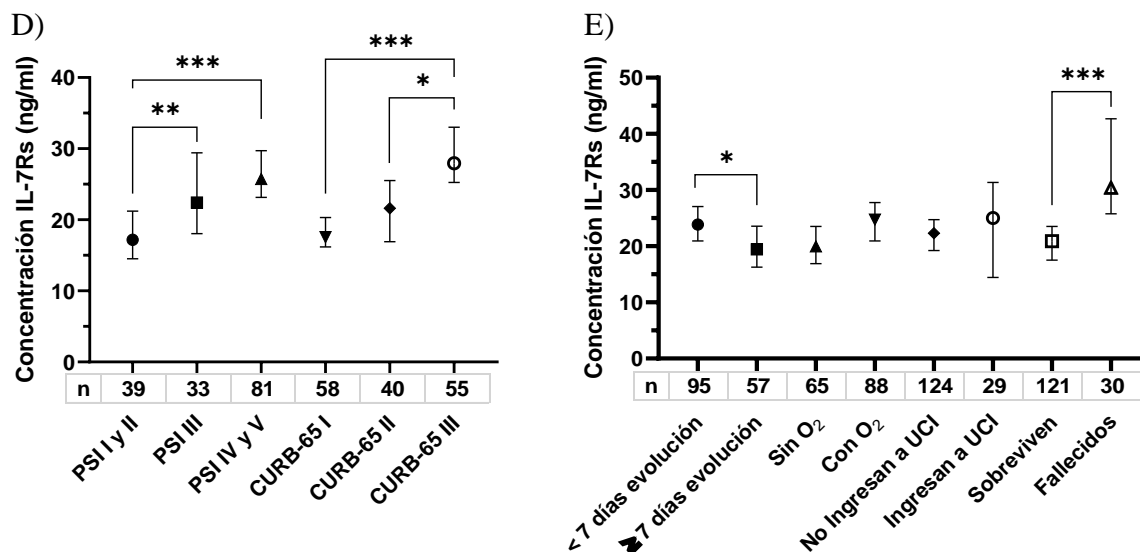
Por otro lado, se analizó la proporción de linfocitos que expresaban CD127 en su membrana (CD3+CD127+). El porcentaje de estos linfocitos está disminuido en adultos  $\geq 65$  años respecto a  $< 65$  años (25,4% vs 39,4%;  $p=0,0009$ ), en mujeres  $\geq 65$  años respecto a las  $< 65$  años (24,8% vs 47,6%;  $p < 0,0001$ ), en hombres que en mujeres  $< 65$  años (36% vs 47,6%;  $p=0,03$ ) [Figura 16A]. También es menor la proporción en los casos moderados (31,8%) y graves (25,6%), respecto a los leves (49,1%) por PSI ( $p < 0,004$ ) y en los graves (25%) respecto a no graves (36,4%) por CURB-65 ( $p=0,02$ ) [Figura 16D].

Las proporciones fueron similares según el tipo de agente detectado [Figura 16B], comorbilidades asociadas [Figura 16C] y evolución [Figura 16E].

**Objetivo específico 4: Comparar la concentración plasmática de IL-7Rs e IL-7 determinada por inmunoensayos, según datos demográficos, comorbilidades, y gravedad de adultos con NAC.**

IL-7Rs en adultos con NAC





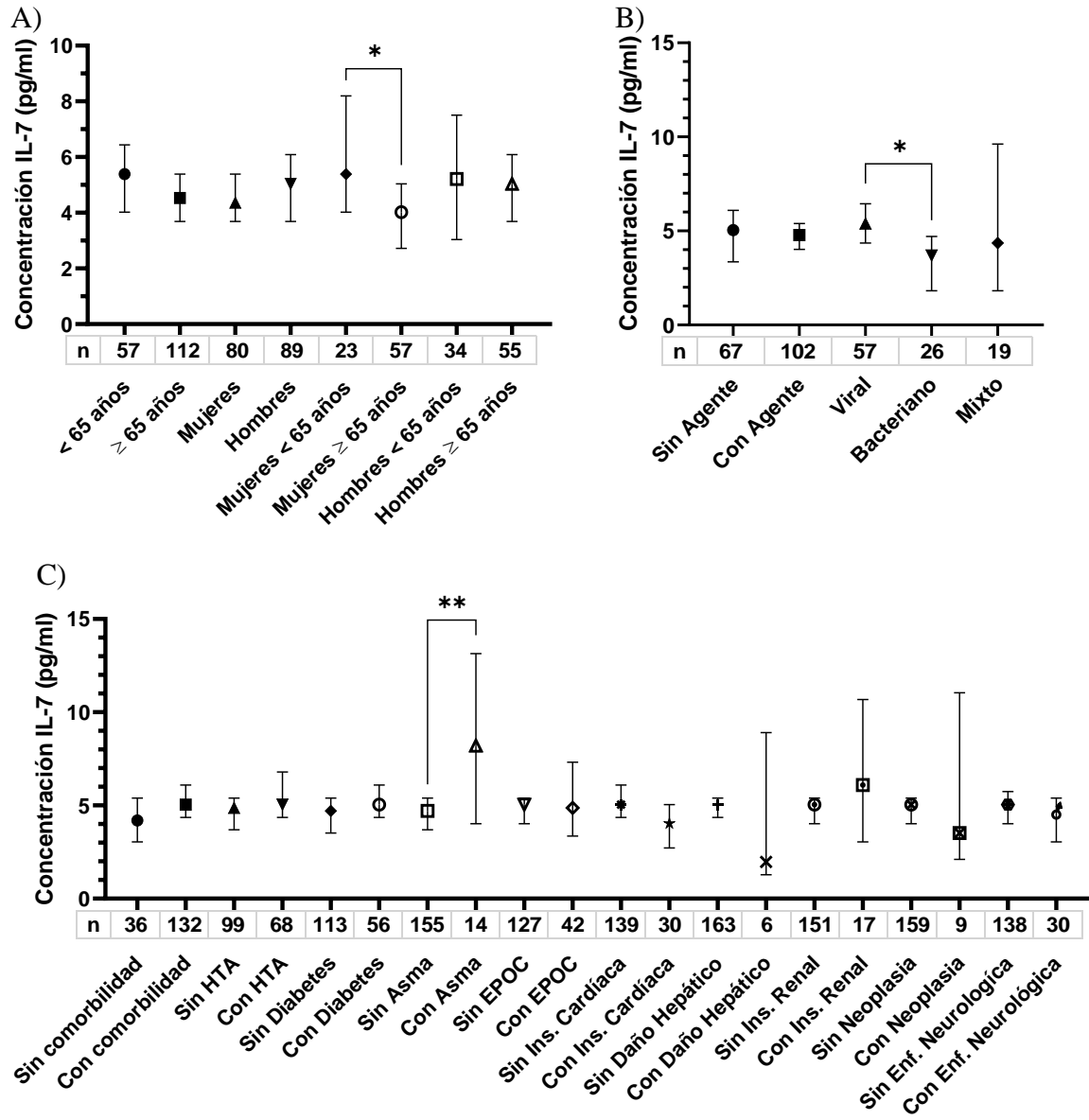
**Figura 17. Concentración plasmática de IL-7Rs en adultos con NAC.** Análisis de la concentración plasmática del receptor soluble de IL-7R (IL-7Rs) en 153 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). Los datos están representados con la mediana y el 95% de intervalo de confianza. El valor de p se obtuvo con la prueba estadística de Mann-Whitney. (\*) p <0,05; (\*\*) p <0,01; (\*\*\*) p <0,001.

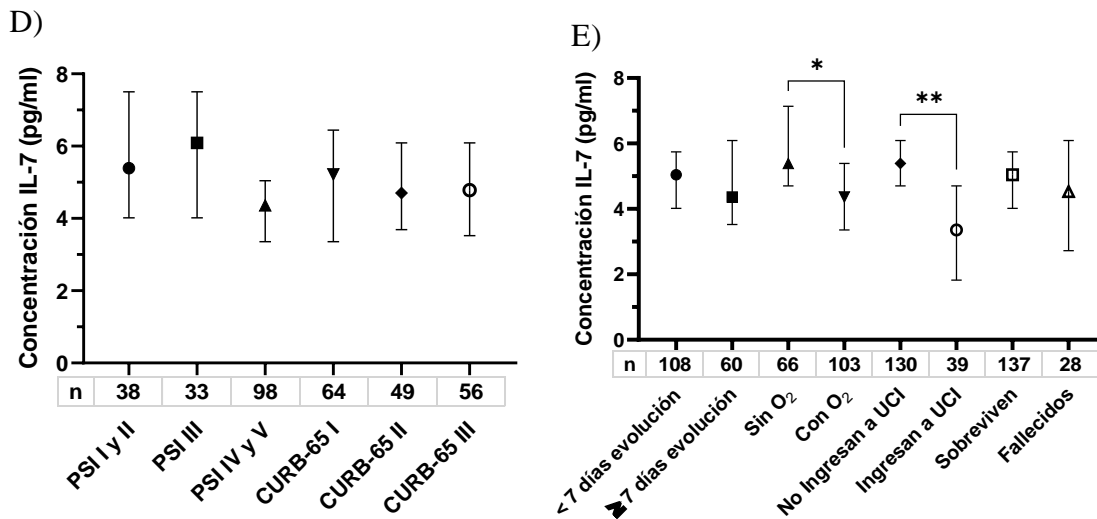
HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

La concentración plasmática del receptor soluble de IL-7 es mayor en adultos que fallecieron (30,41 ng/ml) respecto a los que sobreviven a la NAC (20,9 ng/ml; p=0,0003) [Figura 17E]; en los casos moderados (22,41 ng/ml) y graves (25,76 ng/ml) respecto a los leves (17,18 ng/ml; p<0,006) según PSI, y en los graves (27,96 ng/ml) sobre los moderados (17,55 ng/ml) y leves (21,63ng/ml) según CURB-65 (p<0,01) [Figura 17D]. También fue superior en adultos ≥65 años que en <65 años (24,63 ng/ml vs 17,52 ng/ml; p=0,001) [Figura 17A], manteniéndose esta diferencia entre las mujeres (25,46 ng/ml vs 17,52 ng/ml; p=0,02) y los hombres (23,63 ng/ml vs 17,1 ng/ml; p=0,01). Las concentraciones fueron similares por agente detectado [Figura 17B] y por comorbilidades [Figura 17C]. En el análisis respecto a la evolución de la NAC se observa una disminución de la proteína soluble en adultos con evolución ≥7 días (19,45 ng/ml) respecto a los que tienen evolución <7 días (23,87 ng/ml; p=0,03). En el análisis de área bajo la curva de IL-7Rs en fallecidos se obtuvo un valor de 0,71 (95% IC: 0,60-0,81).



IL-7 en adultos con NAC





**Figura 18. Concentración de IL-7 plasmático en adultos con NAC.** Análisis de la concentración de IL-7 en plasma de 169 adultos con NAC según datos demográficos (A), detección de agente (B), comorbilidades (C), clasificación de gravedad (D) y evolución de la enfermedad (E). Los datos están representados con la mediana y el 95% de intervalo de confianza. El valor de p se obtuvo con la prueba estadística de Mann-Whitney. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ . HTA: hipertensión arterial; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PSI: índice de gravedad de neumonía; O<sub>2</sub>: oxigenoterapia; UCI: unidad de cuidados intensivos.

La concentración plasmática de IL-7 fue menor en mujeres  $\geq 65$  años que en  $< 65$  años (4,02 pg/ml vs 5,39 pg/ml;  $p=0,03$ ) [Figura 18A], en los casos bacterianos (3,69 pg/ml) respecto a los virales (5,39 pg/ml;  $p=0,01$ ) [Figura 18B], en quienes recibieron oxigenoterapia (4,36 pg/ml) respecto a los que no requirieron (5,39 pg/ml;  $p=0,03$ ) y en los pacientes que ingresaron a UCI (3,36 pg/ml) respecto a los que no ingresaron (5,39 pg/ml;  $p=0,002$ ) [Figura 18E]. Por el contrario, el nivel de IL-7 estaba aumentado en adultos con asma (8,2 pg/ml) respecto a los que no presentan asma (4,7 pg/ml;  $p=0,008$ ) [Figura 18C]. La concentración fue similar por gravedad con ambas escalas pronósticas [Figura 18D].

## DISCUSION

La neumonía adquirida en la comunidad es considerada un problema de salud pública por su alta demanda en recursos de salud, alta morbilidad y mortalidad en la población adulta [Peñañiel y cols., 2003; Mandell y cols., 2007; Blanquer y cols., 2010; MINSAL, Gob de Chile, 2011]. Debido a las distintas condiciones y evolución que presentan los pacientes con NAC, se han diseñado escalas clínicas para clasificar y predecir el riesgo de mortalidad de cada paciente y mejorar el manejo clínico, pero estas escalas pronósticas tienen limitaciones, y cometen errores. Esto último se observó en este trabajo, donde 8 pacientes clasificados como leves por PSI y 13 por CURB-65 requirieron de tratamientos intensivos (ingreso a UCI), dos pacientes clasificados como leves por CURB-65 tuvieron desenlace fatal.

Por lo anteriormente mencionado, esta tesis busca aportar nueva información de utilidad científica y clínica sobre la patogenia de la neumonía adquirida en la comunidad, con el propósito de generar nuevos parámetros que guíen un tratamiento adecuado y disminuyan la mortalidad de la NAC, proponiendo un posible nuevo biomarcador que prediga la evolución de los pacientes al inicio de enfermedad.

En este estudio, destaca IL-7Rs como un potencial biomarcador para evaluar la evolución de la NAC, puesto que sus niveles plasmáticos se asociaron directamente con la mortalidad, gravedad y edad, entregando el primer antecedente de la importancia que tiene esta vía de señalización en la patogenia de la NAC. El aumento de la concentración plasmática de IL-7Rs observado en  $\geq 65$  años podría estar relacionado con una menor respuesta del eje IL-7/IL-7R, lo que se traduce en una menor respuesta linfocitaria inmunológica, concordando con la inhibición del eje mencionado en otras enfermedades infecciosas como lo observado en infección por VIH [Guzman-Fulgencio y cols. 2015]. Así mismo el área bajo la curva para los niveles plasmáticos de IL-7Rs en fallecidos, fue similar al de las escalas clínicas estudiadas (0,71 (95% IC: 0,60-0,81)). Siendo, IL-7Rs un buen candidato como biomarcador para predecir el riesgo de muerte en NAC, es necesario profundizar en su relación con la NAC y determinar los niveles de riesgo de desarrollar una enfermedad grave.

Otros parámetros del eje IL-7/IL-7R en adultos con NAC evaluados en esta tesis incluyeron tres polimorfismos de un nucleótido del gen *Il7r*, determinándose una asociación entre estos polimorfismos y la evolución de la NAC, dado que el genotipo TT del SNP c.801-21 A>T, y AG y GG de c.1066 A>G fueron más frecuentes en adultos que ingresaron a UCI y el genotipo GG de este último SNP fue más frecuente en personas que posteriormente murieron. El efecto de los polimorfismos en la gravedad de la enfermedad se podría explicar con la asociación que se determinó entre ciertos genotipos y la variación en la concentración de IL-7Rs. Los genotipos CC (c.731C>T), AA (c.801-21 A>T) y GG (c.1066 A>G) tuvieron elevada concentración plasmática de IL-7Rs [Figura 1 Anexo], esta asociación puede estar dada por la localización en zonas regulatorias putativas [Guzman-Fulgencio y cols. 2015]. Este resultado se relaciona con lo observado en un estudio en pacientes con VIH coinfectados con VHC, donde los genotipos TT de c.801-21 A>T y GG de c.1066 A>G están asociados con elevados niveles de IL-7Rs plasmático, que a su vez se relacionan con un peor pronóstico de la progresión de la enfermedad [Guzman-Fulgencio y cols. 2015].

También se identificaron haplotipos relacionados con la gravedad y evolución de la NAC, siendo CTA más frecuente en fallecidos y CTG en quienes ingresan a UCI, mientras que CAA es más frecuente en quienes no ingresaron a UCI y TTA en los no graves según CURB-65. Es necesario aumentar el tamaño poblacional estudiado para corroborar estos resultados, puesto que la frecuencia de algunos haplotipos es muy baja, como es el caso de CTA, el cual se observó solo 2 veces y en personas fallecidas (2/64), mientras que en sobrevivientes no se observó este haplotipo (0/330), por lo que sería interesante ver si efectivamente este haplotipo está asociado a peor pronóstico de NAC. Este mismo haplotipo se asoció con a un alto riesgo de desarrollar fibrosis hepática grave en coinfectados con VIH/VHC [Guzmán-Fulgencio y cols, 2015]. En el caso de haplotipos genotípicos es importante destacar a CC/TT/GG el cual es más frecuente en clasificados como graves por CURB-65, en quienes ingresaron a UCI y en fallecidos, esto indicaría que la presencia de este haplotipo es de riesgo para el desarrollo de una NAC grave en adultos.

Estos polimorfismos podrían servir para la implementación de algún panel genético para enfermedades inmunológicas y/o infecciosas, como los que ya existen para ciertos tipos de cáncer [Reid y col. 2020].

La disminuida expresión génica de *IL7r* en los casos clasificados como graves según PSI y en fallecidos plantea una posible relación con una evolución grave de la NAC, esto está relacionado con la disminución del recuento de linfocitos que expresan IL-7R de membrana. Los partidores del PCR-tr diseñado para amplificar el gen de *IL7r* se posicionan en el exón 5 y exón 6, esto permite discriminar de los mensajeros correspondientes a las isoformas solubles, detectando mensajeros pre corte y empalme alternativo y mensajeros de membrana.

La concentración plasmática de IL-7 está disminuida en mujeres  $\geq 65$  años respecto a mujeres  $< 65$  años, esto se puede relacionar con el efecto protector de los estrógenos en las mujeres en edad fértil [Andany y cols, 2016; Chen y cols. 2016], reflejado en niveles altos de IL-7 lo que se traduce en mayor señalización de IL-7R y recuentos linfocitarios en niveles normales, teniendo así altos niveles de células inmunológicas preparadas ante una infección. Esto se asocia con lo observado en el recuento linfocitario de CD3+CD127+, el cual está aumentado en las mujeres  $< 65$  años respecto a hombres del mismo grupo etario, esto se relaciona con el antecedente de que las mujeres premenopáusicas tienen un factor protector frente a distintas enfermedades [Andany y cols, 2016; Chen y cols. 2016], hecho en el que podrían estar involucrados los altos niveles de IL-7 y el alto recuento de CD3+CD127+, se requiere corroborar esta información en otros estudios. En adultos con NAC asmáticos se observaron niveles plasmáticos de IL-7 aumentados comparados con los que no tienen asma. Esto es concordante con antecedentes que describen un aumento de IL-7 en asma alérgica en donde IL-7 cumpliría un rol en la homeostasis en las células T CD4+ alérgeno específicas [Goksal y cols. 2006; Yeon y cols. 2017].

El recuento de células CD3+ totales como el de CD3+CD127+ están disminuidos en  $\geq 65$  años, lo que puede contribuir a la disminución en la respuesta inmunológica asociada al envejecimiento, traducándose en una respuesta inmunológica deficiente y un peor control del progreso de la infección. Esto es apoyado por el antecedente que altos niveles de expresión génica se asocian con una mejor sobrevida prospectiva en individuos nonagenarios [Passtoors y cols. 2015], para el caso de este estudio concuerda, ya que hay una disminución en la expresión de *IL7r* en fallecidos. Además, en mayores de 65 años fue mayor la proporción

de casos graves, el requerimiento de oxigenoterapia y la mortalidad, lo que se relaciona con el deterioro de la respuesta inmunológica a causa del envejecimiento [Franceschi y col. 2018].

La proporción de mujeres que requirieron de oxigenoterapia, que ingresaron a la UCI y que fallecieron fue mayor que el de hombres, aunque sin alcanzar significancia estadística. Esto llama la atención considerando que el porcentaje de mujeres clasificadas como graves por PSI fue menor que el de hombre y se explica porque en esta escala se descuenta puntaje por ser mujer (Tabla 3), subestimando la evolución grave en ellas. Por lo anterior, sería necesario reevaluar si esta variable debiera ser considerada en esta escala. Comparando comorbilidades según el sexo, sólo en asma se vio diferencia, mostrando que esta comorbilidad predomina más en mujeres (13%) que en hombres (5%), lo que se relaciona con los antecedentes científicos, que mencionan la disparidad de género en adultos de esta enfermedad [Fuseini y col, 2017].

Por todo lo observado y expuesto en esta tesis, es importante continuar con los estudios de este eje como potencial biomarcador, evaluando, la variación temporal de la concentración sistémica de IL-7Rs e IL-7 a distintos días de evolución, definir un umbral de corte y los rangos fisiológicos y fisiopatológicos para ciertos grupos etarios, determinando los valores indicativos de alerta para una toma de decisión oportuna en los pacientes. Se requieren estudios con un número poblacional que permita visualizar y relacionar otras características, como en el caso de polimorfismo c.1066 A>G el cual presentó una menor frecuencia del alelo G en la población estudiada comparada con la indicada en la literatura.

Una limitante de este estudio es la no inclusión de adultos con NAC y tratamiento ambulatorio, si bien fue posible estudiar un adecuado número de casos leves. En futuros estudios es ideal incorporar a estos casos para así ver si hay diferencia entre casos ambulatorios y hospitalizados. De igual forma, es conveniente analizar la expresión génica de los distintos mensajeros generados, puesto que en este estudio la PCR de cuantificación relativa para el gen *IL7r* fue diseñada con partidores en el exón 5 y exón 6, lo que podría explicar la ausencia de asociación de la expresión y la concentración plasmática del receptor soluble, lo que debe ser corroborado. También es conveniente ampliar los estudios a las

subpoblaciones linfocitarias, principalmente CD4+ y CD8+, para discernir específicamente cual tiene la expresión de CD127 disminuida, incluso, sería útil evaluar otras líneas celulares, como monocitos, los cuales también tienen una importante función del eje IL-7/IL-7R recientemente descrita [Al-Mossawi y col. 2019].

En este estudio se evidencia que el eje IL-7/IL-7R cumple un rol fundamental en la fisiopatología de la NAC, desde los polimorfismos del gen *Il7r*, pasando por la expresión génica del receptor a nivel de mensajero y la formación del receptor de membrana, hasta la implicancia del receptor soluble en la regulación de la vía y las variaciones de este ligando activados (IL-7). Esta nueva información generada es relevante en la clínica, abriendo las puertas a un mecanismo involucrado en la evolución de la NAC no considerado hasta ahora.

## CONCLUSIONES

1. Los genotipos TT del polimorfismo c.801-21 A>T y GG del c.1066 A>G y el haplotipo CC/TT/GG (c.731 C>T, c.801-21 A>T y c.1066 A>G) se relacionan con un peor pronóstico en adultos con neumonía adquirida en la comunidad.
2. La expresión relativa del gen *Il7r* disminuye en los adultos con NAC que desarrollan una enfermedad grave.
3. El recuento linfocitario de CD3+ y CD3+CD127+ disminuye en los mayores de 65 años lo que contribuiría a la atenuada respuesta inmunológica asociada al envejecimiento.
4. La concentración plasmática de IL-7Rs aumentada se asocia a un peor pronóstico de la NAC en adultos.
5. La concentración plasmática de IL-7Rs aumenta en los mayores de 65 años por lo que podría estar asociada al envejecimiento.
6. La disminución de la concentración plasmática de IL-7 se asocia con una NAC grave y con el envejecimiento en mujeres.
7. El aumento de IL-7Rs podría servir como un biomarcador temprano de riesgo de muerte en adultos con NAC.
8. Este es el primer estudio que relaciona alteraciones del eje IL-7/IL-7R con neumonía adquirida en la comunidad en adultos.



## **BIBLIOGRAFIA**

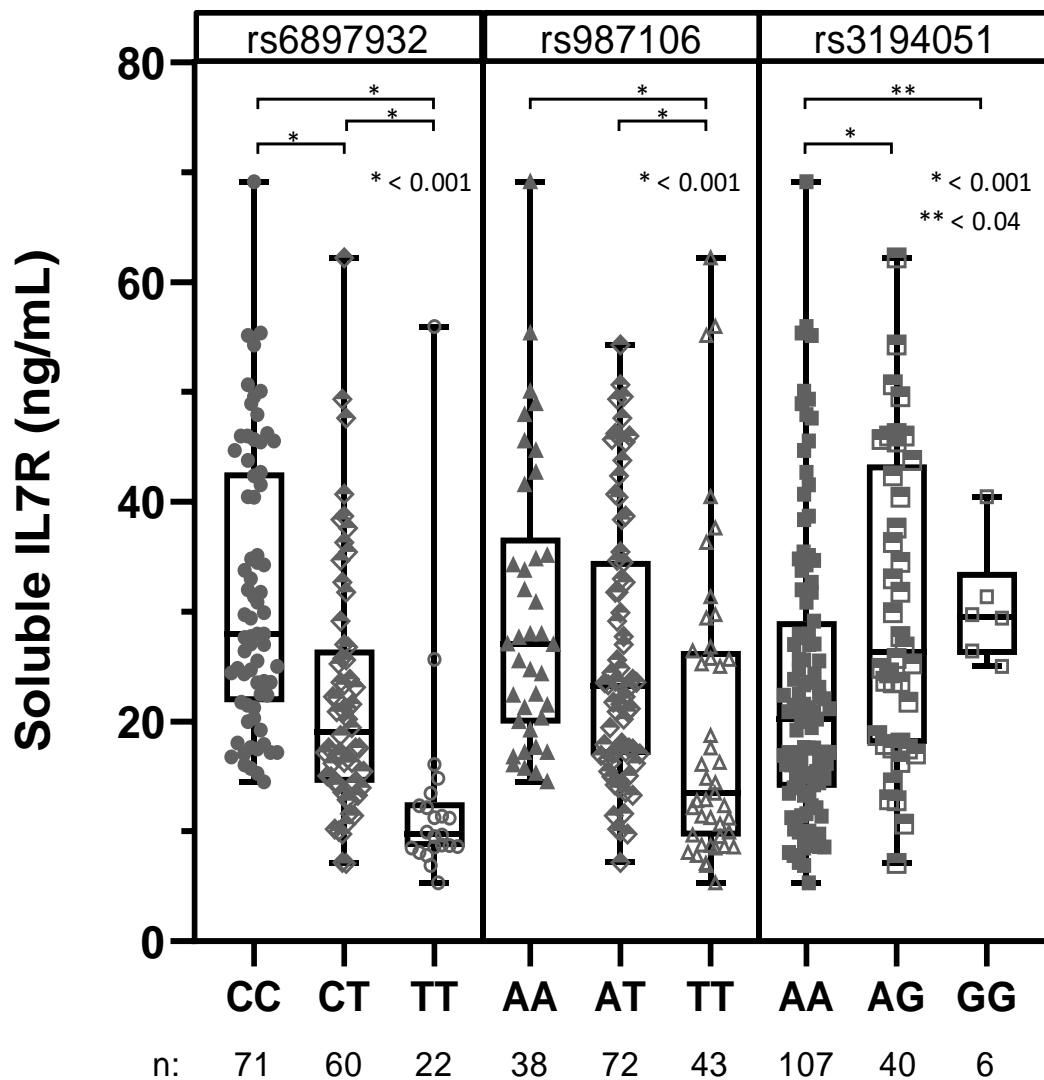
- Al-Mossawi, H., y cols. (2019). Context-specific regulation of surface and soluble IL-7R expression by an autoimmune risk allele. *Nature Communications*, 10:4575.
- Andany, N., y cols (2016). Perspectives on menopause and women with VIH. *International Journal of Women's Health*, 2016:8 1-22.
- Bantar, C., y cols. (2010). Neumonía aguda adquirida en la comunidad en adultos: Actualización de los lineamientos para el tratamiento antimicrobiano inicial basada en la evidencia local del Grupo de Trabajo de Sudamérica (ConsenSur II). *Revista Chilena de Infectología*, 27: 9-38.
- Blanquer, J., y col. (2010). Neumonía adquirida en la comunidad. *Archivos de Bronconeumología*, 46: 26-30.
- Chen, Y., y cols. (2016). Difference in leukocyte composition between women before and after menopausal age, and distinct sexual dimorphis. *Plos One* 11(9): e0162953.
- Crawley, A. M., y cols. (2010). Soluble IL-7R $\alpha$  (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. *The Journal of Immunology*, 184(9): 4679-4687.
- Crawley, A. M., y col. (2012). The influence of HIV on CD127 expression and its potential implications for IL-7 therapy. *Seminars in Immunology*, 24 (2012) 231-240.
- Demaret, J. y cols. (2014). Elevated plasmatic level of soluble IL-7 receptor is associated with increased mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med*, 40:1089-1096.
- Dudbridge, F. (2003). Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25:115-21.
- Fine, M. J., y cols. (1997). A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 336(4): 243-250.
- Franceschi, C., y cols. (2018). The continuum of aging and age-related diseases: common mechanisms but different rates. *Frontiers in Medicine*. 5:61.
- Fuseini, H., y col. (2017). Mechanisms driving gender differences in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 17(3): 19.
- Gregory, S. G., y cols. (2007). Interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 39(9): 1083.

- Goksal, K., y cols. (2006). Serum interleukin-7 levels in patients with allergic asthma. *Allergy and Clinical Immunology*, 117(2):S257.
- Guzmán-Fulgencio, M., y cols. (2015). Association between IL7R polymorphisms and severe liver disease in HIV/HCV coinfecting patients: a cross-sectional study. *Journal of Translational Medicine*, 13(1): 206.
- Jiang, Q., y cols. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(4-5): 513-533.
- Johansson, N., y cols. (2010). Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clinical Infectious Diseases*, 50(2): 202-209.
- Kielsen, K. y cols. (2017). Soluble interleukin-7 receptor levels and risk of acute graft-versus-disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Yclim*, doi:10.1016/j.clim.2017.08.015.
- Lim, W. S., y cols. (2003). Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax*, 58(5): 377-382.
- Luchsinger, V., y cols. (2013). Community-acquired pneumonia in Chile: the clinical relevance in the detection of viruses and atypical bacteria. *Thorax*, 68(11): 1000-1006.
- Luchsinger, V., y cols. (2016). Comparison of Luminex xTAG® RVP fast assay and real time RT-PCR for the detection of respiratory viruses in adults with community-acquired pneumonia. *Journal of Medical Virology*, 88(7): 1173-1179.
- Lundstrom W. y cols. (2012). IL-7 in human health and disease. *Seminars in Immunology*, 24:218-224.
- Mandell, L. y cols. (2007). Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clinical Infectious Diseases*, 44(Supplement\_2): S27-S72.
- Ministerio de Salud (MINSAL), Gobierno de Chile. (2011). Neumonía adquirida en la comunidad en adultos de 65 años y más. Serie Guías Clínicas MINSAL.
- Murphy, K., y col. (2016). *Janeway's immunobiology* 9th edition. Garland Science. 3, 107-111.

- Neill, A., y cols. (1996). Community acquired pneumonia: aetiology and usefulness of severity criteria on admission. *Thorax*, 51(10): 1010-1016.
- Passtoors, W. M. y cols. (2015). IL7R gene expression network associates with human healthy ageing. *Immunity & Ageing*, 12:21.
- Peñafiel, F. y cols. (2003). Neumonía adquirida en la comunidad en el anciano inmunocompetente que requiere hospitalización. Cuadro clínico, factores pronósticos y tratamiento. *Archivos de Bronconeumología*, 39(8): 333-340.
- Pfaffl, M., y cols. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9): e36-e36.
- Puel, A., y cols. (1998). Defective IL7R expression in T-B+ NK+ severe combined immunodeficiency. *Nature Genetics*, 20(4): 394.
- Reid, S., y col. (2019). Update on multi-gene panel testing and communication of genetic test results. *Breast Journal*, 00:1-7.
- Saldías, P. y col. (2014). Evaluación y manejo de la neumonía del adulto adquirida en la comunidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3): 553-564.
- Santiago, J. L. y cols. (2008). Study of the association between the CAPSL-IL7R locus and type 1 diabetes. *Diabetología*, 51:1653-1658.
- Torres, A., y cols. (2013). Guía multidisciplinar para la valoración pronóstica, diagnóstico y tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. *Medicina Clínica*, 140(5): 223-e1.
- Viasus, D. y cols. (2016). Biomarkers for predicting short-term mortality in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, doi: 10.1016/j.jinf.2016.01.002.
- Yeon, S., y cols. (2017). IL-7 plays a critical role for the homeostasis of allergen-specific memory CD4 T cells in the lung and airways. *Scientific Reports*, 7:11155.
- Zaunders, J. J. y cols. (2014). Exploiting differential expression of the IL-7 receptor on memory T cells to modulate immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(4): 391-401.
- Zhang, X. y cols. (2005). Selection of reference genes for gene expresión studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 6:4.

## ANEXO

Figura 1. Concentración plasmática de IL-7Rs según cada genotipo de los polimorfismos estudiados.



El valor de p se obtuvo con la prueba estadística de Mann-Whitney.



## ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

11 ABR. 2017

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.

1 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



**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 y 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](mailto: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 Nº 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.

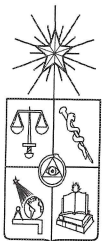
**Los ítems mínimos que deben contener los informes semestrales y finales, son los siguientes:**

- 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.



1 de 3

2 ABR. 2017



- 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:





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 N° 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.

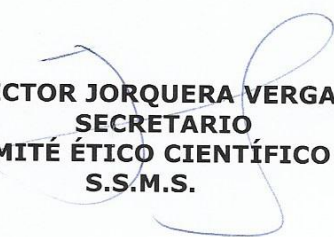
Además, debe comunicar a este Comité lo siguiente:

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,

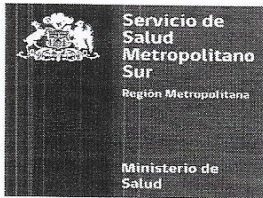


  
**Q.F. VERÓNICA RIVERA SCIARAFFIA**  
**PRESIDENTA**  
**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**  
**S.S.M.S.**

  
**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 <b>Presidenta</b>	
2. Dra. Eliana Cortéz Quezada <b>Vice-Presidenta</b>	—
3. Dr. Héctor Jorquera Vergara <b>Secretario</b>	
4. Nut. María Galleguillos Guerra <b>Vice-Presidenta (S)</b>	
5. Q.F. Cecilia Toro Martínez <b>Secretaria (S)</b>	

**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	