



FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS  
Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en  
adultos con neumonía adquirida en la comunidad grave  
y no grave”

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

**Daniel Alfredo Moya Oyola**

Directora de Memoria:

Dra. Vivian Rose Luchsinger Farías

Programa de Virología

Facultad de Medicina Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Carlos A. Santiviago Cid

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile

Santiago - Chile

2021

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Virus Respiratorios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Fue financiado por el proyecto FONDECYT n° 1171643 de la doctora Vivian Rose Luchsinger Farías.

## Agradecimiento

Primero que todo agradecer a mi familia que me han apoyado en todo, a mi hermano Gaspar que siempre ha estado ahí para brindarme su ayuda. A todo el equipo del Laboratorio de Virus Respiratorios, especialmente a la Profesora Vivian Luchsinger y a Dina Silva que me enseñó la preparación de las muestras para la citometría de flujo. A mis profesores y compañeros de universidad y a mis amigos Enrique, Alfredo, Diego, Juan, Nicolas, Alex, Miguel y Camila por ser mi soporte en estos últimos años.

## Índice

Índice.....	i
Índice de tablas: .....	iii
Índice de figuras:.....	iv
Abreviaturas .....	vi
Resumen.....	viii
Abstract .....	x
1.-Antecedentes.....	1
1.1.-Neumonía adquirida en la comunidad.....	1
1.2.-Epidemiología.....	1
1.3.-Etiología.....	1
1.4.-Diagnóstico .....	2
1.5.-Gravedad de la enfermedad .....	2
1.5.1.-Índice de severidad de la neumonía (PSI).....	2
1.5.2.-CURB-65 .....	3
1.6.-Respuesta inmune (RI) del paciente.....	3
1.6.1.-Linfocitos .....	5
1.6.3.-Linfocito B.....	6
1.6.4.-Linfocitos natural killer .....	6
1.7.-Subpoblaciones linfocitarias y citometría de flujo.....	7
1.8.-Respuesta inmune (RI) y gravedad.....	7
2.-Hipótesis .....	8
3.-Objetivos .....	8
3.1.-Objetivo General .....	8
3.2.-Objetivos Específicos .....	8
4.-Materiales y metodología .....	9
4.1.-Equipos e instrumentos.....	9
4.2.-Materiales y reactivos .....	9
4.3.-Diseño del estudio .....	10
4.4.-Muestras analizadas.....	11

4.5-Determinación del agente.....	11
4.6-Citometría de flujo y estudio inmunológico.....	11
4.7.-Análisis estadísticos .....	12
5.-Resultados .....	14
5.1.-Población estudiada .....	14
5.2.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias entre adultos sin enfermedad respiratoria y pacientes con NAC14	
5.3.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias entre adultos con NAC grave y no grave.....	17
5.5.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias de edad, género y presencia de comorbilidades en pacientes con NAC.....	17
5.6.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias de pacientes con NAC fallecidos y/o ingresados a UCI .....	22
6.-Discusión.....	25
7.-Conclusiones.....	29
8.-Proyecciones .....	30
9.-Referencias.....	31

## Índice de tablas:

<b>Tabla 1:</b> Variables y Estratificación de riesgo según la escala PSI.....	<b>4</b>
<b>Tabla 2:</b> Variables y estratificación según la Escala Pronósticas CURB-65 .....	<b>4</b>
<b>Tabla 3:</b> Anticuerpos con sus respectivos fluorocromos.....	<b>13</b>
<b>Tabla 4:</b> Características demográficas y clínicas de 63 adultos con NAC estudiados categorizados por PSI.....	<b>15</b>
<b>Tabla 5:</b> Características demográficas y clínicas de 63 adultos con NAC categorizados por CURB-65.....	<b>15</b>
<b>Tabla 6:</b> Recuentos de subpoblaciones linfocitarias en sangre de 22 adultos sin enfermedad respiratoria y 63 enfermos con NAC determinados por citometría de flujo.....	<b>16</b>
<b>Tabla 7:</b> Subpoblaciones linfocitarias en sangre de: 38 adultos con NAC grave y 25 no grave según escala pronostico PSI.....	<b>18</b>
<b>Tabla 8:</b> Subpoblaciones linfocitarias en sangre de: 31 adultos con NAC grave y 30 no grave según escala pronostico CURB-65.....	<b>18</b>
<b>Tabla 9:</b> Subpoblaciones linfocitarias en sangre de: 18 adultos con NAC menores de 65 años y 45 adultos con NAC mayores de 65 años.....	<b>20</b>
<b>Tabla 10:</b> Subpoblaciones linfocitarias en sangre de: 10 adultos con NAC menores de 50 años y 53 adultos con NAC mayores de 50 años.....	<b>20</b>
<b>Tabla 11:</b> Subpoblaciones linfocitarias en sangre de: 26 adultos con NAC menores de 70 años y 37 adultos con NAC mayores de 70 años.....	<b>21</b>
<b>Tabla 12:</b> Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 31 hombres y 32 mujeres con NAC.....	<b>21</b>
<b>Tabla 13:</b> Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 28 adultos con NAC sin comorbilidades y 35 adultos con comorbilidades. ....	<b>23</b>

## Índice de figuras:

<b>Figura 1:</b> Participantes del sistema inmune innato y adaptativo junto a su actividad en el tiempo.....	5
<b>Figura 2:</b> Esquema resumen de los linfocitos y sus respectivos CD.....	5
<b>Figura 3:</b> Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias de adultos con NAC y adultos sin enfermedad respiratoria: A) Recuento de células; B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido a 22 adultos sin enfermedad respiratoria y 63 Adultos con NAC y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con <i>t</i> de Student (p); * $p < 0,05$ .....	16
<b>Figura 4:</b> Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias de adultos con NAC grave y no grave según escalas PSI y CURB-65 A) Recuento de células y B) Porcentaje de células en pacientes clasificados por PSI; C) Recuento y D) porcentaje de células en pacientes clasificados por CURB-65. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido en 38 graves y 25 no graves según la escala PSI y 30 graves y 31 no graves según CURB-65, las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con <i>t</i> de Student (p); * $p < 0,05$ . ....	19
<b>Figura 5:</b> Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias entre adultos con NAC mayores o iguales a 65 años y menores de 65: (A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 45 adultos mayores o iguales a 65 años sin enfermedad respiratoria y 18 adultos con NAC y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con <i>t</i> de Student (p); * $p < 0,05$ . ....	22
<b>Figura 6:</b> Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias entre hombres y mujeres con NAC: (A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 32 hombres y 30 mujeres con NAC y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con <i>t</i> de Student (p); * $p < 0,05$ .....	23
<b>Figura 7:</b> Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias de adultos con NAC con y sin comorbilidades; (A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los	

valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 28 adultos con comorbilidad y 35 sin comorbilidades y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con t de Student (p); \*p<0,05.....24

**Figura 8:** Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en adultos con NAC fallecidos y/o ingresados a UCI:(A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 8 adultos fallecidos y/o ingresados y 55 no ingresados y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con t de Student (p); \* p<0,05.....24



## Abreviaturas

- APC:** Célula presentadora de antígenos
- ATS:** Sociedad Torácica Americana
- BSB:** *Brillant stain buffer*
- BSA:** Albúmina de suero bovino
- BTS:** Sociedad Británica del Tórax
- CD3:** Clúster de diferenciación 3
- CD4:** Clúster de diferenciación 4
- CD8:** Clúster de diferenciación 8
- CD16:** Clúster de diferenciación 16
- CD19:** Clúster de diferenciación 19
- CD27:** Clúster de diferenciación 27
- CD45:** Clúster de diferenciación 45
- CD56:** Clúster de diferenciación 56
- CD70:** Clúster de diferenciación 56
- CMH I:** Complejo mayor de histocompatibilidad I
- CMH II:** Complejo mayor de histocompatibilidad II
- cPBS:** Buffer fosfato salino complementado
- DPBS:** Buffer fosfato salino de Dulbecco
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- FBS:** *Stain buffer*
- FVS-780:** *Fixable Viability Strain 780*
- HTA:** Hipertensión arterial
- hMPV:** Metapneumovirus humano
- Ig:** Inmunoglobulina
- NAC:** Neumonía adquirida en la comunidad
- NCAM:** Molécula de adhesión celular neural
- NK:** Natural Killer
- LT:** Linfocitos T
- LB:** Linfocitos B

**LMR:** Proporción linfocito-monocito  
**PBS:** Buffer fosfato salino  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PSI:** Índice de severidad de la neumonía  
**RI:** Respuesta inmune  
**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa  
**TCR:** Receptor de células T  
**UCI:** Unidad de cuidados intensivos  
**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana  
**VRS:** Virus respiratorio sincicial  
**WBC:** Células sanguíneas blancas

## Resumen

**Antecedentes:** La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una infección aguda respiratoria que perjudica al parénquima pulmonar. Posee un gran impacto mundial afectando principalmente la población geriátrica y pediátrica. En adultos, los agentes más frecuentes son *Streptococcus pneumoniae* y virus respiratorios. La gravedad de la enfermedad se evalúa con índices pronósticos como el índice de severidad de la neumonía (PSI) o el CURB-65. La evolución de la NAC podría depender de la respuesta inmune (RI) del enfermo, por ello es importante evaluarlo. En estudios preliminares se detectó una disminución de subpoblaciones de linfocitos T y NK en adultos con NAC respecto a adultos sin enfermedad respiratoria y con distinta gravedad mediante citometría de flujo. Para confirmar este resultado es necesario aumentar los casos estudiados además de estudiar la respuesta inmune humoral, cuya disminución podría contribuir al desarrollo de una enfermedad más grave.

**Hipótesis:** Los adultos graves con NAC tienen menor proporción de las subpoblaciones de linfocitos B (CD19 y CD27), T (CD3, CD4 y CD8) y NK (CD16 y CD56) con respecto a los no graves, y esta disminución está dada por características del paciente tales como la edad, el sexo y las comorbilidades.

**Objetivo:** Determinar si las subpoblaciones linfocitarias B, T y NK están disminuidas en adultos graves con NAC respecto a los no graves y establecer su relación con la edad, el sexo y las comorbilidades de los pacientes.

**Metodología:** Los pacientes fueron enrolados en los hospitales Dr. L. Córdova, Clínico de la Universidad de Chile y San José entre julio de 2018 y julio de 2019 y clasificados por gravedad según PSI y CURB-65. A pacientes con agente infeccioso se cuantificaron los recuentos de linfocitos totales (CD45), LT (CD3), LTCD4 (CD4), LTCD8 (CD8), LB vírgenes (CD19) y activados (CD27) y células NK (CD56 y CD16).

**Resultados:** Se estudiaron 22 adultos sin enfermedad respiratoria y 63 adultos con NAC. Ellos mostraron una diferencia en los recuentos celulares con un  $p < 0,05$  y una diferencia en el porcentaje de CD19, siendo menor en ambos casos los adultos con NAC. En la comparación referente a la gravedad, no se encontró diferencia entre grave y no grave bajo el criterio de PSI; no obstante, por CURB-65 se encontró una disminución significativa en los porcentajes de linfocitos totales CD45, LTCD3, LTCD4 y LBCD27 de pacientes grave. También se encontró disminuido el porcentaje de LTCD3, LTCD4 y LBCD27 en adultos mayores de 65 años, LTCD4 y LBCD27 en mujeres y linfocitos totales en pacientes que poseen comorbilidades.

**Conclusiones:** Las subpoblaciones linfocitarias están disminuidas en adultos con NAC respecto a adultos sin enfermedad respiratoria. La disminución de LT auxiliares y LB vírgenes favorecerían el desarrollo de una enfermedad grave. La proporción de las subpoblaciones estarían afectadas por la edad, sexo y presencia de comorbilidades. Finalmente, los LBCD19 están disminuidos en pacientes graves (fallecidos e ingresados a UCI) proponiendo su estudio como biomarcador de gravedad de la NAC.

## **Abstract**

### **Quantification of lymphocyte subpopulations in adults with severe and non-severe community acquired pneumonia.**

**Background:** Community acquired pneumonia (CAP) is an acute respiratory infection that harm the lung parenchyma. It has a great global impact that mainly affects the geriatric and pediatric population. In adults, the most frequent agents are *Streptococcus pneumoniae* and respiratory viruses. The severity of the disease is evaluated with prognostic indexes such as the severity index of pneumonia (PSI) or CURB-65. The evolution of the CAP could depend on the immune response of the patient, so it is important to evaluate it. In preliminary studies a decrease in subpopulations of T and NK cells was detected in adults with CAP compared to adults without respiratory disease and with different severity by flow cytometry. To confirm the result, it's necessary to increase the cases studied in addition to studying the humoral immune response, whose decrease could contribute to the development of a more serious disease.

**Hypothesis:** Severe adults with CAP have lower proportions of B (CD19 and CD27), T (CD3, CD4 and CD8) and NK (CD16 and CD56) lymphocyte subpopulations compared to non-severe adults, and this decrease is given by patient characteristics such as age, sex and comorbidities.

**Objective:** Determine if the lymphocyte subpopulations B, T and NK are decreased in severe adults with CAP compared to non-severe and establish their relationship with the age, sex and comorbidities of the patients.

**Methodology:** The patients were enrolled in “Hospital Dr. L. Córdova,” Hospital Clínico de la Universidad de Chile” and “Hospital San José” between July 2018 and July 2019 and classified by severity according to PSI and CURB-65. In patients with infectious agent, the total lymphocytes, T cells (TC) (auxiliary and cytotoxic), B cells (BC) (Naive and active) and NK were quantified by flow cytometry with antibodies

labeled with anti-CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD27, CD16 and CD56 fluorochromes respectively.

**Results:** 22 adults without respiratory disease and 63 adults with CAP were studied, they showed a difference in cell counts between all the surface proteins with a  $p < 0.05$  and a difference in the percentage of CD19 being lower in the adults with CAP in both cases. In the comparison between severity, no difference was found between severe and non-severe under PSI criteria, however, by CURB-65 a significant decrease was found in percentages of total CD45, TC-CD3, TC-CD4 and BC-CD27 of severe patients. Also was reduced the percentage of TC-CD3, TC-CD4 and BC-CD27 in adults older than 65 years, the TC-CD4 and BC-CD27 in woman and total lymphocytes in patients with comorbidities.

**Conclusions:** Lymphocyte subpopulations are diminished in adults with CAP compared to adults without respiratory disease. The decrease in naive LB and helper LTs would favor the development of a severe disease and the proportion of the subpopulations are affected by age, sex and presence of comorbidities. Finally, the BC-CD19 are diminished in severe patients (deceased and admitted to ICU) proposing their study as a biomarker of severity of the CAP.

## **1.-Antecedentes**

### **1.1.-Neumonía adquirida en la comunidad**

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es una infección aguda respiratoria que afecta al parénquima pulmonar con compromiso de los alveolos, los que se llenan de líquido y pus, causando dolor al respirar y disminución en la captación de oxígeno. Todo esto puede generar una falla respiratoria progresiva y potencialmente fatal. La enfermedad es causada por agentes como virus, bacterias y hongos adquiridos en un ambiente comunitario (Höltermann y col., 1998; WHO, 2016; Díaz y col., 2005).

### **1.2.-Epidemiología**

La neumonía es considerada a nivel mundial como la enfermedad infecciosa que causa mayor mortalidad, produciendo el 15% de los fallecimientos en menores de 5 años (WHO, 2016). En Chile, las enfermedades respiratorias son la tercera causa de muerte; el 50-60% de estos casos corresponde a una neumonía, aumentando al 80% en la población de riesgo (pediátrica y geriátrica), con una tasa de mortalidad de 6,6/1.000 adultos mayores (García-Ordoñez y col., 2001; DEIS, 2014). Un 20% de los enfermos requiere hospitalización, siendo su letalidad inferior al 2% (Díaz y col., 2005; MINSAL, 2011).

En el mundo, la enfermedad muestra una incidencia estacional, con la mayoría de los casos en los meses de invierno, coincidiendo con las infecciones respiratorias por ciertos virus (MINSAL, 2011).

### **1.3.-Etiología**

Los métodos utilizados habitualmente para detectar los agentes causantes de la enfermedad no logran identificar al microorganismo en un 35% de los casos, denotando la dificultad del diagnóstico de la patología (Skerrett y col., 1999; Luchsinger y col. 2013). El patógeno con mayor ocurrencia en el ámbito extrahospitalario es *Streptococcus pneumoniae*; que en Chile se presenta

aproximadamente en un 20% de los casos. También puede ser causada por bacterias atípicas como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, las que se encuentran en un 9%, 8% y 5% de los casos, respectivamente. Otras bacterias como *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* se detectan en 1% y 2% (Riquelme y col., 2006; Luchsinger y col., 2013). Los virus respiratorios también se detectan en alta frecuencia en los casos de NAC, en especial el virus respiratorio sincicial (VRS) (2,75%), el virus influenza (12,6%) y rinovirus humano (28,6%) (Saldías y col., 2004; Marcos y col., 2009; Luchsinger y col. 2016).

#### **1.4.-Diagnóstico**

Se sospecha de una neumonía cuando el paciente presenta síntomas como fiebre, tos, dificultad para respirar y expectoración purulenta, entre otras. Se confirma realizando una radiografía del tórax, la cual debe de mostrar un infiltrado pulmonar (Yoshikawa y Marrie, 2000; Bantar y col., 2010). En adultos la detección del agente se realiza en muestras respiratorias como expectoración y aspirado o torulado nasofaríngeo mediante amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dandachi y Rodríguez-Barredas, 2018; Nolten, 2018); en orina con inmunocromatografía como Binax NOW para detectar antígenos bacterianos y/o con hemocultivos (Gutierrez y col., 2003; Yu y Stout, 2009).

#### **1.5.-Gravedad de la enfermedad**

La enfermedad puede evolucionar a una forma grave, lo cual no depende del agente de la infección (Luchsinger y col. 2013). Para determinar la gravedad del paciente y pronosticar la mortalidad, se han elaborado y validado diversos índices pronósticos que consideran características y parámetros clínicos de cada individuo (Carpio-Deheza y Céspedes-Vargas, 2013). Dentro de los utilizados en los centros hospitalarios de Chile se pueden encontrar:

##### **1.5.1.-Índice de severidad de la neumonía (PSI)**

Propuesto por la *American Thoracic Society* (ATS), fue obtenido del estudio de una cohorte de 14.199 adultos hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad y



validado en un grupo de más de 2.000 pacientes. Se asignan puntos en base a la edad, estado de comorbilidad y elementos clínicos y de laboratorio. Según el puntaje, los pacientes se clasifican en cinco grupos con porcentajes crecientes de riesgo de mortalidad (**Tabla 1**), indicándose tratamiento ambulatorio en el grupo I y II, un corto período de hospitalización en el grupo III y hospitalización en una unidad de cuidados intensivos para los grupos IV y V (Mandell y col., 2007).

### **1.5.2.-CURB-65**

Índice propuesto por la Sociedad Británica del Tórax (BTS), se basa en parámetros clínicos cuyas iniciales conforman la sigla CURB-65, las que corresponden a: C por compromiso de conciencia, U por niveles de urea, R por frecuencia respiratoria, B por presión arterial y 65 si la edad del paciente es superior o igual a esta cifra (**Tabla 2**). Este modelo predictivo clasifica a los pacientes en 3 grupos, recomendando el manejo ambulatorio para el primer grupo, observación y hospitalización transitoria para el segundo grupo y el ingreso al hospital para el último que incluye a los enfermos graves, especialmente mayores de 65 años (Jiménez, 2004).

Aunque la aplicación clínica de estas escalas ha sido de gran utilidad, ambas clasifican de manera inapropiada a algunos pacientes por lo que fallecen algunos enfermos clasificados en el grupo de bajo riesgo, lo cual es posible debido a otros factores no incluidos en las escalas que afectan la evolución de la NAC en el adulto.

### **1.6.-Respuesta inmune (RI) del paciente**

Frente a la infección, el organismo genera una RI con la finalidad de eliminarla, en la cual participan una serie de células como linfocitos T (LT), linfocitos B (LB) y natural killer (NK). (**Figura 1**)

**Tabla 1:** Variables y estratificación de riesgo según la escala PSI.

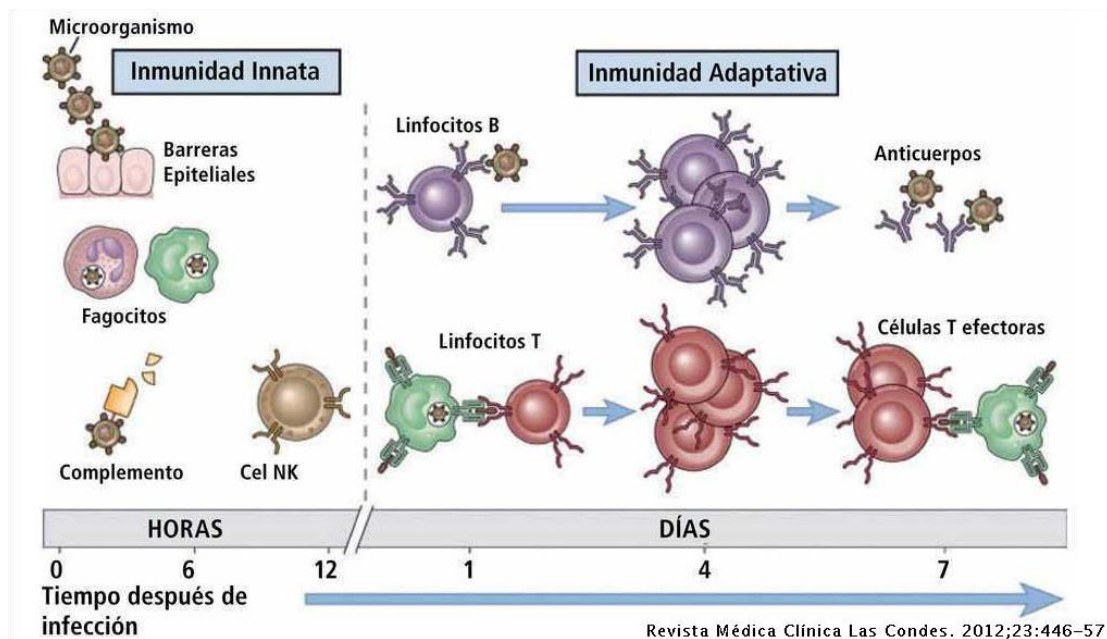
Características		Puntuación	
Edad: Hombre		N° de años	
Edad: Mujer		N° de años -10	
Asilo o residencia		+10	
Enfermedad neoplásica		+30	
Enfermedad hepática		+20	
Insuficiencia cardíaca congestiva		+10	
Enfermedad cerebrovascular		+10	
Enfermedad renal		+10	
Estado mental alterado		+20	
Frecuencia respiratoria >30 x minuto		+20	
Presión arterial sistólica < 90 mmHg		+20	
Temperatura <35oC o >40oC		+15	
Pulso > 125 x minuto		+10	
pH arterial <7,35		+30	
Nitrógeno ureico en sangre >30 mg/dl		+20	
Na <130 nmol/l		+20	
Glucosa >250 mg/dl		+10	
Hematocrito <30%		+10	
PaO <sub>2</sub> <60 mmHg		+10	
Derrame pleural		+10	
Clase de riesgo Fine		Puntuación	Muerte 30 días (%)
Bajo riesgo	Clase I	sí <50 años y sin neoplasia, ni insuficiencia cardíaca, enfermedad cerebrovascular, enfermedad hepática o renal.	0,1
	Clase II	<70	0,6
	Clase III	71-90	0,9
Alto riesgo	Clase IV	91-130	8,2-9,3
	Clase V	>130	27-29,2

(Carpio-Deheza y Céspedes-Vargas, 2013).

**Tabla 2:** Variables y estratificación según la escala pronósticas CURB-65.

Descripción		Puntuación	
C Confusión. Desorientación temporo-espacial		1	
U Urea sérica > 7 mmol/l		1	
R Frecuencia Respiratoria ≥ 30 x minuto		1	
B Hipotensión arterial Presión arterial diastólica ≤ 60 mmHg o Presión arterial sistólica < 90 mmHg.		1	
65 Edad ≥65 años		1	
Grupos de Riesgo			
Puntuación CURB-65	Grupo	Mortalidad	Sitio de atención
0	I	0,7%	Ambulatorio
1		2,1%	Ambulatorio
2	II	9,2%	Considerar hospitalización
3	III	14,5%	hospitalización
4-5		40%	hospitalización Considerar UCI*

\*UCI: Unidad de Cuidado Intensivo.  
(Carpio-Deheza y Céspedes-Vargas, 2013).



**Figura 1:** Participantes del sistema inmune innato y adaptativo junto a su actividad en el tiempo.

### 1.6.1.-Linfocitos

Encargadas del control de las infecciones, estas células son capaces de reconocer a los agentes infecciosos al expresar receptores para el reconocimiento de antígenos. Existen distintas subpoblaciones que se diferencian en sus funciones y componentes estructurales como las proteínas de superficie denominadas Clúster de Diferenciación (CD) que son específicas para cada tipo celular. Cada marcador de superficie se identifica con un número. Por ejemplo: CD45, un marcador que se encuentra en todos los linfocitos (Abbas, 2012).

### 1.6.2.-Linfocito T

Son células del sistema inmune adaptativo que se producen en la médula ósea y maduran en el timo y su función es detectar y destruir células infectadas de forma específica. Para esto deben activarse y su principal mediador de activación es el receptor de las células T (TCR), el cual forma un complejo con la proteína CD3 que genera una cascada de señales intracelulares posterior a la unión del TCR con un

antígeno. TCR también se asocia a un correceptor dependiendo del tipo de LT, por lo que se diferencia en linfocito T citotóxico (LTCD8) si expresan y se une TCR a CD8 y linfocito T auxiliar (LTCD4) si es a CD4. Los correceptores tienen la función de estabilizar la unión del TCR con el antígeno, los cuales deben ser presentados por las células presentadoras de antígenos (APC) las que captan, procesan y presentan antígenos junto con unas moléculas llamadas complejos de histocompatibilidad (CMH) I (si presenta para LTCD8) y el II (si presenta para LTCD4). Una vez activados, los LTCD4 liberan citoquinas y otros mediadores, los cuales promueven la producción de anticuerpos. En el caso de los LTCD8, después de reconocer un antígeno, liberan perforina y granzima, las que causan lisis de la célula infectada (Abbas, 2012; Pennock y col., 2013).

### **1.6.3.-Linfocito B**

Generadas en la médula ósea, expresan CD19 y CD20 en su superficie. Son activadas mediante la interacción con los LTCD4. Este proceso origina su proliferación y diferenciación a células plasmáticas, las cuales secretan anticuerpos. Una vez activados los LB, expresan en su superficie CD27 que al interactuar con su ligando CD70, inducen la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) tales como IgG, IgE, IgA e IgM. Algunos LB activados permanecen en el tiempo constituyendo las células de memoria que frente a una nueva infección por el mismo agente infeccioso, liberarán en forma más rápida mayor cantidad de anticuerpos, con elevación en un plazo breve de los títulos de anticuerpos sistémicos, siendo la respuesta más sostenida y efectiva (Agematsu, 2000; Kurosaki y col., 2015).

### **1.6.4.-Linfocitos natural killer**

Linfocitos que lisan células infectadas liberando perforina y granzima y que producen citoquinas como interferón  $\gamma$ . Poseen un receptor de baja afinidad de la fracción constante de la IgG (CD16), uniéndose a anticuerpos que interactuarán con las células infectadas. A su vez, las NK son capaces de activar e inducir la proliferación de células dendríticas. Se distinguen dos variaciones en su maduración: CD56dim, la que es altamente citotóxica y posee una baja producción de citoquinas, y CD56bright, la cual

presenta baja citotoxicidad y genera gran cantidad de citoquinas. CD56 o molécula de adhesión de células neurales (NCAM) posee una gran variedad de funciones en el organismo, pero su rol principal es el de adhesión celular (Cerwenka y Lanier, 2016; Van Acker y col., 2017; Suen y col., 2018).

### **1.7.-Subpoblaciones linfocitarias y citometría de flujo**

Debido a que estas subpoblaciones linfocitarias se asemejan en su morfología, técnicas como el censo por hemograma carecen de precisión para su recuento. Por eso se han desarrollado nuevos métodos que caracterizan de manera más precisa a las células. Entre ellas se incluye la citometría de flujo, la cual puede discernir entre cada célula, analizando múltiples características físicas y químicas y de partículas en suspensión al pasar en forma individual, una tras otra, a través de un capilar en el que incide un láser. Al cruzar, el haz de luz se dispersa y es recibido por un fotorreceptor de dispersión frontal y uno de dispersión lateral, los cuales informan sobre el tamaño, granularidad y morfología de cada célula. Además, las células pueden estar marcadas con fluorocromos cuya fluorescencia es detectada y procesada por fotomultiplicadores y analizada por un programa del citómetro, entregando datos numéricos y una clasificación de las células sanguíneas junto a la subpoblación de linfocitos.

### **1.8.-Respuesta inmune (RI) y gravedad**

Como la RI del hospedero controla la infección, una menor respuesta podría favorecer el desarrollo de una enfermedad grave en el paciente, en especial si disminuye la respuesta inmune celular por lo que los linfocitos podrían tener un papel en la evolución de la NAC. En investigaciones preliminares realizadas en el Laboratorio de Virus Respiratorios del Programa de Virología, se estudiaron las subpoblaciones linfocitarias de 103 adultos con NAC (70 graves y 33 no graves) incluyendo leucocitos totales, LTCD3, LTCD4, LTCD8 y células NK(CD56) activadas (NKG2D) e inhibidas (NKG2A). Se detectó una disminución de las subpoblaciones en los 70 enfermos graves respecto a los 33 no graves, teniendo un menor recuento de linfocitos (1142 vs 1694 células/ $\mu$ l,  $p=0,0001$ ), de LTCD3 (788 vs 1170 células/ $\mu$ l;  $p<0,001$ ) y LTCD4 (542 vs 748 células/ $\mu$ l;  $p<0,001$ ). También fueron inferiores los porcentajes de linfocitos (11,7% vs 20,8%,  $p=0,000$ ), de LTCD3CD4 (3,2% vs 10,8%,  $p=0,0000$ ),

CD56/NKG2D (1,6% vs 2,6%;  $p=0,001$ ) y de CD56/NKG2A (0,4% vs 0,9%;  $p<0,001$ ) (comunicación personal). Es necesario verificar estos resultados en un mayor número de pacientes y ampliar el estudio a la respuesta inmune humoral, determinando si hay cambios en los linfocitos B en adultos con NAC. Esto puede ser clave en el desarrollo de un nuevo biomarcador que optimice el pronóstico de la evolución de la enfermedad (Méndez y col., 2019).

## **2.-Hipótesis**

Los adultos graves con NAC tienen menor proporción de las subpoblaciones de linfocitos B (CD19 y CD27), T (CD3, CD4 y CD8) y NK (CD16 y CD56) con respecto a los no graves, y esta disminución está dada por características del paciente tales como la edad, el sexo y las comorbilidades.

## **3.-Objetivos**

### **3.1.-Objetivo General**

Determinar si las subpoblaciones linfocitarias B, T y NK están disminuidas en adultos graves con NAC respecto a los no graves y establecer su relación con la edad, el sexo y las comorbilidades de los pacientes

### **3.2.-Objetivos Específicos**

- Caracterizar demográfica y bioquímicamente a los pacientes participante del estudio.
- Evaluar las subpoblaciones de linfocitos B, T y NK en sangre periférica de adultos con NAC graves y no graves mediante citometría de flujo.
- Comparar los recuentos de linfocitos B, T y NK en sangre periférica entre adultos con NAC graves y no graves, y en relación con la edad, el sexo y las comorbilidades.

## **4.-Materiales y metodología**

### **4.1.-Equipos e instrumentos**

Para la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes equipos e instrumentos: Hemocontador Dirui BCC-3000B; Centrifuga Hanshin Medical co. LTD modelo: HC-16A; Centrifuga BOECO Germany U-32R; Gabinete de flujo laminar *HFsafe* 1200 *Heal Force*.

### **4.2.-Materiales y reactivos**

*BD Pharmigen: stain buffer* (FBS) Además de anticuerpos de ratón anti CD3 humano APC; CD4 humano PerCP-Cy5.5; CD8 humano FITC; CD19 humano Pe-Cy7; CD16 humano PE; CD56 humano PE; IgG2a, κ Isotipo control APC; IgG1 κ Isotipo control PerCP-Cy5.5; IgG1 κ Isotipo control FITC; IgG1 κ Isotipo control PE-Cy7; IgG1 κ Isotipo control BV421 y IgG1 κ Isotipo control PE.

*BD Horizon: Brilliant Stain Buffer* (BSB); *Fixable Viability Stain* 780 (FVS-780); Anticuerpo de ratón anti CD45 humano BV510; CD27 humano BV421 y IgG1 κ Isotipo control BV510.

*Corning: Molecular Biology Grade Water*; Buffer fosfato salino de (PBS) 10X y buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS) 10X

Tubos de poliestireno de fondo redondo de 5mL Falcom; dimetil sulfóxido (DMSO) Sigma-Alrich; azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) Merck; Albúmina de suero bovino (BSA) Fraction V AppliChem y solución lisis BD FACS.

Se prepararon las siguientes soluciones y diluciones: PBS 10X diluido 1/10 con agua de grado molecular, PBS complementado (cPBS) con una concentración final de  $\text{NaN}_3$  0.09%, PBS y BSA 0.2%, solución lisis diluido 1/10 con agua de grado molecular, DPBS diluido 1/10 con agua de grado molecular y FVS 780 diluido 1/10 con PBS.

### **4.3.-Diseño del estudio**

Esta memoria de título forma parte del Proyecto FONDECYT N° 1171643, el cual está aprobado por los Comités de Ética correspondientes de cada centro hospitalario donde se enrolan pacientes para el estudio y por el de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El estudio fue realizado entre el año 2018 y 2019 con personas mayores de 18 años que voluntariamente aceptaron participar, lo que se manifiesta mediante su firma de un consentimiento informado. Los médicos que participan en el proyecto FONDECYT enrolaron a los pacientes en el Hospital Dr. Lucio Córdova, el Hospital Clínico de la Universidad de Chile y el Hospital San José.

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron: evolución de la NAC con menos de 7 días, caracterizada por tener un proceso inflamatorio pulmonar de origen infeccioso adquirido en el medio comunitario y confirmada por radiografía del tórax, todo de acuerdo con los criterios de la guía del Ministerio de Salud (MINSAL, 2011). Los criterios de exclusión fueron: inmunosupresión por infección con virus de inmunodeficiencia humano (VIH), tratamiento contra el cáncer, trasplante de órganos, terapia inmunosupresora, uso habitual de corticoides y hospitalización en los 30 días anteriores al enrolamiento para descartar infecciones intrahospitalarias. El estado de gravedad en el que se encontraron los pacientes se determinó aplicando PSI y CURB-65, y se clasificó como grave cuando el paciente obtuvo una puntuación sobre 90 en PSI y/o una puntuación de 3 o más en CURB-65, y no grave si obtuvo 90 puntos o menos en PSI o una puntuación entre 0 y 2, según CURB65.

Con el fin de obtener valores basales se estudiaron 22 adultos sin enfermedad respiratoria, con detección negativa de agentes infecciosos y que voluntariamente aceptaron participar, entre 2017 y 2018.



#### **4.4.-Muestras analizadas**

Las muestras de los pacientes enrolados fueron obtenidas por personal de enfermería y/o kinesiología de cada hospital y fueron: una muestra respiratoria correspondiente a un torulado, aspirado o hisopado nasofaríngeo y/u orofaríngeo, una muestra de orina y dos muestras de sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

#### **4.5-Determinación del agente**

El personal del laboratorio realizó la búsqueda de virus y bacterias atípicas respiratorias en la muestra correspondiente de cada paciente por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), buscando específicamente: adenovirus, bocavirus, VRS, metapneumovirus humano (hMPV), coronavirus, virus parainfluenza, rinovirus, enterovirus, virus influenza A, virus influenza B, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Legionella spp.* Además, se detectaron antígenos de *S. pneumoniae* y *L. pneumophila* por inmunocromatografía BinaxNOW en la orina. Cuando se detectó algún agente, se procesó la muestra de sangre para realizar citometría de flujo.

#### **4.6-Citometría de flujo y estudio inmunológico**

Para la preparación de cada una de las muestras de sangre total con EDTA para la citometría de flujo, se calculó un volumen de sangre que contenía  $10 \times 10^6$  células, en base al recuento de glóbulos blancos totales (WBC) obtenido por hemograma, considerando que  $1 \text{ mL}$  de  $9 \times 10^3 \text{ WBC}/\mu\text{L}$  corresponde a  $10 \times 10^6$  células. El volumen determinado se vertió en un tubo cónico de  $5 \text{ mL}$  y se completó con DPBS 1X si la muestra era menor a  $1 \text{ mL}$ . Se centrifugó a  $3500 \text{ rpm}$  por  $5$  minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó con  $500 \mu\text{L}$  de DPBS 1X, se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en  $1 \text{ mL}$  de DPBS 1X y se agregó  $1 \mu\text{L}$  de FSV 780 1/10 por  $1 \text{ mL}$  de células (dilución final de 1/10000) para teñir células muertas. Se agitó vigorosamente y se incubó en oscuridad por  $15$  minutos. Posteriormente se lavó dos veces con  $2 \text{ mL}$  de cPBS centrifugando a  $3500 \text{ rpm}$  por  $10$  minutos y eliminando el sobrenadante. Se añadió a la muestra  $50 \mu\text{L}$  de *Brillant Stain Buffer* para evitar posibles interacciones inespecíficas entre anticuerpos que interfieran

en la detección y un volumen necesario de FBS para completar 1mL final. Se agitó vigorosamente y se repartió 100µL en cada tubo con los anticuerpos anti-CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD27, CD16 y CD56, con los respectivos isotipos, y en un tubo como control de tinción sólo con FSV. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se agregaron 2mL de solución de lisis y se incubó 15 minutos en oscuridad. Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos descartando el sobrenadante, se lavó dos veces con cPBS centrifugando a 2500 rpm por 5 minutos y eliminando el sobrenadante y se agregaron 200 µL de cPBS. Finalmente, las detecciones se realizaron en el citómetro de Flujo FACSCanto II del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Todo el procedimiento incluyó dos controles: uno solo con tinción vital celular con FSV y el otro sin tinciones.

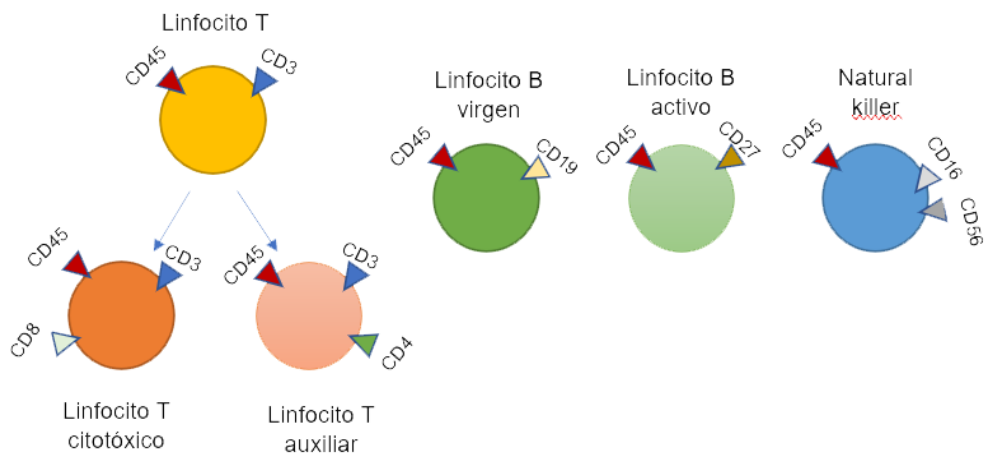
En todas las muestras para citometría se cuantificaron los linfocitos totales, linfocitos T (auxiliares y citotóxicos), linfocitos B (virgenes y activas) y células NK utilizando anticuerpos con fluorocromos visto en la **tabla 3 y figura 2**. Los datos obtenidos de la citometría fueron analizados con el programa FlowJo (versión 10.0.7).

#### **4.7.-Análisis estadísticos**

Se compararon las variables continuas no paramétricas, como los recuentos linfocitarios entre adultos graves y no graves con NAC, a través de la prueba *t* de Student o de suma de rangos de Wilcoxon en el programa GraphPad Prism® (versión 8.0), considerando un valor de  $p < 0,05$  como significativo. Las variables nominales (sexo, enfermedades de base y edad) se analizaron con la prueba chi-cuadrado.

**Tabla 3:** Anticuerpos con sus respectivos fluorocromos.

Anticuerpo	Fluorocromo	Excitación	Emisión
Anti-CD3 humano de roedor	APC	633nm	660nm
Anti-CD4 humano de roedor	PerCP-Cy5.5	488nm	675nm
Anti-CD8 humano de roedor	FITC	488nm	519nm
Anti-CD19 humano de roedor	Pe-Cy7	496nm	785nm
Anti-CD27 humano de roedor	BV421	407nm	421nm
Anti-CD16 humano de roedor Anti-CD56 humano de roedor	PE	488nm	578nm
Anti-CD45 humano de roedor	BV510	405nm	510nm



**Figura 2:** Esquema resumen de los linfocitos y sus respectivos CD.

## 5.-Resultados

### 5.1.-Población estudiada

Los 63 adultos hospitalizados por NAC estudiados tenían una mediana de edad de 74 años y un rango de 27 a 94 años; 9 pacientes (14,3%) fueron internados en unidad de cuidados intensivos (UCI) y 8 (12,7%) fallecieron. Se categorizaron 38 pacientes como graves (60,3%) y 25 no graves (39,7%) según la escala pronóstica PSI y 30 graves (47,6%) y 31 no graves (49,2%), según CURB-65 (2 casos no pudieron clasificarse por falta de antecedentes clínicos). La caracterización demográfica y clínica de los pacientes enrolados se muestra en las **Tablas 4 y 5** en las cuales se utilizó como edad de corte los 65 años debido a que es en la que se presenció mayor cambio en su subpoblación de linfocitos. En 37 pacientes se detectaron sólo virus (58,7%), siendo el más frecuente el virus influenza (13/37 casos = 35,1%); en 11 se detectaron sólo bacterias (17,5%), especialmente *Streptococcus pneumoniae* (9 /11 casos = 81,8%) y en 15 se detectaron ambos agentes (23,8%), siendo la combinación más frecuente virus parainfluenza con *S. pneumoniae* (5/15 casos = 33,3%). Se estudiaron 22 adultos sin enfermedad respiratoria cuya mediana de edad fue 54 años y un rango de 25 a 82 años; el 68% (15) eran mujeres y 23% (5) tenían comorbilidades.

### 5.2.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias entre adultos sin enfermedad respiratoria y pacientes con NAC

Las medianas, proporciones y rangos de los recuentos de las subpoblaciones linfocitarias de linfocitos totales (CD45), LT (CD3), LTCD4 (CD4), LTCD8 (CD8), LB vírgenes (CD19) y activados (CD27) y células NK (CD56 y CD16) obtenidos por citometría de flujo entre adultos con y sin enfermedad respiratoria se muestran en la **tabla 6**. al comparar los recuentos celulares y los porcentajes entre adultos con y sin enfermedad respiratoria (**Figura 3**) se observa una disminución estadísticamente significativa en los recuentos de todas las subpoblaciones estudiadas ( $p < 0,05$ ) en los enfermos respecto a los adultos sin enfermedad respiratoria (**Figura 3A**). Sin embargo, aunque los porcentajes de CD3, CD4, CD27 y CD19 son menores en los enfermos que en los adultos asintomáticos, aunque sólo la diferencia en CD19 fue estadísticamente significativa (10,8% vs 6,5%;  $p = 0,0004$ ) (**Figura 3B**).

**Tabla 4:** Características demográficas y clínicas de 63 adultos con NAC estudiados categorizados por PSI.

Variables		PSI			p
		Grave n (%)	No Grave n (%)	Total n (%)	
Edad	18 - 64 años	5(7,9)	13(20,6)	18(28,6)	0,0008*
	≥65 años	33(52,4)	12(19,0)	45(71,4)	
	Total	38(60,3)	25(39,7)	63(100)	
Genero	Hombre	20(31,7)	11(17,4)	31(49,2)	0,5026
	Mujer	18(28,6)	14(22,2)	32(50,8)	
	Total	38(60,3)	25(39,7)	63(100)	
Comorbilidades (EPOC, HTA y diabetes)	Sin Comorbilidades	15(23,8)	13(20,6)	28(44,4)	0,4583
	Con Comorbilidades	23(36,5)	12(19,0)	35(55,5)	
	EPOC	8(12,7)	6(9,5)	14(22,2)	
	HTA	14(22,2)	6(9,5)	22(34,9)	
	Diabetes	13(20,6)	3(4,7)	16(25,4)	
	Total	38(60,3)	25(39,7)	63(100)	

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial

\* prueba chi cuadrado  $P < 0,05$ , existe una predilección de tener una NAC grave al ser mayor de 65 años.

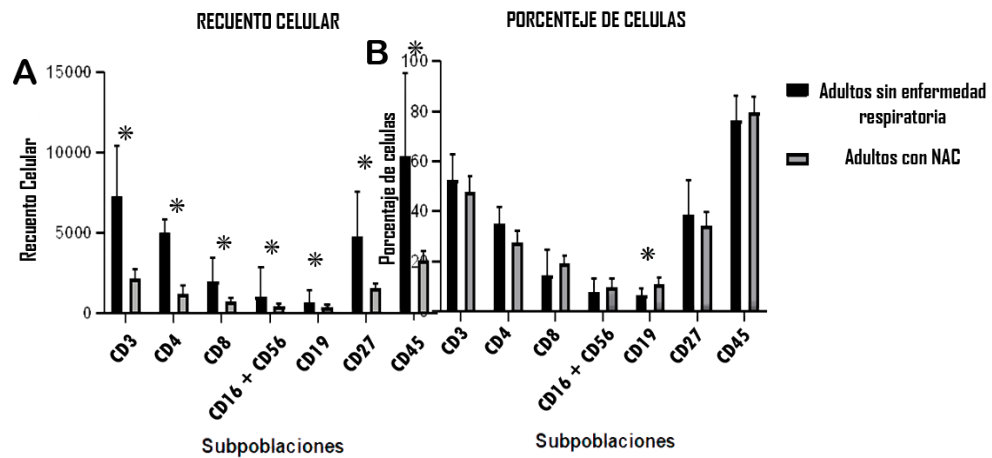
**Tabla 5:** Características demográficas y clínicas de 63 adultos con NAC categorizados por CURB-65.

Variables		CURB-65			p
		Grave n (%)	No Grave n (%)	Total N (%)	
Edad	18 - 64 años	2(3,2)	15(24,2)	17(27,4)	0,0656
	≥65 años	29(46,8)	16(25,8)	45(72,6)	
	Total	31(50,0)	31(50,0)	62(100)	
Género	Hombre	16(25,8)	16(27,9)	32(51,6)	0,396
	Mujer	15(24,2)	15(24,2)	30(48,4)	
	Total	31(50,0)	31(50,0)	62(100)	
Comorbilidades (EPOC, HTA y diabetes)	Sin comorbilidades	12(19,4)	16(25,6)	28(45,2)	0,24
	Con comorbilidades	19(30,6)	15(24,2)	34(54,8)	
	EPOC	9(14,5)	5(8,1)	14(22,6)	
	HTA	8(12,9)	12(19,4)	20(32,3)	
	Diabetes	9(14,5)	6(9,7)	15(24,2)	
	Total	31(50,0)	31(50,0)	62(100)	

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial.

**Tabla 6:** Recuentos de subpoblaciones linfocitarias en sangre de 22 adultos sin enfermedad respiratoria y 63 enfermos con NAC determinados por citometría de flujo.

Subpoblaciones	Enfermos sin enfermedad respiratoria		Enfermos NAC Medianas		P	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango		
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	7288	14505	2181	2131	<0,0001*
	Linfocitos T CD4	5063	11110	1255	9877	<0,0001*
	Linfocitos T CD8	2037	8043	764	4212	<0,0001*
	NK CD16+CD56	1047	3848	444	3100	0,0002*
	Linfocitos B CD19	104	25798	374	16947	0,0268*
	Linfocitos B CD27	4783	13171	1569	18924	<0,0001*
	Linfocitos Totales CD45	9792	20750	3314	20126	<0,0001*
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	52,6	68,4	47,9	72,3	0,3052
	Linfocitos T CD4	35,3	48,4	27,6	54,6	0,0963
	Linfocitos T CD8	14,7	28,1	19,3	47,0	0,1665
	NK CD16+CD56	7,8	23,8	9,8	36,0	0,2942
	Linfocitos B CD19	6,5	11,6	10,8	78,5	0,0004*
	Linfocitos B CD27	38,6	55,2	34,4	88,2	0,4884
	Linfocitos Totales CD45	76,6	89,5	79,8	79,3	0,7708



**Figura 3:** Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias de adultos con NAC y adultos sin enfermedad respiratoria: A) Recuento de células; B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido a 22 adultos sin enfermedad respiratoria y 63 Adultos con NAC y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con *t* de Student (p); \* p<0,05.

### **5.3.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias entre adultos con NAC grave y no grave**

Las medianas, proporciones y rangos de los recuentos de las subpoblaciones linfocitarias de los enfermos con NAC clasificados en graves y no graves según el índice PSI se muestran en la **Tabla 7** y según CURB-65 en la **Tabla 8**. En CURB-65 se observó una disminución significativa en los porcentajes de LTCD4 (24,1% vs 32,5%;  $P=0,0025$ ), LBCD27 (29,0% vs 39,7%;  $P=0,0051$ ) y linfocitos totales CD45 (67,1% vs 84,4%;  $P=0,0050$ ). En 15 pacientes la clasificación por los índices fue discordante, dentro de los cuales 12 pacientes clasificados como grave y 3 pacientes no grave por la escala de PSI fueron considerados no grave y grave en CURB-65, respectivamente (**Figura 4**).

### **5.5.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias de edad, género y presencia de comorbilidades en pacientes con NAC**

Adicionalmente se compararon las subpoblaciones linfocitarias de acuerdo a otras variables que pudieran afectar a las células, tal como edad, género y presencia de comorbilidades, descritas en las **tablas 9, 10, 11, 12 y 13** y **figuras 5, 6 y 7**. Se evaluaron distintos grupos etarios (mayores y menores de 50, 65 y 70 años). Entre los 53 pacientes mayores de 50 años y los 10 bajo esta edad, el porcentaje de CD27 fue menor en los mayores de 50 años (48,50% vs 32,60%;  $P=0,0109$ ) (**Tabla 10**). En el caso de los 18 adultos mayores en comparación a los 45 menores de 65 años (**Tabla 9**) se encontraron proporciones significativamente menores de LT CD3 (55,5% vs 44,4%;  $P=0,0304$ ), LT CD4 (33,75% vs 25,60%;  $P=0,0072$ ) y LB CD27 (43,80% vs 30,70%;  $P=0,0029$ ) esta fue menor en adultos mayores a 65 años (**Figura 5**). Por último, entre los 26 adultos menores a 70 años respecto a los 28 mayores de 70 años (43,00% vs 29,60%;  $P=0,0012$ ), los que también tuvieron un menor porcentaje de CD4 (32,40% vs 25,45%;  $P=0,0211$ ) (**Tabla 11**).

En el caso del género, se encontró una disminución significativa en el porcentaje de LTCD4 (30,70% vs 21,85%) y LB CD27 (38,90% vs 27,75%) en mujeres con respecto a hombres (**Tabla 12**) (**Figura 6**). Respecto a comorbilidades, se analizaron

**Tabla 7:** Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 38 adultos con NAC grave y 25 no grave según escala pronóstica PSI.

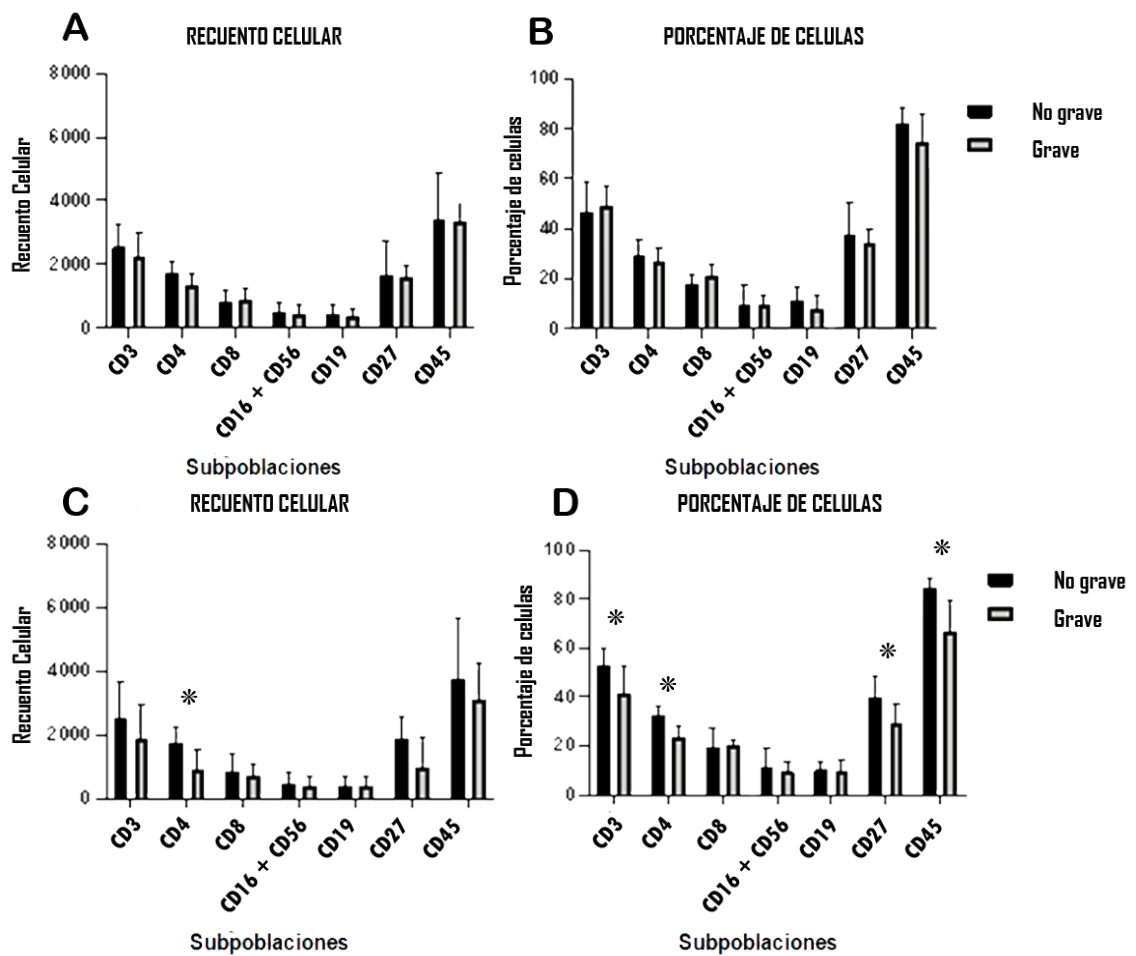
	Subpoblaciones	18 - 64 años		≥ a 65 años		P
		Mediana	Rango	Mediana	Rango	
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	1906	9264	2550	11883	0,1606
	Linfocitos T CD4	1003	5732	1725	9834	0,0468
	Linfocitos T CD8	713	3423	873	4239	0,3757
	NK CD16+CD56	394	2356	466	3016	0,5073
	Linfocitos B CD19	366	3473	383	16902	0,4537
	Linfocitos B CD27	993	6361	1870	18749	0,0514
	Linfocitos Totales CD45	3139	14465	3773	1252	0,148
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	41,3	57,8	52,6	64,6	0,0102
	Linfocitos T CD4	24,1	37,2	32,5	53,2	0,0025*
	Linfocitos T CD8	20,4	47	19,4	36	0,8946
	NK CD16+CD56	10,1	35,3	11,2	31,7	0,3954
	Linfocitos B CD19	9,4	49,7	10,3	75,9	0,6544
	Linfocitos B CD27	29,0	68,3	39,7	88,2	0,0051*
	Linfocitos Totales CD45	67,1	74,8	84,4	50,7	0,0050*

t test \* P<0,05.

**Tabla 8:** Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 31 adultos con NAC grave y 30 no grave según escala pronóstica CURB-65.

	Subpoblaciones	18 - 64 años		≥ a 65 años		P
		Mediana	Rango	Mediana	Rango	
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	2242	9264	2539	11883	0,8507
	Linfocitos T CD4	1337	5732	1725	9834	0,6807
	Linfocitos T CD8	863	4212	781	2810	0,5231
	NK CD16+CD56	420	2356	488	3041	0,7458
	Linfocitos B CD19	339	3473	412	16939	0,3961
	Linfocitos B CD27	1619	6361	1667	18749	0,6228
	Linfocitos Totales CD45	3337	14465	3438	19890	0,7857
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	49,4	72,3	46,8	57,4	0,7326
	Linfocitos T CD4	27,1	50,5	29,4	53,2	0,4281
	Linfocitos T CD8	21,6	47,0	17,8	27,0	0,1203
	NK CD16+CD56	10,1	27,4	9,7	36,0	0,5186
	Linfocitos B CD19	8,4	27,8	11,2	74,6	0,0796
	Linfocitos B CD27	34,4	68,3	37,3	88,2	0,2301
	Linfocitos Totales CD45	75,1	74,8	82,1	69,7	0,3694





**Figura 4:** Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias de adultos con NAC grave y no grave según escalas PSI y CURB-65 A) Recuento de células y B) Porcentaje de células en pacientes clasificados por PSI; C) Recuento y D) porcentaje de células en pacientes clasificados por CURB-65. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido en 38 graves y 25 no graves según la escala PSI y 30 graves y 31 no graves según CURB-65, las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con *t* de Student (p); \* p<0,05.

**Tabla 9:** Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 18 adultos con NAC menores de 65 años y 45 adultos con NAC mayores de 65 años.

	Subpoblaciones	18 - 64 años		≥ a 65 años		P
		Mediana	Rangos	Mediana	Rangos	
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	2641	11859	1936	8086	0,2863
	Linfocitos T CD4	1741	9834	1116	3712	0,16047
	Linfocitos T CD8	892	3322	810	4239	0,5537
	NK CD16+CD56	456	2868	161	3100	0,7373
	Linfocitos B CD19	398	3315	364	24819	0,4617
	Linfocitos B CD27	1876	11794	1237	23820	0,0953
	Linfocitos Totales CD45	3757	15695	3139	26972	0,385
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	55,5	51,7	44,4	76,1	0,0304*
	Linfocitos T CD4	33,8	53,2	25,6	52,0	0,0072*
	Linfocitos T CD8	20,6	24,2	19,4	47,8	0,7034
	NK CD16+CD56	8,2	25,7	11,2	35,3	0,569
	Linfocitos B CD19	10,3	23,3	10,3	85,2	0,569
	Linfocitos B CD27	45,8	57,8	30,7	88,2	0,0029*
	Linfocitos Totales CD45	82,9	49,9	72,3	79,3	0,937

t test \* P<0,05.

**Tabla 10:** Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 10 adultos con NAC menores de 50 años y 53 adultos con NAC mayores de 50 años.

	Subpoblaciones	18 - 49 años		≥ a 50 años		P
		Mediana	Rangos	Mediana	Rangos	
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	2908	11859	1936	8086	0,5590
	Linfocitos T CD4	1741	9834	1116	3712	0,5716
	Linfocitos T CD8	892	3322	810	4239	0,4105
	NK CD16+CD56	456	2868	161	3100	0,3648
	Linfocitos B CD19	398	3315	364	24819	0,8716
	Linfocitos B CD27	1876	11794	1237	23820	0,2665
	Linfocitos Totales CD45	3757	15695	3139	26972	0,6232
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	55,5	51,7	44,4	76,1	0,1365
	Linfocitos T CD4	33,8	53,2	25,6	52	0,2060
	Linfocitos T CD8	20,6	24,2	19,4	47,8	0,2863
	NK CD16+CD56	8,2	25,7	11,2	35,3	0,5313
	Linfocitos B CD19	10,3	23,3	10,3	85,2	0,7151
	Linfocitos B CD27	45,8	57,8	30,7	88,2	0,0109
	Linfocitos Totales CD45	82,9	49,9	72,3	79,3	0,3647

**Tabla 11:** Subpoblaciones linfocitarias en sangre de: 26 adultos con NAC menores de 70 años y 37 adultos con NAC mayores de 70 años.

	Subpoblaciones	Hombres		Mujeres		P
		Mediana	Rango	Mediana	Rango	
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	2350	9264	1851	12031	0,7901
	Linfocitos T CD4	1651	5706	1113	9877	0,2254
	Linfocitos T CD8	884	3423	725	4239	0,541
	NK CD16+CD56	466	1962	454	3100	0,6946
	Linfocitos B CD19	364	24774	395	2318	0,4923
	Linfocitos B CD27	1841	23719	1060	11969	0,1058
	Linfocitos Totales CD45	3438	26528	3279	16203	0,6278
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	47,5	46,7	46,4	75,5	0,5801
	Linfocitos T CD4	30,7	69,7	21,9	53,2	0,0363*
	Linfocitos T CD8	20,0	21,4	19,8	47,0	0,8511
	NK CD16+CD56	9,9	29,1	10,0	35,5	0,8085
	Linfocitos B CD19	11,4	82,5	9,1	49,6	0,6014
	Linfocitos B CD27	38,9	82,1	27,8	69,2	0,0048*
	Linfocitos Totales CD45	81,5	66,7	75,1	79,3	0,5731

t test \* P<0,05.

**Tabla 12:** Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 31 hombres y 32 mujeres con NAC.

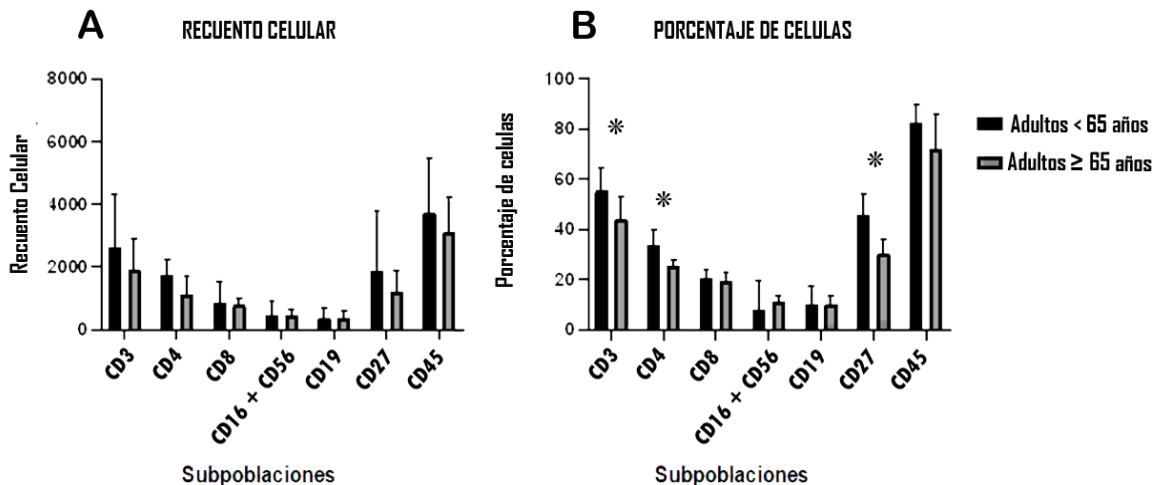
	Subpoblaciones	18 - 69 años		≥ a 70 años		P
		Mediana	Rangos	Mediana	Rangos	
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	2545	12131	1906	7986	0,2615
	Linfocitos T CD4	1746	9851	1099	3718	0,0813
	Linfocitos T CD8	764	3423	821	4239	0,8467
	NK CD16+CD56	477	2868	421	3100	0,7939
	Linfocitos B CD19	423	16789	336	24819	0,0783
	Linfocitos B CD27	1876	18823	1178	23820	0,0795
	Linfocitos Totales CD45	3757	19682	3139	26972	0,0807
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	53,4	65,1	43,4	76,1	0,1463
	Linfocitos T CD4	32,4	54,6	25,5	52,0	0,0211*
	Linfocitos T CD8	19,0	28,5	20,1	47,8	0,0935
	NK CD16+CD56	9,8	25,7	9,9	37,0	0,9973
	Linfocitos B CD19	12,6	75,6	8,1	85,2	0,0715
	Linfocitos B CD27	43,0	82,1	29,6	70,2	0,0012*
	Linfocitos Totales CD45	82,9	66,7	72,8	79,3	0,0807

t test \* P<0,05.

las reportadas con mayor frecuencia en los pacientes estudiados, esto es: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), hipertensión arterial (HTA) y diabetes. Se detectaron menores porcentajes de linfocitos totales CD45 en pacientes que poseen una o más de estas comorbilidades (86,45% vs 73,30%;  $P=0,0112$ ) (Tabla 13) (Figura 7).

### 5.6.-Comparación de los recuentos y proporciones de las subpoblaciones linfocitarias de pacientes con NAC fallecidos y/o ingresados a UCI

Dentro de los pacientes con NAC se hizo una comparación de los fallecidos y/o ingresados en UCI (considerando éstos como pacientes graves) con pacientes no graves. Dado que los pacientes en ambos casos son acotados, se decidió utilizar los dos parámetros juntos, donde se encontró únicamente una disminución significativa en linfocitos B CD19 en los pacientes ingresados y/o fallecidos (299 vs 433 células/ $\mu$ l;  $p=0,0388$ ) (Figura 8).



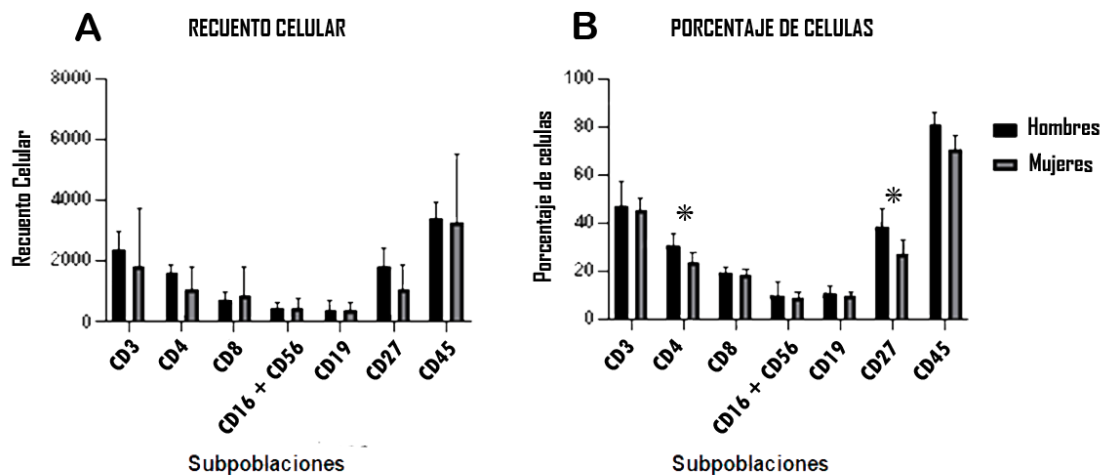
**Figura 5:** Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias entre adultos con NAC mayores o iguales a 65 años y menores de 65: (A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 45 adultos mayores o iguales a 65 años sin enfermedad respiratoria y 18 adultos con NAC y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con *t* de Student (*p*); \*  $p < 0,05$ .

**Tabla 13:** Subpoblaciones linfocitarias en sangre de 28 adultos con NAC sin comorbilidades y 35 adultos con comorbilidades.

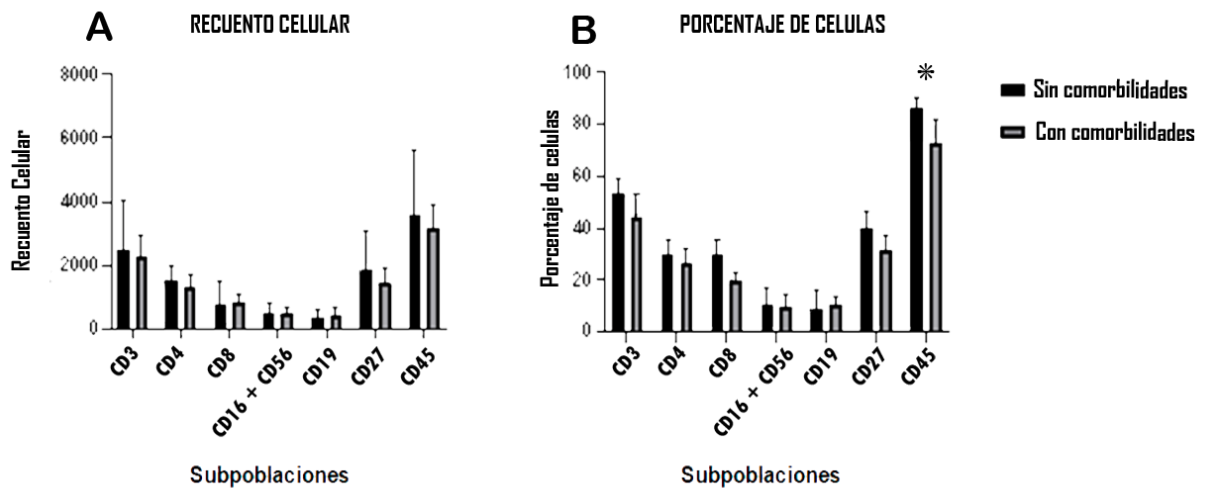
	Subpoblaciones	Sin comorbilidades		Con comorbilidades**		P
		Mediana	Rango	Mediana	Rango	
<b>Recuentos (x10<sup>9</sup>/μL)</b>	Linfocitos T CD3	2452	12131	2241	7864	0,6355
	Linfocitos T CD4	1534	9877	1332	5061	0,7994
	Linfocitos T CD8	764	4239	831	2759	0,6727
	NK CD16+CD56	456	2874	464	3100	0,7652
	Linfocitos B CD19	374	24819	399	2078	0,6727
	Linfocitos B CD27	1852	23820	1448	3139	0,4557
	Linfocitos Totales CD45	3561	26972	3139	9851	0,6355
<b>Porcentaje</b>	Linfocitos T CD3	53,4	75,5	44,4	69,5	0,1044
	Linfocitos T CD4	30,3	56,1	26,8	40,5	0,5802
	Linfocitos T CD8	20,3	47,8	19,4	37,5	0,8556
	NK CD16+CD56	10,8	29,5	9,6	36	0,6331
	Linfocitos B CD19	9,2	82,6	10,7	49,6	0,5708
	Linfocitos B CD27	39,7	88,2	31,5	57,1	0,0771
	Linfocitos Totales CD45	86,5	66,7	73,3	79,3	0,0112*

\*\* Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; hipertensión arterial o diabetes mellitus.

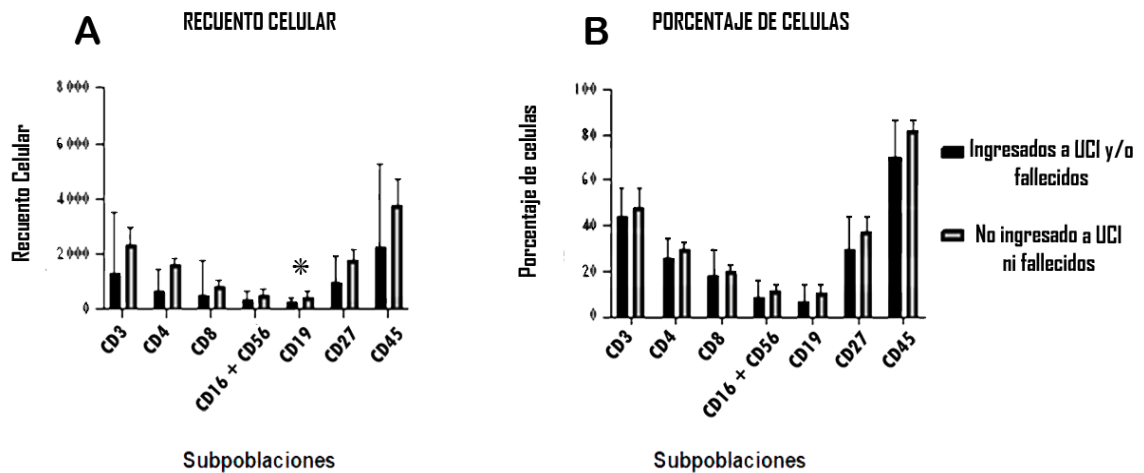
t test\* P<0,05.



**Figura 6:** Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias entre hombres y mujeres con NAC: (A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 32 hombres y 30 mujeres con NAC y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con *t* de Student (p); \* p<0,05.



**Figura 7:** Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias de adultos con NAC con y sin comorbilidades; (A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 28 adultos con comorbilidad y 35 sin comorbilidades y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con *t* de Student (*p*); \* *p*<0,05.



**Figura 8:** Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en adultos con NAC fallecidos y/o ingresados a UCI:(A) Recuento de células y (B) Porcentaje de células. Los valores mostrados en los gráficos corresponden al promedio obtenido de 8 adultos fallecidos y/o ingresados y 55 no ingresados y las barras de error corresponden a la SD. Valores analizados con *t* de Student (*p*); \* *p*<0,05.

## 6.-Discusión

La NAC representa un gran problema en la sociedad actual, con una alta mortalidad. La gravedad de esta enfermedad no dependería del agente infeccioso, sino de algún otro factor como es la RI del hospedero. Por este motivo, en esta memoria de título se estudió la RI celular en adultos con NAC como una posible variable que influye en la gravedad. Los resultados obtenidos mostraron que adultos con NAC presentan una disminución en sus subpoblaciones linfocitarias en comparación a adultos sin enfermedad respiratoria (**Figura 3**), lo cual es contradictorio a lo esperado en un proceso de infección tal como es la neumonía, sugiriendo que una menor RI podría favorecer el desarrollo de la enfermedad. Esto concuerda con lo publicado por Russell y col. 2019, quienes detectaron una disminución de la proporción linfocito-monocitos (LMR) en pacientes con infección respiratoria respecto a adultos asintomáticos, especialmente en enfermos con influenza. También está en concordancia con la disminución de los linfocitos observada en estudios anteriores realizados por el Laboratorio de Virus Respiratorios del Programa de Virología de la Universidad de Chile en adultos con NAC.

En el caso del estudio de la gravedad bajo las escalas pronóstica, se puede proponer la menor proporción de linfocitos en los pacientes como un biomarcador de gravedad para la NAC, ya que en CURB-65 se detectó una disminución del porcentaje de linfocitos totales (CD45), linfocitos T (CD3), linfocitos T auxiliares (CD4), linfocitos B maduros (CD27) y el recuento celular de linfocitos T CD4 en enfermos graves (**Figura 4**), lo cual se tendrá que estudiar con mayor profundidad.

La disminución significativa de los linfocitos B en pacientes graves respecto a los no graves en base a la escala CURB-65, específicamente de LB maduros CD27, podría reflejar la importancia de la respuesta inmune humoral en la evolución de la NAC en el adulto, porque falencias en los LB activados generarían menor cantidad de Ig para combatir la enfermedad. Esto estaría en concordancia con la mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias que presentan los pacientes con inmunodeficiencias de Igs (Hamad Medical Corporation, 2019).

Pese a lo anterior, no se observó ninguna disminución estadísticamente significativa en grave y no grave en base a la escala PSI, lo que no concuerda con la disminución significativa en los recuentos y porcentajes de LT y NK en 70 adultos con NAC graves respecto a 33 no graves detectada por citometría de flujo previamente en el Laboratorio de Virología. La discrepancia en los resultados puede deberse al tamaño muestral utilizado en ambos estudios, habiendo una diferencia notable entre pacientes graves y no graves.

Las diferencias en los resultados obtenidos según la escala utilizada para clasificar a los pacientes pueden deberse a las características que éstas consideran al momento de evaluar la gravedad de los pacientes, especialmente en parámetros que tienen relación directa con las subpoblaciones linfocitarias, como la edad, que tiene un gran impacto tanto en CURB65 como en la RI. La disminución de los linfocitos en adultos mayores es causada posiblemente por la senescencia de las células inmunes o una disminución de éstas con el progresar del tiempo, especialmente LB CD27, que investigaciones realizadas por el grupo de Shi (Shi y col. 2005) determinaron que LB maduro CD27, (particularmente linfocitos B de memoria IgD+IgM+CD27+) presentan una disminución en adulto mayor, lo cual podría tener una influencia en su inmunidad humoral. Cabe señalar que, a excepción de linfocitos totales, son las mismas subpoblaciones que presentan una baja de porcentajes en pacientes graves en CURB-65, lo que coincide porque la edad sobre 65 años es una variable de gran influencia en la clasificación de esta escala, demostrando que este factor se asocia a la gravedad del cuadro clínico en el adulto con NAC. Cabe destacar que entre los 3 umbrales de edad analizados (60, 65 y 70 años) el porcentaje de linfocitos B CD27 es el único parámetro que muestra diferencia significativa en los adultos mayores.

La escala PSI le resta 10 puntos de edad a las mujeres, por lo que podrían tener un riesgo de ser mal categorizadas, como ocurre en 4 casos de este estudio, los que fueron clasificados como no graves por PSI y graves por CURB-65, (3 son mayores de 75 años), también hubo 11 casos graves en PSI los cuales fueron clasificados como no graves por CURB-65 (7 son hombres y 4 son mujeres mayores de 60 años). En los



datos obtenidos se observa una diferencia en LT CD4 y LB CD27, siendo estos menores en mujeres que en hombres, por lo que el género podría ser un factor que influye en los resultados.

La significativa disminución de linfocitos en los pacientes con comorbilidades respecto a los que no tienen sugiere que la presencia de ciertas enfermedades de base impacta en la población linfocitaria y, por ende, en la defensa de la infección, por lo que el padecimiento de una comorbilidad podría afectar en la gravedad de la enfermedad, lo cual es un aspecto que no considera CURB-65 al momento de clasificar, generando posibles falencias en la clasificación de los grupos. También se ha visto otras comorbilidades y factores externos como la Diabetes tipo 2 la cual está asociada a un incremento en el riesgos de padecer NAC o el tabaquismo, alcoholismo y trabajos que están expuesto a sustancias toxicas que son factores que se podrían considerar para el agravamiento de la NAC (Brunetti y col., 2021)(Pessoa y col., 2020), a su vez se ha visto que los pacientes infectados con el nuevo coronavirus surgido el 2019 induce una NAC linfopenica, con una presente desregulación inmunológica agravando la enfermedad. (Bermejo-Martin y col., 2020)

En este estudio se observó una disminución de los linfocitos B CD19 en los pacientes ingresados a UCI y fallecidos, siendo este un posible biomarcador para poder determinar la gravedad de la NAC más objetivo que los parámetros utilizados en Chile, los cuales presentan una diferencia en los fallecidos y/o ingresados a UCI con la gravedad en los pacientes. Una menor cantidad de linfocitos B vírgenes se reflejaría en una defensa inmune ineficiente frente al patógeno, donde no se generarían suficientes Ig para combatir al agente infeccioso, facilitando el agravamiento de la enfermedad.

En todos los casos llama la atención que las diferencias sean significativas al analizar las proporciones, pero no al comparar los recuentos, lo que podría explicarse por una redistribución de los linfocitos, un aumento de otras subpoblaciones no estudiadas

como linfocitos T reguladores y/o por un incremento en monocitos, manteniendo el recuento y alterando la proporción de éstos.

## 7.-Conclusiones

- Las subpoblaciones de linfocitos totales, LT CD3, CD4 y CD8, LB CD19 y CD27 y NK están disminuidas en adultos con NAC respecto a adultos sin enfermedad respiratoria, lo que podría estar favoreciendo el desarrollo de la enfermedad.
- La disminución de las subpoblaciones de linfocitos totales CD45, LB CD27 y LT CD3 y CD4 favorecerían el desarrollo de una NAC grave en adultos, dados los menores porcentajes de ellas en adultos graves respecto a los no graves en base a la clasificación por CURB-65.
- La escala pronóstica utilizada para clasificar a los pacientes por gravedad es relevante en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias en adultos con NAC, debido a los resultados discordantes entre ellas.
- El desarrollo de una NAC grave está asociada a la disminución de las subpoblaciones de LB CD27 y LT CD3 y CD4 en adultos mayores de 65 años.
- La respuesta inmune celular adaptativa difiere dependiendo del sexo, detectándose menores proporciones de LB vírgenes y LT CD4 en mujeres.
- Las comorbilidades como HTA, diabetes y/o EPOC afectan la respuesta inmune y disminuyen los recuentos de linfocitos totales en pacientes con estas enfermedades, lo que puede influir en el desarrollo de la NAC.
- Los LB CD19 están disminuidos en los adultos graves (fallecidos y/o ingresados a UCI), por lo que se propone su estudio como biomarcador de gravedad en adultos con NAC.

## **8.-Proyecciones**

Las escalas pronósticas PSI y CURB-65 son utilizadas en Chile y otros países para determinar la gravedad de los pacientes de NAC, pero según lo visto en este trabajo poseen carencias que afectaría su evaluación. Grupos como el del Ding-Yun Feng y el de Ferrez Cury han integrado la relación de neutrófilos-linfocitos junto a la escala pronostica de CURB-65, logrando una mejor predicción de mortalidad. Considerando todo lo anterior, se propone actualizar las escalas pronósticas PSI y CURB-65 reevaluando las puntuaciones dadas relacionando estas con la disminución de las subpoblaciones y agregando la disminución de CD19 como un factor de gravedad (Ferrez y col., 2021) (Feng y col., 2021).

## 9.-Referencias

- Abbas, Lichtman, Pillai. 2012. Células y Tejidos del Sistema Inmune En *Inmunología celular y molecular*, 7<sup>ta</sup> edición. pp.29-31, Elsevier, España.
- Agematsu, K. 2000. Memory B cells and CD2. *Histology and Histopathology*. 15, 573-576. <http://doi.org/10.14670/HH-15.573>
- Bantar, C., Curcio, D., Jasovich, A., Bagnulo, H., Arango, Á., Bavestrello, L., Famiglietti, A., García, P., Lopardo, G., Losanovsky, M., Martínez, E., Pedreira, W., Piñeyro, L., Remolif, C., Rossi, F., Varón, Y. F. 2010. Updated acute community-acquired pneumonia in adults: Guidelines for initial antimicrobial therapy based on local evidence from the South American Working Group (ConsenSur II). *Revista Chilena de Infectología*, 27(SUPPL. 1), 9–38.
- Bermejo-Martin, J. F., Almansa, R., Menéndez, R., Mendez, R., Kelvin, D. J., & Torres, A. 2020. Lymphopenic community acquired pneumonia as signature of severe COVID-19 infection. *The Journal of infection*, 80(5), e23–e24. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.029>.
- Brunetti, V. C., Ayele, H. T., Yu, O., Ernst, P., & Fillion, K. B. 2021. Type 2 diabetes mellitus and risk of community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *CMAJ open*, 9(1), E62–E70. <https://doi.org/10.9778/cmajo.20200013>.
- Carpio-Deheza, G. & Céspedes-Vargas, J. 2013. Neumonía adquirida en la comunidad: estudio inicial de la validación de una escala pronóstica para su empleo en emergencias del Hospital Clínico. *Revista Médico-Científica "Luz y Vida"*, 4(1): pp.17-23.
- Cerwenka A. & Lanier L. 2016. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 16(2): pp.112-123.
- Dandachi, D., & Rodriguez-Barredas, MC. 2018. Viral pneumonia: etiologies and treatment. *Journal of Investigative Medicine*. 66: pp. 957-965.
- Departamento de estadística e información de salud (DEIS). 2014. Mortalidad por causas, según sexo. Chile 2010-2011.

- Díaz A., Labarca J., Pérez C., Ruiz M., & Wolff M. 2005. Tratamiento de la neumonía del adulto adquirida en la comunidad. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 21(2), 117–131.
- Feng, D. Y., Zou, X. L., Zhou, Y. Q., Wu, W. B., Yang, H. L., & Zhang, T. T. 2021. Combined Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and CURB-65 Score as an Accurate Predictor of Mortality for Community-Acquired Pneumonia in the Elderly. *International journal of general medicine*, 14, 1133–1139. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S300776>
- Ferraz V., Quadros L., Kranz P., Vendramini W., Voss de Cunha S., Cristianetti G., Emerim E., Seligman R., 2021, Developing the Pneumonia-Optimized Ratio for Community-acquired pneumonia: An easy, inexpensive and accurate prognostic biomarker. *PLOS ONE*, [online] Available at: <https://support.microsoft.com/es-es/office/conservar-el-texto-unido-af94e5b8-3a5a-4cb0-9c53-dea56b43d96d> [Accessed 29 August 2021]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248897>.
- García-Ordoñez, M., García-Jiménez, J., Páez F., Álvarez F., Poyato B., Franquelo M., Colmenero J., & Juárez C. 2001. Clinical Aspect and Pronostic Factors in Elderly Patients Hospitalised for Community-Acquired Pneumonia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20: pp. 14-19.
- Gutierrez, F., Masia, M., Rodriguez, J. C., Ayelo, A., Soldan, B., Cebrian, L., & Hidalgo, A. 2003. Evaluation of the Immunochromatographic Binax NOW Assay for Detection of Streptococcus pneumonia Urinary Antigen in a Prospective Study of Community-Acquired Pneumonia in Spain. *Clinical Infectious Diseases*, 36(3): pp. 286–292.
- Hamad Medical Corporation. 2019. Antibody Deficiencies. [online] Available at: <https://www.hamad.qa/EN/your%20health/allergy-and-immunology/immunodeficiency/primary-immunodeficiency/Pages/antibody-deficiencies.aspx> [Accessed 9 december 2019].
- Höltermann, W., Krämer, M., Geppert, P., van Wickern, M. & Lukasewitch P. 1998. Epidemiology, clinical aspects and prognosis of severe progressive community-acquired pneumonia. *Pneumologie*, 52(5):, pp. 263-270.

- Jiménez, P. 2004. Reglas de predicción en neumonía adquirida en la comunidad. *Revista Médica de Chile*, 132(9): pp. 1027-1030.
- Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. 2015. Memory B cells. *Nature Review Immunology*, 15: pp.149-159.
- Luchsinger, V., Ruiz, M., Zunino, E., Martínez, MA., Machado, C., Piedra, PA., Fasce, R., Ulloa, MT., Fink, MC., Lara P., Gebauer, M., Chávez, F., & Avendaño, LF. 2013. Community-acquired pneumonia in Santiago, Chile: The clinical relevance in the detection of viruses and atypical bacteria. *Thorax*, 68: pp. 1000–1006.
- Luchsinger, V., Prades, Y., Ruiz, M., Pizarro, R., Rossi, P., Lizama, L., Garmendia, M., Meza, A., Larrañaga C. & Avendaño, L. 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): pp. 1173-1179.
- Mandell, L., Wunderink, R., Anzueto, A., Bartlett, J., Campbell, G., Dean, N., Dowell, S., File, T., Musher, D., Niederman, M., Torres, A. & Whitney, C. 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): pp. S27-S72.
- Marcos, MA., Esperatti, M., & Torres, A. 2009. Viral pneumonia. *Current Opinion in Infectious Disease*. 22: pp. 143–147.
- Méndez, R., Menéndez, R., Amara-Elori, I., Feced, L., Piró, A., Ramírez, P., Sempere, A., Ortega, A., Bermejo-Martín, J., Torres, A. 2019. Lymphopenic community-acquired pneumonia is associated with a dysregulated immune response and increased severity and mortality. *Journal of Infection*, 78(6), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.04.006>
- Ministerio de Salud. 2011. Neumonía Adquirida en la Comunidad en Adultos de 65 años y más. Santiago, Chile. Series de Guías Clínicas MINSAL.
- Nolten, F. 2018. Molecular Diagnostics for Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 47: pp. S123-126.

- Pennock, N., White, J., Cross, E., Cheney, E., Tamburini, B. & Kedl, R. 2013. T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*, 37(4): pp.273-283.
- Pessoa, E., Bárbara, C., Viegas, L., Costa, A., Rosa, M., & Nogueira, P. 2020. Factors associated with in-hospital mortality from community-acquired pneumonia in Portugal: 2000-2014. *BMC pulmonary medicine*, 20(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-1045-x>
- Riquelme, R., Riquelme, O., Rioseco, ML., Gómez, V., Gil, R. & Torres, A. 2006. Etiología y factores pronósticos de la neumonía adquirida en la comunidad en el adulto hospitalizado, Puerto Montt, Chile. *Revista Médica de Chile*. 134: pp. 597-605.
- Russell, C. D., Parajuli, A., Gale, H. J., Bulteel, N. S., Schuetz, P., de Jager, C. P. C., ... Baillie, J. K. 2019. The utility of peripheral blood leucocyte ratios as biomarkers in infectious diseases: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 78(5), 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.02.006>
- Saldías, F., Farías, G., Villarroel, L., Valdivia, G., Mardónez, JM., & Díaz, A. 2004. Diseño de un índice pronóstico clínico para el manejo de la neumonía del adulto adquirida en la comunidad. *Revista Médica de Chile*, 132(9): pp. 1037-1046.
- Shi, Y., Yamazaki, T., Okubo, Y., Uehara, Y., Sugane, K., & Agematsu, K. 2005. Regulation of Aged Humoral Immune Defense against Pneumococcal Bacteria by IgM Memory B Cell. *The Journal of Immunology*, 175(5), 3262–3267. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3262>
- Skerrett, S. 1999. Diagnostic testing for community-acquired pneumonia. *Clinics in Chest Medicine*, 20(3): pp. 531-548.
- Suen, W., Lee, W., Leung, K., Pan, X. & Li, G. 2018. Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy: A Review on 10 Years Completed Clinical Trials. *Cancer Investigation*, DOI: 10.1080/07357907.2018.1515315.
- Van Acker, H., Capsomidis, A., Smits, E., & Van Tendeloo, V. 2017. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?. *Frontiers in immunology*, 8: pp. 892. doi:10.3389/fimmu.2017.00892



- World Health Organization. (WHO). 2016. Neumonía. [online] Available at: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia> [Accessed 13 May 2018].
- Yoshikawa, T., & Marrie, T., 2000. Community-Acquired Pneumonia in the Elderly. *Clinical Infectious Diseases*, 31 (4): pp. 1066–1078, <https://doi.org/10.1086/318124>.
- Yu, V., & Stout, J. 2009. Rapid Diagnostic Testing for Community-Acquired Pneumonia. *Chest*, 136(6): pp. 1618–1621. doi:10.1378/chest.09-0939.