



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

“DR. EDUARDO LICEAGA”

**IDENTIFICACION DE CAMBIOS MORFOLOGICOS NUCLEARES EN  
NEUTROFILOS DE PACIENTES CON NEUMONIA GRAVE.**

*TESIS*

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN  
NEUMOLOGÍA**

**PRESENTA.**

DR. LOPEZ MENDEZ VICTOR HUGO.  
MÉDICO RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE NEUMOLOGÍA

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. HERNANDEZ SOLIS ALEJANDRO.

**JEFE DE SERVICIO DE NEUMOLOGÍA**

DRA. CASILLAS SUAREZ CATALINA.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD MX, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO 2019

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO  
"DR. EDUARDO LICEAGA"  
CIUDAD DE MÉXICO

-----  
Dra. Catalina Casillas Suarez  
**Jefe de Servicio de Neumología y Profesor Titular**

-----  
Dr. Alejandro Hernández Solís  
**Director de Tesis**

-----  
Dr. Mario Juárez Ortega  
Dr. Oscar Rojas Espinosa  
**Cotutores**

-----  
Dr. Víctor Hugo López Méndez  
**Residente de 4to año de Neumología**  
-----

Este trabajo fue realizado en el área de hospitalización del Servicio de Neumología y Cirugía de tórax del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, con la supervisión del **Dr. Alejandro Hernández Solís**, y el apoyo administrativo de la Dra. Catalina Casillas Suarez, jefa del Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindarme oportunidades maravillosas en la vida.

A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional y por enseñarme que superarse no es fácil pero es el único camino al éxito.

A mi esposa Yadira y mis hermosas hijas, Sthefani y Natalia por brindarme su amor incondicional en esta etapa de crecimiento personal y ser mi mayor motivo de superación en la vida.

A los pacientes que han sido y serán fuente de conocimientos para el avance médico y que día a día me enseñan a amar esta hermosa profesión.

A todos aquellos que me han motivado a seguir adelante y que aportaron valores en mi para conseguir este objetivo.

## **SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS**

<b>ATS</b>	<b>AMERICAN TORACIC SOCIETY</b>
<b>DM</b>	<b>DIABETES MELLITUS TIPO 2</b>
<b>ENCB</b>	<b>ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</b>
<b>IPN</b>	<b>INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL</b>
<b>ADN</b>	<b>ACIDO DESOXIRIBUNECLEICO</b>
<b>VIH</b>	<b>VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA</b>
<b>SIDA</b>	<b>SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA</b>
<b>ICH</b>	<b>CONFERENCIA INTERNACIONAL DE ARMONIZACION</b>
<b>GCP</b>	<b>GUIAS DE PRACTICA CLINICA.</b>

## Índice

Resumen	6
1. Antecedentes	9
2. Planteamiento del problema	14
3. Justificación	15
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	16
5.1 Objetivo general	16
5.2. Objetivo específico	16
6. Metodología	16
7. Definición de variables	21
8. Aspectos éticos y de bioseguridad	22
9. Relevancia y expectativas	23
10. Recursos disponibles	23
11. Resultados	24
12. Conclusiones	29
13. Información adicional	30
14. Referencias bibliográficas	34

## **Resumen**

**Antecedente:** la neumonía grave es la causa más común de insuficiencia respiratoria y sepsis en enfermos en estado crítico, los gastos públicos en estos pacientes son altos y los índices de predicción de gravedad son basados en el estado clínico del paciente, sin una medida objetiva de respuesta tanto a la antibioticoterapia, así como en el pronóstico del paciente. Las comorbilidades juegan un papel importante al disminuir la barrera protectora a nivel pulmonar, así como una inmunoregulación deficiente que predispone a padecer neumonía e incrementar la tasa de morbi-mortalidad. Los neutrófilos son las células de defensa de gran importancia tanto a nivel pulmonar como en todo el organismo, la importancia de su respuesta se encuentra en otros estudios en los que se ha encontrado una tasa alta de respuesta y un empeoramiento en la condición clínica del paciente. Por lo que el estudio del neutrófilo y sus cambios morfológicos y su impacto en la progresión o mejoría clínica del paciente con neumonía grave.

## **Planteamiento del problema**

En este estudio se propone evaluar los cambios que suceden en la morfología nuclear del neutrófilo que permiten la liberación de moléculas que pueden empeorar el estado clínico del paciente. Los resultados nos permitirán conocer si en el suero de los pacientes infectados con neumonías bacterianas graves pueden alterar la morfología nuclear del neutrófilo y por lo tanto la respuesta y liberación de moléculas en el suero de pacientes sin infección activa

**Objetivo general:** investigar el efecto del suero de pacientes con neumonía moderada-grave, sobre la morfología nuclear del neutrófilo en suero de pacientes sanos y su relación con el pronóstico de la enfermedad.

**Material y método:** Es un estudio observacional descriptivo de casos y controles de enero de 2019 a mayo de 2019 en pacientes ingresados al servicio de Neumología y Unidad de cuidados críticos respiratorios con diagnóstico de neumonía viral o bacteriana – moderada y grave. El efecto de los sueros de los pacientes con neumonía sobre la morfología de los neutrófilos de donadores sanos se evaluará



mediante microscopia de fluorescencia, los porcentajes de afectación serán correlacionados con las características clínicas de los pacientes.

Los pacientes incluidos serán aquellos que cumplan los criterios de neumonía bacteriana o viral que amerite hospitalización según los criterios clínicos, radiológicos, bioquímicos, así como de escalas de severidad.

Los resultados obtenidos se compararán entre individuos sanos y pacientes con diagnóstico de neumonía bacteriana. El porcentaje de afección en los neutrófilos se determina mediante el software Image J el cual realiza esta determinación. El análisis y correlación de los resultados clínicos y porcentaje de afección en los neutrófilos se realizará a través del software Graphpad Prims 8 con lo que se determinará la correlación.

### **Resultados:**

De los 29 sueros analizados de pacientes que presentan comorbilidades como diabetes mellitus tipo 2, enfermedad renal crónica KDIGO V que se encuentran bajo tratamiento sustitutivo con hemodiálisis, desnutrición severa, sospecha de tuberculosis sin que esta se haya confirmado, insuficiencia hepática Child Pugh C, se encontró que los pacientes con desnutrición tienen mayor mortalidad. No hay correlación entre el conteo de neutrofílico en la biometría hemática y el porcentaje de afección a nivel nuclear. La enfermedad hepática Child Pugh C presento el mayor porcentaje de afección nuclear sin que esto tuviera una correlación con la mortalidad. Los pacientes con leucopenia y menor porcentaje de afección neutrofílica (3) tuvieron mayor mortalidad. La desnutrición (3) fue la comorbilidad que presento mayor mortalidad. Las causas de defunción fue empeoramiento clínico a pesar de tratamiento intensivo. Los mayores de 60 años mostraron mayor mortalidad (3). El promedio de afección nuclear entre 10 y 15 % que se presentó en la mayoría de los pacientes se correlación con mejoría clínica sin tomar en cuenta la comorbilidad que presenten.

## **Conclusiones.**

En esta serie de casos se demostró que el porcentaje de afección nuclear no se correlaciona directamente con el pronóstico del paciente, la desnutrición es un factor importante para la respuesta neutrofílica, así como del porcentaje de afección neutrofílica, la mayoría de los pacientes que fueron seleccionados padecían neumonía de origen bacteriano. La enfermedad hepática Child Pugh C fue la patología con mayor correlación en afección morfológica neutrofílica. La edad fue el factor pronóstico de mayor relevancia ya que los pacientes que fallecieron fueron mayores de 60 años y con un porcentaje de afección nuclear neutrofílico bajo, que puede indicar una menor actividad celular y por lo tanto mayor mortalidad. La afección neutrofílica no se correlación directamente con la mortalidad debido a que se ve afectada por las comorbilidades de los pacientes, así como la adecuada antibioticoterapia que sea dirigida al agente etiológico. Lo que nos sugiere seguir ampliando el numero de muestras para conocer si la edad puede llegar a afectar la funcionalidad neutrofílica y por lo tanto menor respuesta ante los procesos infecciosos.

## **Palabras clave.**

Neumonía grave, neutrófilos, porcentaje de afección nuclear, netosis.

## **1. Antecedentes.**

La neumonía grave es la causa más común de insuficiencia respiratoria y sepsis entre los pacientes en estado crítico, la tasa de mortalidad es del 40% -50% en los casos más graves. (Gupta et al., 2018). La infección pulmonar con patógenos bacterianos, virales o fúngicos puede conducir a la infiltración masiva de poblaciones inmunes innatas, principalmente los neutrófilos son las células infiltrantes de las vías respiratorias y los espacios alveolares. Esta respuesta inflamatoria está dirigida a controlar y eliminar los patógenos invasores, pero la respuesta inflamatoria exacerbada puede comprometer la función pulmonar y conducir a la muerte (Pechous, 2017).

Los neutrófilos actúan como las primeras células innatas que migran al sitio de infección o inflamación para contener y eliminar patógenos. Además de esto, también proporcionan señales a otras células inmunes innatas sobre una amenaza invasora. Además de mostrar actividad fagocítica contra bacterias patógenas y liberar moléculas antimicrobianas, los neutrófilos también forman trampas extracelulares de neutrófilos para regular la gravedad de la infección, las cuales se forman como consecuencia de la liberación extracelular de contenidos nucleares de neutrófilos. Se han descrito dos modelos de trampas extracelular de neutrófilos, uno implica la liberación de NET de los neutrófilos moribundos, lo que implica el mecanismo de muerte celular y el segundo implica la extrusión del material de cromatina junto con la serina de proteasas de neutrófilos intactos. El primer mecanismo de formación a partir de neutrófilos ocurre dentro de 2 a 3 horas después de la exposición al miristato de forbol como estímulos. El segundo proceso de formación de NET implica el reconocimiento de lipopolisacáridos o bacterias patógenas por plaquetas o neutrófilos. Este segundo proceso de formación se produce muy rápidamente, lo que lleva a la formación de NET en minutos después de la exposición a los estímulos.

En el estudio realizado por (Juárez-ortega et al., 2018) en sueros de pacientes con tuberculosis expuestos indujeron cambios en la morfología nuclear del neutrófilo que incluían picnosis, inflamación, apoptosis y netosis. Los sueros de algunos

contactos domésticos indujeron cambios similares mientras que los sueros de las personas sanas no tuvieron efectos significativos. Las bacterias no parecieron participar en este fenómeno por que la bacteriemia no es una característica reconocida de la tuberculosis no miliar y porque los sueros de pacientes que indujeron cambios nucleares mantuvieron su efecto después la filtración a través de membranas de 0,22 mm. Aunque existe la duda debido a que no había la presencia de bacterias que indujeran los cambios morfológicos nucleares por lo que es interesante conocer si los pacientes con neumonía pueden inducir estos cambios

Brinkmann, et al en 2004 describió un nuevo desplegado de neutrófilos para la contención de microorganismos, que implica, además la muerte del propio neutrófilo, en este fenómeno, el núcleo de estas células pierde su forma lobulada característica, la eucromática y la heterocromática se homogenizan, hay ruptura de su membrana nuclear y disolución de los gránulos citoplásmicos, permitiendo que los componentes celulares y nucleares se mezclen para, finalmente, producir ruptura de la membrana celular y poder ser liberados al medio extracelular. La estructura y componentes de las redes de NET se forman de la descondensación de la cromatina del núcleo que se produce durante la NETosis es extremadamente grande y requiere la descomposición de los nucleosomas en tamaños muchos más pequeños. La investigación realizada por Obermayer et al ha ampliado significativamente el alcance del conocimiento sobre la estructura de las redes. Los resultados presentados por este grupo científico muestran que las hebras NET densas son de hecho condensaciones de fibra más delgadas de un diámetro inferior a 2nm, que están orientadas en paralelo. Además, se ha observado que en aquellos lugares donde las fibras gruesas se desintegran, se forma un NET ampliamente extendido, a menudo conectado a estructuras esféricas con un diámetro de aproximadamente 10 nm. Estos pueden combinarse y formar agregados más grandes. Las fibras de ADN que constituyen componentes de las NET no están rodeadas por membranas. El ADN es uno de los elementos principales de las redes. La investigación realizada por Halverson et al. Ha demostrado que las fibras del ácido desoxirribonucleico que componen las NET tienen fuertes cualidades antibacterianas. Aparte del ADN se componen de un gran grupo de proteínas de

histonas como H1, H2A, H2B, H3 y H4 que constituyen aproximadamente el 70% de todas las proteínas conectadas con NET.

Los NET se encuentran típicamente con histonas, MPO y elastasa de neutrófilos, y el efecto es aislar los efectos de esas moléculas directamente sobre la superficie del patógeno con una NET “pegajosa” de ácido nucleico. Los NET contribuyen a la lesión pulmonar aguda y el daño capilar alveolar durante la infección por Virus de la Influenza tipo A. sin embargo, se sabe muy poco acerca de la relación entre los NET y la infección viral en la patogénesis viral.

Las NET se han propuesto como un mecanismo de defensa innato responsable del aclaramiento de patógenos, pero existe la preocupación de que las NET puedan inducir daños colaterales en los tejidos del huésped. Se detectaron NET en abundancia en modelos de ratón de neumonía bacteriana grave, lesión pulmonar aguda y sujetos con síndrome de distrés respiratorio agudo por neumonía o sepsis. La disminución de los NET redujo la lesión pulmonar y mejoro la supervivencia después del tratamiento con ADNasa I o con deficiencia parcial de proteína arginina deaminasa 4. Se ha observado en humano que el aumento de los NET plasmáticos se asoció con la gravedad y la mortalidad del SDRA. En la infección pulmonar con bacterias induce rápidamente el reclutamiento y el enjambre de neutrófilos y la liberación de NET en la vasculatura pulmonar y en los espacios alveolares. La interrupción de los NET después de su producción podría limitar la extensión de la lesión pulmonar y que, junto con los antibióticos para controla la infección pulmonar, la terapia anti-NET podría reducir efectivamente la progresión de la neumonía a la lesión pulmonar aguda.

Entre los pacientes con neumonía confirmada microbiológicamente, los pacientes con SDRA tenían un mayor nivel de NET plasmáticos en comparación con los pacientes que nunca desarrollaron SDRA, y hubo una tendencia hacia un mayor plasma de NET en pacientes con sepsis con SDRA concomitante. Las NET en plasma aumentaron con la gravedad del SDRA y se asociaron con la mortalidad del SDRA y también la mortalidad en pacientes con sepsis o neumonía.

La neumonía se refiere a una infección aguda del parénquima pulmonar adquirida fuera de un entorno de atención médica. Existen factores de riesgo que pueden llevar al desarrollo de la infección como lo son la edad avanzada, la incidencia anual de hospitalización por neumonía es de aproximadamente 2000 por 100 000 habitantes en estados unidos, esta cifra es aproximadamente tres veces más ala que en la población general.

Comorbilidades crónicas: la comorbilidad que coloca a los pacientes en mayor riesgo de hospitalización con neumonía es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cardiaca, diabetes mellitus, desnutrición e inmunosupresión.

La infección viral del tracto respiratorio puede provocar neumonías virales primara y predisponer a neumonía bacteriana secundaria.

Protección de la vía aérea deteriorada aumentan el riesgo de macroaspiración de contenido del estómago o la microaspiración de las secreciones las vías respiratorias superiores, como la alteración del estado de conciencia, convulsiones, uso de drogas o enfermedades gastrointestinales como debidas a lesiones o dismotilidad.

Fumar y consumo excesivo de alcohol y el uso de opioides son factores de riesgo del comportamiento modificables claves para el desarrollo de neumonía.

En la presentación clínica de la enfermedad los signos y síntomas pulmonares son la presencia de tos (con o sin producción de esputo), la disnea y el dolor torácico pleurítico se encuentran entre los más comunes. Los signos de neumonía en el examen físico incluyen taquipnea, aumento del trabajo respiratorio, presencia de estertores o sibilancias; egofonía y matidez a la percusión sugieren neumonía. Estos signos y síntomas son el resultado de la acumulación de glóbulos blancos, líquidos y proteínas en el espacio alveolar. La hipoxemia puede deberse al deterioro subsiguientes del intercambio de gases alveolares. En la radiografía de tórax la acumulación de glóbulos blancos y líquido dentro los alveolos aparecen como opacidades pulmonares. También son comunes los signos y síntomas sistémicos, como escalofríos, fatiga, malestar general, dolor torácico y anorexia. Taquicardia,

leucocitosis o leucopenia son hallazgos de la respuesta inflamatoria sistémica. Los marcadores inflamatorios, como la tasa de sedimentación eritrocítica, la proteína C reactiva y la procalcitonina pueden aumentar, aunque esta última es en gran medida específica de las infecciones bacterianas. Debido a que la neumonía es una de las principales causas de la sepsis, la presentación inicial puede estar caracterizada por hipotensión, estado mental alterado y otros signos de disfunción orgánica como disfunción renal, hepática y trombocitopenia.

En cuanto al diagnóstico se requiere la demostración de un infiltrado en las imágenes de tórax en un paciente con un síndrome clínicamente compatible. Los hallazgos radiológicos consistentes incluyen consolidaciones lobares, infiltrados intersticiales o cavitaciones. La combinación de un síndrome clínico compatible y los hallazgos y una imagen son suficientes para establecer el diagnóstico clínico de neumonía. Aunque hay que definir la gravedad y lugar de atención; la determinación se basa en el juicio clínico y puede complementarse con el uso de puntuaciones de gravedad. Las puntuaciones de gravedad más utilizadas son el índice de gravedad de neumonía y CURB- 65. Los tres niveles de gravedad (leve, moderada y grave) corresponde a los tres niveles de atención: atención ambulatoria la mayoría de los pacientes que se encuentran con signos vitales normales y sin riesgo de complicaciones. Suelen tener puntuaciones PSI de I a II y puntuaciones CURB – 65 de 0 puntos. Ingreso al hospital: los pacientes que tienen saturaciones de oxígeno periférico < 92% al aire ambiente (y un cambio significativo con respecto al valor inicial) deben ser hospitalizados. Además, los pacientes con puntuaciones PSI > III y CURB – 65 > 1 punto también debe ser hospitalizados. Admisión a la unidad de cuidados intensivos: los pacientes que cumplen algunos de los siguientes criterios principales tienen una neumonía grave y deben ser admitidos; los que cursen con insuficiencia respiratoria que requiere ventilación mecánica, sepsis que requiere soporte vasopresor. Para ayudar a identificar a los pacientes con neumonía grave antes del desarrollo de insuficiencia orgánica la IDSA sugiere los siguientes criterios: estado mental alterado, hipotensión que requiere soporte hídrico, temperatura < 36 grados, frecuencia respiratoria > 30 respiraciones por minuto, relación PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub>

< 250, nitrógeno ureico en sangre > 20 mg/dl, recuento de leucocitos < 4000 células / microL, recuento de plaquetas < 100 000/ml, infiltrados multilobares.

## **2. Planteamiento del problema.**

Las neumonías bacterianas siguen siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las enfermedades críticas que con frecuencia requieren apoyo ventilatorio mecánico. Los neutrófilos se reclutan en el sitio infectado y sirven de primera línea de defensa innata del huésped. El pulmón está continuamente expuesto al ambiente externo y, por lo tanto, debe estar armado para identificar y eliminar patógenos. Aunque se requiere una respuesta inflamatoria efectiva orquestada por células residentes y reclutadas en el pulmón para proteger contra patógenos invasores, por lo tanto, la respuesta inmune representa un acto de equilibrio entre la eliminación de la infección y el empeoramiento de la enfermedad. Las consecuencias biológicas designadas de la infiltración de neutrófilos son dos: eliminar los patógenos a través de la fagocitosis y generar respuestas inflamatorias mediante producción de radicales de oxígeno, enzimas proteolíticas y liberación de péptidos antimicrobianos, las cuales se pueden ver afectadas por la actividad bacteriana y su interferencia en la morfología nuclear del neutrófilo que ayuden a identificar a pacientes con empeoramiento y que requieran una mejor cobertura antimicrobiana.

En este estudio se propone evaluar los cambios que suceden en la morfología nuclear del neutrófilo que permiten la liberación de moléculas que pueden empeorar el estado clínico del paciente. Los resultados nos permitirán conocer si en el suero de los pacientes infectados con neumonías bacterianas graves pueden alterar la morfología nuclear del neutrófilo y por lo tanto la respuesta y liberación de moléculas en el suero de pacientes sin infección activa.



### **3. Justificación.**

Las neumonías siguen siendo una causa frecuente de morbilidad y mortalidad mundial, dentro de los mecanismos de respuesta inmunes se encuentran los neutrófilos que forman parte de la respuesta primaria ante procesos infecciosos virales, bacterianos o fúngicos; en varios estudios se han observado las respuestas de los neutrófilos a estas amenazas la formación de citoquinas, así como de factores estimuladores y de fagocitosis, así como la apoptosis. Aún se desconocen los múltiples factores que pueden favorecer a la recuperación o el empeoramiento de los pacientes con neumonía. En este estudio se propone evaluar los cambios morfológicos de los neutrófilos al exponerlos con el suero de pacientes con neumonía grave en suero de pacientes sanos en la que se observara si existen cambios en la morfología nuclear que alteren la respuesta y que se relacione con un proceso infeccioso más severo o incluso incrementar la mortalidad.

Debido a que no se encuentran datos en la bibliografía específicos a los cambios morfológicos y las consecuencias en infecciones bacteriana neumónicas, es interesante conocer los cambios morfológicos nucleares a estas modificaciones. Esto nos ayudaría a conocer a paciente que muestren empeoramiento y que requieren cambios en cobertura antimicrobiana.

### **4. Hipótesis**

- El suero de los pacientes con neumonía bacteriana puede inducir cambios en la morfología nuclear de los neutrófilos los cuales incluyen picnosis, apoptosis celular y netosis.
- La morfología nuclear del neutrófilo se pierde al exponerse al suero de pacientes con neumonía en sueros de pacientes sanos.
- Hay liberación del ADN nuclear del neutrófilo de pacientes sanos al exponerse al suero de pacientes con neumonía.
- Los cambios en la morfología nuclear del neutrófilo se relacionan con un peor pronóstico en los pacientes con neumonía grave.

- La presencia de NET secundario a los cambios en la morfología nuclear del neutrófilo incrementa la mortalidad en el paciente con neumonía grave.

Hipótesis alterna:

El suero de pacientes con neumonía bacteriana o viral moderada- grave no induce cambios en la morfología nuclear de los neutrófilos los cuales incluyen picnosis, inflamación, apoptosis y netosis.

## **5. Objetivos.**

Objetivo general: investigar el efecto del suero de pacientes con neumonía moderada - grave, sobre la morfología nuclear del neutrófilo en suero de pacientes sanos y su relación con el pronóstico de la enfermedad.

Objetivo específico:

- Determinar la relación entre la pérdida de la morfología nuclear de los neutrófilos con la mortalidad hospitalaria de la neumonía moderada – grave.
- Determinar la relación entre la netosis y liberación de ADN secundario a la pérdida de la morfología nuclear y el pronóstico de los pacientes con neumonía grave.

## **6. Metodología:**

El efecto de los sueros de los pacientes con neumonía sobre la morfología de los neutrófilos de donadores sanos se evaluará mediante microscopia de fluorescencia, los porcentajes de afectación serán correlacionados con las características clínicas de los pacientes.

Los pacientes incluidos serán aquellos que cumplan los criterios de neumonía bacteriana o viral que amerite hospitalización según los criterios clínicos, radiológicos, bioquímicos, así como de escalas de severidad.

Análisis de resultados: Los resultados obtenidos se compararán entre individuos sanos y pacientes con diagnóstico de neumonía bacteriana. El porcentaje de afección en los neutrófilos se determina mediante el software Image J el cual realiza esta determinación. El análisis y correlación de los resultados clínicos y porcentaje de afección en los neutrófilos se realizará a través del software Graphpad Prims 8 con lo que se determinará la correlación.

Material y métodos.

Procedimiento general.

El manejo inicial y subsecuente de cada paciente estará a cargo el Servicio de Neumología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Los médicos del servicio de neumología identificarán a los individuos que cumplan con los criterios de selección y los invitarán a participar en el estudio, explicándole los aspectos éticos. En el caso de los individuos que acepten participar en el estudio, los médicos registraran los datos indicados y les solicitarán la firma de la carta de consentimiento informado.

Muestras biológicas.

Muestras de sangre: a cada participante del estudio se le extraen 10 ml de sangre periférica por punción venosa en una sola ocasión, esta muestra se depositará en un tubo sin heparina.

Procesamiento de las muestras de sangre.

Para determinar los cambios morfológicos inducidos por el suero de los pacientes y los donadores sanos se realizará el procedimiento descrito por Juárez et al 2018.

Obtención de Neutrófilos Humanos

Se tomó sangre venosa periférica con una jeringa heparinizada de voluntarios clínicamente sanos de la ENCB-IPN. La sangre heparinizada fue depositada en tubos, sobre un volumen de polymorphe látex igual al de la sangre tomada. Los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm por 50 min a 25°C. Al cabo de ese tiempo los tubos se recuperaron, identificando la capa de neutrófilos en el gradiente formado.

Los neutrófilos recuperados libres de otras células, se lavaron en dos ocasiones con PBSG por centrifugación a 1100 rpm por 3 min y cuando fue necesario, se realizó lisis de eritrocitos con soluciones de NaCl al 0.2% durante 30 segundos y NaCl al 1.6% para regenerar isotonicidad, el botón celular se desprendió suavemente con una pipeta Pasteur en 1 ml de PBSG, la concentración celular fue ajustada a  $1 \times 10^6$  células/mL.

#### Cultivo de Neutrófilos con el Suero de Pacientes con Neumonía y Suero de Donadores Clínicamente Sanos

Se prepararon laminillas de vidrio perfectamente lavadas, sobre las que se colocaron “máscaras de vinilo” con áreas perforadas de  $0.50 \text{ mm}^2$ , y se esterilizaron en la autoclave a 10 libras por 10 min. En los pozos de  $0.5 \text{ mm}^2$  fueron colocados 40ul de la suspensión celular de neutrófilos y después de 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  de adherencia de los neutrófilos, fue retirado el PBSG. Sobre la monocapa de neutrófilos formada en cada pozo fue colocado el suero de los pacientes y los donadores clínicamente sanos, los cultivos fueron incubados durante 3 a  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ , como controles negativos se utilizó PBSG y PMA (Sigma Toluca, México) como control positivo a una concentración final de 10nM.

#### Análisis de los cambios morfológicos de los neutrófilos

-Microscopia de Fluorescencia y análisis de imágenes: Los neutrófilos cultivados con el suero de pacientes y donadores clínicamente sanos, fueron fijados con para formaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego, las laminillas se lavaron dos veces por inmersión en buffer salina fosfatos (PBS pH 7.3) por 15 segundos, y se dejaron secar al aire. Finalmente, las muestras se tiñeron con el reactivo de Hoechst para DNA, las preparaciones fueron montadas en glicerol al 50% en PBS y revisadas en el microscopio de fluorescencia NIKON ECLIPSE 8000, se analizaron 3 campos por triplicado de cada preparación y se cuantificó el número total de núcleos por campo y el número de núcleos alterados por campo mediante el software Image J 1.47v Wayne Rasband, National Institutes Health, USA, de esta manera se determinó el porcentaje de células afectadas, el área del núcleo fue determinada en las imágenes obtenidas en el microscopio, cada imagen fue

transformada en imágenes binarias y mediante el análisis de partículas utilizando image J se calculó el área nuclear.

### **Tipo y diseño de estudio:**

Es un estudio observacional descriptivo de casos y controles de enero de 2019 a mayo de 2019 en pacientes ingresado al servicio de Neumología y Unidad de cuidados críticos respiratorios con diagnóstico de neumonía viral o bacteriana – moderada y grave.

Población:

se realizará el siguiente estudio en la población de pacientes con ingreso hospitalario por neumonía moderada – grave en el hospital general de México “Dr. Eduardo Liceaga” hospitalizados en la unidad de Neumología y terapia intensiva respiratoria.

Tamaño de la muestra:

Se realizo mediante casos consecutivos de pacientes que ingresaron con diagnóstico de neumonía bacteriana o viral con índice de gravedad, moderado a grave.

### **Criterios de inclusión, exclusión y eliminación donadores con neumonía.**

Criterios de inclusión:

Pacientes mayores de 18 años hospitalizados con diagnóstico de neumonía bacteriana o viral – moderada a muy alto riesgo

Pacientes mayores de 18 años hospitalizados con diagnóstico de neumonía bacteriana o viral – moderada a grave que ameritan uso de ventilación mecánica invasiva y manejo en la unidad de cuidados críticos respiratorios.

Pacientes mayores de 18 años hospitalizados con diagnóstico de neumonía bacteriana o viral con escala de riesgo de gravedad por SMART – COP con riesgo moderado a muy alto riesgo.

Criterios de exclusión:

Pacientes mayores de 18 años hospitalizados en la Unidad de Neumología y Cuidados intensivos respiratorios con diagnóstico de VIH – SIDA.

Pacientes mayores de 18 años hospitalizados en la Unidad de Neumología y Cuidados intensivos respiratorios con enfermedad Inmunológica, hematológica o embarazada.

Pacientes mayores de 18 años hospitalizados en la Unidad de Neumología y Cuidados intensivos respiratorios con diagnósticos de tuberculosis.

Criterios de eliminación:

Todas aquellas muestras que se encuentren contaminadas o mal procesadas; o pacientes que decidan no participar en el estudio.

### **Criterios de selección donadores de sueros en pacientes sanos**

Criterios de inclusión.

se incluirán a individuos de entre 18 y 60 años de edad que se encuentren clínicamente sanos, que no tengan antecedentes de proceso infeccioso de al menos 3 meses de cualquier sitio anatómico. Que no tengan consumo de antibióticos en los últimos 3 meses.

Criterios de exclusión.

no se incluirán pacientes embarazadas, así como individuos con inmunosupresión y enfermedades crónico degenerativas u que padezcan enfermedades respiratorias recientes ya sean virales o bacterianas.

Criterios de eliminación.

Se eliminarán del estudio los individuos que soliciten retirarse del mismo y los individuos que cuyas muestras de sangre no sean óptimas para su procesamiento.

## 7. Definición de variables:

Variable	Definición operacional	Definición conceptual	Tipo de variable	Escala de medición	Valor
Edad	Edad en años cumplidos	Tiempo que ha vivido una persona.	Cuantitativa	Discreta	0-100
Sexo	Genero gramatical propio de un hombre o una mujer.	Genero gramatical propio de un hombre o una mujer	Cualitativa	Nominal	Masculino – femenino
Gravedad	Según la escala CURB- 65	Importancia, dificultad o peligro que presenta la neumonía	Cuantitativo	Ordinal	Riesgo bajo Riesgo intermedio Riesgo alto Riesgo muy alto
Índice de afección neutrófilos		Porcentaje de cambio a nivel nuclear del neutrófilo	cuantitativo	Ordinal	0-50 por porcentaje de regresión
netosis		Barrera física que estaría evitando la diseminación de los microorganismos como el daño a tejido, ya que limita el radio de acción de las moléculas toxicas, participando así en la regulación de diversas infecciones y del proceso inflamatorio.	cualitativo	Ordinal	Presente No presente

## **8. Aspectos éticos y de bioseguridad**

Los sujetos que participarán en este estudio tendrán un riesgo mínimo, debido a que sólo se expondrán al riesgo inherente a la toma de una muestra de sangre. A cada participante del estudio se le extraerán 10 ml de sangre periférica por punción venosa en una sola ocasión; esta muestra se depositará en un tubo sin anticoagulante. Esta muestra de sangre es adicional a las que se le tomarán al paciente para realizar los análisis clínicos que solicite su médico.

La toma de las muestras biológicas la realizará el personal médico responsable de los pacientes. Dichas muestras se emplearán únicamente para los propósitos de investigación descritos en este protocolo; toda la información sobre los pacientes será manejada de manera confidencial y los resultados obtenidos no afectarán de ninguna manera el tratamiento del paciente, que será responsabilidad del personal médico correspondiente. Antes de realizar la toma de muestras, un miembro del grupo de investigación explicará los aspectos arriba mencionados al paciente, y si éste decide participar en el estudio, firmará una carta de consentimiento informado.

Los procedimientos propuestos están de acuerdo con las normas éticas, la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la normatividad institucional en materia de investigación y la declaración de Helsinki de 1975 con sus enmiendas, además de apegarse a los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. Este protocolo y la carta de consentimiento se encuentran apegados a la Ley General de Salud y su Reglamento en Materia de Investigación; y a las Guías de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) sobre las Buenas Prácticas Clínicas (GCP).



## **9. Relevancia y expectativas.**

El impacto socioeconómico de las neumonías que ameritan hospitalización es grande y la mortalidad va en incremento por lo que es importante el desarrollo de nuevos métodos pronósticos que ayuden a orientar el tratamiento temprano de los pacientes.

Este proyecto de investigación generara conocimientos acerca de los cambios morfológicos de los neutrófilos, que son células fundamentales en la respuesta ante procesos infecciosos ya sean virales o bacteriano y que pueden modificar el comportamiento inmunológico de los individuos enfermos, estos hallazgos podrían ayudar a mejorar la respuesta de una forma favorable para la mejoría en los individuos que padecen neumonía siendo esta una enfermedad de alto impacto en los hospitales debido a los gastos que se generan en ellos.

## **10. Recursos disponibles (humanos, materiales y financieros)**

Recursos humanos: El investigador responsable, los investigadores asociados y el estudiante que participan en este proyecto tienen experiencia con las estrategias experimentales que se emplearán, así como con el manejo de muestras de pacientes y con la coordinación y colaboración que se requiere con el personal médico del hospital.

Infraestructura y equipo: el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) cuenta con toda la infraestructura y los equipos que se requieren para la realización de este proyecto en colaboración para la Universidad Nacional Autónoma de México.

Software Graphpad Prims 8, Image J.

1 revisor

1 computadora de uso personal

1 base de datos en el programa Excel.

1 impresora.

## 11. Resultados:

### 1. Características clínicas y de laboratorio.

NO. MUESTRA	EDAD	SEXO	DIAGNOSTICO	COMORBILIDAD	ETIOLOGIA	LEUCOCITOS	NEUTROFILOS	%DE AFECION NUCLEAR	RESPUESTA A TRATAMIENTO
1	34	M	Neumonía	DM tipo 2	Bacteriana	8500	5600	33.75	Mejoría
2	56	M	Neumonía	Insuficiencia Renal	Bacteriana	10500	8300	35.4	Mejoría
3	57	M	Neumonía	Insuficiencia cardiaca	Bacteriana	4800	3500	0	Mejoría
4	76	M	Neumonía	desnutrición	Bacteriana	8200	5700	22	Mejoría
5	46	F	Neumonía	TBP ATS IV	viral	3000	2100	31.1	Mejoría
6	35	F	Neumonía	Insuficiencia Renal	Bacteriana	5000	3200	16	Mejoría
7	67	F	Neumonía	DM tipo 2	Bacteriana	4800	2800	18	Mejoría
8	81	F	Neumonía	Ninguno	Bacteriana	3500	2300	8.8	Mejoría
9	34	F	Neumonía	Cirrosis Hepática	Bacteriana	21000	18000	21.2	Mejoría
10	67	F	Neumonía	TBP ATS IV	Bacteriana	19100	16700	36.5	Defunción
11	75	F	Neumonía	Insuficiencia Renal	Bacteriana	7500	2400	1.9	Mejoría
12	38	F	Neumonía	DM tipo 2	Bacteriana	1900	1300	11.3	Mejoría
13	46	F	Neumonía	TBP ATS IV	viral	5000	3500	18	Mejoría
14	21	F	Neumonía	desnutrición	Bacteriana	4700	3200	12.3	Mejoría
15	67	M	Neumonía	Cirrosis Hepática	Bacteriana	12000	900	60.4	Mejoría
16	75	F	Neumonía	Cirrosis Hepática	Bacteriana	11000	850	70.4	Mejoría
17	34	M	Neumonía	desnutrición	Bacteriana	12500	9800	13.1	Mejoría
18	75	M	Neumonía	Insuficiencia Renal	Bacteriana	14000	9700	3.8	Defunción
19	45	M	Neumonía	DM tipo 2	Bacteriana	13000	9500	14.5	Mejoría
20	67	M	Neumonía	TBP ATS IV	Bacteriana	10000	9000	30	Mejoría
21	34	M	Neumonía	insuficiencia cardiaca	Bacteriana	11000	7800	15	Mejoría
22	84	M	Neumonía	desnutrición	Bacteriana	10100	8400	7.5	Defunción
23	26	F	Neumonía	Insuficiencia Renal	Bacteriana	7200	5900	2.3	Mejoría
24	19	M	Neumonía	DM tipo 2	Bacteriana	5900	3700	14.0	Defunción
25	45	F	Neumonía	TBP ATS IV	Bacteriana	12000	6000	11.3	Mejoría
26	32	M	Neumonía	DM tipo 2	Bacteriana	14600	15070	11.5	Mejoría
27	33	F	Neumonía	TBP ATS IV	Bacteriana	15900	14900	18.9	Mejoría
28	46	F	Neumonía	Desnutrición	viral	4000	3000	11.2	Defunción
29	46	M	Neumonía	Ninguno	Bacteriana	11900	8900	14.5	Mejoría

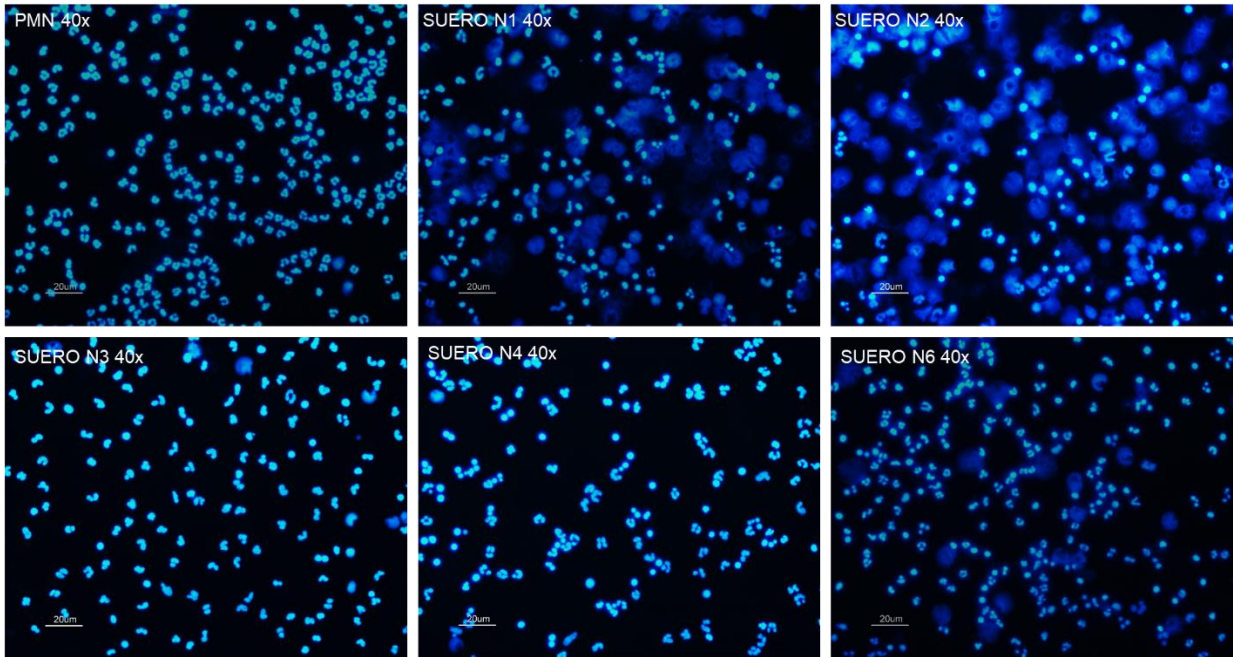


Figura No. 1. PMN en la que se observan neutrófilos en su forma normal sin irregularidades en su núcleo. Suero No. 1 paciente de 34 años con neumonía bacteriana, comorbilidad diabetes mellitus tipo 2, afección nuclear del 33.75%, mejoría clínica.

Suero No. 2 paciente con neumonía bacteriana, comorbilidad enfermedad Renal Crónica, porcentaje de afección nuclear del 35.4. mejoría clínica.

Suero No. 3 paciente con neumonía bacteriana, comorbilidad insuficiencia cardiaca sin afección nuclear, mejoría clínica.

Suero No. 4 paciente con neumonía bacteriana, comorbilidad desnutrición con un porcentaje de afección nuclear del 22%. Con mejoría clínica.

Suero No. 6. Paciente con neumonía bacteriana, comorbilidad enfermedad renal crónica con un porcentaje de afección nuclear del 16 %. Mejoría clínica.

Se observa en la microfotografía como hay alteraciones nucleares importantes en los sueros 1, 2, 4 y 6 correlacionado a tener comorbilidades como Diabetes Mellitus tipo 2, desnutrición, insuficiencia renal, así como la probabilidad de tuberculosis sin que esta se haya diagnosticado. Se observa como en el caso de la microfotografía del suero numero 3 tiene como comorbilidad enfermedad cardiaca sin otra agregad y sin que existan cambios en la morfología nuclear. Procesado con Image J MR.

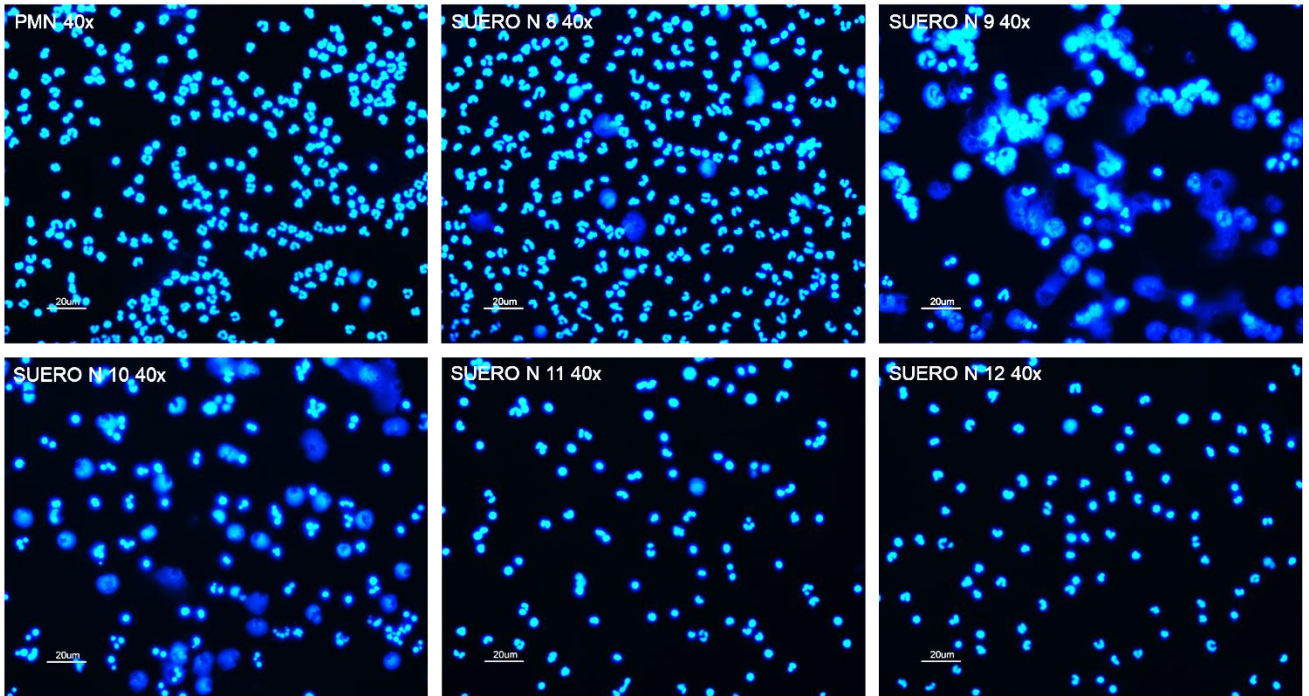


Figura No. 2 suero No 7 paciente con neumonía bacteriana, comorbilidad con Diabetes Mellitus tipo 2 de 67 años con un porcentaje de afección neutrofílica del 18 %. Mejoría clínica.

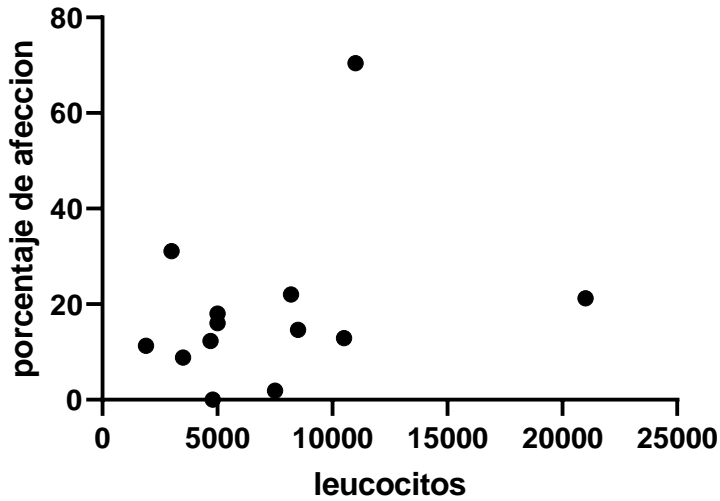
Suero No. 8 paciente de 81 años con neumonía bacteriana sin comorbilidad, con un porcentaje de afección neutrofílica del 8.8%. mejoría clínica.

Suero No. 9 paciente de 34 con neumonía bacteriana, comorbilidad insuficiencia hepática Child Pugh C con un porcentaje de afección del 21.2 %, mejoría clínica.

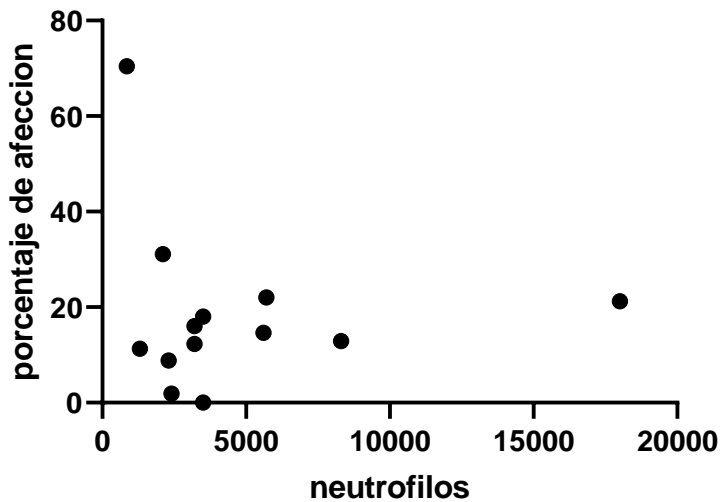
Suero No. 10 paciente de 67 con neumonía bacteriana y sospecha de tuberculosis pulmonar con un porcentaje de afección del 36.5%, defunción.

Suero No. 11. Paciente de 75 años con neumonía bacteriana, comorbilidad enfermedad renal crónica, con un porcentaje de afección de 1.9%, mejoría clínica.

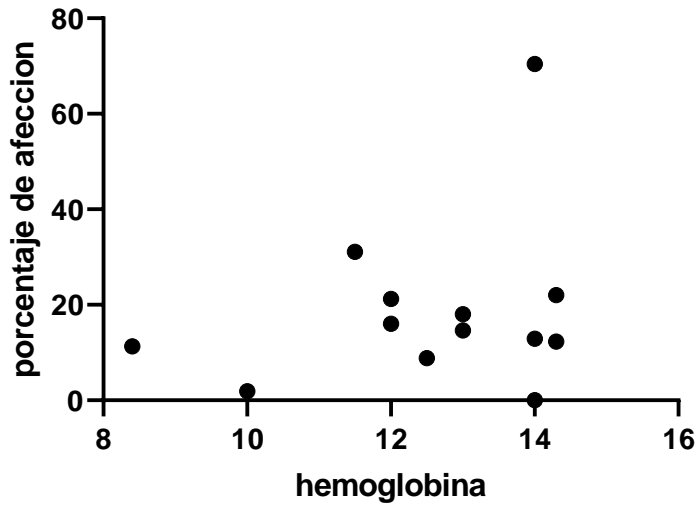
Suero No. 12 paciente de 38 años con neumonía bacteriana, comorbilidad Diabetes Mellitus tipo 2 con un porcentaje de afección de 11.3 %. Mejoría clínica.



1. Correlación entre el porcentaje de afección nuclear neutrofílica con la cantidad de leucocitos en la que observamos que no hay una relación entre ambas debido a que, al incrementarse la leucocitosis, no se observa un incremento en la afección nuclear de los neutrófilos.



2. Correlación entre el porcentaje de afección nuclear neutrofílica y el conteo de neutrófilos en sangre periférica. Se observa que hay un mayor porcentaje de afección en los pacientes con neutropenia, que en el caso de los que tuvieron conteos dentro de valores normales o elevados.



3. Correlación entre la cantidad de hemoglobina y porcentaje de afección neutrofílica. Se observa como los que tienen niveles más elevados de hemoglobina presentan mayor afección neutrofílica. Podría corresponder a una mayor respuesta celular del paciente al agente agresor.

## **12. Conclusiones.**

En esta serie de casos se demostró que el porcentaje de afección nuclear no se correlaciona directamente con el pronóstico del paciente, la desnutrición es un factor importante para la respuesta neutrofílica, así como del porcentaje de afección neutrofílica, la mayoría de los pacientes que fueron seleccionados padecían neumonía de origen bacteriano. La enfermedad hepática Child Pugh C fue la patología con mayor correlación en afección morfológica neutrofílica. La edad fue el factor pronóstico de mayor relevancia ya que los pacientes que fallecieron fueron mayores de 60 años y con un porcentaje de afección nuclear neutrofílico bajo, que puede indicar una menor actividad celular y por lo tanto mayor mortalidad. La afección neutrofílica no se correlación directamente con la mortalidad debido a que se ve afectada por las comorbilidades de los pacientes, así como la adecuada antibioticoterapia que sea dirigida al agente etiológico. Lo que nos sugiere seguir ampliando el número de muestras para conocer si la edad puede llegar a afectar la funcionalidad neutrofílica y por lo tanto menor respuesta ante los procesos infecciosos así como los diversos factores que pueden modificar

### **13. Información adicional.**

#### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

(Nota: se presentará en papel membretado del servicio, con el nombre del proyecto de investigación y numeración progresiva en cada página)

Proyecto de Investigación: estudiar los cambios morfológicos de los neutrófilos en suero de individuos sanos al suministrarse suero de individuos con neumonía grave en muestras biológicas, en el Hospital General de México servicio de Neumología.

Estimado señor(a):

El Servicio de Neumología del Hospital General de México de la Secretaría de Salud, en colaboración con investigadores del Instituto Politécnico Nacional, realizan un proyecto de investigación sobre los cambios morfológicos de los neutrófilos en suero de pacientes con neumonía. El propósito de este proyecto es determinar las características morfológicas de los neutrófilos al ponerse en contacto sueros de pacientes enfermos con los de individuos sanos. Este formato de consentimiento contiene información que lo ayudará a usted Sr. (), Sra. (), Srita. () \_\_\_\_\_, con número de expediente \_\_\_\_\_, a decidir si desea participar en nuestro proyecto de investigación. Tómese su tiempo, lea el formato cuidadosamente y consulte con el médico o el personal del estudio sobre cualquier pregunta que tenga.

Puede haber algunas razones por las cuales a usted no se le permita participar en este proyecto de investigación. Algunas razones son:

- Usted es menor de 18 años o mayor de 60 años de edad.
- Usted está embarazada.
- Usted está en tratamiento con inmunosupresores.
- Usted es portador del virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
- Usted tiene diabetes mellitus, cáncer o alguna enfermedad autoinmune.
- Usted ha sido sometido a una cirugía mayor dentro de las últimas cuatro semanas.



Si usted participa en el proyecto, le pediremos lo siguiente:

() Si es paciente con posible diagnóstico de Neumonía: una muestra de sangre periférica de 10 ml, que se obtendrá por punción venosa en una sola ocasión. Esta muestra de sangre es adicional a las que le tomarán para realizar los análisis clínicos que solicite su médico.

La sangre se obtendrá mediante punción percutánea con un sistema Vacutainer estéril y desechable. Las molestias que usted tendrá por la extracción de la sangre son mínimas. La cantidad de sangre extraída no representa ningún riesgo para usted. Este proyecto de investigación se considera de riesgo mínimo.

Usted no recibirá pago alguno por participar en este proyecto, pero el proyecto tampoco representará ningún costo para usted.

Usted no está obligado a participar en este proyecto, y puede retirarse del mismo en cualquier momento. Si usted decide no participar en el proyecto, su relación con los médicos o con el Hospital General no cambiará de ninguna manera, y seguirá recibiendo los mismos tratamientos y cuidados médicos.

Pregunte cualquier cosa que usted no comprenda. Si no tiene preguntas en este momento, puede hacerlas posteriormente. Durante el proyecto, usted será informado de nuevos datos que pueden afectar su permanencia dentro del mismo.

Si usted tiene alguna pregunta, puede comunicarse con el investigador principal, Dr. Alejandro Hernández Solís, médico adscrito al Servicio de Neumología del Hospital General de México, al teléfono 27892000 ext. 1380, o al teléfono (celular), durante las 24 h. También puede comunicarse con (el nombre y teléfono del presidente del Comité de Ética), quien es el presidente del Comité de Ética del Hospital General de México.

Nosotros mantendremos la información de este proyecto confidencial y privada dentro de los límites de la ley. Bajo ciertas condiciones, las personas responsables de asegurar que las investigaciones se hacen apropiadamente podrían revisar los registros del proyecto; estas personas están también obligadas a mantener su identidad confidencial. De otra manera, cualquier información que lo identifique no será dada a personas ajenas a este proyecto de investigación sin su permiso.

Las muestras obtenidas serán almacenadas según los lineamientos nacionales y serán utilizadas únicamente para los objetivos de este proyecto. Al término del proyecto las muestras obtenidas serán destruidas según los lineamientos sanitarios nacionales.

Al firmar esta página significa que usted acepta que:

- Ha leído esta carta de consentimiento informado.
- Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido respondidas.
- Su participación en este proyecto es voluntaria.
- Da su permiso para que se usen y compartan los datos acerca de su salud como se describe en este documento.
- Puede elegir no participar en el proyecto o retirarse del mismo en cualquier momento que lo desee, y no será sancionado ni perderá ningún beneficio que por derecho le corresponda.

_____	_____
Nombre y Firma del Paciente	Fecha
_____	_____
Nombre y Firma de la persona que conduce la revisión del consentimiento	Fecha

Nombre del Testigo: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el paciente: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del Testigo: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el paciente: \_\_\_\_\_

Recibí copia de este consentimiento

Firma: \_\_\_\_\_

(Firma y Fecha): \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

#### 14. Referencias bibliográficas

2. Camp, J. V, Jonsson, C. B., & Jonsson, C. B. (2017). A Role for Neutrophils in Viral Respiratory Disease, *8*(May).  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00550>
3. Cheemarla, N. R., & Roc, M. Del. (2017). Neutrophils regulate the lung inflammatory response via gd T cell infiltration in an experimental mouse model of human metapneumovirus infection, *101*(June).  
<https://doi.org/10.1189/jlb.4A1216-519RR>
4. Gupta, N., Liu, R., Shin, S., Sinha, R., Pogliano, J., Pogliano, K., ... Corriden, R. (2018). SCH79797 improves outcomes in experimental bacterial pneumonia by boosting neutrophil killing and direct antibiotic activity, (March), 1586–1594. <https://doi.org/10.1093/jac/dky033>
5. Juárez-ortega, M., Muñoz-salazar, R., Becerril-villanueva, E., Hernández-solís, A., Arce-paredes, P., Islas-trujillo, S., & Cicero-sabido, R. (2018). r o f t o n o i t a c i l b u p, (September), 1–18.
6. Liu, J., Pang, Z., Wang, G., Guan, X., Fang, K., Wang, Z., & Wang, F. (2017). Review Article Advanced Role of Neutrophils in Common Respiratory Diseases, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/6710278>
7. Pechous, R. D. (2017). With Friends Like These : The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia, *7*(May).  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00160>
8. Pittman, K. (2013). Damage-Associated Molecular Patterns Control Neutrophil Recruitment, *1*, 315–323. <https://doi.org/10.1159/000347132>
9. Terao, Y. (2018). Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-Like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia, *9*(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00732>
10. Zheng, J., Huang, Y., Islam, D., Wen, X., Wu, S., Streutker, C., ... Zhang, H. (2018). Dual effects of human neutrophil peptides in a mouse model of pneumonia and ventilator-induced lung injury, 1–11.