



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Polimorfismos de los genes *FER* y *FOXO3*. Papel en la susceptibilidad, gravedad y pronóstico de la neumonía adquirida en la comunidad

Facultad de Ciencias de la Salud

**Departamento de Ciencias Médicas y
Quirúrgicas**

José Manuel Valencia Gallardo

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

2016



Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a todas las personas que la han hecho posible. A todos los que me han apoyado, soportado y sufrido.

A mis padres quienes me dieron vida, educación, amor, apoyo y consejos.

A mis compañeros, a mis maestros y amigos, quienes sin su ayuda nunca hubiera podido hacer esta tesis. A todos ellos se los agradezco desde el fondo de mi alma. Para todos ellos hago esta dedicatoria.

A quienes me brindan día a día su amor, su cariño, su estímulo, comprensión y paciencia

Para vosotras, Maricarmen y Miriam.

Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de esta tesis doctoral, Dr. Felipe Rodríguez de Castro, Dr. Jordi Solé Violán y Dr. José Carlos Rodríguez Gallego por la dedicación y apoyo que han brindado a este trabajo. Un estudio de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas; de ellos es el mérito.

Asimismo, agradezco a todos mis compañeros del Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Gran Canaria D. Negrin; su apoyo personal, amistad, consejos y ánimos, especialmente al Dr. Carlos Cabrera, por su “soporte logístico” que tantos quebrantos me ha resuelto.

No puedo olvidarme de la sección de Genética y Biología Molecular del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de Gran Canaria D. Negrin; mis agradecimientos a Nereida y Yanira por su cordial recibimiento y generoso esfuerzo y a Marta por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, material facilitado y las sugerencias aportadas.

Gracias a la Dra. Estefanía Herrera a Miguel Ángel García Bello y Jesús María González “Josu”, sin cuyo saber y dominio estadístico no estaría acabado este trabajo. Tanto esfuerzo ha merecido la pena.



A mis padres, José Manuel y María del Carmen, quienes con su ejemplo de lucha constancia y honestidad permanentemente me alentaron, contribuyendo incondicionalmente a lograr mis metas y objetivos propuestos. Su recuerdo y cariño están siempre presentes. A mis hermanos, a tí Gabriel ejemplo de tenacidad y superación.

Pero, sobre todo, gracias a mi mujer, Maricarmen y a mis hija Miriam por su paciencia, comprensión con este proyecto y por el tiempo que me han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo.

A todos, GRACIAS.

Índice

INTRODUCCIÓN

1. Neumonía Adquirida en la Comunidad.....	3
1.1. Importancia de problema	4
1.2. Incidencia de la neumonía adquirida en la comunidad	5
1.3. Hospitalizaciones por neumonía adquirida en la comunidad	6
1.4. Mortalidad por neumonía adquirida en la comunidad.	8
1.5. Neumonía adquirida en la comunidad grave.	10
1.5.1. Definición.	
1.5.2. Modelos predictivos de riesgo.	
2. Predisposición genética a la infección	19
2.1. Inmunodeficiencias Primarias Convencionales.....	21
2.2. Predisposición Mendeliana a infecciones únicas.....	22
2.3. Predisposición multigénica a la infección.....	24
2.4. Genes involucrados en la susceptibilidad y gravedad de la neumonía.....	26
3. FER y FOXO3	
3.1. Proteínas FER.....	33
3.1.1. Antecedentes.	
3.1.2. FER e inmunidad innata.	
3.1.3. Polimorfismos del gen <i>FER</i> e implicaciones clínicas.	



3.2. Proteínas FOXO.....	42
3.2.1. Antecedentes.	
3.2.2. Factores de transcripción FOXOs e inmunidad innata.	
3.2.3. Polimorfismos del gen <i>FOXO</i> e implicaciones clínicas.	
HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1. Tipo y población estudio.....	59
6.1.1 Criterios de inclusión	
6.1.2 Criterios de exclusión	
6.1.3. Grupo Control	
6.2. Definiciones.....	61
6.3. Estudios microbiológicos.....	62
6.4. Recogida de datos	63
6.5. Estudio genético.....	66
6.5.1. Determinaciones genéticas.	
6.5.1.1. Extracción del ADN	
6.5.1.2. Selección de polimorfismos	
6.5.1.3. Técnicas de tipaje molecular de los SNPs de <i>FER</i> y <i>FOXO3</i>	
6.5.2. Herramientas para el análisis de datos	

RESULTADOS

7.1. Descripción de las poblaciones.....	75
7.1.1. Grupo control	
7.1.2. Grupo de neumonías	
7.2. Susceptibilidad.....	85
7.3. Complicaciones.....	86
7.3.1. Sepsis, sepsis grave y shock séptico	
7.3.2. Bacteriemia	
7.3.3. Síndrome del distrés respiratorio agudo	
7.3.4. Fracaso multiorgánico	
7.3.5. Insuficiencia renal aguda	
7.4. Mortalidad.....	89
DISCUSIÓN.	91
CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA	115

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*.

ATS: *American Thoracic Society*.

CID: Coagulación Intravascular Diseminada.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

FiO₂: Fracción Inspirada de Oxígeno.

FMO: Fracaso Multiorgánico.

IgG: Inmunoglobulina clase G.

IL: Interleucina.

LBA: Lavado Broncoalveolar.

LPS: Lipopolisacárido.

NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad.

Na: Sodio

OR: *Odds Ratio*.

p: Probabilidad.

PaO₂: Presión Parcial de Oxígeno.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PORT: *Pneumonia Patient Outcomes Research Team.*

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones.

PSI: *Pneumonia Severity Index.*

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SDRA: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

SNP: Polimorfismos de un Sólo Nucleótido.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1

TLR: Receptores Tipo "Toll".

ufc: Unidades Formadoras de Colonias.

UCI : Unidad de Cuidados Intensivos.

UMI: Unidad de Medicina Intensiva

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana



Introducción

1. NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

La neumonía es una inflamación del parénquima pulmonar debida a un agente infeccioso. La neumonía no es un proceso único, sino un grupo de infecciones causadas por distintos microorganismos y que afecta a diferentes tipos de personas, lo que condiciona una epidemiología, una patogenia, un cuadro clínico y un pronóstico diversos. Cuando afecta a la población general se denomina neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Se diferencia así de la que aparece en pacientes ingresados en un hospital o en personas que tienen otros factores de riesgo asociados a una mayor probabilidad de infección por agentes patógenos resistentes a los antimicrobianos (tabla 1.1).

-
- Hospitalización en los últimos tres meses durante 48 horas o más.
 - Hospitalización actual de más de cuatro días.
 - Diálisis crónica.
 - Residencia en asilos o centros asistenciales de cuidados mínimos.
 - Tratamiento intravenoso domiciliario en los últimos 30 días.
 - Atención domiciliaria por heridas u otros cuidados especializados de enfermería.
 - Convivencia con personas infectadas por patógenos multirresistentes.
 - Alta prevalencia de resistencia antimicrobiana en la comunidad o en la unidad asistencial.
 - Terapia antimicrobiana en los últimos tres meses.
 - Tratamiento o enfermedad inmunosupresora.
-

Tabla 1.1. Factores de riesgo asociados a infección por patógenos multirresistentes.

1.1 Importancia del problema

La NAC es una enfermedad respiratoria de gran relevancia por su alta prevalencia en la población general, por su variabilidad clínica y por su desigual gravedad. A pesar de los logros alcanzados en la prevención y en el diagnóstico de la NAC, del desarrollo y amplio uso de antibióticos y de los avances en el manejo de los cuidados intensivos, la NAC sigue siendo una causa importante de morbilidad, mortalidad y carga económica en todo el mundo.

La tasa de mortalidad en pacientes con NAC se redujo drásticamente por la introducción de los antibióticos en la década de 1950 aunque, desde entonces, ésta se ha mantenido relativamente estable. Es la principal causa de fallecimiento por enfermedad infecciosa en todo el mundo y la sexta causa de muerte en los países occidentales (2). La NAC no sólo tiene impacto en la mortalidad a corto plazo, sino que un año después del diagnóstico puede alcanzar una tasa del 40% en los pacientes que fueron hospitalizados por ese motivo (3). En los Estados Unidos de América, la mortalidad por neumonía y gripe como proceso combinado representó la octava causa de muerte en 2011 (4).

El conocimiento de los factores pronósticos asociados a la NAC es un aspecto de gran relevancia, tanto en el manejo clínico individual como en el desarrollo de estrategias de salud pública e investigación. Desde el punto de vista de la gestión de recursos, los estudios epidemiológicos ayudan a comprender la dimensión del problema y a modificar actitudes que permitan hacer más eficientes los servicios sanitarios. Valorar la dimensión de un problema de salud supone

analizar su incidencia, sus consecuencias y los recursos que emplea. Conocer, por tanto, los elevados costes que conlleva la NAC en términos de gasto sanitario, morbilidad y mortalidad, permite comprender que las medidas que se adopten para mejorar los recursos sanitarios destinados a su atención tendrán un enorme impacto.

1.2 Incidencia de la neumonía adquirida en la comunidad

Los estudios poblacionales prospectivos sitúan la incidencia anual de NAC entre el 5 y el 11% de la población adulta (5,6); sin embargo, la verdadera incidencia de la enfermedad es difícil de precisar dado que la mayoría de los datos epidemiológicos proceden de pacientes hospitalizados (7). Al no tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria, los estudios poblacionales son insuficientes y la información disponible sobre pacientes ambulatorios es limitada. En la mayoría de los casos, sin embargo, se trata de un proceso benigno estimándose que entre el 50% y 80% de todas las NAC en España son manejadas en régimen ambulatorio (8). Datos recientes de nuestro país, todavía no publicados, apuntan tasas de hospitalización por NAC cercanas al 90%.

En Europa, y en función del área geográfica analizada, se estima que la incidencia anual de NAC puede oscilar entre 1,7 y 11,6 casos por 1.000 habitantes, con mayor relevancia en varones y en los grupos de edad correspondientes a

ambos extremos de la vida (6,9-11). Diversos estudios sitúan la incidencia de la NAC en el Reino Unido entre 1 y 4,7 casos por 1.000 habitantes (12); en Alemania entre 3,7 y 10 casos por 1.000 habitantes (13), y en Finlandia en 11,6 casos por 1.000 habitantes y año (14).

En España, la incidencia anual de NAC varía entre 1,6 y 9 casos por 1.000 habitantes (7,15). Un reciente estudio de base poblacional realizado en el ámbito de la Atención Primaria analizó una cohorte retrospectiva (2003–2007) de sujetos con edades comprendidas entre 20 a 79 años. Los autores encontraron una tasa de incidencia anual de 2,7 casos por 1.000 personas y corroboraron una mayor frecuencia entre niños y ancianos, en varones y en los meses fríos del invierno y del otoño (15).

1.3. Hospitalizaciones por la neumonía adquirida en la comunidad

La proporción de hospitalizaciones por NAC es muy diferente entre los países europeos y oscilan entre el 20 y 50%. Se estima que en la Unión Europea hay cerca de un millón de hospitalizaciones al año por este motivo (9).

En el año 2005 se registraron 1,3 millones de hospitalizaciones por NAC en los Estados Unidos, lo que representaba alrededor de un tercio de todos los casos de la NAC de aquel país. Aproximadamente el 60% de los pacientes hospitalizados

eran mayores de 65 años (3).

En España, según datos del año 2011 del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI), se registró una tasa media de hospitalizaciones por NAC de 2,14 por 1.000 habitantes. Por comunidades autónomas, Canarias y Andalucía fueron las regiones con menores tasas (1,08 y 1,44 respectivamente) de hospitalización, mientras que entre las mayores se encontraron Asturias y Castilla-León (3,0 y 2,65 respectivamente) (16).

Las tasas de hospitalización, aunque son más accesibles que las tasas de incidencia, están influenciadas por factores poblacionales, -difícil acceso a los hospitales por dispersión de la población, por ejemplo-, o por particularidades locales en la organización de los servicios de salud (17,18), entre los que se podrían citar el mayor o menor hábito de remitir pacientes a hospitales desde Atención Primaria, entre otros (15). Aunque estas diferencias podrían influir en la disparidad de las tasas de hospitalización, las razones fundamentales para su tratamiento hospitalario son la gravedad de la NAC, la descompensación de enfermedades subyacentes y los problemas sociales (8). El número de ingresos también aumenta con la edad (1,29 por 1.000 en pacientes de 18 a 39 años frente al 13,21 por 1.000 en aquellos de 55 años o más) (17).

Entre el 10 y el 22% de las NAC hospitalizadas precisan ingreso en una Unidad de Medicina Intensiva (UMI) (11,17,19). En esta categoría, la tasa de complicaciones, estancia hospitalaria y mortalidad son elevadas, oscilando esta última entre el 21 y el 58%, según distintas series (19-22).

1.4. Mortalidad por la neumonía adquirida en la comunidad

La NAC es la causa más común de mortalidad y de discapacidad ajustada por años de vida entre todas las enfermedades respiratorias [más común que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)] y, entre las enfermedades infecciosas, es mayor que la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (18,23). La neumonía es todavía la principal causa de muerte en niños menores de cinco años en el mundo, con más de dos millones de fallecimientos al año (más que el VIH/SIDA, sarampión y malaria juntos).

En España, considerando los datos recogidos en los certificados médicos o los boletines estadísticos de defunción y proporcionados anualmente por el Instituto Nacional de Estadística (INE), el diagnóstico agrupado de neumonía y gripe fue la octava causa de muerte en el año 2012. En ese mismo año se produjeron en nuestro país un total de 9.454 fallecimientos por neumonía, con una tasa bruta de mortalidad de 20,5 muertes por 100.000 habitantes (tasa de mortalidad ajustada por edad 9,6 por 100.000 habitantes y una razón entre la tasa de mortalidad en hombres y en mujeres (probabilidad de morir ligada al sexo) de 1,81 (24).

En la Comunidad Canaria, datos oficiales del MSSSI del año 2011 muestran unas tasas crudas y ajustadas de mortalidad por neumonía y gripe (CIE-10: J10-18)



de 12,5 y 9,3 muertes por 100.000 habitantes, respectivamente. Canarias, junto al País Vasco (14/100.000), es la comunidad autónoma con menores tasas brutas de mortalidad, mientras que las mayores corresponden a Extremadura (32/100.000) y Cantabria (29/100.000). Es interesante señalar que no hay correlación entre el gasto sanitario autonómico *per cápita* y la morbi-mortalidad por neumonía (16,25).

La edad es un factor ligado a una mayor mortalidad (26-29), a una estancia hospitalaria más prolongada y a un mayor tiempo de recuperación tras sufrir una NAC (30). En algunos estudios, se ha demostrado que la edad es un factor pronóstico independiente de mortalidad en la NAC grave (21,31). En España, según datos de 2010, en los pacientes mayores de 65 años, la neumonía y la gripe fueron la quinta causa de mortalidad en los hospitales del Sistema Nacional de Salud, con 11,5 fallecimientos por cada 100 ingresos, y una probabilidad de fallecer ligada a la edad 4,45 veces mayor respecto a los menores de 65 años (32). Sin embargo, otros estudios no confirman esta asociación entre la edad y el pronóstico (33).

1.5 Neumonía adquirida en la comunidad grave.

1.5.1 Definición

No se dispone de una definición consensuada sobre cuando considerar que una NAC es grave. En general comprende dos subgrupos de pacientes: a) aquellos con NAC y shock séptico que requieren vasopresores, o con insuficiencia respiratoria aguda que precisan ventilación mecánica; y b) los que requieren cuidados de soporte o de enfermería especiales por el riesgo de complicaciones. La mayoría de estos enfermos ingresan en una UMI o en unidades de alta dependencia.

La revisión en un documento de consenso de IDSA/ATS (*Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society*) es suficientemente explícita sobre qué criterios mayores definen una NAC grave o el ingreso en una UMI. Los criterios menores son menos categóricos y, de un total de nueve, la presencia de tres o más se considera suficiente justificación para decidir su ingreso en una UMI o en unidades de alto nivel de monitorización (34) (tabla 1.2). Sin embargo, el ingreso en una UMI no parece reducir la mortalidad en aquellos enfermos que presenten cualquier combinación de criterios IDSA/ATS de gravedad menor (35).

Criterios Mayores

Necesidad de ventilación mecánica invasiva

Shock séptico que precise vasopresores

Criterios Menores

Frecuencia respiratoria $\geq 30/\text{min}$ $<36^{\circ}\text{C}$

$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 250$

Afectación radiológica multilobar

Confusión / desorientación

Uremia ($\text{BUN} \geq 20 \text{ mg/dl}$)

Leucopenia (recuento leucocitario $<4.000 \text{ cél/mm}^3$)

Trombocitopenia (recuento plaquetario $<100.000 \text{ cél/mm}^3$)

Hipotermia (temperatura central $<36^{\circ}\text{C}$)

Hipotensión que precise resucitación agresiva con fluidos

Tabla 1.2. Criterios ATS/IDSA de neumonía adquirida en la comunidad grave .

La NAC grave tampoco es una entidad homogénea ya que, aún con unos criterios aparentemente bien establecidos, incluye algunos aspectos que complican su definición: a) existe un grupo de pacientes que, procedentes de un ambiente extrahospitalario, presentan enfermedades de base que condicionan inmunodepresión grave y pueden verse afectados por neumonías causadas por patógenos oportunistas (tabla 1.1); b) el patrón etiológico de la neumonía que afecta al anciano residente en instituciones de larga estancia tiende a parecerse al de la neumonía nosocomial (tabla 1.1); c) existen ciertas infecciones pulmonares que, aunque se generan en la comunidad, no se consideran como NAC grave como es el caso de la tuberculosis.

Una serie de características, basadas en estudios epidemiológicos sobre la NAC, permiten identificar al enfermo con riesgo elevado de mortalidad según factores relacionados con el estado basal del paciente (edad y comorbilidades) y factores presentes en el momento del ingreso (parámetros clínicos, radiológicos y de laboratorio). No hay ningún factor de riesgo lo suficientemente preciso para predecir una evolución desfavorable (tabla 1.3).

Factores subyacentes

Edad > 65 años

Enfermedades preexistentes ^a

Encamamiento crónico

Trastornos deglutorios-Aspiración

Alcoholismo

Malnutrición

Inmunodepresión^b

Hospitalización en el año previo

Esplenectomía

Tratamiento antimicrobiano inapropiado previo al ingreso o retraso en su administración

Factores basales (evaluación inicial)

Temperatura > 38,3°C

Taquipnea (≥ 30 /min)

Hipotensión sistólica (<90 mmHg) o diastólica (<60 mmHg)

Confusión mental

Afectación extrapulmonar^c

APACHE II score > 22

SAPS > 12-13

Leucopenia (< 4×10^9 /L), Linfopenia o leucocitosis ($> 30 \times 10^9$ /L)

Trombocitopenia ($\leq 10^5$ /mm³), trombocitosis ($\geq 4 \times 10^5$ /mm³)

Creatinina > 1,2 mg/dL o BUN > 20 mg/dL

Lácticodehidrogenasa (≥ 260 U/L)

Albúmina sérica disminuida

Hematocrito <30% o hemoglobina <9 g/dL

PaO₂ <60 mmHg o SaO₂ <90% respirando aire ambiente.

Afectación radiológica multilobar, cavitación o derrame pleural

Etiología^d

Bacteriemia

Factores evolutivos

Necesidad de ventilación mecánica

Desarrollo de shock séptico

Insuficiencia renal aguda

Tratamiento antibiótico empírico inicial inapropiado

Rápida diseminación radiológica de la neumonía

Tabla 1.3. Factores de riesgo de aparición de complicaciones y/o muerte en la Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC). ^a EPOC, Insuficiencia Cardíaca, Insuficiencia Renal Crónica, Hepatopatía, Diabetes Mellitus. ^b Tratamiento esteroideo sistémico reciente o citostáticos. ^c Artritis séptica, meningitis, etc. ^d *S pneumoniae*; *S aureus*; bacterias entericas Gram-negativas; *P aeruginosa*, *Legionella* spp.

Por otra parte, el juicio clínico del médico que atiende al paciente con NAC, aun siendo de gran relevancia, ha demostrado que frecuentemente subestima la gravedad de la enfermedad (36). Por ello se han desarrollado diferentes sistemas de puntuación para ayudar al clínico a identificar a los pacientes en riesgo de mal pronóstico en una etapa precoz.

1.5.2 Modelos predictivos de riesgo.

Los modelos predictivos más estudiados son el índice de gravedad de la neumonía (PSI) y el sistema de puntuación CURB-65.

El PSI es una regla de predicción integral, desarrollada para estimar el riesgo de mortalidad dentro de los 30 días de ingreso (37). Sobre la base de 20 variables ponderadas (tabla 1.4), los pacientes se clasifican en cinco clases de riesgo. En las clases I-III se espera que la tasa de mortalidad a ser inferior a 1%, en la clase IV casi 10% y en la clase V se aproxime al 30%.

Como alternativa al PSI, y a partir del modelo predictivo mBTS (36), surge la puntuación CURB-65 que también define el riesgo de mortalidad a 30 días (38). Esta escala pronóstica es el acrónimo de *Confusion*, *Urea* > 44 mg/dL, *Respiratory rate* ≥30 rpm, *Blood pressure* (presión arterial sistólica < 90 mmHg o presión arterial diastólica ≤ 60 mmHg) y edad ≥65 años (tabla 1.5). Con estas variables fácilmente accesibles, se estratifica a los pacientes en tres grupos o clases de riesgo: riesgo bajo, 0-1 puntos (mortalidad 1,5%); riesgo intermedio, 2 puntos (mortalidad 9,2%); y riesgo alto, con 3-5 puntos (mortalidad 22%). La hospitalización se recomienda cuando la puntuación sea mayor de uno, especialmente si hay asociados otros criterios de gravedad como la hipoxemia o la afectación radiológica multilobar (7).

Variables	Puntuación
Factores demográficos	
Edad hombres	Edad en años
Edad mujeres	edad en años -10
Vivir en residencia	10
Comorbilidades	
Neoplasias	30
Hepatopatía	20
Insuficiencia cardiaca	10
ACV	10
Insuficiencia renal	10
Exploración física	
Confusión	20
FR \geq 30/min	20
TAS < 90 mmHg	20
Tª <35° ó \geq 40°C	15
FC \geq 125/min	10
Laboratorio y hallazgos radiológicos	
pH <7,35	30
BUN >30 mg/dl	20
Na ⁺ < 130 mmol/L	20
Glucemia >250 mg/dl	10
Hto <30%	10
PaO ₂ < 60 mmHg ó SpO ₂ <90%	10
Derrame pleural	10

Tabla 1.4. Puntuación del PSI. (*Pneumonia Severity Index*)

También se ha evaluado una versión simplificada de CURB-65 donde sólo se incluyen los parámetros clínicos (CRB-65) (38,39). Es de gran utilidad en Atención

Primaria dada la dificultad de disponer de variables analíticas inmediatas en este medio.

Variables	Puntuación
Confusión	1
FR \geq 30/min	1
TAS < 90 mmHg ó TAD \leq60 mmHg	1
Edad \geq 65 años	1

Tabla 1.5. Puntuación CURB-65.

Estos sistemas de puntuación (PSI, CURB-65), aún estando ampliamente validados (34,39,40), muestran limitaciones pronósticas. El PSI es una escala de riesgo de mortalidad y no de gravedad de la neumonía. Debido al valor ponderado asignado a la edad, al género y a las comorbilidades, el PSI puede infravalorar la gravedad de la NAC en pacientes jóvenes, de sexo femenino y sin enfermedades subyacentes; a su vez, puede sobreestimar la gravedad en ancianos o en pacientes con comorbilidades. Por otra parte, el CURB-65, aún con la ventaja de su mayor simplicidad de cálculo, probablemente tiene una menor capacidad para identificar los pacientes de bajo riesgo que pudieran ser tratados a nivel ambulatorio (41), ya que ignora el impacto de las comorbilidades en el pronóstico y de variables clínicas importantes (por ejemplo, SpO₂) en la gravedad de la NAC. Además, el poder discriminatorio del CURB-65 es limitado en población senescente por los puntos de corte de la presión arterial diastólica (< 60 mmHg) y del nitrógeno ureico (> 20 mg/dL), anomalías frecuentemente presentes en pacientes ancianos (42).

Finalmente, al igual que los criterios menores de ATS/IDSA, diversos estudios han demostrado que el índice de Fine (PSI) y el CURB-65 no constituyen la herramienta ideal para predecir el ingreso en UMI (43,44). Estas reglas de predicción parecen valorar aceptablemente la gravedad de los pacientes con NAC en el momento del diagnóstico, aunque la práctica clínica pone de manifiesto que algunos pacientes categorizados como de riesgo bajo-moderado se deterioran rápidamente y acaban desarrollando una NAC grave.

La morbimortalidad de una infección viene determinada por el resultado de una compleja interacción, no evaluada por las escalas pronósticas, entre elementos del microorganismo (virulencia, carga bacteriana, serotipo, infecciones previas o acompañantes...), la intervención terapéutica (cobertura, posología, dosificación, precocidad, combinación, vía de administración...) y, muy especialmente, factores ligados al huésped (edad, comorbilidades, inmunodepresión...). No obstante, en la práctica clínica seguimos observando muertes por neumonía en sujetos sin factores de riesgo ni enfermedades subyacentes, a pesar de recibir un tratamiento antimicrobiano adecuado (45); también comprobamos que más de la mitad de los fallecimientos por neumonía neumocócica bacteriémica se producen en pacientes de menos de 65 años; y que la infección por una cepa idéntica de *Streptococcus pneumoniae* puede causar shock séptico, un síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y muerte en un determinado paciente, o una infección banal y autolimitada en otro (46). La tuberculosis también nos ofrece un ejemplo paradigmático en este sentido. Una proporción significativa (10-20%) de sujetos con exposición intensa y mantenida al bacilo tuberculoso no se infectará; alrededor



del 5% de los sujetos infectados desarrollará una tuberculosis clínica en el transcurso de los dos años siguientes a la infección; la mayoría de los sujetos (90-95%) con infección tuberculosa latente nunca sufrirán una enfermedad tuberculosa y el resto (5-10%) desarrollarán una tuberculosis clínica a lo largo de su vida, habitualmente por reactivación de la infección original. En definitiva, lo que conocemos en la actualidad de la fisiopatología de las infecciones respiratorias explica muchas de las manifestaciones clínicas específicas que observamos en la práctica, pero no aclara suficientemente por qué sólo algunos pacientes sufren este tipo de evolución, o ciertas manifestaciones y complicaciones.

2. PREDISPOSICIÓN GENÉTICA A LA INFECCIÓN

Durante más de 15.000 años, el período que va desde el Paleolítico superior a la Revolución Industrial, la esperanza de vida del ser humano se mantuvo en torno a los 25 años. A finales del siglo XIX, apenas el 35% de la población europea alcanzaba los 40 años. En esa época, el 60% de los fallecimientos eran consecuencia de una infección, una proporción que en siglos anteriores era aún mayor. Desde una perspectiva histórica, el aumento de la esperanza de vida que se observa en los países más desarrollados es un fenómeno nuevo (47).

Es evidente que este incremento de la esperanza de vida media observado a lo largo del siglo pasado, no traduce una repentina selección natural de genes codificantes de un sistema inmune de alta calidad en los países ricos (46). Si aceptamos que un paciente que fallece por una infección tiene unas defensas defectuosas frente a esa infección, también tenemos que admitir que esta 'inmunodeficiencia' persiste en el ser humano desde tiempo inmemorial y que lo que se ha conseguido en el último siglo es simplemente enmascararla gracias al progreso médico. Hasta los avances recientes en el campo de la higiene, de las vacunas y de los antimicrobianos, no era raro que una cierta proporción de los hijos en una familia murieran por una enfermedad infecciosa, a pesar de la más que probable exposición de los supervivientes a los mismos microorganismos que mataron a sus hermanos.

Actualmente son muchos los datos que sugieren que la susceptibilidad a las infecciones tiene un elevado componente hereditario. Las primeras evidencias que apoyaron la hipótesis de que la variabilidad clínica y la inmunodeficiencia eran hereditarias proceden de observaciones de agregación familiar o étnica de infecciones, tanto raras como comunes, que seguían un patrón de herencia mendeliano (monogénico) (48). Estudios epidemiológicos de niños adoptados también apoyan la tesis de la heredabilidad de la predisposición a sufrir infecciones. Sorensen et al. (49) publicaron un estudio sobre las causas de muerte prematura en 1.000 familias con niños adoptados a edad temprana. Estos investigadores comprobaron que, si los padres biológicos de estos niños habían fallecido por una infección antes de los 50 años de edad, su hijo tenía un riesgo relativo de morir por infección de 5,81; por el contrario, el fallecimiento de los padres adoptivos por una infección no confería un mayor riesgo al hijo adoptado de fallecer por esta causa. También observaron que un padre biológico fallecido por una neoplasia no implicaba para el hijo un mayor riesgo de morir por este motivo, mientras que si el padre adoptivo moría por cáncer el hijo tenía un riesgo 5,16 veces mayor de morir también por una neoplasia. Por tanto, la susceptibilidad y la respuesta a la infección parecen tener una influencia genética sorprendentemente importante, mientras que el desarrollo de cáncer tiene una acentuada influencia ambiental.

Existen múltiples formas de predisposición genética a la infección en humanos. Según su patrón de herencia esta predisposición se puede clasificar en mendeliana y poligénica. Cada vez se describen más trastornos congénitos de la

inmunidad innata, conocidos como inmunodeficiencias primarias (IDP) convencionales, que se asocian a múltiples infecciones; también encontramos enfermedades infecciosas comunes, cuya base genética implica, probablemente, la alteración de muchos genes (46,48). En todo caso, esta distinción entre predisposición mendeliana en individuos con infecciones raras (un gen, infecciones múltiples), y predisposición compleja o poligénica en poblaciones con infecciones habituales (una infección, múltiples genes), es cada vez menos nítida. Se reconocen con más frecuencia IDP no convencionales, más raras, que confieren una predisposición a infecciones singulares (un gen, una infección) (50). También se ha descrito la resistencia mendeliana a patógenos virulentos (lo que implica susceptibilidad en el resto de la población). Finalmente, la denominada susceptibilidad poligénica, todavía por demostrar, puede reflejar fundamentalmente el impacto de un gen predominante (*major gene*).

2.1. Inmunodeficiencias Primarias Convencionales.

La evidencia más clara de la predisposición genética al desarrollo de infecciones procede de las IDP convencionales, descritas por primera vez a finales de los años 40 y principios de los 50 del siglo pasado, tras el descubrimiento de los antimicrobianos (51). Aunque la mayoría de los niños se curaban con estos nuevos fármacos, pronto quedó claro que una minoría sufría múltiples infecciones recurrentes, un hallazgo que, obviamente, habría sido difícil de documentar antes

de disponer de los antibióticos. Desde entonces se han descrito clínicamente más de 200 IDP convencionales y se ha dilucidado la base genética de más de 150 de ellas. Estas enfermedades son raras, -la mayoría con prevalencias inferiores a un caso por cada 50.000 nacimientos-, y tienen un patrón de herencia mendeliano recesivo que afecta directamente a los leucocitos y un fenotipo inmunológico identificable en el laboratorio. Los niños que sufren estas enfermedades se presentan clínicamente con infecciones graves, múltiples y recurrentes, debidas a microorganismos oportunistas o a patógenos más virulentos (46).

2.2. Predisposición Mendeliana a infecciones únicas.

Cada vez es más incuestionable que no todas las IDP predisponen a múltiples infecciones (fenotipos) en un mismo individuo. Hoy sabemos que un creciente número de trastornos genéticos confieren una predisposición mendeliana a un único tipo de infección (52). Estas IDP no convencionales pueden ser recesivas o dominantes y pueden afectar o no a células hematopoyéticas. Al contrario que las IDP convencionales, no suele detectarse en el laboratorio ninguna alteración inmunológica antes de que se identifique la alteración genética. Probablemente, el síndrome más meticulosamente descrito de este grupo de enfermedades es la susceptibilidad mendeliana a enfermedades producidas por micobacterias (53), que se define como una vulnerabilidad selectiva a micobacterias poco virulentas,

tales como la BCG y las micobacterias ambientales. Los pacientes con este síndrome también sufren salmonelosis no tifoideas extraintestinales. Desde su descripción se han identificado más de 17 defectos genéticos implicados en este síndrome, que afectan a nueve genes relacionados fisiológicamente con una inmunodeficiencia de IFN- γ (54). Algunos pacientes, especialmente aquellos con defectos en IFN- γ R1 e IL-12p40, no sólo sufren infecciones por micobacterias poco virulentas sino también por *Mycobacterium tuberculosis*, lo que suscita la idea de una predisposición mendeliana a sufrir enfermedades infecciosas comunes por sujetos, por otra parte, sanos.

La observación de una marcada predisposición a sufrir enfermedades neumocócicas invasivas ha llevado a la identificación de sujetos con deficiencia de una kinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK-4) y de MyD88 (55,56) (figura 1). Los pacientes con estas IDP presentan una alta susceptibilidad a la infección diseminada por *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Raramente presentan infecciones por otras bacterias y nunca se han observado infecciones relevantes por hongos, virus o parásitos. El mecanismo concreto por el que estas IDP predisponen a la infección por bacterias capsuladas no se conoce con exactitud. Una característica clínicamente relevante es que los pacientes con deficiencia de IRAK-4 y de MyD88 presentan una respuesta inflamatoria (clínica y biológica) baja y retardada, incluso en el curso de infecciones diseminadas graves, por lo que a menudo el diagnóstico de la infección se retrasa (57). Lo curioso de estos dos ejemplos es que la situación clínica de los sujetos afectados mejora con la

edad, lo que contrasta con lo que sucede en la mayoría de las IDP convencionales, cuya situación clínica empeora con el tiempo.

2.3. Predisposición multigénica a la infección.

El concepto de gen principal (*major gene/locus*), en contraposición al efecto mendeliano, hace referencia a una menor penetrancia (la frecuencia con que el genotipo provoca una enfermedad es altamente variable lo que da lugar a un significativo solapamiento de distribuciones genotípicas y ausencia de correspondencia 1:1 entre genotipo y fenotipo) debido a una mayor influencia en el individuo tanto de otros genes como de factores ambientales. Este concepto fue acuñado por primera vez en el contexto de estudios de segregación complejos, que es un método estadístico basado en un modelo de herencia en el que un fenotipo dado puede ser el resultado de los efectos conjuntos de un *locus* principal, un componente poligénico y de factores ambientales (48). Desde los años 70, se han identificado varios genes principales en diversos fenotipos infecciosos, como la lepra, la malaria, leishmaniasis, esquistosomiasis y algunas infecciones víricas (58). Más recientemente se ha identificado un gen principal, el gen *TOX* (que codifica un factor nuclear implicado en el desarrollo de linfocitos T CD4+, clave en la inmunidad frente a las micobacterias), que confiere una predisposición a la tuberculosis pulmonar precoz (59).

Es habitual distinguir dos patrones de herencia multigénica –oligogénica y poligénica- según el número e impacto relativo de los genes que influyen en la enfermedad. La oligenicidad supone que el fenotipo depende de un número reducido de genes principales y de otros factores genéticos con contribuciones menores. Por el contrario, la poligenicidad supone que los rasgos fenotípicos de un individuo están determinados por muchos genes que colaboran en diferentes *loci* para generar una susceptibilidad a los factores ambientales desencadenantes. En este caso no hay un factor genético único responsable de la enfermedad, sino que son numerosos genes, con efectos menos marcados o más sometidos a los efectos ambientales, los que determinan las manifestaciones de la misma. Cada gen ejerce un pequeño efecto aditivo y los efectos de todos los genes son acumulativos, es decir, ningún gen es dominante o recesivo sobre los demás. Cada factor de riesgo genético probablemente explica sólo un componente del riesgo global, una manifestación específica o una fracción de la población total. En cualquier caso, a nivel poblacional puede emularse una verdadera herencia poligénica por la presencia de numerosos rasgos mendelianos o de genes principales, cada uno de los cuales afecta a un reducido número de sujetos o grupos específicos de individuos.

La identificación de una verdadera predisposición poligénica requiere analizar un gran número de sujetos, tanto por el pequeño efecto esperado para cada gen, como por la naturaleza aditiva de estos efectos. En los últimos años se ha llevado a cabo un considerable esfuerzo en la identificación de los polimorfismos genéticos, principalmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), implicados

en diferentes enfermedades. Los resultados obtenidos en la mayoría de los casos no han sido concluyentes, lo que se explica, entre otras razones, por el insuficiente tamaño muestral, la falta de homogeneidad del fenotipo clínico, las diferencias étnicas de la población estudiada, la elección inadecuada del grupo control y la ausencia de corrección para múltiples comparaciones. Además, el análisis individual de SNPs no tiene en cuenta otros polimorfismos en el mismo gen, o en genes vecinos, con los que podría encontrarse en desequilibrio de ligamiento (DL), y que tienden a heredarse ligados en un haplotipo (60,61). Los nuevos estudios genómicos (GWAS, *genome-wide association studies*), capaces de analizar millones de SNPs en miles de individuos, tal vez puedan contribuir a descifrar la arquitectura multigénica de las enfermedades infecciosas más complejas (46).

2.4. Genes involucrados en la susceptibilidad y gravedad de la neumonía.

La inmunidad innata, la primera línea de defensa frente a la infección, engloba los componentes del sistema inmune que presentan mecanismos para el reconocimiento de estructuras comunes, no específicas, presentes en muchos microorganismos. Las células de la inmunidad innata poseen una amplia variedad de receptores, codificados genéticamente, necesarios para el reconocimiento semiespecífico de los patógenos. Algunos de estos receptores tienen por finalidad el reconocimiento de microorganismos recubiertos de opsoninas. Entre estos

receptores cabe destacar los receptores de la porción Fc de la inmunoglobulina (Ig) G (receptores Fc γ , Fc γ R), los receptores de factores de complemento y los receptores de colectinas (proteínas surfactantes y lectina de unión a manosa) (tabla 2.1) (46).

RECEPTORES DE OPSONINAS		
	Ligandos	Función
Fc γ R (I, IIa, IIIa, IIIb)	Inmunoglobulina G, PCR	Fagocitosis
CR (CR1, CR2, CR3)	C3b, C3bi, C4b...	Fagocitosis
Calreticulina/CD91	SP-A, SP-D, MBL	Fagocitosis
SR (SR-A, CD36, MARCO)	Múltiples ligandos	Fagocitosis
RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS (PRR)		
	Ligandos (PAMP)	Función
TLR (TLR 1-10)	Lipopéptidos, peptidoglicanos, lipoarabinomanano, fosfolipomanano, glicosilfosfatidilinositol, ácido lipoteicoico, zymosan, ssRNA virus, dsRNA virus, lipopolisacáridos, mananos, flagelina, motivos CpG	Inflamación efectora
RIG-I (RIG-I, MDA5)	dsRNA cortos y largos, 5'trifosfato ssRNA	Antiviral (IFN-I)
NLR (NOD1, NOD2, NLRP3, NLRC4, AIM2)	Peptidoglicanos, toxina de ántrax, toxinas bacterianas, flagelina, dsDNA	Inflamación
CLR (Dectinas, DC-SIGN, MBL, MINCLE- Fc γ R)	Mananos, beta-1,3-glucanos, oligosacáridos repetidos, factor de acordonamiento micobacteriano	Inflamación, Fagocitosis

Tabla 2.1. Receptores de la inmunidad innata implicados en el reconocimiento de microorganismos. Fc γ R: receptores de inmunoglobulina G; CR: receptores de complemento; SP: proteína surfactante; MBL: lectina de unión a manosa; SR: receptores *scavenger*; MARCO (receptor de macrófagos con estructura de colágenos, inglés: *macrophage receptor with collagenous structure*); DC- SIGN (inglés: *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*); CLR: receptores lectina tipo C; TLR: receptores tipo Toll; RIG: receptores tipo RIG; RIG-I: gen inducible por ácido retinoico I (inglés: *retinoid acid-inducible gene I*); IFN: interferón; NOD: dominio de oligomerización y de unión a nucleótidos; NLR: receptores tipo NOD; PDG: peptidoglicano; MDA5: proteína de melanoma asociada a diferenciación 5; MINCLE: receptor de lectina tipo C inducible de macrófagos; AIM2: ausente en proteína 2 de melanoma.

Además de los receptores de opsoninas, las células de la inmunidad innata poseen receptores capaces de reconocer directamente diversos patrones moleculares altamente conservados presentes en los microorganismos (PAMPs, acrónimo del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), por lo que son denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, acrónimo del inglés *pattern recognition receptors*) (tabla 2.1). Entre los PRRs, los receptores tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) (figura 2.1) y los receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*; NLR, *NOD-like receptors*) (figura 2.2) juegan un importante papel en la activación de las funciones efectoras de la inmunidad innata y en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria (62,63, 64).

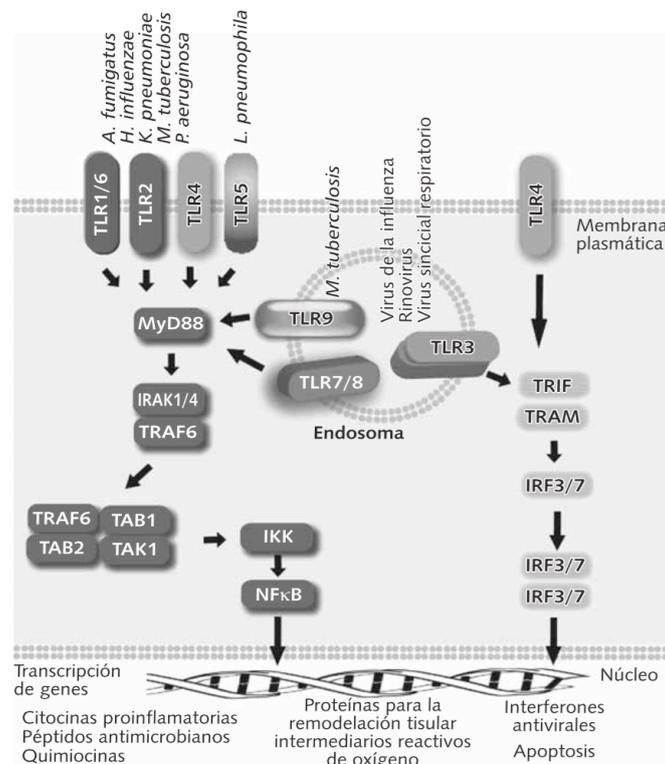


Figura 2.1. Receptores tipo Toll en el reconocimiento de patógenos pulmonares PAMPs. Los TLRs reconocen una variedad de PAMPs. Los receptores inician cascadas de señalización que culminan con la traslocación del NFκB al núcleo para la activación de la transcripción de genes proinflamatorios. Reproducido con autorización del autor (64).

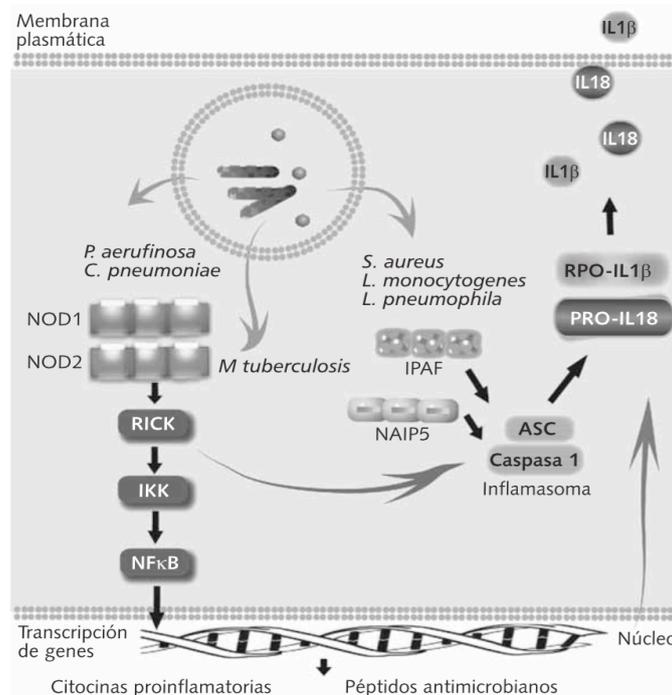


Figura 2.2. Receptores tipo NOD en el reconocimiento de patógenos respiratorios. Los microorganismos que logran acceso directo o aquéllos que pueden traslocar sus productos al citosol son reconocidos por los miembros de la familia NLR. Los receptores NOD1 y NOD2 pueden inducir la producción de citocinas pro- inflamatorias y de péptidos antimicrobianos, mientras que IPAF y NAIP5 forman un complejo con la proteína adaptadora ASC y con caspasa 1 (inflammasoma) para generar las forma biológicamente activas de IL1β e IL18. Reproducido con autorización del autor (64).

En condiciones basales, en el pulmón sano, la inmunidad innata incluye a los macrófagos alveolares, las células dendríticas y las proteínas surfactantes (SP)-A1, -A2 y -D. Además, las células epiteliales juegan un importante papel en la inmunidad innata pulmonar. Tras el inicio de la respuesta inflamatoria, la activación del endotelio y de los leucocitos circundantes promueve la permeabilidad vascular y la extravasación de leucocitos. El aumento de la permeabilidad vascular va a favorecer, además de la llegada de anticuerpos, la de

PRRs solubles, como los componentes del sistema de complemento o la proteína C reactiva (PCR) (65).

La inducción de una respuesta inflamatoria rápida y selectiva ante agresiones externas y la tolerancia ante antígenos inocuos son claves para mantener la integridad y homeostasis del tracto respiratorio. Una respuesta innata deficientemente señalizada ocasionaría una reacción insuficiente frente a una intensa o virulenta exposición a patógenos mientras que su deficiente regulación desplazaría a la reparación tisular controlada por un daño tisular persistente (66).

Se han descrito múltiples deficiencias y polimorfismos de genes implicados en las respuestas inmunes innatas que se relacionan con una diferente susceptibilidad a infecciones respiratorias y con sus consecuencias (por ejemplo, SDRA) (tabla 2.2) (67), aunque hay discordancias en los resultados publicados en diferentes estudios genéticos.

Componente afecto	Asociación	Referencias
Mecanismos de iniciación y amplificación		
TLRs (Receptores Toll-like)		
TLR4	Neumonía por <i>Legionella sp.</i> Infección respiratoria grave por VRS	Tae et al., Hawn et al.
TLR5	Neumonía por <i>Legionella sp.</i>	Hawn et al.
CD14	Bronquiolitis por VRS	Inoue et al.
IRAK-4 (IL-1 receptor-associated kinase 4)	Infecciones bacterianas, particularmente infección neumocócica	Ku et al.
Activación NEMO – NF-κB	Infección neumocócica invasiva recurrente	Ku et al.
Mal (MyD88 adaptor-like protein)	Infección neumocócica invasiva	Khor et al.
MBL (mannose-binding lectin)	Infección neumocócica invasiva, infecciones respiratorias recurrentes, SDRA	Roy et al., Gomi et al., Gong et al.
C2 complemento	Enfermedad neumocócica invasiva, neumonía recurrente	Jönsson et al.
Mecanismos reguladores		
NF-κB p50	Lesión pulmonar aguda	Adamzik et al.
IκB-α	Infección neumocócica invasiva, lesión pulmonar aguda	Chapman et al, Zhai et al.
IL-6	Infección neumocócica invasiva	Schaaf et al.
IL-10	Neumonías con evolución desfavorable, lesión pulmonar aguda	Wattanathum et al.
STAT-3 (signal transducer and activator of transcription 3)	Síndrome hiper-IgE, infecciones respiratorias graves y recurrentes	Holland et al.

Tabla 2.2. Presentación de infecciones respiratorias según polimorfismo genético (adaptado de ref. 67)

Existe redundancia en el reconocimiento de los patrones moleculares de microorganismos por los diferentes PRRs. Por ejemplo, TLR1 y TLR2 así como NOD1 y NOD2 reconocen diferentes componentes del peptidoglicano (68,69). Esto parece ser la consecuencia de una presión selectiva ejercida por la subversión evolutiva de los patógenos y la necesidad en mamíferos de establecer vías de respuesta innata múltiples y en paralelo (66). Además, confiere ventaja de respuesta al huésped, pues con un número limitado de receptores se puede

defender de un número muy amplio de patógenos. Por otra parte, el nivel de especificidad de los PRRs es suficientemente alto como para que diferentes PRRs puedan reconocer PAMPs de un mismo microorganismo sin entrecruzar sus respuestas (69). Los PRRs se encuentran distribuidos con perfiles particulares en cada tipo de célula, pero su función es la misma independientemente de su localización celular; además, un solo receptor genera una respuesta celular mediante su interacción con varios ligandos que son estructuralmente distintos (71). Finalmente, la redundancia de PRRs también implica una mayor modulación de la respuesta inmune por estos receptores y, posiblemente, suplencia de su señalización en caso de disfunción por polimorfismos. Para un mismo patógeno, el huésped dispone de un repertorio diverso de PRRs (72). Quizás, por esa razón, las deficiencias en un PRR ocasionen fenotipos con representatividad clínica menos relevante que las deficiencias de proteínas adaptadoras, dado que éstas últimas participan en la señalización común de múltiples PRRs (73,74). Así, los sujetos con deficiencia de una kinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK-4) y de MyD88 (figura 2.1) presentan una alta susceptibilidad a la infección diseminada por *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, son infrecuentes las infecciones por otras bacterias y no se han documentado infecciones relevantes por hongos, virus o parásitos. Una característica clínicamente relevante es que los pacientes con deficiencia de IRAK-4 y de MyD88 presentan una respuesta inflamatoria (clínica y biológica) baja y retardada, incluso en el curso de infecciones diseminadas graves (75,76).

3. FER y FOXO3

La inevitable exposición a patógenos en el tracto respiratorio -y sus potencialmente graves consecuencias- ha supuesto una enorme presión selectiva sobre el pulmón para adaptarse a la infección. En la gran mayoría de los casos ésta no se produce o es clínicamente irrelevante. Sin embargo, en ocasiones, las defensas del huésped permiten la proliferación de patógenos o desencadenan respuestas inapropiadas (inflamación, remodelado inmune y respuesta pulmonar secundaria) que comprometen la propia función pulmonar. La respuesta inmune es dinámica y cambiante en celularidad y señalización, y en su mayor parte supone un proceso evolutivo para responder adecuadamente a la exposición a patógenos respiratorios (77).

3.1. Proteínas FER

3.1.1 Antecedentes

Las proteínas FER (*feline sarcoma-related*) y FPS/FES (*fps*, Fujinami poultry sarcoma; *fes*, feline sarcoma) son los dos únicos miembros de una subfamilia de proteínas nucleares y citoplasmáticas con actividad tirosin-quinasa (TK).

La estrecha similitud estructural entre las TK Fer y Fps/Fes sugiere que podrían tener funciones biológicas similares o incluso redundantes (78). Tanto

Fps/Fes (p92^{fes}) y Fer (p94^{fer}) contienen un dominio catalítico carboxi-terminal con actividad TK, y un dominio central con homología Src 2 (SH2). En el extremo amino-terminal, y a diferencia de otras proteín-quinasas citoplasmáticas, presentan un dominio FCH con homología Fer/CIP4 seguido de tres dominios en hélice superenrollada (*coiled-coil*, CC) que están implicados en la autofosforilación y la posterior activación de la TK (figura 3.1). Estudios recientes apoyan la reclasificación de los dominios N-terminales de FES/FER en un dominio F-BAR (FCH + CC1) y un dominio FX (CC2 / CC3) (79). La regulación de la actividad TK por los dominios CC es una característica definitoria única de la familia de quinasas Fes/Fer (80,81).

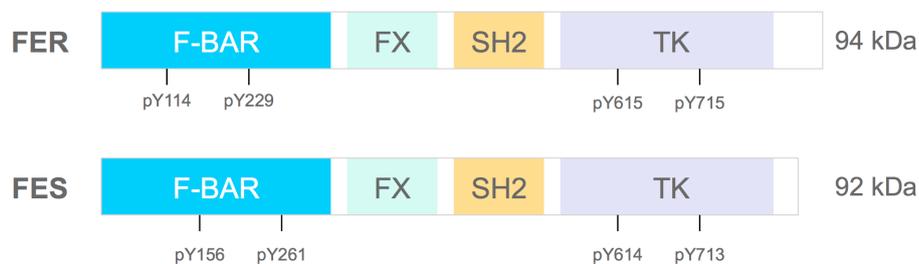


Figura 3.1 Organización de los dominios de FER/FER (adaptado de referencia 116).

El proto-oncogén *fer* codifica una proteína FER de 92 kDa (p94^{fer}) de expresión ubicua. En el adulto, Fps se expresa en células hematopoyéticas de estirpe mieloide -incluyendo macrófagos neutrófilos y mastocitos- eritrocitos y plaquetas, así como en ciertas células neuronales y epiteliales (82).

Numerosos ligandos (GM-CSF, EPO, PDGF, EGF, IL3, IL4, IL6, IgE FcγRI, etc), tras interactuar con sus receptores celulares, inducen la activación celular vía FPS/FES y FER. Estas quinasas han sido implicadas en diversas funciones celulares tales como el reordenamiento del citoesqueleto y la regulación de la señalización intracelular en las interacciones célula-matriz e intercelular mediadas por uniones adherentes y adhesiones focales (82-84).

Diferentes líneas de investigación apoyan un papel de FER en la progresión tumoral (85). FER está altamente expresado en el cáncer de mama (85) y próstata (86); se asocia con progresión de la leucemia mielobástica aguda (87) y adenocarcinoma de pulmón (88); con el desarrollo de metástasis de carcinoma hepatocelular (89), y con mal pronóstico en el carcinoma renal de células claras (90). Datos recientes indican que FER puede mediar la resistencia a la quinacrina, un agente antimalárico y antineoplásico, a través de la mayor activación de la vía del NF-κB, lo cual podría tener implicaciones terapéuticas (91).

3.1.2. FER e inmunidad innata

Diversos estudios experimentales establecen un papel biológico para FES/FER en la regulación de la inmunidad innata a través del control de la producción macrofágica de TNF-α.

Zirngibl et al. demostraron en un modelo experimental de endotoxemia que los ratones *fes*^{-/-} expuestos a LPS muestran niveles séricos elevados de TNF-α y reducidos de IL-10, en comparación con ratones de tipo salvaje tratados con LPS

(92). Beutlet et al ya habían demostrado que la administración experimental en ratones de un anti-TNF- α seis horas antes de la inyección de LPS reducía la mortalidad aproximadamente un 50% (93), y que en los ratones tratados con TNF- α recombinante se reproducían muchas de las manifestaciones fisiopatológicas (hipotermia, cambios en la glucemia y lactato plasmáticos, hematocrito y recuento leucocitario, niveles de IL-1) cuando se les inyectaba LPS (94), estableciendo así el papel de TNF- α como un mediador clave de los efectos de la endotoxina *in vivo*.

Parsons et al. aportaron evidencias de que la mayor secreción de TNF- α en ratones *knockout* (*fes*^{-/-}) era probablemente debida a una mayor activación de la vía NF- κ B en respuesta a la estimulación con LPS. Posiblemente, un defecto en la internalización de TLR4 u otros receptores clave (79), sería responsable de una activación más intensa y sostenida de NF- κ B. Este aspecto proporciona una explicación fisiológica altamente plausible de la mayor susceptibilidad de los ratones *fes*^{-/-} al shock endotóxico (95). Simultáneamente, estos autores observaron una disminución en los niveles plasmáticos máximos de IL-10 como expresión de desequilibrio en los niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias. La mayor secreción macrofágica de citoquinas pro-inflamatorias como expresión de una mayor sensibilidad a endotoxinas en los ratones *FER/FES null* podría explicar por qué su deficiencia afecta negativamente a la supervivencia de los ratones expuestos a LPS (figura 3.2).

También demostraron que en ratones *fes*^{-/-} se producía una mayor migración transendotelial de leucocitos cuando eran expuestos al LPS en comparación con los



ratones control (95), hallazgos similares a los ya observados previamente en ratones mutantes *fer^{DR/DR}* tras exposición a LPS (96). Esto sugiere que, en condiciones normales, FER/FES limita la respuesta inflamatoria mediante el adecuado control del reclutamiento y trans migración celular ligado a una menor expresión de moléculas de adhesión (PSGL-1 *P-selectin glycoprotein ligand-1* y CD11b) en la superficie de los leucocitos inducidas por LPS/TNF. La mayor señalización de NF- κ B y la disminución de la PARP (poli ADP ribosa polimerasa) observadas en ratones *fes^{-/-}* se correlaciona con una mayor supervivencia celular, lo que apoya un papel de FES/FER en control de la respuesta infamatoria mediante la activación de la apoptosis (95).

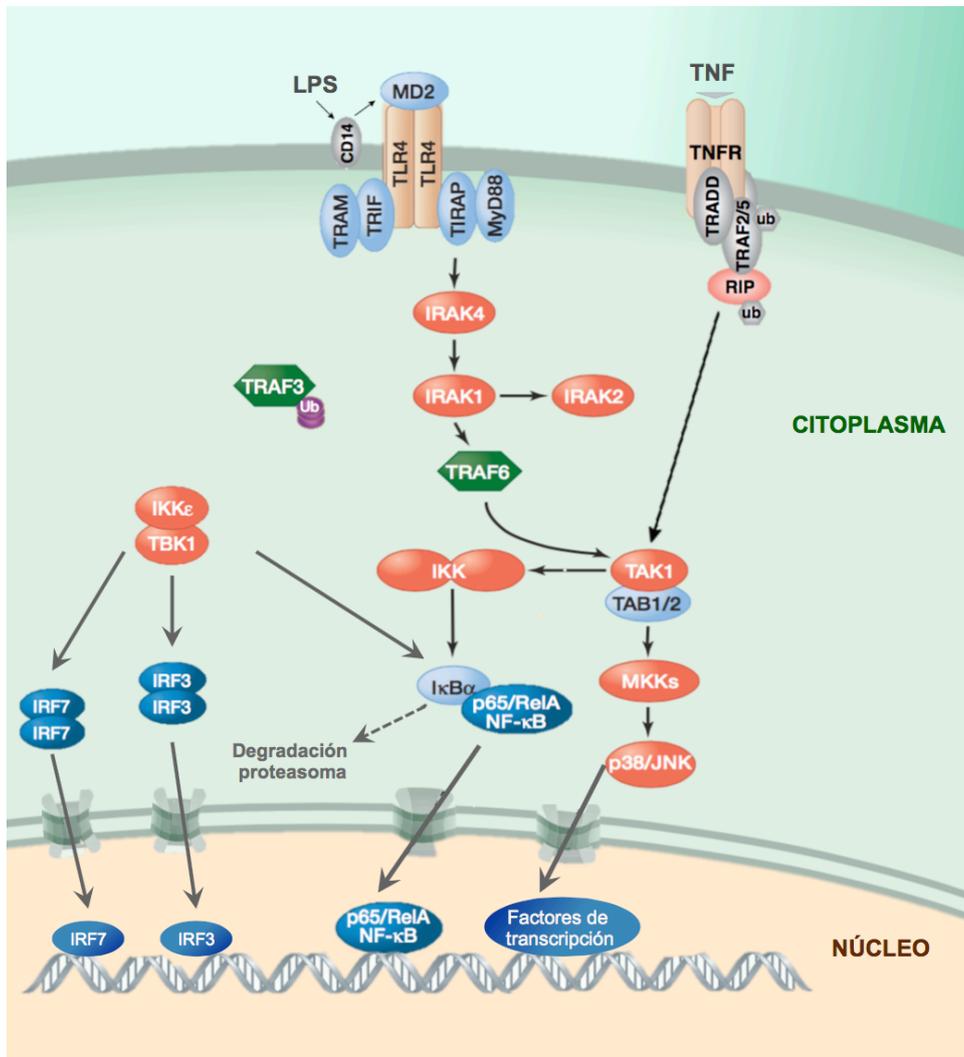


Figura 3.2. Esquema simplificado de la señalización TNF- α y TLR4. TLR4 es un receptor transmembrana que pertenece a la familia receptor TOLL / IL-1. Tras su estimulación se inicia una cascada de señalización intracelular que da como resultado la activación de MAP kinasas (JNK, p38MAPK) y NF- κ B. La activación de NF- κ B es un proceso de doble vía. Inicialmente, la fosforilación induce la degradación de su inhibidor I κ B, lo que permite la exposición de una secuencia de localización nuclear NF- κ B, y su movilidad hacia el núcleo. Posteriormente, modificaciones post-traduccionales de NF- κ B tales como la fosforilación de la subunidad p65/RelA, permite una transcripción más estable y prolongada de sus genes diana. Una vez activadas todas estas moléculas de señalización, en particular NF- κ B, inducen la transcripción de mediadores proinflamatorios, tales como TNF- α (ilustración reproducida por cortesía de www.cellsignal.com)

El descubrimiento de los dominios F-BAR aporta una mejor comprensión molecular de cómo las proteínas FES/FER participan en los cambios dinámicos en las membranas celulares. Se postula un modelo según el cual las proteínas adaptadoras F-BAR y las F-BAR quinasas (FES/FER) cooperan para regular los procesos que activan la polimerización de la actina (fig 3.3). Dicha interacción finalmente darán lugar a cambios dinámicos en la membrana celular (curvatura, invaginación y escisión) responsables de importantes funciones celulares (endocitosis, fagocitosis, la formación de lamellipodia, la adhesión o la migración celular) (79,97,98) y podría explicar su papel en la internalización y regulación “*a la baja*” del complejo del receptor TLR4 (92).

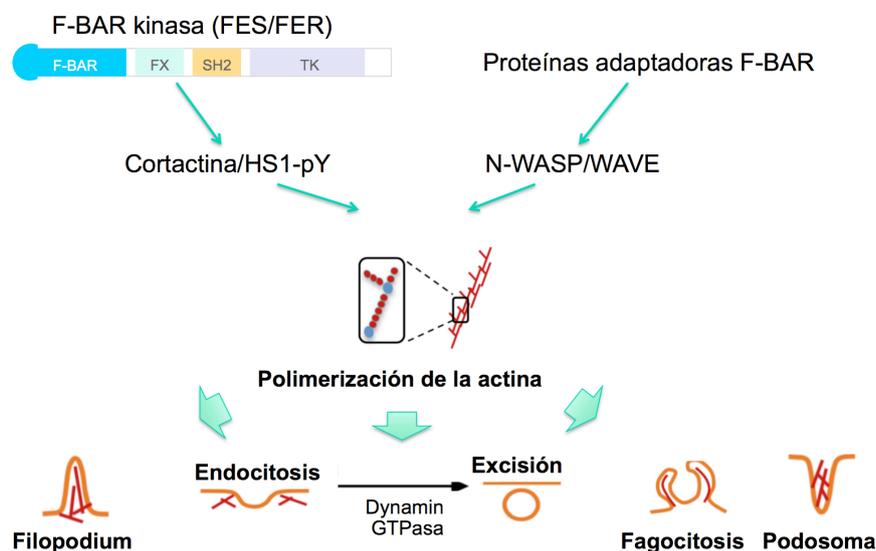


Fig. 3.3 cooperación de proteínas adaptadoras F-BAR y FES/FER en la regulación de la actividad de la actina. Los adaptadores F-BAR interactúan con la maquinaria de ensamblaje de la actina (ej. N-WASP, WAVE) para acoplar las invaginaciones de la membrana a la polimerización de la actina. Las F-BAR quinasas (FES/FER) intervienen en la fosforilación de la cortactina (y de su homólogo hematopoyético HS1). Teniendo en cuenta el papel de cortactina en la estabilización de la actina, se postula que FES/FER participa, a través de la regulación de los procesos celulares, en la endocitosis, fagocitosis, formación de filopodio, lamellipodia y podosomas y en la migración celular (adaptado de ref. 79, 98)

También se han identificado diferentes patologías asociadas a cambios de expresión y mutaciones génicas que afectan a F-BAR, incluyendo trastornos del desarrollo, enfermedades neurológicas (enfermedad de Huntington), enfermedades autoinmunes (Síndrome de Wiskott-Aldrich), neoplasias (mama, vejiga), hipertrofia cardiaca, la captación de glucosa, y la disfunción renal (98).

3.1.3. Polimorfismos del gen *FER* e implicaciones clínicas

En el primer estudio de tipo GWAS [*Genome Wide Association Study*] publicado sobre sepsis secundaria a neumonía se incluyeron los datos del genotipado de cuatro cohortes independientes de pacientes (99). Tras el análisis de casi seis millones de SNPs (5.888.277 SNPs) se identificó una variante común del gen *FER* (cromosoma 5q21), localizado en un intrón (rs4957796 T>C) que se asoció a un menor riesgo de muerte. Tras la estratificación de los enfermos por el genotipo, la mortalidad se redujo desde aproximadamente 25% en los pacientes homocigotos para el genotipo salvaje (TT), a un 15% y 10% según fueran portadores u homocigotos para el alelo menor C, respectivamente.

Un segundo *locus* (rs79423885) ubicado en el cromosoma 6, en una región denominada “desierto genético” mostró se asoció con una mayor supervivencia en las cuatro cohortes, aunque no alcanzó el valor umbral aceptado como estadísticamente significativo para el estudio genético de asociación ($p \leq 5 \times 10^{-7}$). Al no haber elementos funcionales asociados a este *locus*, las implicaciones clínicas

de este hallazgo son difíciles de interpretar. En el meta-análisis de los pacientes con sepsis por neumonía se identificaron otros 11 *loci* relacionados con la supervivencia a 28 días ($p < 1 \times 10^{-5}$)

Teniendo en cuenta que el alelo menor de *FER* se presenta en la población europea con una frecuencia aproximada del 20%, su expresión permitiría una reducción del 10% de mortalidad por sepsis causada por neumonía.

A pesar de la alta frecuencia de los alelos y de la relevancia del efecto de este SNP (99), es controvertido el grado de protección que esta variante de *FER* podría conferir a la población. En un estudio posterior, Shöneweck y col. (100) evaluaron la expresión de la variante rs4957796 de *FER* y el SNPs rs79423885 y su asociación con el riesgo de mortalidad a 28 días en una cohorte de 740 pacientes con sepsis secundaria a neumonía, sin que pudieran replicar los resultados del estudio de Rautanen y col.

3.2. Proteínas FOXO.

3.2.1. Antecedentes.

Forkhead box transcription factor family O (FOXO) constituye una familia de factores de transcripción altamente conservados durante la evolución. En los seres humanos, se conocen cuatro isoformas de FOXO que se expresan ampliamente y regulan una gran variedad de funciones celulares, como el metabolismo energético, la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, la resistencia al estrés oxidativo y la apoptosis (101-103) (figura 3.4).

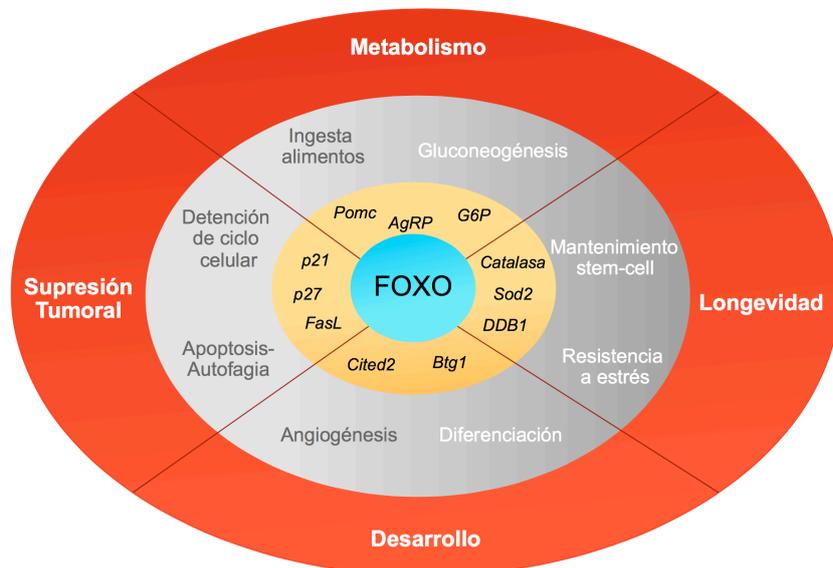


Figura 3.4. La familia de factores de transcripción FOXO juegan un papel importante en la longevidad y la supresión tumoral al activar la expresión de genes diana implicados en la resistencia al estrés, el metabolismo, la detención del ciclo celular y la apoptosis.. El control eficaz de la actividad FOXO en respuesta a estímulos ambientales es probable que sea clave en la prevención el envejecimiento y las enfermedades dependientes de la edad, incluyendo el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y diabetes.

Los factores de transcripción FOXO transforman una variedad de estímulos externos y/o ambientales (factores de crecimiento, nutrientes, estrés oxidativo) en diversas respuestas biológicas a través de la modulación de la expresión de genes específicos. La actividad transcripcional de FOXOs está regulada por una compleja combinación de modificaciones post-traduccionales (PTM), tales como la fosforilación, acetilación, ubiquitinación y metilación (104,105), que serían responsables de la amplia variedad de funciones transcripcionales. Así, la activación de la vía de señalización PI3K por factores de crecimiento (insulina, IGF-1) determina la fosforilación de las proteínas FOXO por la AKT/PKB (106) y su secuestro citoplasmático, ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Por el contrario, en ausencia de señales de factores de crecimiento se inactiva la vía de señalización PI3K-AKT lo que, al evitar su fosforilación, permite la translocación nuclear de FOXOs y la transcripción de sus genes diana (107).

Ciertas señales de estrés (estrés oxidativo, TNF- α) pueden evitar la inactivación de FOXO por PI3K-AKT y permitir la translocación nuclear de FOXOs. Las “quinasas de estrés”, como JNK (*Jun N-terminal kinases*), permiten activar a FOXOs aun en presencia de factores de crecimiento (107,108).

3.2.2. Factores de transcripción FOXOs e inmunidad innata.

Diversos estudios han relacionado a las FOXOs con la inmunidad innata. Su et al. demostraron que FOXO regula la respuesta inflamatoria a través de la señalización mediada por TLR4 y la expresión de IL-1b en los macrófagos humanos

(107,109). En el epitelio respiratorio de mamíferos existe una síntesis y liberación basal de productos antimicrobianos (AMPs) por activación génica constitutiva, lo que representa una primera línea de defensa frente a las bacterias y patógenos oportunistas (110). La inactivación y degradación de FOXOs parece ser el estado habitual de las células epiteliales en ausencia de infección, aunque, en respuesta a un estado de privación de energía y/o estrés celular, los factores de transcripción FOXOs pueden activar la expresión de los genes que codifican AMPs, independientemente de la estimulación por sus vías inmunoregulatoras habituales (NF- κ B y MAPK). Esto constituye un mecanismo cruzado de regulación entre metabolismo e inmunidad innata que permite la adaptación del organismo a las condiciones ambientales (107,111).

Diversas evidencias apoyan un papel relevante de los factores FOXOs durante la infección. En un modelo murino de neumonía por *P. aeruginosa* y *Haemophilus influenzae* no tipable (NTHi), se determinaron la activación y translocación nuclear de FOXO3 en las células epiteliales respiratorias (107). En el mismo estudio, el silenciamiento de los genes *FOXO1/3* se asociaba a una mayor internalización de patógenos en las células epiteliales y a una menor liberación de diversas citoquinas proinflamatorias (IL-6, IP 10, IL-8) durante la infección bacteriana. El silenciamiento de *FOXO* reducía de forma selectiva la liberación de IL-6 en respuesta a agonistas de TLR4 y TLR2 (LPS y lipoproteínas, respectivamente), sin afectar a la liberación de IL-6 en respuesta a la flagelina (ligando de TLR5) ni a IL-1b, como ya demostraron otros autores (109); también reducía la secreción de IL-6 y IP10, dependiente de TRIF (vía de señalización de TLR3 endosómico) en el

epitelio bronquial.

FOXOs e insulina modulan, a través del eje PI3K-AKT, la respuesta inmune innata; por esta vía, la insulina regula negativamente la actividad transcripcional de FOXO inducida por TLR3 (144). Hasta ahora, el papel de FOXO en la inmunidad innata es insuficientemente conocido, como lo demuestra las referencias que, tanto sobre sus efectos inflamatorios como anti-inflamatorios aparecen en la literatura. Esta yuxtaposición de acciones no es necesariamente una paradoja; en el contexto de daño celular oxidativo, se ha informado que FOXOs es capaz de promover tanto la apoptosis como la supervivencia celular. Como anteriormente se expuso, la razón por la que FOXOs puede tener funciones aparentemente opuestas es la diversidad de modificaciones postraduccionales a los que está sometido. Así, la actividad transcripcional de FOXOs está determinada no sólo por su reclutamiento nuclear sino también por el patrón particular de fosforilación, metilación, acetilación o interacciones con otras proteínas (107).

3.2.3. Polimorfismos del gen *FOXO3* e implicaciones clínicas.

Lee y cols. describieron un SNP sinónimo en el gen que codifica FOXO3, cuyo alelo menor está asociado con una evolución más benigna de la enfermedad de Crohn y artritis reumatoide y con un mayor riesgo de desarrollar formas graves de malaria (112). Utilizando datos fenotípicos, los autores identificaron subgrupos de pacientes con enfermedad de Crohn agresiva o indolente. Un GWAS mostró que la presencia de un SNP intrónico dentro del gen *FOXO3A* (*rs12212067T* → *G*) se

asociaba con el pronóstico de la enfermedad, pero no con la susceptibilidad a desarrollarla; el alelo menor (G) fue, de manera consistente, más común en pacientes con un curso indolente de la enfermedad. Tras la estimulación *in vitro* con diferentes PAMPs, los monocitos de individuos sanos y homocigotos para el alelo menor (G) expresaban niveles más bajos de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), y niveles más elevados de la citoquina antiinflamatoria IL-10, que los monocitos homocigotos para el alelo principal (T). Todo esto sugiere que diferencias en la transcripción FOXO3 influyen en el perfil de citoquinas producidas por los monocitos.

La función de FOXO3 depende en gran parte de modificaciones post-traduccionales que determinan si éste queda retenido o se excluye del núcleo celular. La translocación de FOXO3 fuera del núcleo ocasiona un aumento en la producción de TNF- α , mientras que su posterior re-acumulación nuclear (recuperación nuclear) se correlaciona con una disminución de la producción de TNF- α y el aumento de IL-10 (figura 3.5). Tras la estimulación con LPS, los autores observaron que la recuperación nuclear se produjo más rápidamente en los monocitos homocigotos para el alelo menor (G) que en los homocigotos para el alelo mayor (T), lo que se correlacionaba con una reducción precoz en la síntesis de TNF- α y un aumento de producción de IL-10.

Otras investigaciones han mostrado que los monocitos homocigotos para el alelo menor (G) producen más factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF β 1) que los homocigotos para el alelo mayor (T). En estos estudios el bloqueo de la

señalización TGFβ1 abolió las diferencias genotipo-específicas en la producción TNF-α e IL-10. FOXO3 interactúa directamente con el promotor de *TGFβ1*, y el silenciamiento de *FOXO3A* en dos líneas celulares de monocitos humanos reduce la transcripción de TGFβ1. Esto sugiere que la recuperación nuclear precoz de FOXO3 en monocitos homocigotos para el alelo menor (G) induce una mayor producción de TGFβ1, que a su vez modula la producción de TNF-α e IL-10 (113).

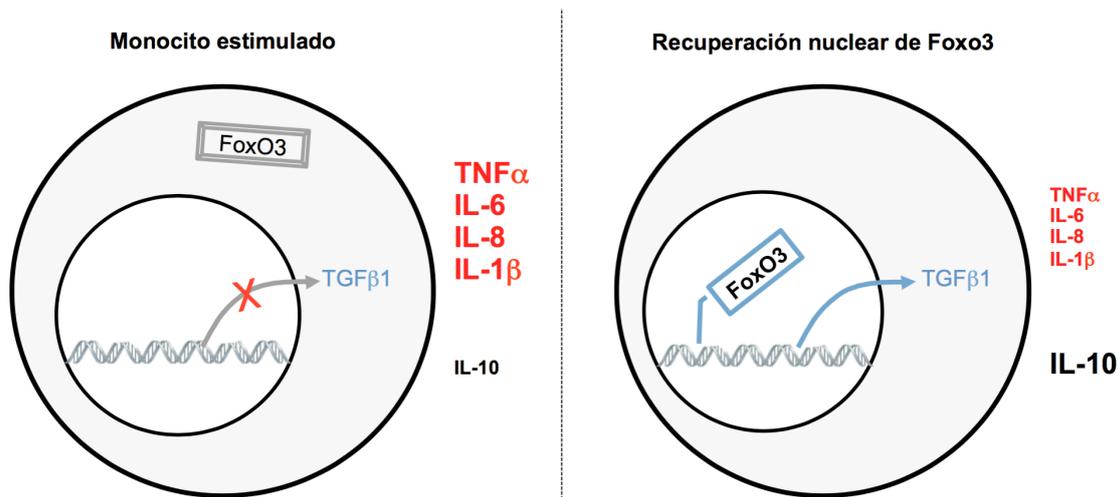


Figura 3.5. Activación de la vía de FOXO3 y respuestas inflamatorias dependientes de TGFβ1. Tras la activación de monocitos, FOXO3 se transloca fuera del núcleo lo que inactiva su programa transcripcional. El restablecimiento de su actividad transcripcional depende de su translocación nuclear y su síntesis de *novoo*. A través de un mecanismo dependiente de TGFβ1, FOXO3 suprime las respuestas inflamatorias mediante el aumento de la producción de citoquinas antiinflamatorias y la supresión de la de citoquinas pro-inflamatorias (adaptado de ref. 113).

Este alelo también se asoció con un aumento en la susceptibilidad a la malaria grave en cohortes de pacientes de Kenia y vietnamitas, lo cual es consistente con el efecto negativo que tienen los niveles bajos de TNF-α y la alta producción de IL-10 en la eliminación del parásito.

Podemos concluir que a pesar de su importancia, la NAC no es una enfermedad de declaración obligatoria y, por tanto, no es posible conocer su incidencia con exactitud. La NAC es la infección que con mayor frecuencia condiciona el ingreso hospitalario de un paciente. Aunque con tasas de hospitalización muy variables, las razones fundamentales para su tratamiento hospitalario son la gravedad de la NAC y la descompensación de enfermedades subyacentes. El número de ingresos también aumenta con la edad.

Una reciente publicación de los resultados de un GWAS que analizaba en cuatro cohortes de paciente ingresados en UCIs, la supervivencia de la sepsis, identificaron variantes comunes en el gen *FER* que se asocian con un menor riesgo de muerte por sepsis debido a la neumonía.

El análisis clínico-epidemiológico de una cohorte multicéntrica de pacientes hospitalizados por NAC que va a ser sometida a estudio genético nos aporta información actualizada sobre aspectos demográficos, comorbilidades y gravedad de la NAC en la población de nuestras zonas de cobertura sanitaria y nos permite cotejar nuestros resultados con publicaciones previas.

La homogeneidad y congruencia epidemiológica de nuestra cohorte es condición previa para estudiar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de dos SNPs del gen *FER* (rs4957796T>C; rs62375529T>C) y un SNPs de *FOXO3A*, en un grupo control y en el grupo de pacientes ingresados por NAC. De confirmarse la replicación del estudio, la expresión de estas variantes génicas comunes demostrarían diferencias significativas en la susceptibilidad, en el



desarrollo y gravedad de la sepsis secundaria a NAC y en la supervivencia.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



Hipótesis

La morbimortalidad de una infección viene determinada por el resultado de una compleja interacción, no evaluada completamente por las escalas pronósticas, entre factores del microorganismo, el tratamiento administrado y características del huésped. La configuración genética de cada paciente forma parte de estas últimas y contribuye a justificar la reconocida variabilidad interindividual en la susceptibilidad y en la evolución de las neumonías.

FOXO3 y *FER* son determinantes genéticos de la respuesta del huésped a la infección que desempeñan un papel en la susceptibilidad a la neumonía, en el desarrollo de formas más graves de la misma y en su evolución. Su estudio contribuye a superar las limitaciones de los actuales modelos clínicos de predicción de riesgo en la neumonía adquirida en la comunidad.



Objetivos

1. Realizar un análisis clínico-epidemiológico de una cohorte multicéntrica de pacientes hospitalizados por NAC que va a ser sometida a estudio genético.
2. Comparar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de dos SNPs del gen *FER* (rs4957796T>C; rs62375529T>C) en un grupo control (población general española, PGE) y en el grupo de pacientes ingresados por NAC. Con ello se pretende determinar si los SNPs localizados en este gen se asocian a una menor susceptibilidad, mejor evolución y menor mortalidad en enfermos con NAC
3. Comparar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante del gen *FOXO3A* (rs12212067T>G) en la PGE y en el grupo de pacientes ingresados por NAC, para determinar si dicho SNP se asocia a una mayor susceptibilidad a la NAC, peor evolución y mayor mortalidad en enfermos con NAC.



Material y métodos

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Tipo y población de estudio

Los sujetos proceden de cohortes prospectivas de pacientes con diagnóstico de NAC ingresados de forma consecutiva en hospitales españoles (Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín de Las Palmas de Gran Canaria, Hospital Universitario de La Princesa, de Madrid; Hospital San Jorge de Huesca y Hospital Clínico y Universitario de Valencia) entre marzo de 2001 y diciembre de 2014.

Todas las etapas del estudio se realizaron en completa conformidad con la Declaración de Helsinki (114). El protocolo fue aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) de los hospitales participantes con el correspondiente formato de consentimiento informado.

6.1.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión fueron: 1) edad mayor o igual a 18 años; 2) diagnóstico de NAC definida por la presencia, en un paciente no hospitalizado, institucionalizado ni inmunodeprimido, de un infiltrado pulmonar de reciente aparición en la radiografía de tórax, hallazgos exploratorios compatibles con neumonía [tos de nueva aparición o empeoramiento de la tos previa con o sin expectoración, taquipnea, dolor torácico y temperatura anormal ($>38^{\circ}\text{C}$ ó $<36^{\circ}\text{C}$).

.1.2. Criterios de exclusión

Quedaron excluidos del estudio aquellos enfermos que, aún con diagnóstico de neumonía, cumplía alguno de los criterios siguientes:

- Enfermedad fatal a corto plazo: aquellos casos de enfermedad crónica grave o mala calidad de vida previa en que la neumonía formaba parte de un proceso terminal, no considerándose en este caso tributario de ingreso en UCI.
- Receptores de trasplante de órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos.
- Neutropenia secundaria a tratamiento quimioterápico o enfermedad hematológica maligna.
- Inmunosupresión primaria o secundaria a radioterapia, fármacos citotóxicos, tratamiento con esteroides o SIDA.
- Neumonía por aspiración
- Neumonía nosocomial

6.1.3 . Grupo control.

El grupo control constituye la población de referencia en los estudios de susceptibilidad y estaba formado por personal investigador y clínico, estudiantes universitarios y donantes de sangre y/o médula ósea no relacionados

genéticamente, procedentes de cada uno de los hospitales participantes en el estudio. Todos los sujetos eran españoles caucásicos y mayores de edad, fueron informados sobre los estudios que se pretendía llevar a cabo y firmaron el preceptivo consentimiento. A este conjunto de estos individuos nos referiremos como población general española (PGE).

6.2. Definiciones.

6.2.1 Neumonía adquirida en la comunidad (NAC)

Toda infección aguda del tracto respiratorio inferior caracterizada por la aparición de infiltrado pulmonar agudo en la radiografía de tórax y compatible con neumonía, un examen clínico compatible y adquisición extrahospitalaria de la infección; esto es, quedan excluidas, además de las nosocomiales, aquellas que se presentan en residentes en centros de larga estancia o de asistencia a la tercera edad.

6.2.2. Neumonía comunitaria grave

Comprende aquellos pacientes que por su NAC cumplieran alguno de los dos criterios mayores que incluye la definición adaptada de la *American Thoracic Society* (shock séptico y/o necesidad de ventilación mecánica invasiva o no invasiva) (115).

Además, los enfermos fueron clasificados en función de su gravedad (sepsis, sepsis severa, shock séptico, fracaso multiorgánico) (116).

6.2.3. Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA)

Para el diagnóstico de SDRA se emplearon los criterios establecidos por *American-European Consensus Conference on ARDS*, y que incluyen: proceso de presentación aguda, $PaO_2/FiO_2 \leq 200$ mmHg, infiltrados pulmonares bilaterales presentes en la radiografía simple de tórax y sin evidencia clínica de hipertensión pulmonar o con una presión de enclavamiento en arteria pulmonar ≤ 18 mmHg. (117).

6.3. Estudios microbiológicos.

Las técnicas de investigación microbiológica, la administración de fármacos antimicrobianos y otras terapias quedaron a criterio del médico tratante.

El diagnóstico microbiológico se consideró *definitivo* si cumplía alguna de las siguientes condiciones: (a) hemocultivos positivos para patógenos bacterianos (en ausencia de un origen extrapulmonar de la infección); (b) el cultivo de líquido pleural identificaba un patógeno bacteriano; (c) crecimiento significativo en el cultivo cuantitativo de muestras respiratorias (un cultivo cuantitativo positivo del aspirado endotraqueal con un crecimiento de patógenos bacterianos $\geq 10^6$ unidades formadoras de colonias/mL (ufc/ml), un cultivo cuantitativo positivo de lavado

broncoalveolar con un recuento bacteriano $\geq 10^4$ UFC/ml y/o una muestra obtenida con cepillo protegido con un recuento bacteriano $\geq 10^3$ UFC/ml); (d) examen de esputo con un recuento bacteriano $\geq 10^7$ UFC/ml (con cumplimiento de los criterios de calidad habituales de >25 leucocitos polimorfonucleares y <10 células epiteliales por campo de campo de 100x) y (e) resultado positivo de la prueba para el antígeno urinario de *Legionella* o *S. pneumoniae*. También entraban en la consideración de diagnóstico microbiológico *definitivo* el aislamiento de *Pneumocystis jiroveci*, *Legionella pneumophila* o *Mycobacterium tuberculosis* en cualquier muestra.

La neumonía neumocócica bacteriémica se definió como tal cuando hubiera al menos un hemocultivo positivo para *S pneumoniae*.

El diagnóstico de NAC polimicrobiana se estableció cuando se aislaron dos o más gérmenes en muestras válidas. La NAC se consideró de etiología desconocida si los resultados microbiológicos no fueron concluyentes.

6.4. Recogida de datos

Según un formulario de recogida de datos diseñado a tal efecto, se registraron (por entrevista directa y/o revisión de historia clínica) los datos demográficos, hábitos tóxicos, comorbilidades, variables biológicas habituales, esquema de antibioterapia prescrito y hallazgos microbiológicos.

Se consideraron fumadores aquellos individuos con tabaquismo activo o que hubieran abandonado el hábito tabáquico ≤ 6 meses antes del comienzo de estudio. El abuso de alcohol se estableció como un consumo diario ≥ 80 g. de alcohol en el último año mientras que el consumo de drogas fue recogido como la toma de cualquier droga ilegal.

El tratamiento inmunosupresor se definió como la administración de cualquier agente citotóxico o corticoides (dosis ≥ 20 mg de prednisona al día o su equivalente durante dos o más semanas).

Se consideró que el paciente había recibido tratamiento antibiótico previo si se administró este tipo de fármacos durante al menos 5 días en los 3 meses precedentes. El criterio de infección previa consideraba la presencia de neumonía, tuberculosis u otra infección microbiológicamente documentada. El ingreso hospitalario previo se definió como hospitalización previa en los últimos 3 meses. La sospecha de aspiración quedó establecida por la evidencia clínica.

Se recogieron en todos los pacientes los antecedentes de EPOC, asma, neoplasia previa, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, enfermedad renal o hepatopatía crónicas, enfermedad neurológica, patología psiquiátrica, enfermedad autoinmune, infección por VIH y los trastornos de deglución.

El criterio de cumplimiento terapéutico se evaluó según las directrices de *American Thoracic Society*, aceptándose como una adherencia terapéutica adecuada la combinación de una cefalosporina de 3^a generación o amoxicilina-clavulánico con

un macrólido o una fluorquinolona. El uso de cualquier otro esquema de tratamiento fue considerado “no adherente”.

Para la estimación de gravedad y el riesgo de mortalidad por NAC se aplicaron las escalas pronósticas PSI (*Pneumonia Severity Index*) de Fine (37) y el sistema de clasificación APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) al diagnóstico de la NAC y al ingreso del paciente en la UMI, respectivamente (118). Se recogió información terapéutica adicional como la necesidad de drogas vasoactivas, ventilación mecánica y/o terapia de reemplazo renal.

También se registraron las complicaciones que aparecieron en los siguientes 30 días al diagnóstico de la NAC. Estas incluían cualquier empeoramiento de las enfermedades de base del paciente y/o la presencia de shock (presión arterial sistólica < 90 mmHg a pesar de la administración de líquidos intravenosos o que precisaba medicación vasopresora); coagulación intravascular diseminada (CID) (119); insuficiencia renal (creatinina sérica mayor de 1,5 mg/dl y/o urea mayor de 40 mg/dl en pacientes con función renal previa normal); insuficiencia respiratoria aguda grave ($PaO_2/FiO_2 < 300$ mmHg, o < 200 mmHg cuando se trataba de pacientes con EPOC); y metástasis sépticas (artritis séptica, endocarditis, otitis, meningitis, empiema, pericarditis purulenta). También se registró la necesidad de traslado del paciente a la UCI, la necesidad de ventilación mecánica y la mortalidad hospitalaria y atribuible. También se recogieron datos referentes a la duración del tratamiento antibiótico (oral e intravenoso) y su adecuación a las recomendaciones vigentes (115)

Todos los pacientes fueron evolutivamente seguidos hasta su fallecimiento (relacionado o no con la neumonía) o alta hospitalaria. Se consideró enfermedad fatal a corto plazo a aquellos casos de enfermedad crónica grave o con mala calidad de vida previa en los que la neumonía formaba parte de un proceso terminal, siguiendo los criterios de McCabe y Jackson. (120).

6.5. Estudio genético

6.5.1. Determinaciones genéticas

6.5.1.1 Extracción del ADN

A todos los individuos incluidos en cada uno de los grupos ya descritos, se les extrajo dos viales de sangre: un tubo con EDTA, para posteriormente extraer el ADN, y un tubo con heparina para la obtención del suero. Tanto las muestras biológicas como los consentimientos informados de los pacientes se remitieron al Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín (HUGCDN) a través de mensajería (desde los Servicios participantes ubicados en hospitales fuera de Gran Canaria), o directamente por los médicos colaboradores del HUGCDN.

La extracción del ADN genómico se obtuvo a partir de 400 μ l de sangre periférica mediante el uso de equipo de *iPrep™ Purification Instrument* y se

utilizaron los reactivos de *iPrep™ PureLink® gDNA Blood Kit*® (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se procedió a la verificación de la integridad y cuantificación del ADN extraído mediante el empleo del espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000*® (NanoDrop Technologies®, Wilmington, DE, EE.UU.).

6.5.1.2. Selección de polimorfismos

La información necesaria para realizar la selección de las variantes genéticas se obtuvo de bases públicas con acceso desde internet, principalmente NCBI, Ensemble y Genecard, plataformas que integran a grandes bases de datos, incluyendo la del Proyecto del Genoma Humano (*HapMap project*). En *HapMap*, la población de referencia escogida en nuestro estudio ha sido la CEU, que se corresponde con habitantes en Utah con ancestro del oeste y norte de Europa que representan a la población denominada como caucásica. Para el gen *FER*, se estudian dos polimorfismos, rs4957796 (cromosoma 5:109066439T>C) y rs62375529 (cromosoma 5: 109081631T>C), ambos intrónicos y en alto desequilibrio de ligamiento ($D'=1$ y $r^2=0.8$), mientras que para el gen *FOXO3* el estudio se centró en un SNP sinónimo (no codificante) también intrónico en *FOXO3A* denominado rs12212067 (cromosoma 6: 108981196T>G).

6.5.1.3.. Técnicas de tipaje molecular de los SNPs de *FER* y *FOXO3A*

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real (Q-PCR) fue la técnica empleada para la determinación de los tres SNPs de *FER* y *FOXO3A*.

Se basa en la misma tecnología de amplificación de la PCR convencional pero permite simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación al emplear sondas de hidrólisis. Estas sondas de hidrólisis son oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos y tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se quiere amplificar. La discriminación alélica mediante sondas de hidrólisis *TaqMan* (*Life Technologies*®, Carlsbad, USA) se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la *Taq* polimerasa para escindir una sonda de doble marcaje durante la hibridación de la secuencia diana complementaria. Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la *Taq* polimerasa la hidroliza y se libera el fluorocromo del extremo 5' de la sonda (donador); el fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar espacialmente separados. Por lo tanto, la fluorescencia detectada (longitud de onda específica VIC a ≈ 550 nm y/o FAM a ≈ 520 nm) en el termociclador de Q-PCR es directamente proporcional a la fluoróforo liberado y a la cantidad de ADN molde presente en la PCR.

El genotipado de los SNPs de *FER* (rs4957796, rs62375529) y *FOXO3A* (rs12212067) se realizó usando sondas de genotipado *TaqMan SNP* prediseñadas y específicas (*TaqMan*®*Pre-designed SNP genotyping assay*. IDs: C_28002866_10, C_90533619_10 y C_30780203_10) de acuerdo con el protocolo del fabricante y

con los reactivos comercialmente disponibles. Para el proceso de amplificación del material genético se empleó el equipo *ViiA™7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EE.UU.). Ciclo a ciclo se registraban las curvas de fluorescencia que también se podían leer a punto final, a través del análisis con el programa informático *ViiA™7 Software Instrument Console*. De esta forma se obtienen las gráficas de las frecuencias alélicas.

6.5.2. Herramientas para el análisis de datos

Se comenzó con un estudio descriptivo de los datos obtenidos para, a continuación, realizar un análisis estadístico univariante y multivariante. La estadística univariante se realizó con el objeto de conocer, mediante tests paramétricos y no paramétricos, la distribución de las variables. El análisis estadístico se realizó con intervalos de confianza al 95% y un nivel de significación del 5%. Los análisis se realizaron con paquetes estadísticos y softwares específicos. Se utilizó el *Haploview 4.2* para la estimación y el cálculo del desequilibrio de ligamiento (D y r^2).

Las frecuencias alélicas y genotípicas observadas se determinaron por recuento directo en cada grupo de estudio. El equilibrio Hardy-Weinberg (HWE, *Hardy-Weinberg equilibrium*) se testó para cada SNP utilizando el test de χ^2 , con corrección de Yates, para comparar las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software *SPSS 20.0* (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0,



Estados Unidos) y el *RKwards 0.6.3* (<https://rkward.kde.org>). La comparación de frecuencias alélicas y genotípicas se realizó mediante el test exacto de Fisher o el test de Chi² con corrección para comparaciones múltiples.

El estudio analiza tanto la susceptibilidad (estudio caso/control) como la progresión o gravedad y pronóstico (estudio prospectivo) de la NAC. La relación entre gravedad y mortalidad con los genotipos se evaluó mediante modelos binarios de regresión logística. La edad, sexo y las comorbilidades se incluyeron como variables independientes para el análisis multivariante. Las tasas de supervivencia se estimaron empleando el método de Kaplan-Meier y su comparación con los genotipos se realizó por medio del test log-rank. El análisis multivariante ajustado por edad, sexo y comorbilidades realizó con el modelo proporcional de Cox





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



Resultados



7. RESULTADOS.

7.1. Descripción de las poblaciones.

7.1.1. Grupo control

Nuestro grupo control estaba constituido por 1019 individuos sanos españoles, caucásicos, procedentes de los *cinco* hospitales que participaron en el estudio. Su distribución demográfica en cuanto a edad y sexo fue similar en los distintos centros participantes. En cuanto al resto de características demográficas, por los criterios de inclusión en el grupo control, no tienen relevancia para el estudio genético.

Los tres SNPs incluidos en este estudio están en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P= 0,72$ para rs4957796, $P= 0,28$ para rs62375529, $P= 0,18$ para rs12212067). La distribución de las frecuencias genotípicas en el grupo de controles para los SNPs estudiados de los genes *FER* y *FOXO3A* se detallan en la tabla 7.1.

<i>FER</i> (cromosoma 5)		<i>FoxO3A</i> (Cromosoma 6)	
CC: 21 (2,3)	CC: 25 (2,6)	GG: 15 (1,5)	
rs62375529 CT: 205 (22,7)	rs4957796 CT: 275 (28,2)	rs12212067 GT: 183 (18,0)	
TT: 679 (75,0)	TT: 676 (69,3)	TT: 821 (80,6)	
905	976	1019	

Tabla 7.1. Frecuencias genotípicas de los SNPs de *FER* y *FOXO3A* en el grupo control; expresado como n (%).

7.1.2. Grupo de neumonías

La cohorte de estudio estaba formada por 1064 pacientes españoles de raza caucásica procedentes de los cinco hospitales participantes, con una media de edad de $62,7 \pm 17,6$ años y predominio de varones. El 39,5% de los pacientes eran fumadores y en el 14,6% de enfermos se recogieron antecedentes de consumo de alcohol u otras drogas. Las comorbilidades, gravedad según la puntuación PSI y complicaciones de toda la cohorte quedan desglosadas en la tabla 7.2.

La mortalidad global fue del 9% ($n = 96$ pacientes) y estaba relacionada con la NAC en el 86% de los casos. En el 48,6% de los enfermos ($n=517$) se documentó el germen causal de la NAC siendo el neumococo el microorganismo identificado con más frecuencia (29% de los pacientes, 59,7% de aislamientos).

En los pacientes ingresados en hospitalización general ($n = 695$), la edad media fue $64,6 \pm 18$ años. No hubo diferencias significativas de mortalidad relacionadas con el sexo aunque sí con la edad (fallecidos vs. supervivientes $82,3 \pm 18$ años vs. $64,1 \pm 18$ años, $p < 0,001$). La mortalidad en este grupo fue del 2,73% .

La media de edad de los pacientes con NAC ingresados en UMI fue $59,2 \pm 16$ años con una proporción significativamente mayor de varones que de mujeres.

Total de pacientes (n = 1064)	
Características demográficas	
Edad (media ± DS)	62,7 ± 17,6
Hombres	703 (66,1)
Comorbilidades	
EPOC	284 (26,8)
Asma	50 (4,7)
Diabetes Mellitus	246 (23,1)
Enfermedad hepática	72 (6,7)
Enfermedad renal	83 (7,8)
Enfermedad cardiovascular	127 (11,9)
VIH	5 (0,4)
Enfermedad autoinmune	37 (3,5)
Neoplasia	110 (10,3)
Enfermedad neurológica	123 (11,5)
Enfermedad psiquiátrica	49 (4,61)
Sin comorbilidad	308 (29,0)
Gravedad	
PSI I-III	446 (42,8)
PSI IV-V	596 (57,2)
Variables clínicas (Media ± DS)	
PaO ₂ /FI ₂	228,78 ± 108,5
Glucemia (mg/dl)	152,9 ± 76
Hematócrito (%)	37,8 ± 5,7
Natremia (mEq/L)	136 ± 9
Temperatura (°C)	37,7 ± 1,8
BUN (mg/dl)	28,0 ± 22,7
Frecuencia cardiaca	102,6 ± 21,8
Complicaciones	
Bacteriemia	136 (12,7)
Derrame pleural	247 (24,4)
Insuficiencia renal aguda	293 (27,6)
Shock	236 (22,2)
SDRA	70 (6,6)
Ventilación mecánica	276 (26,1)
FMO	167 (16,5)
Neumococo	309 (29,0)

Tabla 7.2. Características demográficas y clínicas de la cohorte de pacientes con NAC. Los datos se presentan como n (%), salvo aclaración contraria. Los porcentajes siempre se calcularon a partir de datos no perdidos. DS: desviación estándar.

La tasa de mortalidad en UMI fue de 20,3% (n = 77 pacientes), de los cuales 16 (19,4%) fallecieron dentro de los tres primeros días. Como dato interesante, la mortalidad en la UCI fue del 23,7%, cuando estuvo presente al menos uno de los dos criterios mayores de la *American Thoracic Society* para la NAC grave.

En el análisis univariante, las variables asociadas con una mayor mortalidad en la toda la cohorte de estudio fueron: edad mayor de 65 años, la hepatopatía crónica, la diabetes mellitus, la insuficiencia renal aguda, el SDRA, el desarrollo de shock séptico o disfunción multiorgánica y la necesidad de tratamiento de soporte con ventilación mecánica (tabla 7.3).

Con el fin de identificar los factores pronósticos independientes, se procedió a un análisis multivariante que incluyó a las variables significativas del análisis univariante. Debido a su co-linealidad con diversas variables, las escalas PSI y APACHE II no se incluyeron en el modelo final. Ni la edad ni las comorbilidades se asociaron significativamente con la mortalidad hospitalaria; por el contrario, el desarrollo de insuficiencia renal aguda o shock y el soporte con ventilación mecánica fueron predictores independientes de mortalidad (tabla 7.4).

Total de pacientes (n = 1064)	Supervivientes (n = 968)	Exitus (n = 96)	p
Edad > 65 años	479 (49,5)	58 (60,4)	0,04
Sin comorbilidades	292 (30,2)	16 (16,8)	0,006
Diabetes	216 (22,3)	30 (31,6)	0,04
Enfermedad hepática	57 (5,9)	15 (15,8)	0,001
Insuficiencia renal aguda	228 (23,6)	65 (67,7)	<0,001
Shock	160 (16,5)	76 (80)	<0,001
FMO	119 (12,6)	48 (65,7)	<0,001
FR >30	293 (32,1)	58 (64,4)	<0,001
SDRA	42 (4,4)	28 (29,8)	<0,001
VM	199 (20,8)	77 (81,1)	<0,001

Tabla 7.3. Análisis univariante de las variables asociadas a la mortalidad de la cohorte. FR: frecuencia respiratoria. VM: Ventilación Mecánica.

Total de pacientes (n = 1064)	OR (IC 95%)	p
Insuficiencia renal aguda	2,14 (1,25-3,67)	0,005
Shock	5,79 (2,94-11,40)	<0,001
VM	4,36 (2,24-8,51)	<0,001

Tabla 7.4. Análisis multivariante de los factores pronósticos de mortalidad de la cohorte. VM: Ventilación Mecánica.

El análisis ROC se empleó para establecer el umbral discriminativo (*cut-off*) de mortalidad de las escalas PSI y APACHE II en la cohorte de estudio. Ambas escalas pronósticas superaron al área bajo la curva (AUC) de predicción obtenida para la edad. Las curvas de supervivencia hospitalaria fueron estadísticamente significativas para un *cut-off* >95 de PSI y *cut-off* >15 de APACHE II (p <0,001) (figura 7.1, tabla 7.5).

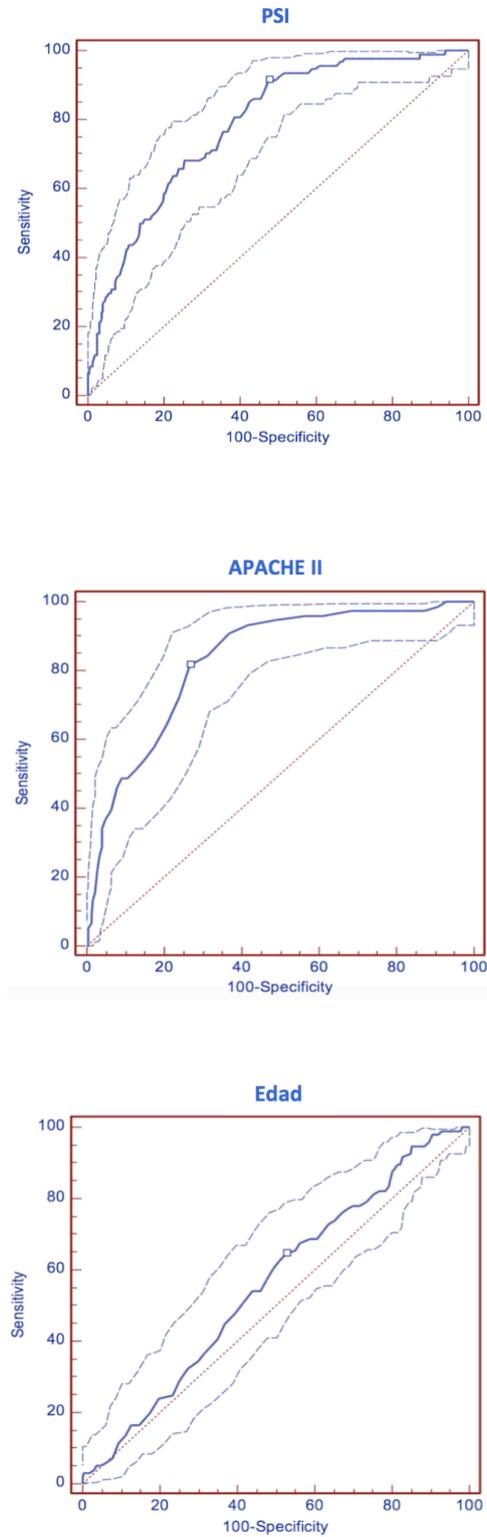


Figura 7.1 Curvas ROC de las escalas de gravedad (PSI, APACHE II) y de la edad para predecir la mortalidad hospitalaria.

	AUC	p	Cut-off	S	E	VPP	VPN	LR+	LR-
PSI	0,787	< 0,001	>95	91,49	52,34	16,1	98,4	1,92	0,16
APACHE II	0,83	< 0,001	>16	81,58	73,23	30,1	96,6	3,05	0,25
Edad	0,56	0,057	> 63	64,58	47,42	10,9	93,1	1,23	0,75

Tabla 7.5. valores de corte y parámetros de diagnóstico para las escalas PSI y APACHE II y la edad como predictores de mortalidad hospitalaria. S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo. LR+ *likelihood ratio* positivo, LR- *likelihood ratio* negativo.

el 71,6% de los pacientes de hospitalización general padecían alguna patología de base. Las enfermedades renal y neurológica fueron las comorbilidades más prevalentes en los pacientes fallecidos (tabla 7.6) aunque en el análisis multivariante no fueron variables predictoras de mortalidad (tabla 7.9). En este grupo de enfermos, cada año de edad incrementaba 1,10 veces el riesgo de fallecer por NAC. La complicación de la NAC con insuficiencia respiratoria aguda, aunque incrementaba 7.35 veces el riesgo de muerte, sólo fue marginalmente significativa (p= 0,057).

Hospitalización general	Supervivientes (n= 676)	Exitus (n= 19)	χ²	p	
Sexo	H	428 (63,3)	13 (68,4)	0,20	ns.
	M	248 (36,7)	6 (31,6)		
Sin Comorbilidad		196 (29,0)	1 (5,3)	5,13	0,023
EPOC		187 (27,7)	8 (42,1)	1,88	ns.
Asma		36 (5,3)	0 (0,0)	1,06	ns.
Diabetes Mellitus		144 (21,3)	5 (26,3)	0,27	ns.
Enfermedad hepática		35 (5,2)	1 (5,3)	0,0	ns.
Enfermedad renal		55 (8,1)	4 (21,1)	3,95	0,047
Enfermedad cardiovascular		85 (12,6)	4 (21,1)	1,18	ns.
Enfermedad autoinmune		23 (3,4)	0 (0,0)	0,67	ns.
Neoplasia		76 (11,3)	2 (10,5)	0,01	ns.
Enfermedad neurológica		83 (12,3)	7 (36,8)	9,86	0,002
Enfermedad psiquiátrica		34 (5,0)	0 (0,0)	1,00	ns.

Tabla 7.6. Datos demográficos y comorbilidades en los pacientes ingresados en hospitalización general. Análisis univariante de supervivencia.

Hospitalización general	Supervivientes (n= 676)	Exitus (n= 19)	p
Edad	64,1 ± 18	82,3 ± 8,8	<0,001
PaO₂/FiO₂	253 ± 106,9	181,59 ± 98,8	<0,027
Glucemia (mg/dl)	145 ± 68,5	155,7 ± 77,7	ns.
Hematócrito (%)	38,5 ± 5,1	35,4 ± 4,9	0,009
Natremia (mEq/L)	136 ± 5	137 ± 5	ns.
Temperatura (°C)	37,9 ± 1,1	37,6 ± 1	ns.
BUN (mg/dl)	22,8 ± 16	34,1 ± 29,8	0,007
Frecuencia cardíaca	93,9 ± 20,2	97,4 ± 30,4	ns.

Tabla 7.7 edad y variables clínicas. en los pacientes ingresados en hospitalización general. Análisis univariante de supervivencia. BUN: Nitrógeno no ureico.

Hospitalización general	Supervivientes (n= 676)	Exitus (n= 19)	X²	p
Insuficiencia respiratoria aguda	357 (52,9)	18 (94,7)	13,03	<0,001
Shock	4 (0,6)	3 (15,8)	42,81	<0,001
SDRA	2 (0,3)	2 (10,5)	33,53	<0,001
Ventilación mecánica	8 (1,2)	3 (15,8)	24,96	<0,001
FMO	9 (1,3)	3 (15,3)	22,72	<0,001
Bacteriemia	53 (7,9)	3 (15,8)	1,57	ns.
Neumococo	182 (26,9)	7 (36,8)	0,91	ns.

Tabla 7.8 Complicaciones en los pacientes ingresados en hospitalización general. Análisis univariante de supervivencia.

Hospitalización general (n = 695)	OR (IC 95%)	p
Edad	1,10 (1,03-1,16)	0,001
Shock	25,73 (2,42-272,64)	0,007
Ventilación mecánica	7,67 (1,47-39,90)	0,015

Tabla 7.9. Análisis multivariante de los factores predictores de mortalidad en hospitalización general.

Las comorbilidades estuvieron presentes en el 69,8% de los enfermos que ingresaron en UMI. El shock, SDRA, necesidad de ventilación mecánica y fracaso multiorgánico fueron complicaciones relacionadas con mayor mortalidad. El valor promedio de APACHE II fue mayor en los pacientes fallecidos (24 ± 6 vs 18 ± 7 puntos, $p < 0,001$). Sólo las complicaciones (shock, FMO) y el uso de soporte con ventilación mecánica fueron predictores independientes de mortalidad en este grupo (tablas 7.10-7.13).

UMI		Supervivientes (n= 292)	Exitus (n= 77)	X ²	p
Sexo	H	204 (69,9)	58 (75,3)	0,88	ns.
	M	88 (30,1)	19 (24,7)		
Sin Comorbilidad		96 (32,9)	15 (19,7)	4,94	0,026
EPOC		67 (23)	22 (28,9)	1,15	ns.
Asma		12 (4,1)	2 (2,6)	0,36	ns.
Diabetes Mellitus		72 (24,7)	25 (32,9)	2,10	ns.
Enfermedad hepática		22 (7,5)	14 (18,4)	8,09	0,004
Enfermedad renal		20 (6,8)	4 (5,3)	0,24	ns.
Enfermedad cardiovascular		28 (9,6)	10 (13,2)	0,82	ns.
Enfermedad autoinmune		14 (4,8)	0 (0,0)	3,78	ns.
Neoplasia		24 (8,2)	8 (10,5)	0,40	ns.
Enfermedad neurológica		26 (8,9)	7 (9,2)	0,00	ns.
Enfermedad psiquiátrica		13 (4,5)	2 (2,6)	0,51	ns.

Tabla 7.10. Pacientes ingresados en UMI. Distribución según sexo y comorbilidades en relación con supervivencia (análisis univariante).

UMI	Supervivientes (n= 292)	Exitus (n= 77)	p
Edad	58,3 ± 16,5	62,7 ± 14,3	0,03
PaO ₂ /FiO ₂	194,5 ± 85,9	206,3 ± 149,1	ns.
Glucemia (mg/dl)	164,6 ± 88,6	164,3 ± 75,5	ns.
Hematócrito (%)	36,8 ± 6,5	36,3 ± 6,9	ns.
Natremia (mEq/L)	135 ± 15	137 ± 7	ns.
Temperatura (°C)	37,4 ± 2,8	37 ± 1,1	ns.
BUN (mg/dl)	34,5 ± 27,4	43,4 ± 31,8	0,01
Frecuencia cardiaca	109,4 ± 21,8	106,9 ± 26	ns.
APACHE II	18 ± 7	24 ± 8	<0,001

Tabla 7.11. Pacientes ingresados en UMI. Supervivencia según edad y variables clínicas (análisis univariante). BUN: Nitrógeno no ureico.

UMI	Supervivientes (n= 292)	Exitus (n= 77)	χ^2	<i>p</i>
Insuficiencia respiratoria aguda	276 (94,5)	75 (97,4)	1,09	ns.
Shock	156 (53,4)	73 (96,1)	46,62	<0,001
SDRA	40 (14,2)	26 (34,7)	16,36	<0,001
Ventilación mecánica	191 (65,6)	74 (97,4)	30,23	<0,001
FMO	110 (41,7)	45 (83,3)	31,15	<0,001
Bacteriemia	70 (24)	10 (13,0)	4,33	0,03
Neumococo	104 (35,6%)	16 (20,8)	6,11	0,01

Tabla 7.12. Pacientes ingresados en UMI. Supervivencia según complicaciones (análisis univariante). Neumococo (identificación microbiológica).

UMI (n = 369)	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Shock	9,72 (2,83-33,36)	<0,001
FMO	3,46 (1,47-8,13)	0,004
Ventilación mecánica	21,85 (2,91-164,03)	0,003

Tabla 7.13. Análisis multivariante de los variables predictoras de mortalidad. Grupo de UMI.

7.2. Susceptibilidad.

Para poder evaluar la influencia de las variables genéticas en el pronóstico de la NAC, se procedió al análisis de las frecuencias alélicas observadas y las esperadas los SNPs de los genes *FER* y *FOXO3A*. Al igual que en el grupo control, la diferencia de frecuencias no fue significativa, por tanto, dichos SNPs también se

encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en la cohorte de pacientes. Igualmente, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas para los SNPs a estudio en los pacientes con NAC con aquéllas observadas en el grupo control (tablas 7.14 y 7.17).

	Controles	NAC	X²	p
rs62375529	C: 247 (13,6)	C: 252 (13,2)	0,15	0,69
	T: 1563 (86,4)	T: 1656 (86,8)		
	n =1810	n =1908		
rs4957796	C: 325 (16,6)	C: 269 (15,1)	1,76	0,18
	T: 1627 (83,4)	T: 1517 (84,9)		
	n =1952	n =1786		
rs12212067	G: 213 (10,5)	G: 193 (9,7)	0,63	0,34
	T: 1825 (89,5)	T: 1795 (90,3)		
	n =2038	n =1988		

Tabla 7.14.- Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados en pacientes con NAC y en grupo Control; expresado como n (%).

7.3. Complicaciones

7.3.1. Sepsis, sepsis grave y shock séptico

Se compararon las frecuencias genotípicas entre los pacientes que presentaron estas complicaciones frente a los pacientes que no las desarrollaron y

grupo control (tablas 7.1 y 7.15). No se observaron diferencias significativas en las frecuencias observadas de los polimorfismos seleccionados de *FER* (rs4957796, rs62375529) y *FOXO3A* (rs12212067).

SNPs - genotipos		NO SEPSIS		SEPSIS NO GRAVE		SEPSIS GRAVE		SHOCK SÉPTICO	
		N	%	N	%	N	%	N	%
FERrs62375529	CC	1	0,5%	6	1,4%	6	5,1%	7	3,7%
	CT	50	24,6%	91	21,7%	23	19,7%	39	20,7%
	TT	149	74,9%	322	76,8%	88	75,2%	142	75,5%
N		200		419		117		188	
FERrs4957796	CC	2	1,1%	9	2,3%	6	5,6%	6	3,4%
	CT	48	25,5%	95	24,0%	24	22,2%	47	26,7%
	TT	135	73,4%	292	73,7%	78	72,2%	123	69,9%
N		185		396		108		176	
FOXO3rs12212067	GG	3	1,6%	8	1,8%	0	0,0%	1	0,5%
	GT	34	17,6%	75	16,9%	22	17,6%	34	16,8%
	TT	157	80,8%	361	81,3%	103	82,4%	167	82,7%
N		194		444		125		202	

Tabla 7.15. Asociación genotipo y sepsis; expresado como N y %.

7.3.2. Bacteriemia

No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de los genotipos de los pacientes que presentaron bacteriemia en comparación con los que no presentaron esta complicación (tabla 7.16).

7.3.3. Síndrome de distrés respiratorio agudo

Al comparar las frecuencias genotípicas en los polimorfismos seleccionados

entre el grupo de pacientes que desarrolló SDRA frente a los que la desarrollaron, las diferencias no alcanzaron significación estadística (tabla 7.16).

7.3.4. Fracaso multiorgánico (FMO)

La distribución de frecuencias genotípicas en el grupo de pacientes que presentó fracaso multiorgánico no fue significativamente diferente a los que no desarrollaron esta complicación (tabla 7.16).

7.3.5. Insuficiencia renal aguda

Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas, en cuanto a las frecuencias genotípicas entre los enfermos con NAC que desarrollaron insuficiencia renal aguda y los pacientes sin dicha complicación, para ninguno de los SNPs estudiados (tabla 7.16).

SNPs - genotipos	Bacteriemia				SDRA				FMO				Insuf Renal aguda				
	no		si		no		si		no		si		no		si		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
FERrs62375529	CC	16	2,0%	4	3,3%	18	2,1%	2	3,5%	13	1,8%	6	4,2%	11	1,6%	9	3,6%
	CT	173	21,6%	30	24,6%	186	21,9%	11	19,3%	167	22,9%	24	16,7%	160	23,9%	42	16,7%
	TT	613	76,4%	88	72,1%	645	76,0%	44	77,2%	548	75,3%	114	79,2%	498	74,4%	200	79,7%
	N	802		122		849		57		728		144		669		251	
FERrs4957796	CC	19	2,5%	4	3,4%	22	2,8%	1	1,8%	17	2,5%	6	4,4%	16	2,6%	7	2,9%
	CT	183	24,5%	31	26,3%	197	24,7%	12	21,8%	169	24,9%	31	23,0%	162	25,9%	51	21,4%
	TT	545	73,0%	83	70,3%	578	72,5%	42	76,4%	493	72,6%	98	72,6%	447	71,5%	180	75,6%
	N	747		118		797		55		679		135		625		238	
FOXO3rs12212067	GG	11	1,3%	1	0,8%	12	1,4%	0	,0%	11	1,4%	1	,7%	9	1,3%	3	1,1%
	GT	140	16,6%	25	20,5%	148	16,8%	14	21,2%	130	17,1%	29	19,1%	123	17,8%	42	15,6%
	TT	692	82,1%	96	78,7%	722	81,9%	52	78,8%	620	81,5%	122	80,3%	560	80,9%	225	83,3%
	N	843		122		882		66		761		152		692		270	

Tabla 7.16 . Asociación genotipo y complicaciones; expresado como N y %.

7.4. Mortalidad

Comparamos las frecuencias genotípicas y alélicas entre el grupo de pacientes con NAC supervivientes y fallecidos sin que se observaran diferencias significativas para ninguno de los polimorfismos estudiados (tabla 7.17).

SNPs - genotipos		CTRL		NAC		Mortalidad 28 días				Exitus			
						no		si		no		si	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
FERrs62375529	CC	21	2,3%	22	2,3%	17	2,0%	3	5,6%	17	2,0%	3	3,8%
	CT	205	22,7%	208	21,8%	194	22,4%	9	16,7%	189	22,3%	14	17,9%
	TT	679	75,0%	724	75,9%	656	75,7%	42	77,8%	640	75,7%	61	78,2%
	N	905		954		867		54		846		78	
FERrs4957796	CC	25	2,6%	24	2,7%	21	2,6%	2	3,8%	21	2,7%	2	2,6%
	CT	275	28,2%	221	24,7%	202	24,9%	12	23,1%	197	25,0%	17	21,8%
	TT	676	69,3%	648	72,6%	587	72,5%	38	73,1%	569	72,3%	59	75,6%
	N	976		893		810		52		787		78	
FOXO3rs12212067	GG	15	1,5%	12	1,2%	12	1,3%	0	,0%	12	1,4%	0	,0%
	GT	183	18,0%	169	17,0%	156	17,3%	9	15,0%	152	17,4%	13	14,6%
	TT	821	80,6%	813	81,8%	734	81,4%	51	85,0%	712	81,3%	76	85,4%
	N	1019		994		902		60		876		89	

Tabla 7.17. Asociación genotipo y mortalidad expresado como N y %. *Exitus*: muertes hospitalarias totales. CTRL (controles).

	Control	NAC	Dominante	Recesivo
rs62375529	N=905 TT=75.0% CT=22.7% Ref=TT	N=954	OR= 1.40	OR= 3.7
rs4957796	N=976 TT=69.3% CT=28.2% Ref=TT	N=893	OR= 1.35	OR=3.31
rs12212067	N=1017 TT=80.6% GT=18.0% Ref=TT	N=994	OR=1.43	OR=6.39

tabla 7.18 comparación NAC vs Controles. Valores detectables de OR para los diferentes SNPs, según modelo dominante o recesivo, para los tamaños de muestra empleados (potencia estadística >85% con umbral de significación 0,05).





Discusión



Un aspecto relevante de esta Tesis fue proporcionar datos clínicos y epidemiológicos propios y actualizados, así como identificar factores predictores de mortalidad a partir de una cohorte de pacientes adultos hospitalizados por NAC. La relevancia del estudio es su diseño (multicéntrico y prospectivo), la homogeneidad de la población (caucásica y de nacionalidad española) y el tamaño de la cohorte (n=1069), requisitos previos para no limitar metodológicamente la validez de los resultados nuestro estudio genético y comparar los hallazgos epidemiológicos y clínicos con los aportados por la literatura médica

En nuestra cohorte, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) es el principal agente causal de la NAC que requiere ingreso hospitalario. Diversos estudios centrados en la epidemiología de la neumonía neumocócica, defienden que aunque las comorbilidades tengan relevancia en la evolución del paciente, su influencia se pondera en exceso sobre la gravedad de las manifestaciones clínicas (121,122). Por otra parte, los diferentes escalas pronósticas utilizadas en la práctica clínica (PSI, APACHE II, etc.) no incluyen a la etiología de la NAC o a la bacteriemia como variables pronósticas relevantes.

Con la finalidad de aportar información complementaria y atenuar las limitaciones pronósticas de estas escalas, algunos estudios se tratan de identificar nuevas variables clínico-analíticas como la elevación de la proteína C reactiva (123,124), la hipoalbuminemia (124,125) o el uso previo de antibióticos (126). Otros autores diseñan sistemas multivariados para la toma de decisiones. Así recientemente, Cillóniz et al. en un estudio prospectivo con 372 pacientes con diagnóstico de NAC en un servicio de urgencias, el riesgo de bacteriemia era

elevado en aquellos enfermos ≥ 50 años, con dolor pleurítico y valores de proteína C reactiva ≥ 22.945 mg/dl; la probabilidad de bacteriemia fue 49,4% cuando concurrían estos tres factores de riesgo y 0,7% cuando ninguno de ellos estaba presente (127). El diagnóstico etiológico se estableció en 124 (33%) casos y el patógeno más frecuentemente aislado en su serie fue *S. pneumoniae* (50% de los pacientes)

Papel de la bacteriemia en el pronóstico

La bacteriemia tradicionalmente se ha asociado con mal pronóstico en los pacientes con NAC. En un estudio de la NAC en la era pre-antibiótica, Tilghman et al. llamó la atención sobre la alta mortalidad en adultos con neumonía neumocócica bacteriémica (78%), en comparación con 28% en aquellos con neumonía neumocócica no bacteriémica. Ya en la década de los 60, Austrian y Gold reportaron una tasa de mortalidad del 17% en los adultos con neumonía neumocócica bacteriémica tratados con penicilina (128); durante las últimas cinco décadas esta tasa de mortalidad se ha mantenido estable y sin grandes cambios (129).

En nuestra población de estudio, El 12,7% de los pacientes (hospitalización vs UMI 8,1 vs. 21,7%) presentaron bacteriemia. La mortalidad de toda la cohorte no estuvo asociada a dicha complicación, sin embargo, el análisis univariante del grupo de UMI mostró diferencias en la mortalidad relacionadas con la bacteriemia (*exitus* vs. supervivientes 13,0 vs. 24,0%, $p= 0,003$).

S. pneumoniae es el principal patógeno responsable de NAC bacteriémica y la bacteriemia es más forma invasiva más frecuente de NAC neumocócica y enfermedad neumocócica invasiva (ENI) (128,130). La prevalencia de la colonización nasofaríngea, invasividad e incidencia de la enfermedad neumocócica difiere según serotipos de *S. pneumoniae* (131,132) Existen evidencias de que la distribución de serotipos varía con la edad del paciente y que la invasividad por *S. pneumoniae* no significa necesariamente virulencia o letalidad (133). Los serotipos "con baja invasividad" (serotipos L o *low invasiveness*) habitualmente son responsables de más altas tasas de letalidad (CFR). Lujan et al. (134) demostraron en una serie prospectiva de 299 casos de neumonía neumocócica bacteriémica que el aislamiento de "serotipos L" de neumococo (3, 6A, 6B, 8, 19F, y 23F) fue un factor de riesgo independiente de mortalidad a 30 días (OR 7.02, 95% CI 1.72–28.61). Conclusiones similares se aportaron en un meta-análisis sobre neumonía neumocócica bacteriémica, señalando al serotipo como un factor predictor independiente de mortalidad (132). Así, aquellos serotipos asociados a una mayor de riesgo de mortalidad (3, 6A, 6B, 9N y 19F) tendían a una mayor prevalencia de portadores nasofaríngeos, a baja invasividad y estaban, en mayor medida, encapsulados *in vitro* (131). Marrie et al. (130) demostraron que en una cohorte de 1154 pacientes con ENI, 163 enfermos (14,1%) murieron dentro de los primeros 30 días y más de la mitad (62,6%) de las muertes ocurrieron en los primeros 5 días de ingreso, siendo el serotipo infectante de alta mortalidad ($\geq 20\%$ de letalidad) uno de los factores que contribuyeron a la mortalidad precoz (5 primeros días de ingreso).

En nuestro grupo de UMI, 18 pacientes (23,3%) fallecieron en los 5 primeros días, todos con puntuaciones de FINE 4 ó 5 y APACHE II \geq 17; el diagnóstico microbiológico se obtuvo en 9 enfermos (6 de ellos neumococo) con un sólo caso de NAC neumocócica bacteriémica.

Dado que la mortalidad, en el grupo de pacientes de UMI, no pudo atribuirse a una mayor comorbilidad (19,7% vs 32,9%, $p= 0,026$) ni a mala adherencia al cumplimiento terapéutico, la NAC por serotipos de *S. pneumoniae* de baja invasividad/alta letalidad podrían estar implicados en parte de la mortalidad microbiológicamente “oculta” de este grupo.

En nuestra cohorte global hubo diferencias significativas en la media de PSI entre los pacientes con bacteriemia y sin bacteriemia ($p < 0,001$), sin embargo, al completar el estudio de variables con el análisis multivariante, la bacteriemia no demostró ser un factor independiente de predicción de supervivencia, observación similar a la realizada por otros autores (121,135). Esto parece resaltar la importancia de los factores del huésped en la evolución de la enfermedad y, a su vez, limite la relevancia de la bacteriemia y la relación entre el serotipo neumocócico y mortalidad (123,129,135).

Comorbilidades en el pronóstico de la NAC

Una característica de nuestro estudio fue la alta prevalencia de comorbilidades (71,6% en hospitalización, 69,8% en UMI); sin embargo no demostraron tener relevancia pronóstica ni en la cohorte total ni en el análisis por

grupos (hospitalización general vs. UMI) de los enfermos. Otros autores han llegado a conclusiones similares en cohortes multicéntricas de pacientes con NAC (121,122); en ellas, el pronóstico de la NAC fue dependiente sólo de las complicaciones relacionadas con la sepsis y las asociadas al ingreso en una UMI así como de la elección de un tratamiento antimicrobiano adecuado. En nuestro estudio, el 96,6% de los pacientes recibió antibióticos según las guías ATS/IDSA.

Edad y pronóstico del paciente con NAC

La NAC es una enfermedad vinculada a las edades extremas. En nuestra cohorte de pacientes con NAC y en concordancia con otros estudios, la edad fue una variable asociada significativamente a mayor mortalidad en los pacientes ingresados en hospitalización general.

La edad es un fuerte predictor de mortalidad incluso en pacientes sin comorbilidades (129). Aunque esta susceptibilidad podría deberse a comorbilidades no identificadas otra explicación plausible es la inmunosenescencia. El envejecimiento se asocia con cambios en la respuesta inmune innata y adaptativa, tales como una alteración funcional de macrófagos con deficiente procesamiento y presentación de antígenos a células T, un cambio de respuesta de citoquinas TH1 a TH2 o una menor producción de anticuerpos tras vacunación frente a la gripe (136). A nivel experimental, los macrófagos de ratones senescentes poseen una respuesta pro-inflamatoria defectuosa frente a *S. pneumoniae* (producen menos TNF α , IL-1 β e IL-6 tras señalización por TLR-2)

(137). Estos defectos de señalización TLR-dependientes relacionados con la edad contribuiría a explicar, de ser extrapolable a humanos, la mayor susceptibilidad a la NAC en las personas de edad avanzada.

Papel de los estudios genéticos de susceptibilidad en la NAC.

El sistema inmunitario es muy eficiente desde una perspectiva poblacional y, en conjunto, la especie humana puede considerarse inmunocompetente, como queda acreditado por la supervivencia de la especie durante más de 200.000 años a pesar de la abundancia y diversidad de microorganismos. Sin embargo, desde el punto de vista individual, el sistema inmune es más deficiente que otros sistemas fisiológicos y los defectos innatos de la inmunidad son más la norma que la excepción. A pesar de una adaptación gradual evolutiva de nuestros genes, la mayoría de los individuos son y son intrínsecamente vulnerables a las infecciones.

(48)

Desde una perspectiva evolucionista, los agentes patógenos han ejercido una poderosa influencia en la diversidad genética humana. En el caso particular de la NAC, diversas razones hacen que el conocimiento de los aspectos genéticos sea de gran interés: *a)* la variabilidad genética puede ser un factor de riesgo y un indicador pronóstico (p. ej., desarrollo de sepsis, fracaso multiorgánico); *b)* el estudio de los genes ayudará a identificar vías patogénicas y descubrir las bases moleculares de la respuesta a los fármacos (farmacogenética) y *c)* los genes pueden representar, en un

futuro próximo, una diana en el tratamiento (terapia génica).

Hay *estudios* bien conocidos de *agregación familiar*, fundamentalmente en inmunodeficiencias primarias, en las que un patrón de herencia monogénico define a un fenotipo con susceptibilidad a infecciones habitualmente graves.

Los *estudios epidemiológicos* apoyan el papel determinante de la herencia en el pronóstico de la infección. Una de las primeras observaciones que avalaron esta posibilidad fueron los estudios de adopción de Sorensen y colaboradores que encontró en una larga cohorte de adultos que el riesgo de muerte prematura por causa infecciosa era elevado cuando alguno de sus padres habían fallecido por infecciones (49). Por tanto, la capacidad de respuesta de la inmunidad a una infección estaría determinada por las diferencias genéticas entre los individuos que, a su vez, podrían explicar la diversidad de manifestaciones clínicas entre individuos. Tal es el caso de la sepsis, que representa una respuesta inflamatoria aguda no específica y desproporcionada frente a una presunta o comprobada infección por diversos microorganismos y puede evolucionar a la disfunción orgánica múltiple y muerte del sujeto que la padece.

Los *estudios de asociación genética* han sido los más utilizados y con mayor éxito en la detección de factores genéticos de susceptibilidad a enfermedades complejas o poligénicas. Aunque su diseño admite múltiples variaciones, en esencia en estos estudios se trata de elegir un gen candidato, cuya principal característica es que tenga importancia funcional, para posteriormente identificar algunos de sus polimorfismos y analizar si los alelos de esos *loci* polimórficos se asocian con un

rasgo fenotípico determinado o con la frecuencia de una enfermedad. La asociación entre el genotipo y el fenotipo se realiza a través de asociaciones estadísticas.

Sin embargo, los estudios de asociación genética, en la sepsis, han aportado evidencias contradictorias sobre el efecto de un polimorfismo concreto, lo que dificulta la replicación de los resultados .

Los *estudios de asociación de genoma completo* (GWAS) se basan en una aproximación diferente: explorar todo el genoma sin hipótesis previa, es decir, sin necesidad de elegir previamente los genes candidatos, proporcionando un método razonablemente no sesgado para encontrar factores de riesgo genético para la enfermedad.

Recientemente Rautanen et al. identificaron un polimorfismo no sinónimo (SNP rs4957796 C→T) en el gen *FER*, como una variante genética común con relevancia pronóstica, en el primer estudio de tipo GWAS publicado sobre supervivencia en sepsis secundaria a neumonía (99). En el estudio, basado en un meta-análisis de tres cohortes independientes y posterior replicación en una cuarta cohorte, la expresión del alelo menor *C*, con una frecuencia casi el 20% de la población europea, se asoció con una reducción de la mortalidad por sepsis secundaria a neumonía con un efecto inusualmente fuerte en comparación con los riesgos genéticos habitualmente detectados en otros rasgos complejos. Es importante señalar que se redujo la asociación entre SNPs y supervivencia cuando se descartaron los casos de sepsis asociadas a neumonía sin patógeno responsable; esto que indicaría un mayor tamaño de efecto e implicaría que causas no infecciosas

de infiltrados pulmonares (vg. SDRA), no constituirían un factor de confusión para el efecto observado.

El SNP identificado en el gen *FER* es intrónico; este hecho es muy común ya que alrededor del 80% de las variantes de riesgo identificadas en los GWAS sobre enfermedades complejas residen en regiones intergénicas o regiones intrónicas no codificantes.

Sin embargo, la falta de evaluación funcional del SNP identificado en el trabajo de Rautanen y colegas solo permite establecer una aproximación al mecanismo de la enfermedad. El gen *FER* codifica para un receptor tirosin-kinasa (TK) no transmembrana de expresión ubicua. Mediante su acoplamiento a receptores de factores de crecimiento, esta TK interviene en la maquinaria contráctil de la actina y miosina, regulando procesos celulares (adhesión célula-célula, quimiotaxis de neutrófilos) relacionados, al menos, con la inmunidad innata del huésped frente a patógenos.

Por otra parte, encontrar una asociación significativa no implica que ese polimorfismo genético sea el responsable del efecto clínico estudiado. Ello se debe a que los genes que se encuentran muy próximos tienden a heredarse en bloque, (desequilibrio de ligamiento, figura 7.1) y, por tanto, el polimorfismo en cuestión puede que sólo sea un marcador de la variabilidad genética en otra posición del mismo gen o de otro gen vecino que pudieran ser los verdaderos responsables del fenotipo estudiado. Por ello, cuando se encuentra una asociación entre una enfermedad y un determinado SNP de un gen, se deben investigar otros SNPs en la

misma región y comparar la fuerza de la asociación con diferentes combinaciones de polimorfismos ligados o haplotipos. En el caso de la NAC y sepsis secundaria es de gran importancia dado que es la combinación de diferentes polimorfismos y la interacción entre los factores genéticos y los ambientales es lo que muy probablemente determine las diferencias en la susceptibilidad y formas de presentación de la enfermedad.

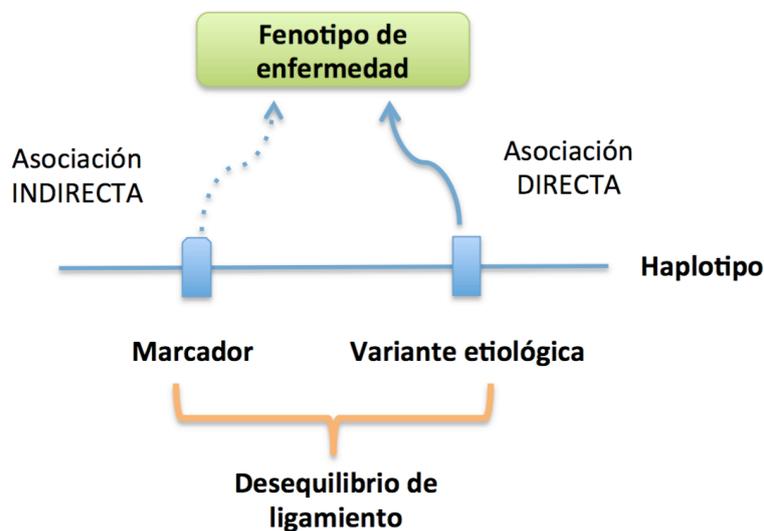


Figura 8.1: Estudios de asociación. (adaptada de ref. 138)

En la selección de casos y controles en los GWAS, además de considerar los criterios diagnósticos bien definidos de la enfermedad que se está investigando, es fundamental que la selección se realice dentro del mismo grupo étnico. Recientemente, Hirschhorn et al, en un análisis sistemático de la bibliografía en relación con los estudios de asociación refieren que uno de los errores más frecuentes que determina la aparición de falsos positivos (error estadístico tipo 1),

son las diferencias étnicas entre los casos y los controles, lo cual demuestra la importancia de tales replicaciones para corroborar la validez de un factor de susceptibilidad. En el estudio de Rautanen et al. no hay información específica sobre el grado de homogeneidad étnica de los participantes en el estudio (139).

En nuestro estudio, cuando analizamos la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en relación al pronóstico no encontramos asociación significativa entre las variantes de los SNPs estudiados (rs4957796, rs62375529, rs1221206) con la supervivencia. Estos resultados, respecto al SNP rs4957796 del gen *FER*, son concordantes con los recientemente publicados por Shönenweck y col. (100) que, con 298 pacientes sepsis secundaria a neumonía, no pudieron replicar los resultados del estudio de Rautanen et al.; sin embargo, el estudio de Shönenweck, en su replicación, sólo incluían a pacientes con sepsis grave y estaba limitado a la mortalidad. Nuestro estudio amplía el análisis a un grupo de pacientes con NAC sin sepsis grave lo que nos permitió evaluar una posible asociación entre dicho SNPs con diferencias en la predisposición a formas más graves (NAC con sepsis grave y shock, séptico) bacteriemia y complicaciones (SDRA, FMO). No encontramos una asociación del SNPs rs4957796 ni de los otros SNPs incluidos en estudio (rs4957796, rs62375529, rs1221206) con la predisposición a formas más graves de la enfermedad ni con la susceptibilidad a la NAC. Para el caso de estas variantes génicas en el estudio de las NAC, el tamaño de la muestra fue suficiente para detectar diferencias estadísticamente significativas una potencia estadística > 85% ($\alpha = 5\%$).

No existe una explicación simple para estas discordancias; aunque la susceptibilidad a la NAC, sepsis grave y shock séptico pudiera estar genéticamente determinada, el fenotipo identificable sería consecuencia de interacciones complejas entre factores exógenos (tipo y virulencia del microorganismo, tamaño del inóculo, adecuación del tratamiento antibiótico empírico inicial, etc.) y endógenos (edad, sexo, malnutrición, comorbilidades, etc.) con el genotipo. Por ello, es difícil determinar la contribución que tiene un SNP, u otros SNPs en el mismo gen, en el contexto de otros muchos factores que pueden no ser fáciles de controlar en estudios clínicos.

En todo caso, conviene resaltar que los GWAS están originariamente diseñados para detectar nuevos hallazgos biológicos; en el caso particular de los SNPs de nuestro estudio, no poder replicar sus resultados cuestionan su utilidad clínica en la prevención, elección de tratamiento o estratificación de riesgo (100).

En general, el hecho de que el fenotipo de un individuo dependa de la combinación específica de alelos en dos o más *loci*, podría sugerir que éste se debiera a la interacción o epistasis entre dichos alelos. Tal sería el caso de los SNP sinónimo (rs12212067T → G) identificado en el gen *FOXO3A*, cuya expresión está asociada a una evolución más benigna de enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias (enfermedad de Crohn y artritis reumatoide) aunque con un mayor riesgo de desarrollar formas graves de ciertas infecciones como la malaria (112). En nuestro estudio no demostramos diferencias significativas en la susceptibilidad y/o evolución de la NAC ligadas a la expresión de dicho SNP, aunque

podría atribuirse a que el efecto de dicho SNP adquiriera mayor relevancia ante ciertos tipos de infección (140).

En este sentido, lo deseable sería que, en un contexto clínico equiparable, todo factor genético de susceptibilidad o protección fuera valorable en cualquier cohorte independiente incluso para un escaso número de pacientes.

Si tenemos en cuenta todos los factores mencionados previamente y los resultados de los GWAS, se puede comprender la confusión reinante respecto al papel que desempeñan determinados polimorfismos en el efecto biológico o riesgo de enfermedad.

El presente estudio presenta varias virtudes. En primer lugar, se trata de un estudio multicéntrico y con un amplio tamaño muestral, con lo que se minimizan los errores tipo II y facilita la extrapolación de los resultados a otras instituciones. En segundo lugar, las poblaciones estudiadas son étnicamente homogéneas. Es bien conocido que la frecuencia de los diferentes SNPs varía según las diferentes etnias (141), de manera que si un grupo étnico está predispuesto a desarrollar una enfermedad por razones exclusivamente socioculturales, todo polimorfismo que se observe con más frecuencia en esa población tenderá a asociarse con la enfermedad, y por tanto, se pueden encontrar “asociaciones genéticas” que pueden reflejar simplemente diferencias étnicas y no la existencia de genes de susceptibilidad. El hecho de que en nuestro estudio todos los sujetos fueran españoles de raza caucásica, da consistencia a los resultados. En tercer lugar, el fenotipo estudiado es homogéneo, lo que es un aspecto clave en cualquier estudio cuyo objetivo sea

detectar los genes asociados a un fenotipo clínico. Aunque esto puede ser relativamente fácil en algunas enfermedades, es más complicado de establecer en otros cuadros infecciosos, como la sepsis, cuyas manifestaciones clínicas, evolución y etiología pueden ser muy variables. Sin embargo, la NAC ofrece la oportunidad de estudiar un grupo de pacientes con una menor incertidumbre diagnóstica y menor variabilidad en cuanto al agente etiológico. En cuarto lugar y a diferencia del estudio de Rautanen et al., en nuestra replicación evaluamos -por separado- la asociación de los SNPs del gen *FER* con cada una de las formas de gravedad de la sepsis relacionada con la NAC (sepsis, sepsis grave y shock séptico).

Si bien estos genotipos no se asociaron a una mayor tasa de bacteriemia, el escaso número de pacientes con esta complicación no permite extraer conclusiones definitivas. Tampoco pudo observarse ninguna relación entre el genotipo y la predisposición a la infección por patógenos específicos.

Por otra parte, hay algunas limitaciones que deben ser mencionadas. Aunque se siguieron unas pautas de antibioterapia para la NAC y protocolo de manejo de la sepsis y del shock séptico de acuerdo a las recomendaciones vigentes, ciertas variables no controladas pudieran haber influido en el pronóstico (infusión de líquidos, administración de Proteína C recombinante etc.), En segundo lugar, aunque la muestra estudiada es muy importante, el estudio puede aún puede tener un limitado poder estadístico para detectar diferencias pequeñas aunque significativas. Los GWAS han identificado cientos de variantes genéticas que se asocian a enfermedades complejas y que, en la mayoría de los casos, sólo confieren



pequeños incrementos de riesgo. Parece que hay un gran componente de heredabilidad que, de alguna manera, aún evade cualquier posibilidad de detección. Entre las posibles explicaciones para este "heredabilidad ausente" se incluirían, la existencia de un gran número polimorfismos con un efecto pequeño aún no encontrados o la presencia de variaciones estructurales o epigenéticas raras aún no detectables por la tecnología de genotipado actual (142).

Un hecho inherente a todas las enfermedades complejas, como son las enfermedades infecciosas, es que la magnitud del efecto de una variante polimórfica sobre el fenotipo es generalmente débil y dependiente de las interacciones con otros genes o entre los genes y factores ambientales de difícil detección. De hecho, la situación clínica más probable sería la existencia de múltiples mutaciones, con efectos menores en la producción de las moléculas implicadas o en su función pero que, en conjunto condicionarían una mayor repercusión en la defensa frente a la infección. Averiguar la relativa contribución y la interacción entre todos estos polimorfismos, y otros aún no determinados, requeriría una extensa base de datos genética y clínica.

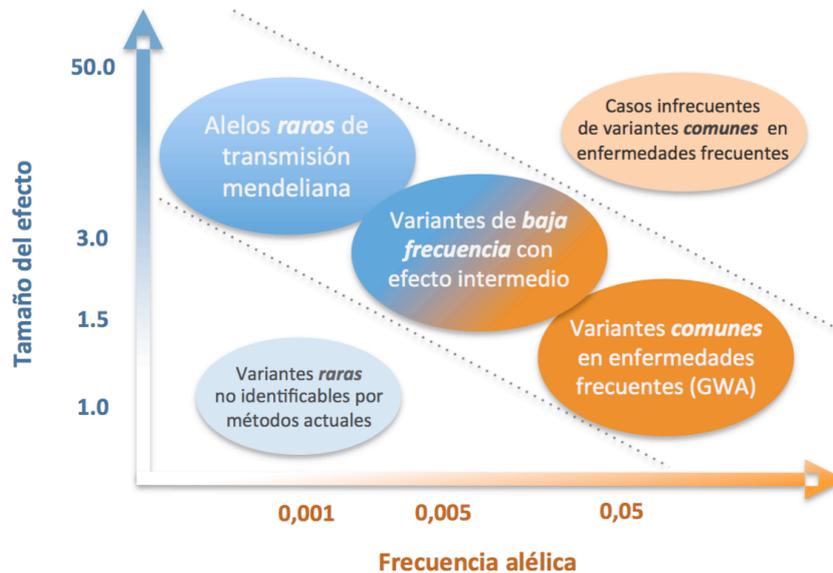


Fig 8.2. Variantes genéticas de según frecuencia alélica y fuerza del efecto genético (odds ratio). El mayor énfasis e interés radica en la identificación de las asociaciones con las características que se muestran entre líneas diagonales de puntos. Adaptado de Manolio con autorización, ref 142)

Por tanto, los retos más inmediatos en la genética de las enfermedades infecciosas deberán centrarse en: 1) descifrar genéticamente nuevas IDP monogénicas graves; 2) investigar la frecuencia de alelos mórbidos y su penetrancia clínica real; 3) explorar las interacciones entre el genoma humano y los genomas de los microorganismos; 4) profundizar en las bases mendelianas de la resistencia a infecciones víricas graves (gripe aviar, ébola, etc); 5) analizar el componente hereditario de las infecciones del adulto, considerando aspectos inmunológicos y epigenéticos; 6) estudiar genéticamente la relación entre numerosas infecciones pediátricas órgano-específicas y la contribución de la inmunidad intrínseca. Todo ello nos permitirá profundizar en el papel fisiológico y patológico de células y moléculas, proporcionar consejo genético a las familias afectadas y desarrollar



tratamientos más específicos y con abordajes diferentes. La administración de IFN- γ exógeno en pacientes con micobacteriosis es solo un ejemplo (54).



Conclusiones

Nuestros resultados no respaldan que los SNPs estudiados los genes *FER* y *FOXO3A* jueguen algún papel en la susceptibilidad ni en el pronóstico de la NAC.

Así pues, podemos concluir que:

1. La expresión del SNP *rs4957796* del gen *FER* no se asocia a una diferente susceptibilidad, al desarrollo de sepsis en sus diferentes formas de gravedad ni a diferencias en la mortalidad en los pacientes hospitalizados por NAC .
2. La expresión del SNP *rs62375529* del gen *FER* no determina cambios significativos en susceptibilidad, desarrollo de sepsis en sus diferentes formas de gravedad ni en la mortalidad en los pacientes hospitalizados por NAC
3. La expresión del SNP *rs12212067* del gen *FOXO3A* no se asocia significativamente a una diferente susceptibilidad, al desarrollo de sepsis en sus diferentes formas de gravedad ni distinta mortalidad en los pacientes hospitalizados por NAC



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



Bibliografía

1. Rodríguez de Castro F, Zalacaín Jorge R. Neumonía adquirida en la comunidad. En: Alvarez-Sala Walter JL, Casán Clará C, Rodríguez de Castro F, Rodríguez Hermosa JL, Villena Garrido V, editores. *Neumología Clínica*, Barcelona: Elsevier; 2010. p. 279-88
2. Armitage K, Woodhead M. New guidelines for the management of adult community-acquired pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 20:170–17
3. Niederman MS. Community-acquired pneumonia: the U.S. perspective. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009;30:179-88.
4. Hoyert DL, Xu JQ. Deaths: Preliminary data for 2011. National vital statistics reports; vol 61 no 6. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2012
5. Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, Kallinen S, Kleemola M, Koskela M, et al. Microbial etiology of community-acquired pneumonia in the adult population of 4 municipalities in eastern Finland. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1141–54
6. Almirall J, Bolívar I, Vidal J, Sauca G, Coll P, Niklasson B, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. *Eur Respir J*. 2000; 15:757-63.
7. Menéndez R, Torres A, Aspa J, Capelastegui A, Prat C, Rodríguez de Castro F. Neumonía adquirida en la comunidad. Nueva normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). *Arch Bronconeumol*. 2010;46(10):543–558.
8. Almirall J, Bolibar I. Aspectos epidemiológicos no resueltos de la neumonia adquirida en la comunidad en adultos (Non resolved epidemiological aspects of community-acquired pneumonia in adults). *Med Clin* 1998; 111:216-7.

9. Gibson G, Loddenkemper R, Sibille Y, Lundbäck B, editores. European Lung White Book. European Respiratory Society and European Lung Foundation, Comprehensive Survey on Respiratory Health in Europe. Bruselas: ERSJ Ltd; 2013.
10. Gutiérrez F, Masia M, Mirete C, Soldan B, Rodríguez JC, Padilla S, et al. The influence of age and gender on the population-based incidence of community-acquired pneumonia caused by different microbial pathogens. *J Infect.* 2006;53:166–74.
11. Falagas ME, Mourtzoukou EG, Vardakas KZ. Sex differences in the incidence and severity of respiratory tract infections. *Respir Med.* 2007;101:1845–63.
12. Loddenkemper R, Gibson G, Sibille Y, editores. European Lung White Book. European Respiratory Society and European Lung Foundation, The First Comprehensive Survey on Respiratory Health in Europe. Bruselas: ERSJ Ltd; 2003.
13. Welte T, Kohnlein T. Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009;30:127–35.
14. Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, Kallinen S, Karkola K, Korppi M, et al. Incidence of community-acquired pneumonia in the population of four municipalities in eastern Finland. *Am J Epidemiol.* 1993;137:977–88.
15. Chacón García A, Ruigómez García Rodríguez LA. Incidencia de neumonía adquirida en la comunidad en la cohorte poblacional de la base de datos en atención primaria (BIFAP). *Aten Primaria.* 2010;42(11):543–551.

16. Montes-Santiago J, Machado B, Pérez A, Rodríguez X, Rodil V, Rey G. Hospitalizaciones y mortalidad por neumonía en España: Variaciones geográficas e influencia de los factores económicos sanitarios. *Rev Clin Esp.* 2013;213(Espec Congr):226.
17. Trotter CL, Stuart JM, George R, Miller E. Increasing hospital admissions for pneumonia, *England. Emerg Infect Dis.* 2008;14:727-33.
18. Niederman MS, Luna CM. Community-Acquired Pneumonia Guidelines: A Global Perspective. *Semin Respir Crit Care Med* 2012;33:298-310. .
19. Pascual FE, Matthay MA, Bacchetti P, Wachter RM. Assesment of prognosis in patients with community-acquired pneumonia who require mechanical ventilation. *Chest* 2000; 117: 503-512.
20. Sabatier C, Peredo R, Villagrà A, et al. Neumonía comunitaria grave. Estudio descriptivo de 7 años y utilidad de los criterios de la Infectious Diseases Society of America y la American Thoracic Society 2007 en la identificación de los pacientes que requieren ingreso en una unidad de cuidados intensivos. *Med Intensiva* 2010;34:237-45.
21. Wilson PA, Ferguson J. Severe community-acquired pneumonia: an Australian perspective. *Intern Med J.* 2005 Dec;35(12):699-705.
22. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *JAMA* 1996; 275:134-14.
23. World Health Organization, Department of Health Statistics and Informatics. Estimates of Deaths by Cause for the Year 2008. 2008.

- http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf. Accessed May 30, 2012
24. Patrones de mortalidad en España, 2012. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015.
 25. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Indicadores de Salud 2013. Evolución de los indicadores del estado de salud en España y su magnitud en el contexto de la Unión Europea. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2014.
 26. Moine P, Vercken JB, Chevret S, Chastang C, Gajdos P and the French Study Group for Community-Acquired Pneumonia in the Intensive Care Unit. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology and prognosis factors. *Chest* 1994;105:1487-1495.
 27. Pachon J, Prados MD, Capote JA, Cuello JA, Garnacho J, Verano A. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, prognosis and treatment. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:369-373.
 28. Leroy O, Santré C, Beuscart C, Georges H, Guery B, Jacquier JM et al. A five-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on prognosis in patients admitted to an intensive care unit. *Intensive Care Med* 1995; 21:24-31.
 29. Díaz A, Álvarez M, Callejas C, Rosso R, Schnettler K, Saldías F. Cuadro clínico y factores pronósticos de la neumonía adquirida en la comunidad grave en adultos hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(1):20-6.

30. Örtqvist A, Hedlund J, Grillner L, et al. Aetiology, outcome and prognostic factors in community-acquired pneumonia requiring hospitalisation. *Eur Respir J* 1990; 3:1105- 1113.
31. Almirall J, Mesalles E, Klamburg J, Parra O, Agudo A. Prognostic factors of pneumonia requiring admission to the intensive care unit. *Chest* 1995;107:511-516..
32. Subdirección General de Información Sanitaria e Innovación Estadísticas Comentadas: La hospitalización de las personas mayores en el Sistema Nacional de Salud. CMBD – Año 2010[Publicación en Internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2012.
33. Riquelme R, Torres A, El-Ebiary M, De la Bellacasa JP, Estruch R, Mensa J, Fernández-Solá J, Hernández C, Rodríguez-Roisin R. Community-acquired pneumonia in the elderly: A multivariate analysis of risk and prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154: 1450-5
34. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007;44(Suppl 2):S27-72.
35. Liapikou A, Ferrer M, Polverino E, Balasso V, Esperatti M, Piñer R, et al. Severe community-acquired pneumonia: validation of the Infectious Diseases Society of America/ American Thoracic Society Guidelines to predict an intensive care unit admission. *Clin Infect Dis* 2009;48:377-85

36. Neill AM, Martin IR, Weir R, Chereshsky A, Epton MJ, Jackson R, Schousboe M, Frampton C, Hutton S, Chambers ST, Town GI. Community acquired pneumonia: aetiology and usefulness of severity criteria on admission. *Thorax* 1996;51:1010-6.
37. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336:243-250.
38. Lim WS, Van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI. et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* 2003; 58:377-382.
39. Lim WS, Baudouin S, George R, Hill A, Jamieson C, Le Jeune I, et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax* 2009;64:iii1-iii55.
40. Aujesky, D, Fine MJ. "The pneumonia severity index: a decade after the initial derivation and validation." *Clin Infect Dis* 2008;47: S133-139.
41. Aujesky D, Auble TE, Yealy DM, Stone RA, Obrosky DS, Meehan TP, Graff LG, Fine JM, Fine MJ. Prospective comparison of three validated prediction rules for prognosis in community-acquired pneumonia. *Am J Med.* 2005;118:384-92.
42. Myint P K, Kamath A V, Vowler S L, Maisey D N, Harrison B D. The CURB (confusion, urea, respiratory rate and blood pressure) criteria in community-acquired pneumonia (CAP) in hospitalised elderly patients age 65 years and over: a prospective observational cohort study. *Age Ageing* 2005; 34: 75-7

43. Capelastegui A, España PP, Quintana JM, Areitio I, Gorordo I, Egurrola M, Bilbao A. Validation of a predictive rule for the management of community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2006; 27: 151-7.
44. Man SY, Lee N, Ip M, Antonio G E, Chau S S, Mak P, Colin A Graham CA, Zhang M, Lui G, Chan PKS, T Ahuja AT, David Hui DS, Sung JJY, Rainer TH. Prospective comparison of three predictive rules for assessing severity of community-acquired pneumonia in Hong Kong. *Thorax* 2007; 62: 348-53
45. Rodríguez A, Lisboa T, Blot S, Martin-Loeches I, Solé-Violan J, De Mendoza D, Rello J; Community-Acquired Pneumonia Intensive Care Units (CAPUCI) Study Investigators. Mortality in ICU patients with bacterial community-acquired pneumonia: when antibiotics are not enough. *Intensive Care Med.* 2009; 35:430-8.
46. Rodríguez de Castro F, Solé Violán J, Rodríguez Gallego JC. Genética e Infecciones Respiratorias. En: Prados Sánchez C y Rajas Naranjo O. Infecciones Respiratorias. Monografías Neumomadrid. Madrid 2015 Vol XXII 141-55.
47. Casanova JL, Abel L. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. *J Exp Med.* 2005; 202: 197-201.
48. Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *Journal of Clinical Investigation* 2009;9: 2506-2514.
49. Sorensen, T.I., G.G. Nielsen, P.K. Andersen, and T.W. Teasdale. 1988. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N. Engl. J. Med.* 318:727-732.

50. Picard C, Casanova JL, Abel L. Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in humans. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18: 383-90.
51. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS et al. Primary Immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124: 1161-78.
52. Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 55-66.
53. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1941-9.
54. Casanova JL, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013; 14: 215-43.
55. Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science.* 2003; 299: 2076-9.
56. von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science.* 2008; 321: 691-6.
57. Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, et al. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore).* 2010; 89: 403-25.
58. Casanova JL, Abel L. Human genetics of infectious diseases: a unified theory. *EMBO J.* 2007; 26: 915-22.

59. Abel L, Baghdadi JE, Bousfiha AA, Casanova JL, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Phil Trans R Soc B*. 2014; 369: 20130428.
60. Cooper DN, Nussbaum RL, Krawczak M. Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. *Hum Genet*. 2002; 110: 207-8.
61. Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001; 2: 91-9.
62. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009; 21: 317-37.
63. Netea MG, van der Meer JWM. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med*. 2011; 364: 60-70.
64. Juárez Carvajal E, López González JS, Torres Rojas M, Sada Díaz E. Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Rev Inst Nal Enf Res Mex* 2009;22:S: 366-378
65. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181: 1294-309.
66. Lafferty EI, Qureshi ST, Schnare M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. *Journal of Inflammation* 2010; 7:57.
67. Mizgerd JP. Acute Lower Respiratory Tract Infection. *N Engl J Med*. 2008; 358: 716-727.

68. Bérubé J, Bourdon C, Yao Y, Rousseau S. Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cell Signal* 2009;21:448-456.
69. O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*;2006;18:3-9.
70. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292-96.
71. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:365–98.
72. Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol* 2006;176:3717-3724.
73. Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, et al. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog* 2005
74. Jeyaseelan S, Young SK, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein (TIRAP) is a critical mediator of antibacterial defense in the lung against *Klebsiella pneumoniae* but not *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 2006;177:538–547
75. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Wilson CB. Myeloid differentiation factor 88 is essential for pulmonary host defense against *Pseudomonas aeruginosa* but not *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2004;172:3377–3381.

76. Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, et al. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)*. 2010; 89: 403-25
77. Mizgerd JP. Respiratory Infection and the Impact of Pulmonary Immunity on Lung Health and Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186: 824–829,
78. Sangrar W, Zirgibl RA, Gao Y, Muller WJ, Jia Z, Greer PA. An Identity Crisis for fps/fes: Oncogene or Tumor Suppressor? *Cancer Res* 2005; 65: 3518-22.
79. Craig AWB. FES/FER kinase signaling in hematopoietic cells and leukemias. *Frontiers in Bioscience* 2012;17:861-875.
80. Read RD, Lionberger JM, Smithgall TE. Oligomerization of the Fes tyrosine kinase. Evidence for a coiled-coil domain in the unique N-terminal region. *J Biol Chem* 1997;272:18498-18503.
81. Kanda S, Miyata Y, Kanetake H. Non-receptor Protein Tyrosine Kinase Fes as a Candidate for Anticancer Molecular Targeting Therapy. In Murphy PB and J.R. Clarke Eds. *Oncogene Proteins: Structure, Functions and Analyses*. Nova Science Publishers, Inc 2008; 209-221.
82. Parsons SA, Greer PA. The Fps/Fes kinase regulates the inflammatory response to endotoxin through down-regulation of TLR4, NF- κ B activation, and TNF- α secretion in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 2006;80: 1522–1528.
83. McCafferty DM, Craig AWB, Yotis A, Senis YA, Greer P. Absence of Fer Protein-Tyrosine Kinase Exacerbates Leukocyte Recruitment in Response to Endotoxin. *J Immunol* 2002; 168:4930-4935.

84. Greer P. Closing in on the Biological Functions of FES/FPS y FER. *Nature* 2002;3:278-89.
85. Ivanova IA, Vermeulen JF, Ercan C, Houthuijzen JM, Saig FA, Vlug EJ, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs M, Derksen PWB. FER kinase promotes breast cancer metastasis by regulating $\alpha 6$ - and $\beta 1$ -integrin-dependent cell adhesion and anoikis resistance. *Oncogene* 2013; 32: 5582–5592.
86. Allard P, Zoubeydi A, Nguyen LT, Tessier S, Tanguay S, Chevrette M, Aprikian A, Chevalier S. Links between Fer tyrosine kinase expression levels and prostate cell proliferation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159: 63–7.
87. Pasder O, Shpungin S, Salem Y, Makovsky A, Vilchick S, Michaeli S, Malovani H, Nir U. Down- regulation of Fer induces PP1 activation and cell-cycle arrest in malignant cells. *Oncogene* 2006; 25: 4194–4206.
88. Ahn J, Truesdell P, Meens J, Kadish C, Yang X, Boag AH, Craig AWB. Fer Protein-Tyrosine Kinase Promotes Lung Adenocarcinoma Cell Invasion and Tumor Metastasis. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0003-T.
89. Li H, Ren Z, Kang X, Zhang L, Li X, Wang Y, Xue T, Shen Y, Liu Y. Identification of tyrosine- phosphorylated proteins associated with metastasis and functional analysis of FER in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* 2009; 9: 366. doi: 10.1186/1471-2407-9-366.
90. Miyata Y, Kanda S, Sakai H, Greer PA. Fer expression correlates with malignant aggressiveness and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 104: 681–686.

91. Guo C, Stark GR. FER tyrosine kinase (FER) overexpression mediates resistance to quinacrine through EGF-dependent activation of NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 7968–7973.
92. Zirngibl RA, Senis Y, Greer PA. Enhanced Endotoxin Sensitivity in Fps/Fes-Null Mice with Minimal Defects in Hematopoietic Homeostasis. *Mol Cell Biol* 2002;22: 2472–2486.
93. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Pillars Article: Passive Immunization Against Cachectin/Tumor Necrosis Factor Protects Mice from Lethal Effect of Endotoxin. *Science*, 1985; 229:869–871.
94. Bauss, F., Droge, W., Mannel, D. N. Tumor necrosis factor mediates endotoxic effects in mice. *Infect. Immun* 1987;55: 1622–1625.
95. Parsons SA, Mewburn JD, Truesdell P, Greer PA. The Fps/Fes kinase regulates leucocyte recruitment and extravasation during inflammation. *Immunology* 2007;122: 542–55.
96. McCafferty, DM, Craig AW, Senis YA, Greer PA: Absence of Fer protein-tyrosine kinase exacerbates leukocyte recruitment in response to endotoxin. *J Immunol* 2002;168: 4930-5.
97. Aspenstrom, P. Roles of F-BAR/PCH proteins in the regulation of membrane dynamics and actin reorganization. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009;272,:1-31.
98. Liu S, Xiong X, Zhao X, Yang X, Wang H. F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes—from structure to human diseases. *Journal of Hematology & Oncology* 2015 8:47. DOI 10.1186/s13045-015-0144-2.

99. Rautanen A, Mills TC, Gordon AC, Hutton P, Steffens M, Nuamah R, et al. Genome-wide association study of survival from sepsis due to pneumonia: an observational cohort study. *Lancet Respir Med* 2015;3:53–60.
100. Schöneweck F, Kuhnt E, Scholz M, Brunkhorst FM, Scherag A. Common genomic variation in the FER gene: useful to stratify patients with sepsis due to pneumonia? *Intensive Care Med*. 2015;41:1379-81.
101. Nakae J, Barr V, Accili D. Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR. *EMBO J* 2000;19: 989–996.
102. Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N. FOXO transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005;7: 752–760.
103. Accili, D., and Arden, K.C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004;117: 421–426.
104. Daitoku H, Sakamaki J, Fukamizu A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein–protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1813: 1954–1960.
105. Van der Horst A, Burgering BMT. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8, 440-450.
106. Kops, GJ, N. D. de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 1999; 398: 630–634.

107. Seiler F, Hellberg J, Lepper PM, Kamyschnikow A, Herr C, et al. FOXO Transcription Factors Regulate Innate Immune Mechanisms in Respiratory Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 2013, 190. www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1200596.
108. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007; 120: 2479–2487.
109. Su D, Coudriet GM, Kim DH, Lu Y, Perdomo G, Qu, Slusher S, Tse HM, J. Piganelli J, Giannoukakis N, Zhang J, Dong H. FoxO1 links insulin resistance to proinflammatory cytokine IL-1 β production in macrophages. *Diabetes* 2009; 58: 2624–2633.
110. Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev* 2004. 198, 169–184.
111. Becker T, Loch G, Beyer M, Zinke I, Aschenbrenner AC, Carrera P, et al. FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* 2010; 463, 369–373.
112. Lee JC, Espéli M, Anderson CA, Linterman MA, Pockock JM, Williams NJ, et al. Human SNP Links Differential Outcomes in Inflammatory and Infectious Disease to a FOXO3-Regulated Pathway. *Cell* 2013;155, 57–69.
113. Lee JC, Smith KGC. Prognosis in autoimmune and infectious disease: new insights from genetics. *Clinical & Translational Immunology* 2014;3:e15. doi:10.1038/cti.2014.8.

114. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. <http://www.wma.net>.
115. Ewig S, Ruiz M, Mensa J, Marcos MA, Martínez JA, Arancibia F, Niederman MS, Torres A: Severe community-acquired pneumonia. Assessment of severity criteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158:1102-1108.
116. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-55
117. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149:818-824.
118. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;10:818-29.
119. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *New England Journal of Medicine* 1999; 341:586-592.
120. Weinstein MC, Toy EL, Sandberg EA, Evans JS, Kuntz KM et al. Modeling for health care and other policy decisions: *Value Health* 2001;4:348-61
121. Mongardon N, Max A, Bouglé A, Pène F, Lemiale V, Julien Charpentier J et al. Epidemiology and outcome of severe pneumococcal pneumonia admitted to intensive care unit: a multicenter study. *Critical Care* 2012, 16:R155. <http://ccforum.com/content/16/4/R155>.

122. Georges H, Leroy O, Vandebussche C, Guery B, Alfandari S et al. Epidemiological features and prognosis of severe community-acquired pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med* 1999; 25: 198-206.
123. Fica A, Bunster N, Aliagac F, Olivares F, Portee L, Braune S et al. Bacteremic pneumococcal pneumonia: serotype distribution, antimicrobial susceptibility, severity scores, risk factors, and mortality in a single center in Chile. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:115-123.
124. Lee J, Hwang SS, Kim K, et al. Bacteremia prediction model using a common clinical test in patients with community-acquired pneumonia. *Am J Emerg Med* 2014; 32: 700-704.
125. Shindo Y, Ito R, Kobayashi D, Ando M, Ichikawa M, et al. Yasuhiro Goto. Risk factors for 30-day mortality in patients with pneumonia who receive appropriate initial antibiotics: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015; 15: 1055-65
126. Metersky ML, Ma A, Bratzler DW, Houck PM. Predicting Bacteremia in Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169: 342-347
127. Cillóniz C, Gabarrús A, Almirall J, Amaro R, Mariano Rinaudo M, et al. Bacteraemia in outpatients with community-acquired pneumonia. *ERJ* 2015. **DOI:** 10.1183/13993003.01308-2015
128. Palma I, Mosquera R, Demier C, Vay CA, Famiglietti A, Luna CM. Impact of bacteremia in a cohort of patients with pneumococcal pneumonia. *J Bras Pneumol*. 2012;38:422-430.

129. Naucler P, Jessica Darenberg, J, Morfeldt, E Örtqvist A, Normark BH. Contribution of host, bacterial factors and antibiotic treatment to mortality in adult patients with bacteraemic pneumococcal pneumonia. *Thorax* 2013;68:571–579
130. Marrie, TJ, Tyrrell FJ, ; Garg S; Vanderkooi OG. Factors Predicting Mortality in Invasive Pneumococcal Disease in Adults in Alberta. *Medicine* 2011; 90:171-179
131. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EAM, Ndiritu M, Klugman KP, Rückinger S et al. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2010;51:692–9.
132. Navarro-Torné A, Gomes Dias J, Hrubá F, Lopalco PL, Pastore-Celentano L, Amato Gauci AJ, et al. Risk factors for death from invasive pneumococcal disease, Europe, 2010. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.140634>.
133. Pletz MW, Welte T, Klugman KP. The paradox in pneumococcal serotypes: highly invasive does not mean highly lethal. *Eur Respir J*. 2010;36:712–3.
134. Luján, Gallego M, Belmonte Y, Fontanals D, Vallès J, Lisboa T, Rello J. Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteraemic pneumonia. *Eur Respir J* 2010; 36: 1073–1079.
135. Bordón J, Peyrani P, Brock GN, Blasi F, Rello J et al. The Presence of Pneumococcal Bacteremia Does Not Influence Clinical Outcomes in Patients With Community-Acquired Pneumonia. Results From the Community-Acquired Pneumonia Organization (CAPO) International Cohort Study. *Chest* 2008; 133:618–624

136. Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol.* 2010; 184:2518– 2527.
137. Boyd AR, Shivshankar P, Jiang S, Berton MT, Orihuela CJ. Age-related Defects in TLR2 Signaling Diminish the Cytokine Response by Alveolar Macrophages during Murine Pneumococcal Pneumonia. *Exp Gerontol.* 2012;47: 507–518
138. Baldin D.J. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006;7:781-91.
139. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4:45-61.
140. Nguetse CN , Kremsner PG. Velavan TP. FOXO3A regulatory polymorphism and susceptibility to severe malaria in Gabonese children. *Immunogenetics* 2015; 67:67-71.
141. Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med.* 2001;29:557-61.
142. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ. Goldstein DB, Hindorf LA, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;461:747 – 753.