

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE SANGRE
PERIFÉRICA Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA EN PACIENTES
DIABÉTICOS TIPO 2 CON INFECCIONES EN TEJIDOS
BLANDOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestro en Ciencias en Investigación Clínica.

PRESENTA

Margarita Esquer Mendívil

Director: Dr. Mario I. Vega Paredes

Codirector: Dr. Jorge Herrera Abarca

19 Septiembre 2008



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 16:00 horas del día 22 del mes de Enero del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESM para examinar la tesis de grado titulada:

“Determinación de Apoptosis en Células de Sangre Periférica y su Correlación Clínica en Pacientes Diabéticos Tipo 2 con Infecciones en Tejidos Blandos”.

Presentada por el alumno:

ESQUER

Apellido paterno

MENDIVIL

materno

MARGARITA

nombre(s)

Con registro:

B	0	1	1	2	1	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

Maestro en Ciencias en Investigación Clínica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARIO ISRAEL VEGA PAREDES

CO-DIRECTOR

DR. JORGE EDUARDO HERRERA ABARCA

DR. LEOPOLDO AGUILAR FAISAL

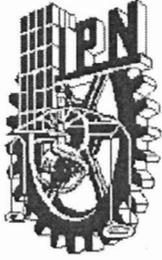
DRA. NORMA ESTELA HERRERA GONZÁLEZ

DRA. GUADALUPE CLEVA VILLANUEVA LÓPEZ

DR. CESAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **08** del mes **septiembre** del año **2008**, el (la) que suscribe **MARGARITA ESQUER MEDIVIL** alumno (a) del Programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA** con número de registro **B011218** adscrito a la **ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA** manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **DR. JORGE EDUARDO HERRERA ABARCA** y del **DR. MARIO ISRAEL VEGA PAREDES** y cede los derechos al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo al correo electrónico **maqui esquer@hotmail.com**. Sí el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


MARGARITA ESQUER MENDIVIL

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández”, bajo la dirección del Dr. Mario Vega Paredes y el Dr. Jorge Herrera Abarca, profesor de la Escuela Superior de Medicina del IPN, con la asesoría del Dr. César González Bonilla. El proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación con el registro R-2005-3502-15 (IP. Dr. César González Bonilla) y tuvo financiamiento de CONACYT con el registro 2004-C01-48018 (IP. Dr. Mario Vega Paredes). Los autores agradecen la participación de Martha Elisa González García, Rosa Evelin Guzmán Valencia y Miriam Hernández Atenógenes, parte de los resultados que se presentan aquí constituyeron su tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza” de la UNAM.

LISTA DE ABREVIATURAS.

ADA	Asociación Americana de Diabetes
AGEs	Productos de Glicación Avanzada
AIF	Apoptosis-inducing Factor
APAF-1	Protease Activating Factor-1
Bcl-2	B Cell Leukemia/Lymphoma-2
DAG	Diacil Glicerol
DM1	Diabetes Mellitus tipo1
DM2	Diabetes Mellitus tipo2
DR5	Receptor de Muerte 5
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
Fas	CD95 (Fas/APO-1) Antígeno de apoptosis 1
FasL	CD178 (FasL/CD95L/TNFSF6) Factor Soluble TNF.
FN	fascitis Necrosante
FGR	Filtrado glomerular renal
FPG	Formamidopirimidina DNA glicosilasa
GLUT	Glucose Transporter
GLUT-4	Glucose Transporter-4
GF	Gangrena de Fournier
IFN-γ	Interferón gama
LPS	Lipopolisacarido
NFκB	Factor Nuclear Kappa B
NOD	Diabéticos no obesos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
LSP	Leucocitos de Sangre Periférica
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SS	Solución Salina
SSA	Secretaria de Salud
Smac/DIABLO	Second mitochondria derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pl.
TGF-α	Factor de Crecimiento Tumoral-alpha
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral.
TUNEL	Terminal-Deoxinucleotidyl-transferase mediated dUTP-digoxingenin nick end labelling.

TABLA DE CONTENIDO.

1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Diabetes Mellitus.....	3
1.1.1. Definición.....	3
1.1.2. Panorama epidemiológico.....	4
1.1.3. Mecanismo de acción de la insulina.....	5
1.1. 4. Complicaciones de la DM2.....	6
1.1. 5. Diabetes mellitus e infecciones.....	7
1.1. 6. Infecciones en tejidos blandos.....	8
1.1.7. Gangrena de Fournier.....	10
1.2. Apoptosis.....	11
1.2.1. Definición.....	11
1.2.2. Diabetes mellitus y apoptosis.....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
5.1. General.....	16
5.2. Específicos.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1. Lugar de realización.....	17
6.2. Diseño del estudio.....	17
6.4 Criterios de selección.....	18
6.4.1. Universo de trabajo.....	18
6.4.2. Criterios de inclusión.....	18
6.4.3. Criterios de no inclusión.....	19
6.4.4. Criterios de eliminación.....	19
6.4.5. Criterios de exclusión.....	20
6.5. Variables.....	20
6.5.1 Independientes.....	20
6.5.2. Dependientes.....	22
6.5.2. De control.....	24
6.5.3. Confusoras.....	24
6.6. Análisis estadístico.....	26
6.7. Procedimientos.....	26
6.7.1. Pacientes.....	26
6.7.2. Purificación de LSP.....	26
6.7.3. Preparación de laminillas.....	27
6.7.4. Citoinmunoquímica.....	27
6.7.5. Determinación de la fragmentación de DNA mediante TUNEL.....	28
6.7.6. Cuantificación de células positivas inmunoteñidas.....	29
6.8. Recursos.....	29
6.9. Aspectos Éticos y de Bioseguridad.....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1. Descripción clínica.....	31
7.2. Evaluación de apoptosis por TUNEL.....	33
7.3. Expresión de Caspasa-3 activa.....	35
7.4. Expresión de Fas.....	37
7.5. Expresión de Fas-L.....	39
7.6. Apoptosis y características clínicas.....	41
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	53
10. PERSPECTIVAS.....	53
11. INDICE.....	54
12. BIBLIOGRAFIA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Proceso de Apoptosis.....	11
2. Apoptosis en LSP mediante TUNEL.....	33
3. Proporción de células positivas para TUNEL.....	34
4. Imágenes representativas de las células caspasa 3 activa positivas.....	35
5. Análisis densitométrico de la expresión de caspasa 3 activa.....	36
6. Imágenes representativas de la expresión de Fas.....	37
7. Análisis densitométrico de la expresión de Fas.....	38
8. Imágenes representativas de la expresión de FasL.....	39
9. Análisis densitométrico de la expresión de Fas-L.....	40
10. Correlación entre expresión de FasL y TUNEL.....	41
11. Expresión de FasL de acuerdo al desenlace clínico.....	42
12. Correlación entre apoptosis y glucemia.....	43
13. Correlación entre la expresión de Fas y la glucemia.....	43
14. Correlación entre expresión de FasL y glucemia.....	44
15. Relación entre expresión de Fas e índice de DOQUI.....	45
16. Correlación entre la expresión de FasL y la osmolaridad sanguínea.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

1. Clasificación de la Insuficiencia Renal Crónica de acuerdo al Filtrado Renal Glomerular.....	7
2. Características generales de los pacientes con DM2 e Infección de tejidos blandos(ITB).....	31
3. Características clínicas del grupo de estudio de pacientes con DM2 controlada y el porcentaje de apoptosis en LSP.....	32

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constituye un problema de salud pública mundial creciente. Esta enfermedad se caracteriza por la deficiente secreción o utilización de insulina que lleva a graves alteraciones en el metabolismo y al daño orgánico múltiple. Las infecciones de los tejidos blandos son frecuentes en los pacientes diabéticos. Los pacientes con DM pueden presentar incremento en la apoptosis de leucocitos de sangre periférica (LSP) debido a la hiperglucemia persistente, lo que puede afectar la respuesta inmune contra infecciones. Por lo que en este trabajo se estudió la presencia de apoptosis en LSP de pacientes con DM2 con infección en tejidos blandos y su correlación con evolución clínica. Se evaluó la proporción de células en apoptosis “espontánea” e “inducida” mediante la determinación de caspasa 3 activa, expresión de Fas y FasL por inmunohistoquímica, además de la fragmentación de DNA por la técnica de TUNEL. Se observó que los pacientes con DM2 e infección en tejidos blandos presentan más apoptosis inducida (TUNEL) y expresión de FasL en LSP. Se encontró correlación entre apoptosis inducida y expresión de FasL o glucemia, la cual también correlaciona con la expresión de Fas y FasL. Así mismo, encontramos correlación entre la expresión inducida de FasL y el índice DOQUI y osmolaridad sanguínea. En este trabajo mostramos por primera vez que existe un incremento en la apoptosis inducida de LSP en los pacientes DM2 con infección, lo cual puede explicar en parte la inmunosupresión con que cursan. Estos resultados sugieren mecanismos de apoptosis dependientes de caspasas con la posible participación de Fas y FasL. La correlación entre glucemia y expresión de Fas y FasL, sugiere que, de manera directa o indirecta, la glucosa induce la expresión de estas moléculas, lo cual podría explicar el mecanismo de la inducción de apoptosis en pacientes con DM2.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) constitutes an increasing worldwide public health problem. This disease is defined by a deficient secretion or peripheral utilization of insulin which drives to severe metabolic alterations and multiple organic damages. Soft tissue infections are common among diabetic patients. DM2 patients may increase peripheral blood leukocytes (PBL) apoptosis due to the persistent hyperglycemia, which may impair the immune response against infections. Therefore, in this work we studied the presence of apoptosis of PBL in DM2 patients with soft tissue infections, and whether there is correlation with the clinical features. The proportion of cells with “spontaneous” or “induced” apoptosis was assessed determining active caspase 3, Fas, and FasL expression by immunohistochemistry, and DNA fragmentation by TUNEL in PBL. We found that patients with DM2 and soft tissue infections showed more induced apoptosis (TUNEL) and FasL expression in PBL. Correlation between induced apoptosis and FasL or glycemia was found, which also correlated with Fas and FasL expression. Correlation between FasL expression and the DOQUI index and blood osmolarity was also found. In this work we demonstrated for the first time an increase in PBL induced apoptosis of DM2 patients with infection, which in part may explain the immunosuppression they present. These results suggest a caspase dependent apoptosis mechanism with the participation of Fas and FasL. The correlation between glycemia and Fas and FasL expression suggests that glucose may, directly or indirectly, induce the expression of these molecules, which may explain the induction of apoptosis in DM2 patients

1. ANTECEDENTES

1.1. Diabetes Mellitus.

1.1.1. Definición

La diabetes mellitus (DM), comprende a un grupo heterogéneo de enfermedades sistémicas, crónicas, de causa desconocida, con grados variables de predisposición hereditaria y la participación de diversos factores ambientales que afectan al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas que se asocian con una deficiencia en la cantidad, cronología de secreción y/o en la acción de la insulina. Estos defectos traen como consecuencia una elevación anormal de la glucemia después de cargas estándares de glucosa e incluso en ayunas, conforme existe mayor déficit de la secreción de insulina (1).

En la revisión por un comité de expertos del Grupo Nacional para la Información en Diabetes (NDDG) (*Nacional Diabetes Data Group*) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la clasificación de DM de 1979, fue modificada y trajo como consecuencia que en el 2000 se publicaran las nuevas recomendaciones para la clasificación y diagnóstico, quedando de la siguiente manera:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Destrucción de las células β pancreáticas que lleva a deficiencia absoluta de insulina (A. Autoinmune, B. Idiopática)
2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Resistencia periférica a la insulina predominante con deficiencia relativa en la secreción pancreática y viceversa.
3. Otros tipos específicos. Incluyen endocrinopatías, enfermedades de páncreas exógeno, defectos genéticos de insulina o de células β , etc.
4. Diabetes mellitus gestacional. Relación con el embarazo (2).

Permanecen los términos de intolerancia a la glucosa y de alteraciones de la glucosa en ayuno, como una etapa intermedia entre DM y glucosa normal, pero con mayor riesgo para presentar enfermedades cardiovasculares. Las cifras que se toman para glucosa normal son hasta 109 mg/dL. De 110 a 125 mg/dL como alteraciones de glucosa en ayuno. De 126 mg/dL y mayor se toma como diagnóstico provisional de DM, hasta obtener segunda muestra que corrobore hiperglucemia. Cuando se detecta esta a cualquier hora y se acompañe de síntomas típicos de DM es diagnóstico de DM. Una prueba de tolerancia a la

glucosa oral con cifra mayor de 200 mg/dL a las 2 horas, se considera como diagnóstico provisional hasta tener segunda muestra que lo corrobore, en tanto una prueba de tolerancia a la glucosa oral con cifras de glucosa a las 2 horas mayores de 140 mg/dL, pero menores de 200 mg/dL, se refiere como intolerancia a la glucosa (2).

1.1.2. Panorama epidemiológico.

En el decenio de 1985 a 1995, la población diabética mundial se incrementó considerablemente de 30 a 135 millones. En la actualidad se calcula que la población de personas con DM en el mundo es de 140 millones y se espera aumente a 300 millones en los próximos 20 años. En 1993, la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas mostró una prevalencia de DM de 7.2%. Esta enfermedad ocupa el cuarto lugar entre las principales causas de muerte y el primer lugar como causa de muerte entre las enfermedades crónico-degenerativas y representa 16.7% de las defunciones con una tasa de 32.7 por 100 000 habitantes en 1991, la cual, comparada con la de 1980 representa una variación absoluta de 11.67 puntos y 33.59% de variación relativa (7). La diabetes es la causa más frecuente de polineuropatía y alrededor del 70% de las personas con DM presentan alteraciones neuropáticas en los 10 años que siguen al diagnóstico. La diabetes se relaciona con el 50% de todas las amputaciones no traumáticas y la nefropatía diabética es causa de insuficiencia renal terminal y de ceguera en el adulto (3).

En 1997, cerca de cuatro millones de mexicanos padecía DM, de los cuales alrededor de 2 y medio millones eran derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (4). La diabetes constituye un problema de salud pública importante para el IMSS. En 2006, fue la tercera causa de consulta en el área de medicina familiar (7,779,198 consultas, 11.1 % del total), la cuarta causa de consulta de especialidades (649,090 consultas, 3.9 % del total), la octava causa de consulta de urgencias (329,621 consultas, 2.1% del total) y la octava causa de egreso hospitalario (66,300 egresos, 4.7 % del total). Ese año se registraron 20,857 defunciones por diabetes mellitus, con un impacto financiero superior a 634 millones de pesos erogados, solo en medicamentos. Además, los costos derivados de las complicaciones asociadas a la diabetes son una carga importante para el sistema de salud. La insuficiencia renal crónica, que requiere diálisis peritoneal, implica cada año un

gasto de 127 mil pesos, mientras que en hemodiálisis el costo se eleva a 234 mil y un trasplante renal alcanza los 230 mil pesos por paciente (5) .

1.1.3. Mecanismo de acción de la insulina.

La insulina introduce glucosa a las células a través de su receptor. Este receptor está compuesto por una subunidad alfa localizada en el exterior de la membrana, acoplada por puentes disulfuro a la subunidad beta, que es una proteína transmembranal. La insulina se une a la subunidad alfa y esto propicia de inmediato una autofosforilación de la subunidad beta, que tiene lugar en residuos de tirosina y serina. La autofosforilación de la tirosina parece estar en estrecha relación con el transporte de glucosa hacia las células, pues se ha demostrado que los adipocitos de pacientes con DM2 tienen una reducción de 50 a 80% en la actividad de tirosincinasa en comparación con individuos normales. Este defecto parece ser bastante específico del diabético, ya que no se observa en la resistencia a la insulina del obeso no diabético. Otro mecanismo celular de la resistencia a la insulina en la DM2 se relaciona con las proteínas transportadoras de glucosa (ver Figura 1). La exposición de las células a la insulina resulta en una translocación de las proteínas transportadoras de glucosa a partir de un depósito intracelular en los microsomas de baja densidad hacia la membrana celular. Las células de pacientes con DM2 tienen una disminución marcada de las proteínas transportadoras de glucosa, tanto en los microsomas de baja densidad como en la membrana celular. Estas proteínas transportadoras de glucosa (GLUT) (Glucose transporters) y de ellas la GLUT 4 se expresa en los dos tipos de tejidos en donde la acción de la insulina es predominante: el tejido adiposo y el músculo esquelético (6).

En la DM2 el páncreas es incapaz de mantener una producción adecuada de insulina, debido al incremento en la demanda por la disminución de la actividad biológica de la hormona. La acción anormal de la insulina quizás obedezca a una reducción de la actividad autocatalítica del receptor y, con mayor probabilidad, a anomalías de los segundos mensajeros que vinculan la activación del receptor con sistemas intracelulares específicos tanto enzimáticos como de transporte de glucosa (6).

Los factores de riesgo mas importantes para el desarrollo de resistencia a la insulina y DM2 son edad avanzada, obesidad, inactividad física y embarazo (7). La edad es el factor que se

relaciona más fuertemente con la hiperglucemia en ayuno; conforme se alcanza mayor edad el riesgo de desarrollar DM2 aumenta. Se sabe que la edad participa en los dos componentes patógenos principales, pues disminuye la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y aumenta la resistencia periférica a la hormona. La obesidad se caracteriza también por un estado de resistencia a la insulina; el riesgo de DM2 en un individuo obeso disminuye si logra reducir su peso corporal. La dieta alta en carbohidratos es difícil de separar de la obesidad como factor de riesgo para DM2. Aunque el papel del sedentarismo en el desarrollo de la DM2 es controvesial, el ejercicio físico mejora la sensibilidad a la insulina. El embarazo cursa con cambios hormonales, que sobre todo en sus últimos meses, ocasionan resistencia a la insulina, que puede favorecer la aparición de hiperglucemia en ayunas y DM2 (6;7).

1.1. 4. Complicaciones de la DM2.

Las complicaciones más frecuentes de la diabetes son la nefropatía, retinopatía, neuropatías, cetoacidosis y estado hiperosmolar. La hiperglucemia es uno de los factores de riesgo reconocidos para la aparición y progresión de las alteraciones vasculares y neurológicas de la DM. La elevación mantenida en las concentraciones de glucosa provoca cambios en las proteínas plasmáticas y tisulares con el consecuente daño orgánico. El aumento en la vía del poliol, el proceso de glucosilación no enzimático, el estrés oxidativo y el estrés carbonílico, son algunos de los mecanismos que explican el daño vascular inducido por la glucosa (8). Pueden afectarse vasos sanguíneos de diversos calibres. La macroangiopatía se desarrolla a medida que los vasos de mediano calibre disminuyen su luz, con depósitos de ateroma en su endotelio que provocan que la sangre tenga más dificultad para transitar a través de los mismos, lo que conduce a patologías isquémicas, cardíacas y cerebrales.

La microangiopatía conduce a retinopatía, neuropatía periférica y daño renal. La neuropatía periférica se afectan frecuentemente los nervios de las piernas y pies. La falta de sensibilidad puede conducir a descuido en lesiones que se infectan con facilidad y que con frecuencia terminan en amputaciones (9).

Los pacientes diabéticos de larga evolución presentan complicaciones renales como la Insuficiencia Renal Crónica (IRC), la cual por si misma es causa del fallecimiento del paciente en etapa terminal (10). La IRC se define como la reducción progresiva e irreversible del filtrado glomerular. La Fundación Nacional del Riñón (NKF) (*Nacional Kidney Foundation*), clasifica a la IRC en cinco estadios en función de su Filtrado Renal Glomerular (FGR) (Tabla 1)

Tabla 1
Clasificación de la Insuficiencia Renal Crónica
de acuerdo al Filtrado Renal Glomerular.

ESTADIO	DESCRIPCIÓN	FILTRADO GLOMERULAR (mL/min)
1	Daño renal con FGR normal	>90
2	Leve	60 a 89
3	Moderado	30 a 59
4	Severo	15 a 29
5	Falla renal terminal (diálisis)	< 15

Multiplicado por 0.85 en caso de ser mujer (11).

1.1. 5. Diabetes mellitus e infecciones.

La DM se asocia con frecuencia a infecciones, en especial cuando se presenta algún desequilibrio metabólico. Aunque la relación entre el control glucémico y el riesgo de adquirir infecciones no se conoce bien, los pacientes diabéticos presentan una alta predisposición a adquirir infecciones intrahospitalarias, principalmente en situaciones post-operatorias o cuando se encuentran en terapia intensiva (12-14). Se ha demostrado que las causas más comunes de hospitalización de pacientes diabéticos son las enfermedades en el sistema circulatorio (33%), los desórdenes inmunitarios, metabólicos, nutricionales y endocrinos (13%); sin embargo, las infecciones fueron la segunda causa de hospitalización (14%) (15;16)

Los factores que contribuyen a incrementar la susceptibilidad a las infecciones en DM2 incluyen a las enfermedades vasculares periféricas (acompañadas generalmente por isquemia), neuropatía y disfunción del sistema inmune (17;18). En modelos experimentales se ha demostrado que la diabetes representa un riesgo adicional en las infecciones

polimicrobianas. En los ratones obesos diabéticos (modelo que corresponde a DM2) algunas bacterias como: *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens* presentan un efecto sinérgico que resulta en mayor severidad de las infecciones polimicrobianas (19). Los ratones NOD (que padecen DM1) establecen respuestas inflamatorias ineficientes, con menor producción de quimiocinas, como la proteína inflamatoria 2 del macrófago (MIP-2) (macrophage inflammatory protein-2), reducción de estallido respiratorio y mayor daño en tejidos infectados por *S. aureus*. (20). Las células epiteliales de la vejiga de ratones NOD exhiben mayor adhesividad a *Serratia marcescens* (21). En los gatos diabéticos las infecciones urinarias por *E. coli* son comunes a pesar del control glucémico (22).

1.1. 6. Infecciones en tejidos blandos.

Aunque la definición de infección puede variar, implica la colonización de más de 10^5 bacterias por gramo de tejido. La infección se acompaña habitualmente de una respuesta inflamatoria e invasión a los tejidos. Debido a que las técnicas de microbiología cuantitativa no son de uso rutinario, el diagnóstico se basa sobre todo en los hallazgos clínicos.

La infección se clasifica desde un punto anatómico, como superficial cuando está confinada a los tejidos externos a la fascia (piel y tejido celular subcutáneo). La infección se considera profunda cuando afecta fascia, músculo, articulación o hueso. La infección también se clasifica por su severidad como infección que amenaza o no amenaza la extremidad. Las infecciones que no amenazan la integridad de la extremidad son aquellas que tienen menos de dos centímetros de celulitis, suelen acompañarse de una ulceración superficial y no presentan evidencia de isquemia o infección profunda establecida. Las infecciones que no cumplen estos criterios se consideran como una amenaza para la extremidad. Estas últimas a veces son de tal gravedad que amenazan la vida del paciente (23-26). Los factores de riesgo adicionales para las infecciones necrosantes son edad, alcoholismo, enfermedad vascular, neoplasia, inmunodepresión, obesidad, e insuficiencia renal crónica (27).

La celulitis necrosante polimicrobiana afecta primariamente a la piel y tejido celular subcutáneo; la fascitis necrosante se inicia en el plano más profundo de la fascia superficial y afecta secundariamente a la piel, respetando la fascia profunda y el músculo; la celulitis

necrosante sinérgica por Gram negativos se extiende hasta la fascia más profunda y puede afectar al músculo y finalmente la mionecrosis causada por el género *Clostridium* se inicia en el músculo y se puede extender a capas más superficiales.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones de tejidos blandos dependen del grado de profundidad de la lesión y del tipo de germen causal; por lo general, son infecciones polimicrobianas aunque en ocasiones se han descrito como tipo monobacteriana. Puede haber participación de bacterias anaerobias, y la más grave es la fascitis necrosante, que tiene múltiples sinónimos, como gangrena de Meleney, celulitis crepitante no clostridiana, celulitis sinérgica bacteriana y gangrena hemolítica subcutánea. Otras infecciones que comprometen estructuras subcutáneas incluyen la gangrena de Fournier, infección del implante peneano y la mucormicosis cutánea (28).

Las bacterias anaeróbicas que no forman esporas, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Peptoestreptococo* y *Peptococo níger*, pueden producir celulitis anaeróbica. En ocasiones estos anaerobios se acompañan de algunas especies bacterianas facultativas como estafilococos, algunos estreptococos o bacilos coniformes en una infección mixta. Por lo general el periodo de incubación es de varios días y la instalación del cuadro clínico gradual. Se observa edema moderado de la zona afectada, así como decoloración mínima de la piel; el dolor también es moderado. Con frecuencia hay secreción purulenta, oscura y fétida, acompañada de crepitación por la presencia de gas en tejido celular subcutáneo (16).

El tratamiento consiste en desbridación quirúrgica del tejido necrótico y drenaje de la secreción purulenta, dejando siempre descubierta la zona afectada. Además de estas medidas, deben administrarse antibióticos, en general de amplio espectro, que cubran tanto bacterias anaerobias como enterobacterias por la frecuencia de su vinculación (28).

La fascitis necrosante es una Infección grave del tejido blando subcutáneo que llega a la fascia. Su presentación es aguda y puede afectar cualquier parte del organismo, pero es más frecuente en extremidades, pared abdominal, región perianal. Los gérmenes encuentran como sitios de entrada a lesiones de la piel, abrasiones, quemaduras,

contusiones, laceraciones, inyecciones, mordeduras o heridas traumáticas o quirúrgicas, sobre todo después de procedimientos de abordaje abdominal.

Al principio el área afectada se presenta eritematosa y edematosa, con márgenes nítidos y dolorosa. El proceso progresa rápidamente con cambios en la coloración de la piel, ya que de eritematosa pasa a ser azul grisácea o morada, seguida de aparición de tejido necrótico. En este punto, el área afectada ya no es dolorosa, por el contrario se vuelve indolora por la trombosis de pequeños vasos con destrucción de nervios superficiales. Cuando se trata de infecciones polimicrobianas a menudo se observa gas subcutáneo y la toxicidad sistémica es muy importante. Habitualmente se encuentra leucocitosis y las tinciones de Gram se caracterizan por una gran diversidad de microorganismos sin presencia de leucocitos. El tratamiento consiste en una desbridación quirúrgica muy agresiva, que se repite cuantas veces sea necesario, además de la administración de antibióticos de amplio espectro con cobertura contra microorganismos anaerobios y aerobios, sobre todo del tipo de las enterobacterias (13;29;30).

1.1.7. Gangrena de Fournier.

La gangrena de Fournier corresponde a una fascitis necrosante que afecta los genitales. Aunque originalmente fue descrita de cómo un caso de gangrena en el escroto, algunos autores extienden la definición de la región a la infección perineal tanto en hombres como en mujeres (31;32).

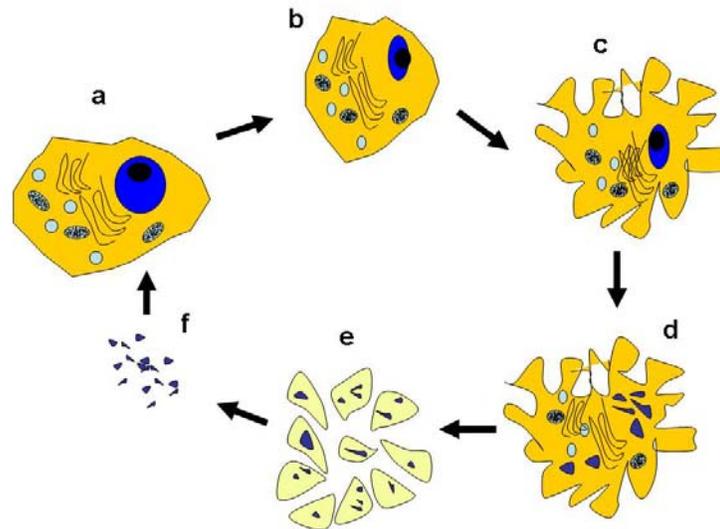
La gangrena de Fournier se inicia en la región perirrectal, los pacientes presentan ataque al estado general y dolor escrotal. La infección puede diseminarse a los glúteos, muslos o pared abdominal y progresar a septicemia en unos cuantos días. El control incluye desbridación quirúrgica agresiva y tratamiento con antibióticos de amplio espectro. Los gérmenes más frecuentes en estos pacientes son enterobacterias Gram. negativas. La mortalidad es elevada y en diferentes series se informa con valores del 7 al 95%, con un promedio del 20%, sobre todo cuando hay factores de riesgo adicionales, como el alcoholismo. (33-35).

1.2. Apoptosis.

1.2.1. Definición.

La palabra apoptosis es de origen griego y significa "lo que cae o lo que se desprende", en analogía a las hojas y pétalos que se desprenden de los árboles. La apoptosis es un programa de muerte celular regulado que requiere de la interacción de componentes de la red de señalización, que se activan por estímulos provenientes del interior o del exterior de la célula, entre los que se pueden enumerar la unión de ligandos a sus receptores de la superficie celular, daño al DNA como resultado de defectos en los mecanismos de reparación, el tratamiento por fármacos pro-apoptóticos y citotóxicos, irradiación ó supresión de factores de supervivencia (36).

Figura 1
Proceso de Apoptosis



a. Célula normal, b. Condensación de la cromatina (picnosis), c. Alteraciones de la membrana celular, d. Fragmentación nuclear, e. Cuerpos apoptóticos, f. Endocitosis y degradación.

La apoptosis es un proceso normal y necesario de los ciclos de vida de los organismos, pero la disfunción o regulación ineficiente del programa apoptótico está implicado en una variedad de condiciones patológicas, ya sean degenerativas, por infección o por autoinmunidad (23).

Las células en apoptosis tienen cambios morfológicos que se pueden identificar por microscopía de luz (36). Las imágenes características incluyen disminución en el tamaño celular, modificaciones en la apariencia de la membrana celular que se deben a alteraciones en el citoesqueleto, condensación de la cromatina (picnosis). Al final, la célula se descompone en varios fragmentos (cuerpos apoptóticos), los cuales son endocitados y degradados por macrófagos. De esta forma el contenido de las células seniles no se libera al exterior y se previene la respuesta inflamatoria (Figura 1).

Existen dos vías de apoptosis, la extrínseca y la intrínseca. La primera inicia por la activación de los “ligandos de muerte”, como el factor de necrosis tumoral (TNF) (Tumor necrosis factor), ligando de Fas (FasL) o el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)(TNF-related apoptosis inducing ligand), los cuales se unen a sus receptores en la membrana celular, originando la formación del dominio de muerte asociado a TNF (TRAAD)(TNF receptor associated death domain) y el dominio de muerte asociado a Fas (FAAD) (Fas associated death domain), que se acoplan a la pro-caspasa 8 con la consecuente activación de la llamada “cascada de las caspasas” 7,6 y 3, la cual conduce a la degradación del DNA. La otra forma de apoptosis se produce por la vía mitocondrial o intrínseca. Esta vía también involucra a la procaspasa 8, pero inicialmente se activa la proteína que interacciona con Bcl2 (BID) (Bcl2 interacting protein) en la membrana mitocondrial, que se despolariza y condiciona la liberación del citocromo C y del complejo Smac/DIABLO al citosol, lo que conduce a la formación del “apoptosoma”, que activa a las caspasas 9 y 3, y que converge en la vía final antes descrita para la vía extrínseca(37).

Es posible detectar y cuantificar apoptosis mediante evaluación de la expresión de las proteínas involucradas en este proceso (antiapoptóticas y proapoptóticas) así como la fragmentación de DNA (38).

1.2.2. Diabetes mellitus y apoptosis.

La apoptosis es un fenómeno que se encuentra involucrado en la patogenia de la diabetes y sus complicaciones. Se sabe que hay participación de apoptosis en el daño pancreático autoinmune en la DM1 (39).

Se ha demostrado que el tratamiento de diversas líneas celulares con concentraciones elevadas de glucosa se asocia con un incremento en la apoptosis de estas. Así, se ha demostrado en células β de páncreas de rata (40), cultivos primarios de microglia de rata (41), líneas celulares epiteliales de cristalino (42), células de túbulo proximal de riñón humano (43), células mesangiales murinas y humanas (44), células endoteliales (45), músculo liso de aorta humana (46), miocitos de corazón (47) y células de miocardio de ratones diabéticos (48), entre otras. Se ha demostrado que las ratas diabéticas tienen daño renal asociado con apoptosis (49). La apoptosis contribuye en el daño vascular que causa la nefropatía diabética (50). en ratas diabéticas se encuentran células apoptóticas en la aorta (51) y que la perfusión *ex vivo* de corazones de rata causa apoptosis (52). Por ello, se considera que la apoptosis participa en la aterogénesis (53) y en la cardiomiopatía dilatada (54). Sin embargo, en los pacientes diabéticos, aunque hay apoptosis en células del epitelio cristalino no parece correlacionar con el desarrollo y extensión de catarata (55).

La apoptosis que se presenta en la hiperglucemia crónica se asocia con la degeneración vascular y neuronal de la diabetes. En ratas diabéticas se presenta apoptosis de diversos tipos de neuronas, como las productoras de vasopresina (56) y de ganglios espinales (57), las corticales (58) y del hipotálamo (59), y también hay apoptosis en células mesangiales (60) lo que contribuye al daño microvascular de la neuropatía periférica. Se sabe que en pacientes diabéticos puede haber apoptosis asociada a neuropatía, aunque no se observa con la claridad del modelo de rata diabética (61).

En algunos modelos se ha descrito que el lipopolisacárido (LPS) puede aumentar la apoptosis (41) y los mecanismos de muerte incluyen las dos vías de apoptosis, pues se ha demostrado incremento en la expresión de la proteína asociada a fibroblastos (Fas) (Fibroblast associated) y la ausencia de alteraciones en la expresión de Bcl-2 y Bcl-x (40), así como la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Oxygen reactive species), como súper óxidos, óxido nítrico y peroxinitritos (62).

Se han demostrado múltiples mecanismos de apoptosis en la hiperglucemia crónica, los cuales involucran tanto a la vía intrínseca como a la extrínseca. En los ratones diabéticos se ha demostrado que la producción de ROS contribuye en la nefropatía (50;63). En la DM2

hay activación de NF κ -B que lleva a la inducción de citocinas proinflamatorias (64) aumento de IL-6 y TNF, (64) y su receptor en suero, la cual se acompaña de apoptosis en células endoteliales (65;66). En los ratones NOD con insulinoma hay activación de caspasa 3 por la vía Fas-FasL, por la acción de IL- β e IFN- γ (67;68).

La vía intrínseca también está implicada, pues las células mesangiales de ratones diabéticos muestran caspasa 9 activa,(60). Existe evidencia de que en humanos la hiperglucemia ocasiona la activación de varias proteínas proapoptóticas, entre las que se incluyen a las caspasas 9 y 3, así como proteínas de la familia de Bcl-2 (69). También se ha demostrado la desestabilización de la membrana mitocondrial y la consecuente liberación de citocromo C (69)

Existe información controvesial en relación a la apoptosis de células LSP (leucocitos de sangre periférica) en diabetes. En un estudio que incluyó pacientes con DM1 y DM2 se determinó apoptosis en LSP y se encontró que los pacientes con DM2 tenían disminución de glutatión intracelular, lo que refleja mayor estrés oxidativo, pero presentaban menor grado de apoptosis (70). Los autores explican estas observaciones como un reflejo de mayor rigidez de las células en pacientes diabéticos. Es importante señalar que en este estudio se determinó apoptosis “espontánea”, la cual indica la proporción de células muertas circulante y que las células apoptóticas pueden ser clarificadas rápidamente. Por otro lado, se puede “inducir” apoptosis *in vitro* mediante LPS, hipoxia o choque térmico y debe considerarse que la hiperglucemia potencia el efecto citotóxico del LPS y de la isquemia (18;41;59). En contraste, otro estudio demuestra apoptosis en neutrófilos de sangre periférica de pacientes con DM1, incluso cuando se encuentran bien controlados (71). En otro estudio, en el que se examinó la oxidación y el daño en el DNA de LSP de pacientes diabéticos, mediante electroforesis y determinación de sensibilidad a la formamildopirimidina DNA glicosilasa (FPG) y electroforesis, respectivamente, demostró que estos pacientes tienen una mayor susceptibilidad al daño por estrés oxidativo en los neutrófilos, pero no en los linfocitos o células mononucleares (72).

El índice de apoptosis en pacientes con diabetes puede estar relacionado al grado de control metabólico. Es más probable que se encuentre apoptosis de LSP cuando se

presenta cetoacidosis. Aunque se ha descrito que la acidificación del medio de cultivo induce activación de neutrófilos *in vitro*, con un aumento en la expresión de CD18 y disminución de apoptosis (73), hay evidencia de que *in vivo* la hiperglucemia, el metabolismo anaerobio y la formación de cuerpos cetónicos inducen apoptosis. En ratas hiperglucémicas se presenta daño cerebral cuando hay isquemia debido a la producción de lactato que lleva a acidosis intra y extracelular. De hecho, el daño celular intrínseco que causa la isquemia, se potencia por el incremento en la producción de radicales libres, la falla mitocondrial y la activación de endonucleasas (74). Estas observaciones concuerdan con el hecho de los pacientes con DM1 que cursan con cetosis, presentan daño oxidativo de LSP y apoptosis que puede disminuir su cantidad (75). Así mismo, se ha demostrado que las plaquetas pueden agregar fagocitos en apoptosis causando trombosis, respuesta inflamatoria y daño vascular (76).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las infecciones de tejidos blandos son complicaciones graves de la diabetes, que se presentan más frecuentemente en pacientes que no han llevado un control adecuado. Generalmente requieren de un manejo hospitalario integral y tienen una alta letalidad.

Estos pacientes cursan con descontrol metabólico como cetoacidosis. El proceso inflamatorio infeccioso y los productos tóxicos del metabolismo alterado tienen la capacidad de producir muerte celular programada. Si bien existen mecanismos compensadores que impiden la muerte celular masiva en estos pacientes.

Es razonable pensar que exista una asociación entre la magnitud de apoptosis y gravedad de los pacientes. Por ello, la finalidad de este proyecto es evaluar la existencia de apoptosis y moléculas que participan en la inducción de apoptosis (Fas, FasL y caspasa 3 activa), en LSP y si existe correlación con criterios clínicos en pacientes con DM2 y con infecciones en tejidos blandos.

Comprender mejor la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes, en este caso de los mecanismos de apoptosis y compensadores de supervivencia celular, permitirá evaluar

la utilidad de posibles indicadores pronósticos y encontrar medidas terapéuticas más efectivas.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.

1) ¿Cuáles son las diferencias en la expresión de Fas, FasL y caspasa 3 activa, así como el nivel de apoptosis en los pacientes con DM2 con y sin infección de tejidos blandos?

2) ¿Cuál es la correlación entre la expresión de Fas, FasL, caspasa 3 activa y la apoptosis en pacientes con DM2 con y sin infección de tejidos blandos?

3) ¿Cuál es la correlación entre la expresión de Fas, FasL, caspasa 3 activa y la apoptosis con criterios clínicos de la enfermedad?

4. HIPÓTESIS.

Los pacientes con DM2 con infecciones de tejidos blandos tienen alteraciones metabólicas que pueden inducir apoptosis de LSP. Estas alteraciones metabólicas constituyen un primer estímulo que es controlado por mecanismos de homeostasis celular, que impiden que las células mueran por apoptosis; sin embargo, al someter a las células a un segundo estímulo (choque térmico) las células desarrollarán apoptosis, con aumento en la expresión de moléculas relacionadas, como Fas, FasL y caspasa 3 activa. En consecuencia, se espera encontrar más apoptosis en LSP en condiciones de choque térmico y que exista correlación con parámetros clínicos.

5. OBJETIVOS.

5.1. General.

Identificar apoptosis y la expresión de moléculas involucradas en la apoptosis (Fas, FasL y caspasa 3 activa) en LSP de pacientes con DM2 sin infección, DM2 con infección en tejidos blandos y en individuos sanos, y determinar la correlación de la apoptosis con el grado de descontrol metabólico y algunas complicaciones crónicas de la enfermedad.

5.2. Específicos.

5.2.1. Determinar las diferencias en apoptosis espontánea e inducida en LSP de pacientes con DM2 sin infección y con infección de tejidos blandos.

5.2.2. Determinar la expresión espontánea e inducida de Fas, FasL y caspasa 3 activa en células de sangre periférica de pacientes con DM2 sin infección y con infección de tejidos blandos.

5.2.3. Determinar la correlación entre apoptosis, expresión de Fas, FasL y caspasa 3 activa con el grado de descontrol metabólico y algunas complicaciones crónicas de la DM2.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Lugar de realización.

Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS, y la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología, Unidad Médica de Alta Especialidad General del Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS.

6.2. Diseño del estudio.

Estudio clínico transversal comparativo en una muestra de 20 pacientes con DM2 con infección en tejidos, 14 pacientes con DM2 bajo control metabólico y 15 individuos sanos. La lectura de las muestras se realizó de manera ciega. Una vez reclutados los pacientes que reunieron los criterios de selección, previa aceptación y firma de carta de consentimiento bajo información, se les practicó evaluación clínica integral con atención especial a obtener los datos de control metabólico así como la existencia de complicaciones agregadas y todos estos datos se registraron en el expediente y en hojas especiales (anexo1). Acto seguido, se les tomó muestras para estudios de gabinete. Se incluyó la toma de 5mL de sangre en un tubo con anticoagulante para realizar la medición de apoptosis en LSP mediante marcaje de endiduras terminales con dUTP mediada por TdT (TUNEL)(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling), así como para la determinación de Fas, FasL y caspasa 3 activa. Después de la toma de la muestra la purificación de las células se realizó durante las dos primeras horas, para evitar la lisis celular.

6.3. Tamaño de la muestra.

La muestra se calculó en base a las observaciones de Shidham (70) considerando la diferencia de proporciones para los grupos de pacientes con DM2 sin infección y con infección, esperando una proporción de LSP apoptóticos del 0 - 5% en pacientes con DM2 sin infección y del 35% en DM2 con infección después de choque térmico, con un valor alfa de 0.05 y una potencia del 80%. Se requieren 15 pacientes con DM2 con infección de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N z_{\alpha/2}^2 P(1-P)}{(N-1)e^2 + z_{\alpha/2}^2 P(1-P)}$$

N = 400, número aproximado de pacientes con DM2 que se atienden al año en urgencias

Z= 0.05 (1.96)

P= Proporción de apoptosis en con infección DM2 (0.3)

e = 0.2

6.4 Criterios de selección.

6.4.1. Universo de trabajo.

Se realizó en una muestra de 20 pacientes con diagnóstico de DM2 mayores de 30 años, con infección en tejidos blandos que se hospitalizaron en el Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández" del Centro Médico Nacional "La Raza" del IMSS, y 15 pacientes con DM2 sin infección que asistieron para su control a la consulta en la clínica multidisciplinaria "Los Reyes" de la FES-Zaragoza UNAM, así como 15 controles sanos otorgados por el servicio de laboratorio clínico del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional "La Raza".

6.4.2. Criterios de inclusión.

- Pacientes que aceptaron participar en el estudio
- Consentimiento informado por escrito.
- Mayores de 30 años de edad,

- de cualquier género,
- en tratamiento con hipoglucemiantes orales o insulina,

6.4.3. Criterios de no inclusión

- Pacientes con DM1
- Acidosis láctica
- Coma hipoglucémico
- Trombosis mesentérica
- Pancreatitis aguda
- Cetoacidosis alcohólica
- Cetoalcalosis diabética
- Enfermedad Terminal
- Cáncer
- Encefalitis
- Cardiopatía isquemia aguda
- Hematuria
- Sospecha de infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
- Uso previo de glucocorticoides, cimetidina, clorpromacina, difenilhidantoína e inmunodepresores
- Hipopotasemia grave, broncoaspiración, edema cerebral, alcalosis de rebote, neumotórax, neumomediastino espontáneos.

6.4.4. Criterios de eliminación.

- Pacientes con información incompleta
- Evidencia de insuficiencia renal aguda, si no se corrige concentración de urea después de las maniobras de hidratación
- Insuficiencia renal previa por otras causas, sospecha de acidosis láctica, complicaciones como la hipoglucemia,
- Hipopotasemia grave, broncoaspiración, edema cerebral, alcalosis de rebote, neumotórax, neumomediastino espontáneos, shock séptico
- Iatrogenia.

6.4.5. Criterios de exclusión.

- Deseo de abandonar el estudio
- Datos incompletos

6.5. Variables.

6.5.1 Independientes.

Infección en tejidos blandos.

- Definición conceptual. Infección por microorganismos (bacterias, hongos o virus) que son capaces de generar un proceso inflamatorio y daño tisular local o generalizado.
- Definición operacional. Pacientes con diagnóstico de infección de tejidos blandos al ingreso al hospital.
- Categoría. Nominal dicotómica
- Escala de medición. Presente o ausente
- Unidad de medida. Si o no

Control metabólico de la diabetes.

- Definición conceptual. Pacientes con hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}) menor de 7%.
- Definición operacional. Pacientes que en el momento de la toma de muestra para la determinación de apoptosis tuvieran menos de 126 mg/dL de glucosa en sangre.

Clasificación del Grado de Descontrol Metabólico

CONTROLADA	< 126 mg/dl
LEVE	127 A 150
MODERADA	151 A 250
SEVERA	> 250

- Categoría. Cuantitativa.
- Escala de medición. Cuantitativa continua.

e) Unidad de medida. mg/dL

Glucemia

a) Definición conceptual. Cantidad de glucosa en sangre circulante.

b) Definición operacional. Cantidad de glucosa en sangre reportada por el laboratorio del hospital o la Clínica de Medicina Familiar.

c) Categoría. Cuantitativa discreta

d) Escala de medición. Discreta

e) Unidad de medida. mg/dL

Osmolaridad sanguínea

a) Definición conceptual. Concentración de solutos en el sangre (generalmente plasma), ésta permanece constante entre 285-295 mosmxkg⁻¹ H₂O, independiente de las fluctuaciones en la ingesta de agua y de solutos. Esta homeostasis se debe a mecanismos regulatorios muy precisos entre los cuales está el control de la ingesta y las pérdidas, pero de los cuales el más importante es la excreción de agua por el riñón.

b) Definición operacional. Cifra resultante de siguiente fórmula

$$\text{Osmolaridad sanguínea (mOsm/L)} = 2 (\text{Na}^+ + \text{K}^+) + \text{Glicemia (mg/dl)}/18 + \text{BUN (mg/dl)}/2.8$$

c) Categoría. Cuantitativa discreta

d) Escala de medición. Discreta

e) Unidad de medida. mOsm/L

Insuficiencia renal.

a) Definición conceptual. Pérdida lenta y progresiva de la función renal, definida como un bajo índice de filtrado glomerular, que es usualmente determinado indirectamente por el nivel de creatinina en el suero de la sangre.

b) Definición operacional. De acuerdo a Clasificación del grado de IRC de acuerdo a la escala de la Fundación para la Diálisis y la Calidad (DOQUI) (*Foundation Dialysis Outcome and Quality Initiative*).

Clasificación del
Grado de IRC

Grado de IRC	Índice DOQUI
SIN IRC (>90 ml/min)	1
IRC LEVE (60 a 89 ml/min)	2
IRC MODERADA (30 a 59 ml/min)	3
IRC SEVERA (15 a 29 ml/min)	4
IRC TERMINAL (<15 ml/min)	5

- c) Categoría. Cuantitativa discreta.
- d) Escala de medición. Discreta
- e) Unidad de medida. Grado, 1 a 5.

Complicación aguda de diabetes

- a) Definición conceptual. Se consideran aquí solo las complicaciones agudas de la diabetes resultado del aumento de la osmolaridad por la hiperglicemia y la acidosis por las alteraciones metabólicas
- b) Definición operacional. La misma
- c) Categoría. Nominal
- d) Escala de medición. Discreta
- e) Unidad de medida. Los siguientes estratos.

Complicación Aguda

	Síntoma
Estado Hiperosmolar	Osmolaridad > 310 Moles
Cetoacidosis	pH <7.35
Edo. Mixto	Estado Hiperosmolar y Cetoacidosis

6.5.2. Dependientes.

Apoptosis

- a) Definición conceptual. Muerte celular programada, observada durante procesos fisiológicos normales. Se caracteriza por contracción celular y condensación del núcleo, el cual se desintegra. Los leucocitos apoptóticos teñidos con Wright, presentan condensación del citoplasma con cromatina basófila y fragmentación del núcleo o colapso formando discretas vesículas (cuerpos apoptóticos) (77).
- b) Definición operacional. LSP positivos mediante el ensayo “*In Situ Cell Death Detection Kit*”, 1168 4817 919 (Roche Applied Science) Se considera positivo cuando hay coloración ocre en citosol o núcleo y se cuantificó mediante densitometría digital computada.

- c) Categoría. Cuantitativa discreta.
- d) Escala de medición. Discreta
- e) Unidad de medida. pixeles/mm².

Fas.

a) Definición conceptual. Proteína que actúa como factor letal sobre membranas celulares. Conlleva a la inducción de apoptosis al interactuar con su ligando FasL expresado en células efectoras en el epitelio activando receptores celulares específicos de muerte.

b) Def. Operacional. Proteína de superficie o citosólica de LSP detectada por el anticuerpo FAS (C-20) sc-705 (Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA) por inmunohistoquímica. Se considera positiva cuando hay coloración ocre en membrana o citosol.

- c) Categoría. Cuantitativa discreta
- d) Escala de medición. discreta
- e) Unidad de medida. pixeles/mm².

FasL.

a) Definición conceptual. Proteína que actúa como factor letal sobre membranas celulares. Conlleva a la inducción de apoptosis al interactuar con su receptor Fas expresado en la membrana celular. FasL se expresa en células efectoras en el epitelio activando receptores celulares específicos de muerte.

b) Definición operacional. Proteína de superficie o citosólica de LSP detectada por el anticuerpo FAS-L (N-20) sc-834 (Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA) mediante inmunohistoquímica. Se consideró positiva cuando hay coloración ocre en membrana o citosol y se cuantificó mediante densitometría digital computada.

- c) Categoría. Cuantitativa discreta
- d) Escala de medida. Discreta
- e) Unidad de medida. pixeles/mm².

Caspasa 3

- a) Definición conceptual. Enzima efectora en la vía de apoptosis, miembro de la familia de las cistein-aspartato proteasas, también conocida como CPP32, apopain, or YAMA.
- b) Definición operacional. Proteína citosólica o nuclear de LSP reconocida por el anticuerpo anti-caspasa 3 activa AB 3623 (Chemicon International, Temecula, CA USA) mediante inmunohistoquímica. Se considera positiva cuando hay color café u ocre. Se cuantifica mediante análisis densitométrico computado.
- c) Categoría. Cuantitativa discreta
- d) Escala de medición. Discreta
- e) Unidad de medida. pixeles/mm².

6.5.2. De control.

Edad.

- a) Definición conceptual. Tiempo transcurrido, generalmente expresado en años, a partir del nacimiento y hasta el momento en que se requiere contar dicho dato.
- b) Definición operacional. Años transcurridos desde el nacimiento hasta el momento del estudio.
- c) Categoría. Cuantitativa discreta
- d) Escala de medida. Discreta.
- e) Unidad de medida. Años cumplidos

Género.

- a) Definición conceptual. Expresión fenotípica correspondiente a características masculinas o femeninas.
- b) Definición operacional. Apariencia y características de Masculino o Femenino. El que exprese en paciente.
- c) Categoría. Nominal dicotómica
- d) Escala de medida. Masculino o femenino
- e) Unidad de medida. Masculino o femenino

6.5.3. Confusoras.

Alcoholismo.

a) Definición conceptual. La OMS ha sustituido el término alcoholismo por el de síndrome de dependencia al alcohol, y lo define como “un estado de cambio en el comportamiento de un individuo, que incluye, además de una alteración que se manifiesta por el consumo franco de bebidas alcohólicas, una continuidad de este consumo de manera no aprobada en su ambiente socio-cultural, a pesar de las dolorosas consecuencias directas que puede sufrir como enfermedades físicas, rechazo por parte de la familia, perjuicios económicos, y sanciones penales, es un estado de alteración subjetiva, en el que se deteriora el dominio de la persona dependiente, sobre su forma de beber, existe la urgencia de ingerir alcohol y se pone de manifiesto una importancia fundamental en el alcohol, en que el planteamiento de las ocasiones de beber, puede tener preferencia sobre el resto de sus actividades. Además de estos cambios, se observa un estado de alteración psico-biológica, con signos y síntomas a la privación del alcohol ingestión de bebidas alcohólicas para lograr su alivio y aumento de la tolerancia”.

b) Definición operacional. Hábito de consumir alcohol. Personas que aceptan consumir alcohol una vez por semana.

c) Categoría. Nominal dicotómica

d) Escala de medida Cualitativa

e) Unidad de medida. Si o no

Tabaquismo.

a) Definición conceptual. Enfermedad adictiva crónica al tabaco provocado principalmente, por uno de sus componentes activos, la nicotina; la acción de dicha sustancia acaba condicionando el abuso de su consumo. El tabaquismo es una enfermedad crónica sistémica perteneciente al grupo de las adicciones y está catalogada en el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales DSM-IV de la *American Psychiatric Association*. Actualmente supone la principal causa mundial de enfermedad y mortalidad evitable.

b) Definición operacional. Hábito de fumar tabaco. Personas que aceptan fumar tabaco de manera regular.

c) Categoría. Nominal dicotómica

d) Escala de medida Cualitativa

e) Unidad de medida. Si o no

6.6. Análisis estadístico.

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando un programa de análisis estadístico (Prism 4© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) (analysis of variance) de una vía. Utilizado análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre grupos. $p \leq 0.05$ se consideró como significativa. Para los análisis de correlación se realizó una prueba de Spearman.

6.7. Procedimientos.

6.7.1. Pacientes.

Veinte pacientes con diagnóstico de DM2 mayores de 30 años, con infección en tejidos blandos y 15 pacientes con DM2 controlada.

6.7.2. Purificación de LSP.

La purificación de LSP se realizó mediante la técnica de separación por gradiente empleando el reactivo “Lymphoprep” (Fresenius Kabi Norge AS, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway Lys), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se mezcló 1:1 de sangre problema con solución salina 0.9 %NaCl, mientras que se midió el volumen de “lymphoprep” estéril de acuerdo al volumen total de mezcla sangre/S.S., guardando la relación 3 mL lymphoprep-10 mL mezcla y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL la cantidad adecuada de lymphoprep y se adicionó lentamente por las paredes del tubo la mezcla sangre/S.S., esto se realizó con mucho cuidado para no romper el gradiente de densidad, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 30 minutos. Después se separó la capa de células con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y se colocó en otro tubo Falcon se adicionó una cantidad igual de solución salina fisiológica (SSF) a la capa extraída y se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 1500 rpm, finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de SSF.

6.7.3. Preparación de laminillas.

Después de la purificación una parte de las células fue sometida a choque térmico a 37°C por 2 hrs., y posteriormente los leucocitos fueron contados. En un pozo una mezcla de 50 μL de linfocitos, con 50 μL de azul tripano. Se colocaron 10 μL en una cámara de Neubauer con la mezcla y las células se contaron bajo microscopia de luz (20X), se realizó el cálculo para obtener 5×10^4 células/ μL .

Para la obtención de una laminilla a una concentración de 5×10^4 , se realizó la regla:

$$\text{No. de células contadas: } 1000 \mu\text{L} :: 5 \times 10^4 \text{ células: } X \mu\text{L}$$

X= volumen necesario para una laminilla a esta cantidad de células.

Este valor se multiplicó por el número de laminillas a elaborar y el valor obtenido se completó con SSF de tal forma que a cada celda de la citocentrífuga se le adicionaron 200 μL de muestra para cada laminilla. Después de dejar secar las laminillas se rotularon y se fijaron con formaldehído al 4% por 20 minutos. Después de haber transcurrido el tiempo se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se almacenaron para su posterior inmunotinción.

6.7.4. Citoinmunoquímica.

Reactivos.

- Silano (Sigma, CA. USA).
- Citrato de sodio (0.01 M pH 6.0).
- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Bloqueador Suero de Cerdo 2% (DAKO corporation, CA. USA).
- Biotina (Link, DAKO LSAB + kit, DAKO Corporation).
- Sustrato diaminobenzidina (DAB)(DAKO LIQUID DAB + Substrate-Chromogen Solution (DAKO corporation).

Anticuerpos.

- Anti-Fas (Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-FasL (Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA)

- Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) (Horseradish peroxidase) (DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).
- Anti-caspasa 3 activa (Becton, Dickinson and Company, NJ USA).

Método.

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un solo tiempo en todos los grupos. A partir de las laminillas obtenidas por citocentrifugación se procedió a la inmunotinción. Se realizó la recuperación de antígeno con citrato de sodio, por 20 min en baño María, posteriormente se realizaron 2 lavados para eliminar el exceso de citrato. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en suero normal de cerdo al 2%.

Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-caspasa 3 activa (1:250), anti-Fas (1:1000) y anti-FasL (1:250). Después de lavar con amortiguador de fosfatos (PBS) 1X, las laminillas se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina por 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar se adicionó estreptavidina conjugada a HRP, por último el color se generó mediante la adición del substrato DAB durante 1-4 minutos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina por 15 seg. Las muestras fueron deshidratadas bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

6.7.5. Determinación de la fragmentación de DNA mediante TUNEL.

A partir de las laminillas obtenidas mediante citocentrifugación, se procedió a realizar la evaluación de la fragmentación celular mediante TUNEL. Brevemente, se incrementó la permeabilidad de la membrana celular mediante la incubación de las laminillas en citrato de sodio (pH 6, 0.01M), por 20 minutos a 95°C en baño María. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60

minutos en suero normal de cerdo al 2%. Posteriormente se procedió a adicionar la enzima; se hizo una mezcla de 50 μ L de enzima con 450 μ L de buffer, que contiene oligonucleótidos conjugados con fluoresceína, la cual se incubó con las muestras por 60 minutos en a 37°C, en oscuridad. Se lavó 5 veces, 5 minutos con PBS 1X. Posteriormente se realizó la incorporación del anticuerpo anti-fluoresceína, para lo cual se adicionaron 20 μ L de poldioxanona (PDO) y se incubó a 37 °C/30 minutos, se lavó 5 minutos con PBS 1X en 3 ocasiones. El desarrollo de color se realizó con la adición de DAB, monitoreando bajo el microscopio de luz. Cuando se observó la coloración café en las células se detuvo el registro del tiempo y se eliminó el exceso de DAB e inmediatamente se lavó con agua corriente para detener la reacción, se contratiñó con hematoxilina (1:1 con agua destilada) por 30 segundos, se deshidrató y montó con resina sintética, se dejó secar mínimo 24 horas para hacer el análisis en el microscopio.

6.7.6. Cuantificación de células positivas inmunoteñidas.

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes (Imagen-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD. USA).

6.8. Recursos.

Biológicos:

Veinte muestras de pacientes con DM2 e infección en tejidos blandos, atendidos en el servicio de terapia intensiva del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS, así como 15 pacientes con DM2 bajo control metabólico, de la clínica multidisciplinaria “Los Reyes” de la FES-Zaragoza de la UNAM, y 15 individuos sanos que se presentaron al banco central de sangre del CMN “La Raza”, IMSS.

Equipo.

Microscopios de luz, equipo comercial para la técnica de inmunohistoquímica y analizador de imágenes.

Humanos:

Un médico internista, 3 Doctores en Ciencias, y 3 Químico Fármaco biólogos.

Químicos:

Soluciones químicas para lavar y preparar las muestras y anticuerpos para la inmunohistoquímica.

6.9. Aspectos Éticos y de Bioseguridad.

El presente estudio se apegó a las normas sobre investigación en seres humanos de la Coordinación de Investigación en Salud, así como a las disposiciones contenidas en La Ley General de Salud en materia de Investigación, acordes a la Declaración de Helsinki y a sus adecuaciones posteriores (Hong Kong y Tokio), en cuyo marco conceptual se basan la información amplia y minuciosa acerca del proyecto y las aclaraciones en todos sentidos a las dudas de los pacientes o representantes legales de los candidatos a participar, así como la elaboración de la carta de consentimiento informado, que además de incluir las razones y justificación del estudio contempla los posibles riesgos y los beneficios. Se mantuvo el respeto a la confidencialidad de la información.

7. RESULTADOS.

7.1. Descripción clínica.

Se estudiaron 20 pacientes consecutivos con diagnóstico de DM2 e infección de tejidos blandos (ITB) (Tabla 2) 15 pacientes con DM2 sin infección (Tabla 3) y 20 personas sanas. Entre los diabéticos con ITB se encontraron 15 hombres y 5 mujeres, en tanto que en los diabéticos sin infección se encontraron 13 hombres y dos mujeres.

Tabla 2
Características generales de los pacientes con DM2 e Infección de tejidos blandos (ITB).

Paciente	Tiempo de Evolución (años)	Sexo	Edad	Glucosa (mg/dl)	Grado de Descontrol	Diagnostico	Grado de IRC	Complicación Aguda	Leucocitos	Desenlace	% de Apoptosis	
											Espontánea	Inducida
1	1	F	51	315	Severo	Fascitis cuello	Sin		11400	Alta	1	33
2	10	F	66	317	Severo	Absceso cara	Leve	Edo. Hiper	8400	Alta	20	S/D
3	10	F	60	193	Moderado	Fascitis perine	Sin			Alta	0	17
4	3	M	56	149	Leve	Fascitis MP	Leve		16500	Alta	0	4
5	8	M	47	455	Severo	Fournier	Leve	Edo. Hiper	14500	Alta	0	8
6	11	M	59	402	Severo	Sx Fournier	Leve	Ceto	11100	Deceso	0	35
7	9	M	57	634	Severo	Sx Fournier	Leve	Edo. Hiper	4660	Alta	0	15
8	11	M	43	229	Moderado	Fournier	Sin		6700	Alta	0	
9	20	M	74	336	Severo	Absceso geniano	Leve		11400	Alta	0	7
10	15	M	59	300	Severo	Pie Diabético	Moderada		10400	Alta	0	2
11	10	M	64	279	Severo	Fascitis MPD	Leve		6000	Alta	0	2
12	1	M	49	103	Controlado	Absceso cuello	Leve	Edo. Hiper	4200	Deceso	0	0
13	1	M	44	127	Leve	Fascitis cadera	Sin		9300	Alta	0	4
14	5	F	72	448	Severo	Fournier	Severa	Edo. Mixto	7000	Deceso	4	8
15	18	F	65	208	Moderado	Sx Fournier	Moderada		19100	Alta	12	32
16	6	M	53	311	Severo	Fascitis Abdominal	Sin		13100	Alta	16	34
17	1	F	63	112	Leve	Sx Fournier	Sin		19300	Alta	49	84
18	1	M	41	107	Controlado	SX Fournier	Sin		13.5	Alta	2	3
19	3	M	59	178	Moderado	Sx Fournier y Fascitis Abdominal	Sin	Edo. Hiper	9400	Deceso	0	S/D
20	1	M	63	148	Leve	Fascitis Abdominal y Perine	Sin		5700	Alta	2	17
Promedio	7.25		57.25	268							5.3	21

La edad promedio de los diabéticos sin infección fue de 59.9 años (39 a 80), en tanto que en aquellos con ITB fue de 57.3 (41-74). El tiempo de evolución promedio de la diabetes en el grupo de pacientes sin infección fue de 8.8 años (1 a 25), en tanto que en los pacientes con ITB fue de 7.3 (1 a 20). La glucemia promedio para el grupo de diabéticos sin infección fue de 141.9 mg/dL (99 a 200), en tanto que para el grupo de DM2 con infección fue de 254

mg/dL (103 a 634) (Tabla 3). De los cuales siete presentaron fascitis, nueve cursaban con gangrena de Fournier, tres tenían abscesos y uno pie diabético. El 50% de los pacientes con DM2 e infección presento descontrol metabólico severo, en 20% fue moderado y en 15% fue leve, solo el 15% estaban controlados; mientras que en el grupo de DM2 sin infección 35% tenían descontrol metabólico moderado, 7% descontrol leve y el 57% estaban controlados

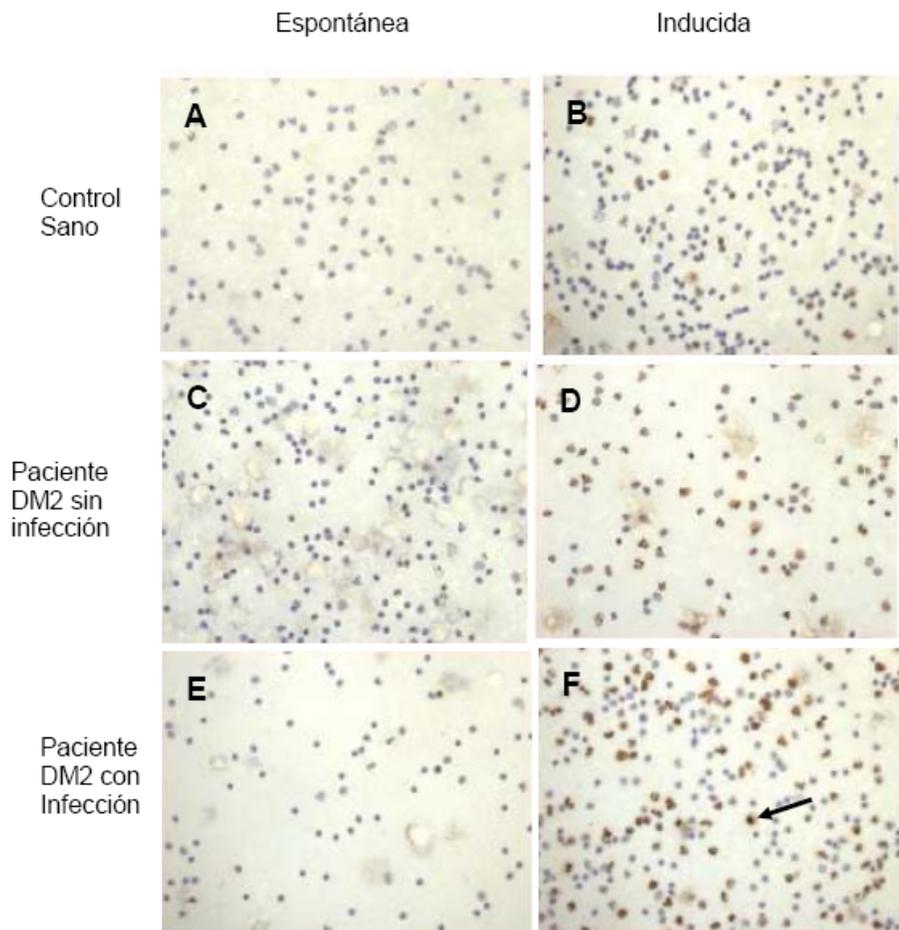
Tabla 3
Características clínicas del grupo de estudio de pacientes con DM2 controlada y el porcentaje de apoptosis en LSP.

Paciente	Tiempo de Evolución (años)	Sexo	Edad	Glucosa (mg/dl)	Tratamiento	% de Apoptosis	
						Espontánea	Inducida
1	1	M	52	120	Hipo-glucemiante	5	12
2	15	F	66	120	Hipo-glucemiante	12	4
3	20	F	66	133	Hipo-glucemiante	5	8
4	25	F	75	161	Hipo-glucemiante	13	8
5	16	F	76	99	Hipo-glucemiante	1	19
6	4	F	49	145	Metformina	0	4
7	6	F	50	160	Dieta	4	
8	5	F	39	115	Glibenclamida	3	4
9	15	F	73	161	Hipo-glucemiante	3	S/D
10	1	M	56	134	Glibenclamida	4	10
11	8	F	65	200	Glibenclamida	0	8
12	1	F	80	150	Mibenclamida	0	1
13	1	F	42	110	Dieta	15	1
14	5	F	49	157	Biloclón	5	21
Promedio	9.4		59.9	142		4.7	8.3

7.2. Evaluación de apoptosis por TUNEL.

En la Figura 2 se presentan resultados de apoptosis cuantificada por TUNEL en los diferentes grupos experimentales. La apoptosis en las muestras de los controles sanos sometidas a choque térmico fue mínima (Figura 2B), en comparación con las mismas muestras sin choque térmico (Figura 2A). Se pudo observar tinción principalmente nuclear y citoplásmica. En general, se encontró mayor número de células apoptóticas en los pacientes con DM2 e ITB. Se encontró un incremento en la apoptosis inducida por choque térmico (Figura 2F) en comparación con la apoptosis espontánea en los mismos pacientes (Figura 2E).

Figura 2
Apoptosis en LSP mediante TUNEL

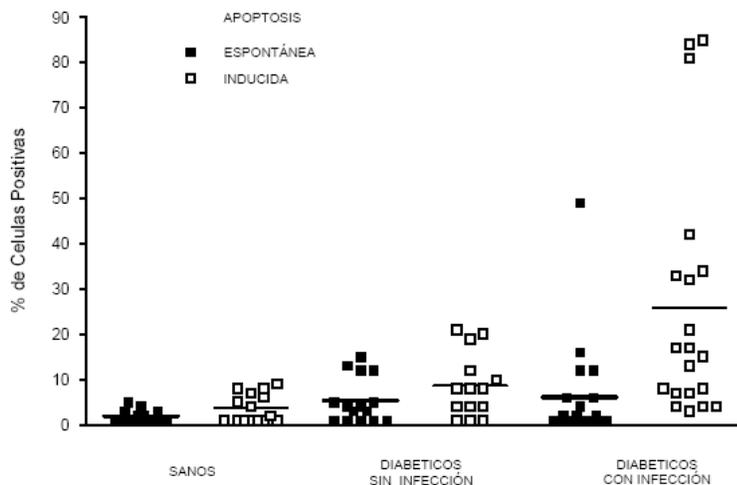


Los controles sanos no presentan fragmentación de DNA (células color azul), (A y B). En LSP de pacientes con DM2 e infección se observa apoptosis en las muestras sometidas al choque térmico (F) por la tinción (café oscuro) principalmente en el núcleo de las células (flecha). En las muestras de los pacientes con DM2 sin infección se observa una discreta presencia de células positivas para TUNEL (café claras), en las muestras sometidas al choque térmico (D).

En los pacientes con DM2 sin infección se encontró tinción más leve en las LSP sometidas a choque térmico (Figura 2D), en comparación con las células de los mismos pacientes pero sin recibir choque térmico (Figura 2C). En algunas muestras, sobre todo en el grupo de DM2 con infección, se pueden observar cuerpos apoptóticos teñidos de color café característicos de una apoptosis tardía.

Se realizó un análisis densitométrico digital computado para asignar un valor numérico a la intensidad de las tinciones y disminuir la subjetividad de la evaluación visual. El análisis de la apoptosis (células TUNEL positivas) se presenta en la Figura 3.

Figura 3
Proporción de células positivas para TUNEL



Cada línea representa la media de cada uno de los grupos del número de células positivas (color café). Después de la tinción de TUNEL, se contaron 200 células por laminilla, y se calculó el porcentaje de células positivas para TUNEL en LSP. Apoptosis espontánea (■) y apoptosis inducida (□). Se observa una diferencia en el número de células TUNEL positivas en el grupo de pacientes con DM2 e infección, la cual es estadísticamente significativa (***) $p=0.0001$ vs controles sanos. ANOVA).

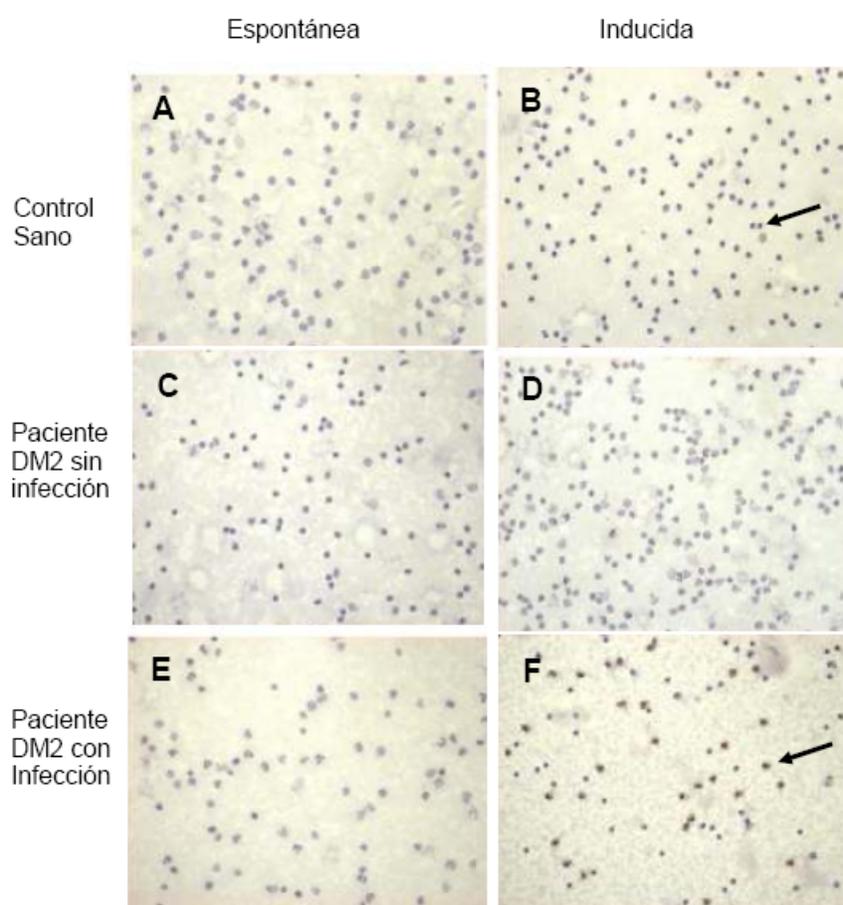
Se observó que no existe diferencia significativa entre los diferentes grupos de pacientes cuando las muestras que no fueron tratadas con choque térmico (menos del 5% de apoptosis en los diferentes grupos); sin embargo, en las células tratadas con choque térmico, se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$), entre los

pacientes con DM2 e infección ($22.5 \pm 4.2 \%$) y los pacientes con DM2 sin infección ($8.9 \pm 1.2\%$) y controles sanos ($4.5 \pm 1.8\%$).

7.3. Expresión de Caspasa-3 activa.

En la Figura 4 se presentan resultados representativos de la expresión de caspasa 3 activa por inmunocitoquímica.

Figura 4
Imágenes representativas de las células caspasa 3 activa positivas

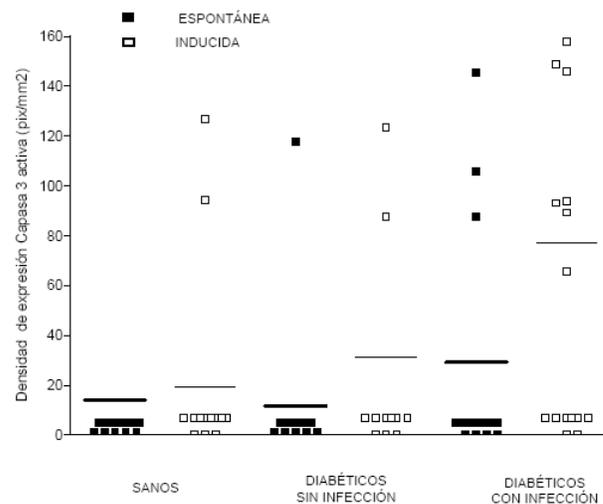


Los LSP de sangre periférica de los controles sanos y los DM2 sin infección en condiciones espontáneas no expresan caspasa 3 activa (color azul) (A y C), mientras que hay una ligera positividad en las células de pacientes con DM2 con infección en condiciones de no inducción (color café claro) (E). Los LSP sometidos a choque térmico de los controles sanos y los pacientes con DM2 sin infección muestran expresión discreta (color café) (B y D), mientras que las células sometidas a choque térmico de pacientes con DM2 e infección muestran una mayor positividad para caspasa 3 activa (color café en núcleos) (F).

Las muestras de los tres grupos experimentales que no fueron sometidas a choque térmico carecen de expresión de caspasa 3 activa (Figura 4A, C, y E). Los LSP proveniente de pacientes con DM2 e infección y sometidos a choque térmico (Figura 4F), muestran evidente expresión de caspasa 3 activa, mayor en comparación con las células provenientes de los pacientes con DM2 sin infección o los controles (Figura 4B y D). Lo cual es muy consistente con los hallazgos obtenidos por TUNEL. La expresión de esta proteína fue principalmente citoplásmica, aunque en algunas muestras en el grupo de DM2 con infección se pudo observar tinción nuclear, lo cual denota translocación nuclear, paso muy importante para la inducción de la degradación del DNA.

El análisis densitométrico de la expresión de caspasa 3 activa (Figura 5) indica un comportamiento parecido al encontrado con la tinción de TUNEL, pues las células provenientes de los diferentes grupos de pacientes que no fueron sometidas a choque térmico exhiben expresión similar de caspasa 3 activa.

Figura 5
Análisis densitométrico de la expresión de caspasa 3 activa

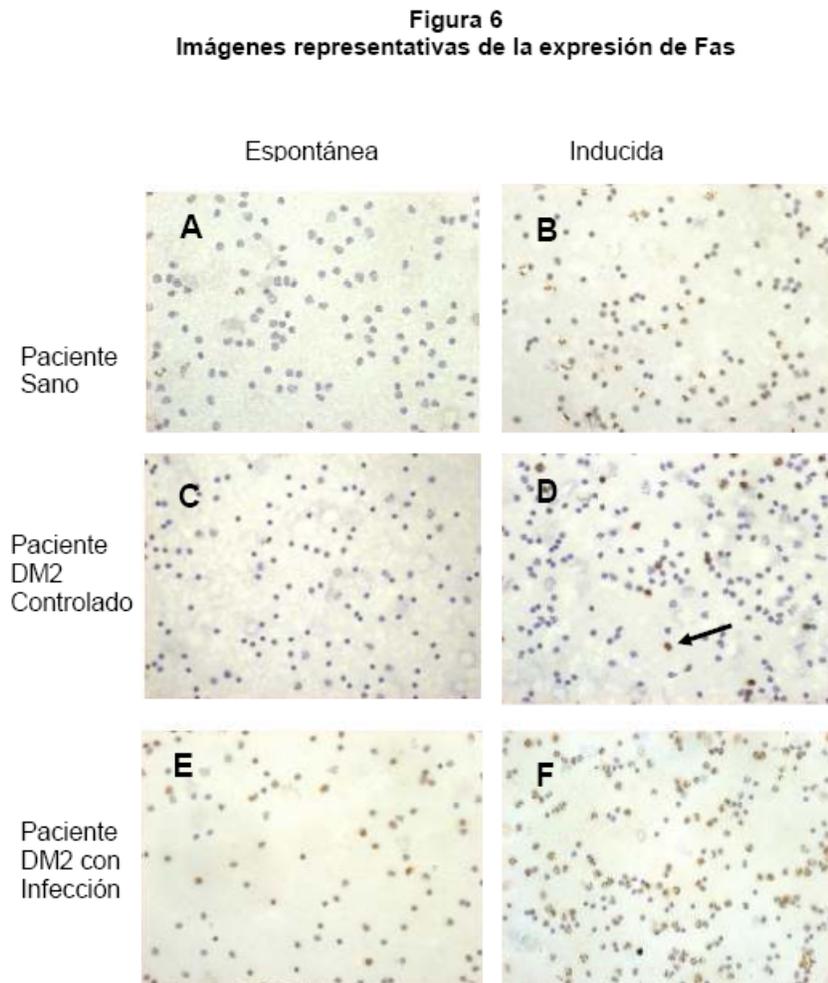


Análisis densitométrico digital de la inmunocitoquímica para caspasa 3 activa en LSP (ejemplos presentados en la figura 3). Se presenta la media de muestras por triplicado de los diferentes pacientes. Apoptosis espontánea (■) y apoptosis inducida (□). Se observa diferencia en la densidad de células de los pacientes del grupo de diabéticos con infección (* $p=0.0129$) en la apoptosis inducida. (Densidad de expresión en píxeles/mm²)

En contraste, en las muestras sometidos a choque térmico, las células de pacientes con DM2 e infección presentan mayor en la expresión de caspasa 3 activa en comparación con las células de pacientes con DM2 sin infección e individuos sanos ($p= 0.0129$, ANOVA).

7.4. Expresión de Fas.

La Figura 6 ilustra resultados característicos de la expresión de Fas.

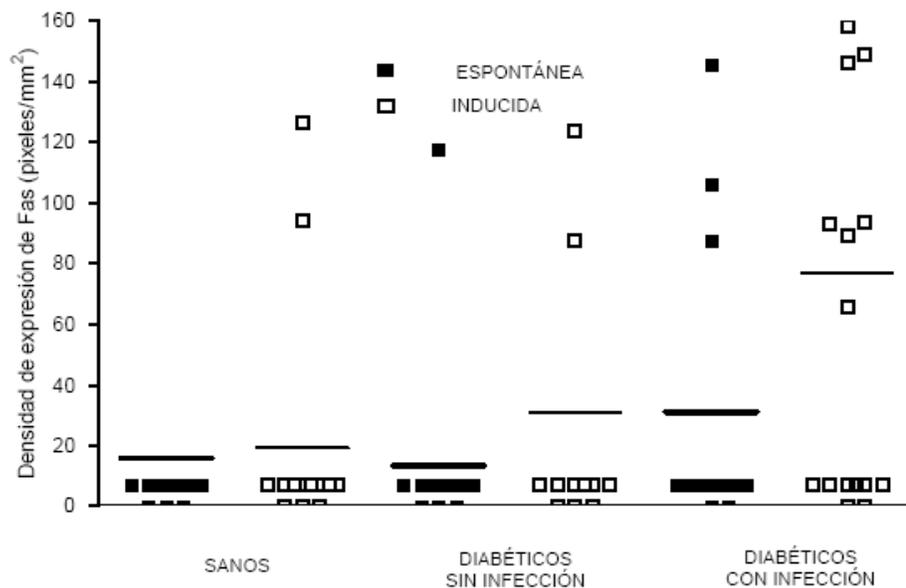


Los controles sanos, muestra expresión de este receptor de muerte, principalmente a nivel citoplásmico, solo cuando las células son sometidas a choque térmico de igual manera que en los pacientes con DM2 controlada (A, B, C y D). En la muestras de pacientes con DM2 e infección, se observa una expresión en las células que no fueron sometidas a choque térmico (E), sin embargo, en las células de los mismos pacientes sometidas al choque térmico se incrementa de manera importante la expresión de Fas principalmente en el membrana celular y citoplasma (F).

De manera interesante encontramos que en general, la expresión de esta proteína está disminuida en las LSP que no fueron sometidas a choque térmico (expresión espontánea) en los pacientes con DM2 tanto sin infección, como con infección, si se comparan con los pacientes sanos. No se observan cambios importantes en la expresión de esta proteína en las muestras sometidas a choque térmico (expresión inducida) (Figura 6B, D y F).

El análisis densitométrico de la densidad de la expresión de Fas se muestra en la Figura 7. Existe menor expresión de esta proteína en los LSP sin choque térmico (expresión espontánea) de DM2 sin infección y DM2 con infección, en comparación con la encontrada en individuos sanos ($p= 0.0053$, ANOVA). No se observan diferencias significativas entre los grupos estudiados cuando los LSP fueron tratados con choque térmico (expresión inducida),

Figura 7
Análisis densitométrico de la expresión de Fas

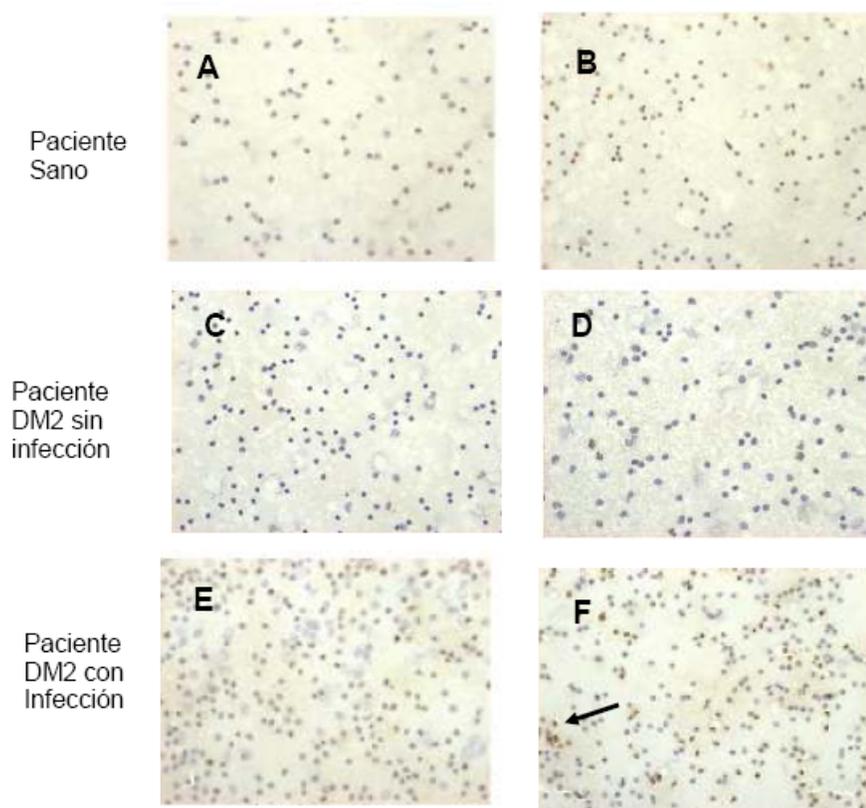


Cada línea representa la media de los diferentes pacientes analizados por inmunocitoquímica para Fas en células de sangre periférica no sometida a choque térmico (■) y sometida a choque térmico (□). Se observa menor expresión en células de pacientes del grupo de DM2 sin infección en relación a los que presentaron DM2 con algún tipo de infección ($*p= 0.0053$ vs pacientes sanos, ANOVA).

7.5. Expresión de Fas-L.

La Figura 8 presenta resultados característicos de la expresión de Fas-L.

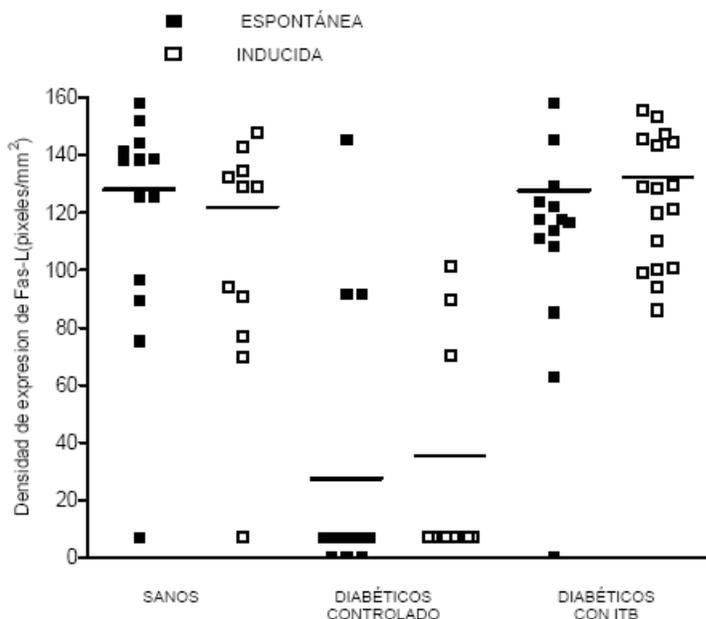
Figura 8
Imágenes representativas de la expresión de FasL



Las células de sangre periférica de los controles sanos muestran una ligera expresión de FasL (color café), principalmente a nivel citoplásmico, solo en las células que fueron sometidas al choque térmico (**A** y **B**), resultados similares se observaron en las células de pacientes con DM2 bajo control (**C** y **D**). En contraste, las muestras que corresponden a los pacientes con DM2 e Infección muestran claramente un aumento en la expresión del ligando de Fas principalmente en el membrana celular y citoplasma, similar a lo que ocurre con la expresión de Fas (**E** y **F**), tanto en las células sin choque térmico como en las que se sometieron al choque térmico.

Los LSP de pacientes con DM2 e infección manifiestan expresión elevada de FasL, tanto en las células tratadas como en las no tratadas con choque térmico (Figura 8E y F). En contraste con las LSP de pacientes con DM2 sin infección (Figura 8C y D) o los controles (Figura 8A y B). El análisis densitométrico de la densidad de expresión de Fas-L (Figura 9)

Figura 9
Análisis densitométrico de la expresión de Fas-L



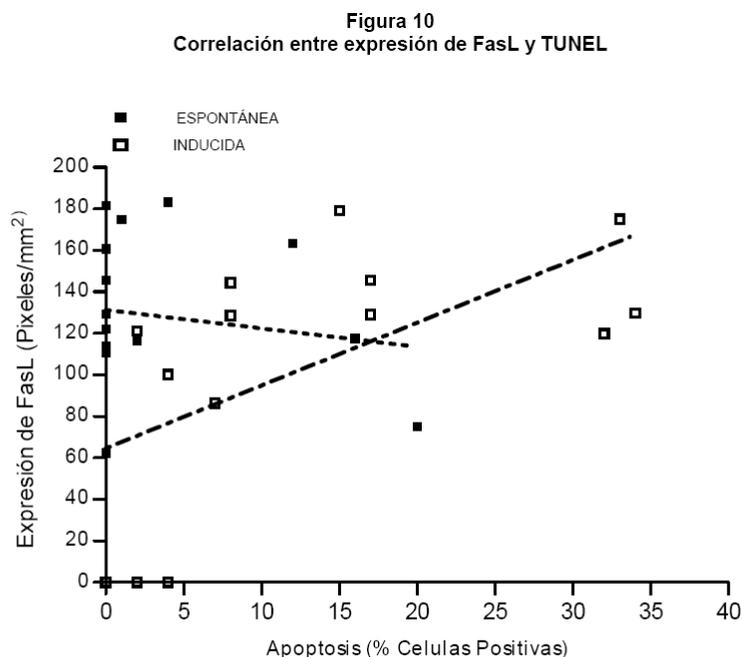
Cada línea representa la media de los diferentes pacientes analizados por inmunocitoquímica para Fas-L en LSP no sometidos a choque térmico (■), se observa mayor expresión de esta proteína en los pacientes del grupo de DM2 con infección en comparación con los controles sanos ($***p=0.0021$ vs individuos sanos). En los LSP sometidos a choque térmico (□) se observa diferencia en el grupo de DM2 con infección ($**p=0.0001$ vs Individuos sanos con DM2 sin infección, ANOVA).

en las células no tratadas con choque térmico de los pacientes con DM2 e infección es mayor que la encontrada en los pacientes con DM2 sin infección o con el grupo control ($p=0.002$). De igual manera, las células tratadas con choque térmico de pacientes con DM2 e infección muestran mayor expresión de Fas-L en comparación con los pacientes con DM2 sin infección y de lo grupo control ($p=0.002$).

7.6. Apoptosis y características clínicas.

Analizamos la posible correlación entre el tipo de infección y el índice de apoptosis en el grupo de pacientes con DM2 e infección. Se encontró asociación entre apoptosis y el tipo de infección, pues los pacientes con síndrome de Fournier muestran una media de apoptosis del 20.44% y el 33% de estos presentó un apoptosis inducida por arriba del 20%. El 35 % de los pacientes analizados presentó fascitis, con una media de apoptosis inducida de 23.28%, de la cual el 28% de estos pacientes mostró una apoptosis por arriba del 20%. El 15% de los pacientes presentó abscesos, de los cuales el 100% mostró una apoptosis menor del 5%. Cabe mencionar que el 95 % de los pacientes analizados muestra una apoptosis espontánea por debajo del 20% de manera independiente al tipo de infección.

No se encontró correlación entre la expresión de Fas y el índice de apoptosis espontánea o inducida (datos no mostrados), pero si entre expresión de FasL y apoptosis inducida ($r=0.5935$, $p=0.0126$), aunque que no existió correlación entre la expresión de FasL y la apoptosis espontánea ($r=0.1456$, $p=0.3011$) (Figura 10).

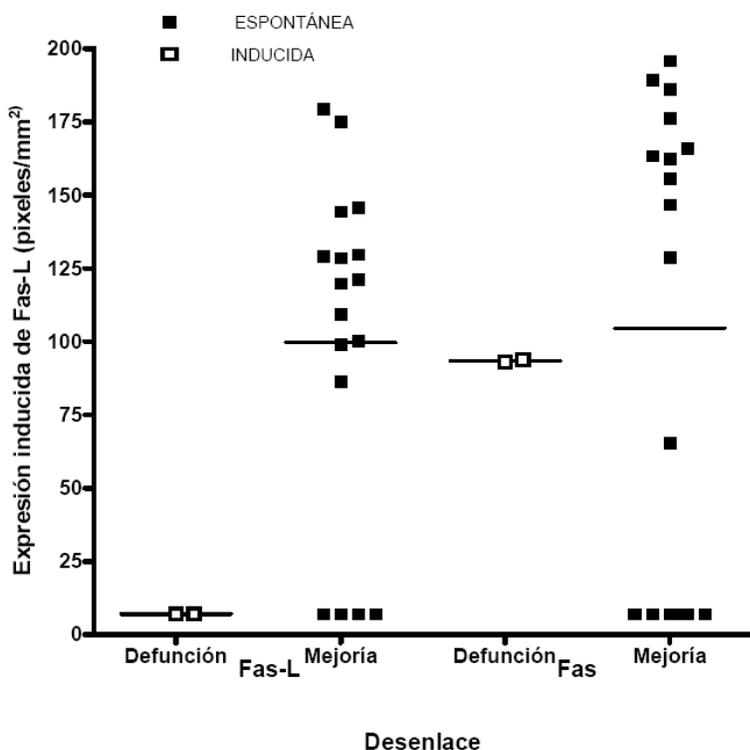


El porcentaje de apoptosis en los pacientes con DM2 e infección muestra una correlación positiva con la expresión de FasL inducida (---) Lo cual no se observa con la expresión de FasL espontánea (···) ($r^2 = 0.3522$, $p=0.0253$ vs $r^2 = 0.02149$, $p=0.6021$).

Además, se evaluó la posible correlación entre los diferentes parámetros clínicos (Tablas 2 y 3), con el porcentaje de apoptosis, y con la expresión de Fas, y FasL.

No se encontró correlación entre proporción de LSP en apoptosis o la expresión de Fas con desenlace clínico (muerte); sin embargo, la expresión de FasL parece tener correlación inversa con la muerte de los pacientes ($r = -0.6051$, $p = 0.0050$) (Figura 11),

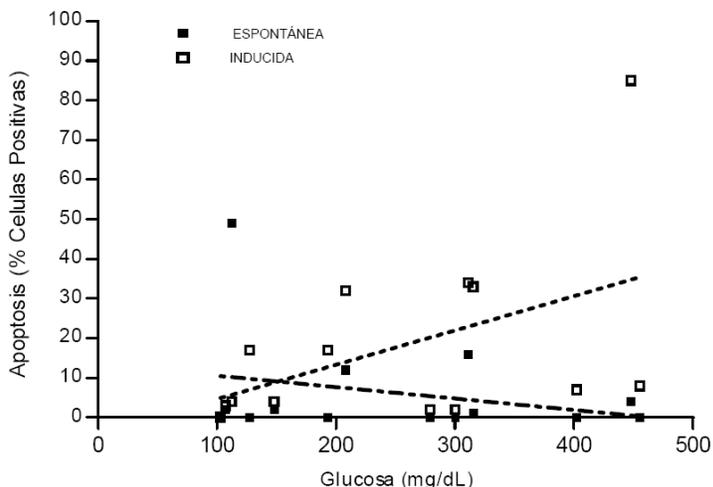
Figura 11
Expresión de FasL de acuerdo al desenlace clínico



Los LSP de los pacientes que fallecieron presentaron mayor expresión de Fas que de FasL en condiciones de choque térmico ($p = 0.005$).

aunque solo hubo dos defunciones y el tamaño de muestra puede ser insuficiente para hacer esta inferencia. Tampoco se demostró correlación entre proporción de apoptosis de LSP espontánea o inducida y glucemia ($p = 0.3895$ y $p = 0.0238$, respectivamente) (Figura 12), osmolaridad sanguínea, tiempo de evolución de la DM2 o índice DOQUI.

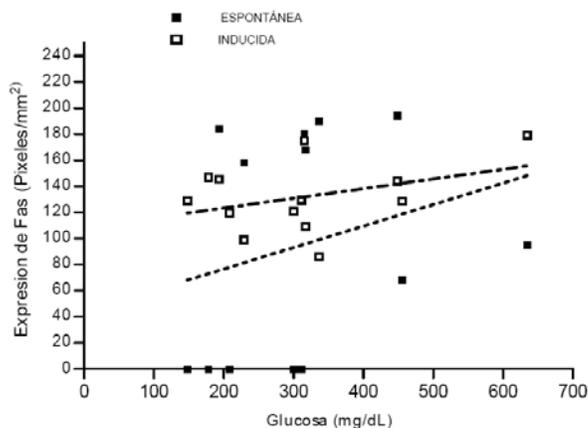
Figura 12
Correlación entre apoptosis y glucemia



En pacientes con DM2 e infección el porcentaje de apoptosis (TUNEL) inducida (---) muestra correlación discreta positiva con la glucemia, lo que no se observa con la apoptosis espontánea (- -) ($r^2 = 0.2277$, $p = 0.0845$ vs $r^2 = 0.07491$, $p = 0.3437$).

La expresión de Fas tanto en condiciones espontáneas como inducidas correlaciona con la glucemia (Figura 13) (Spearman, $r = 0.6157$, $p = 0.0043$ y $r = 0.4495$, $p = 0.0307$ respectivamente).

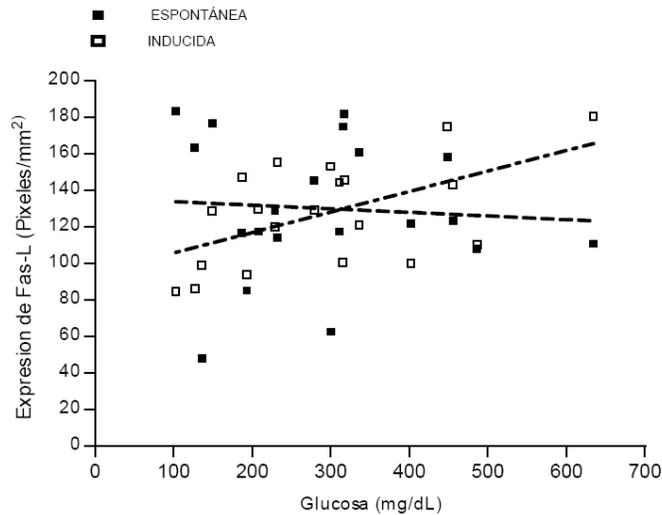
Figura 13
Correlación entre la expresión de Fas y la glucemia



La expresión de Fas tanto espontánea (- -) como inducida (---) en los pacientes con DM2 e infección muestra correlación positiva con la glucemia ($r^2 = 0.615$, $p = 0.004$ y $r^2 = 0.449$, $p = 0.030$ respectivamente).

En tanto que la expresión FasL solo correlaciona con la glucemia en condiciones de inducción (Figura 14), ($r = 0.5295$, $p = 0.0314$).

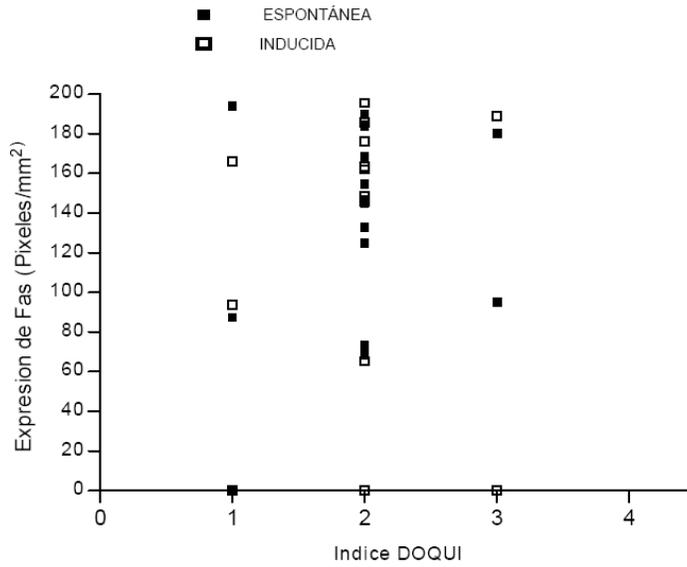
Figura 14
Correlación entre expresión de FasL y glucemia



En los pacientes con DM2 e infección la expresión inducida de FasL (---) muestra una correlación positiva con la glucemia, lo cual no se observa con la expresión de FasL espontánea (--) ($r^2 = 0.3046$, $p = 0.0116$ vs $r^2 = 0.005$, $p = 0.7642$).

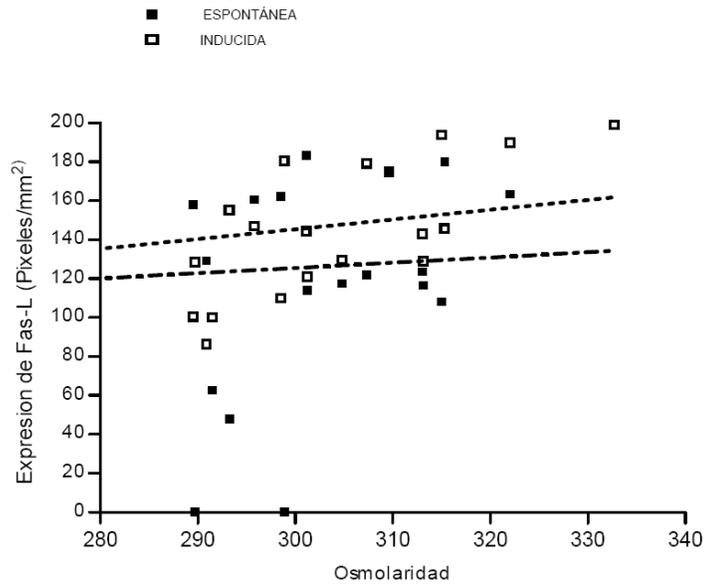
Se encontró correlación entre expresión de Fas e índice de DOQUI, la cual fue negativa en LSP no inducidos, pero positiva en LPS inducidos (Figura 15), (análisis de Pearson $r = -0.6311$, $p = 0.0277$ y $r = 0.759$, $p = 0.0006$ respectivamente). No existió correlación entre expresión de FasL y el índice de DOQUI (datos no mostrados). Por último, encontramos correlación entre osmolaridad sanguínea y expresión inducida de FasL (Figura 16), pero no con espontánea (Figura 15) ($r = 0.1209$, $p = 0.3403$ y $r = 0.5732$, $p = 0.0203$ respectivamente).

Figura 15
Relación entre expresión de Fas e índice de DOQUI



La expresión de Fas tanto espontánea como inducida en los pacientes con DM2 e infección muestra una correlación con el índice DOQUI ($r = -0.5682, p = 0.0090$ y $r = 0.6059, p = 0.009$ respectivamente).

Figure 16
Correlación entre la expresión de FasL y la osmolaridad sanguínea



En los pacientes con DM2 e infección, la expresión inducida (····) de FasL muestra una discreta correlación positiva con la osmolaridad, lo cual no se observa con la expresión de FasL espontánea (---) ($r^2 = 0.1098, p = 0.1535$ vs $r^2 = 0.0099, p = 0.6751$).

8. DISCUSIÓN.

La apoptosis es un programa de muerte celular altamente regulado y eficiente que requiere de la interacción de múltiples factores, los componentes de la red de señalización apoptótica se encuentran genéticamente codificados y listos para ser activados por un estímulo que induzca la muerte celular (78). La apoptosis juega un papel importante en ambas situaciones, en el desarrollo de las células embrionarias y en la homeostasis tisular en el adulto. La apoptosis es el mecanismo más común por el cual el organismo elimina las células dañadas o innecesarias sin la inducción de una inflamación local (78).

Existe evidencia de que la apoptosis participa en diversos procesos fisiopatológicos de la diabetes. Se le ha relacionado a neurodegeneración, pues se ha observado que en ratas diabéticas se presenta apoptosis de neuronas productoras de vasopresina (56), de neuronas corticales, del hipotálamo (59) y de ganglios espinales (79). En cultivos primarios de microglia de rata se presenta apoptosis en presencia de altas concentraciones de glucosa y si se le agrega LPS se observa un efecto sinérgico (41), existe evidencia de que en pacientes diabéticos puede haber apoptosis asociada a neuropatía, pero no con la claridad que se observa en el modelo de rata diabética (61).

Se ha demostrado que la apoptosis de LSP se presenta más frecuentemente en infecciones, DM y neoplasias. Las células más afectadas son los neutrófilos, linfocitos y eosinófilos (70). Sin embargo, no existen reportes de cómo se encuentra la apoptosis en LSP de pacientes diabéticos, comparado con pacientes diabéticos con infección.

Se ha descrito disminución de apoptosis de linfocitos de sangre periférica en leucemias (80;81) y aumento padecimientos como SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (82;83), mononucleosis infecciosa (84), asma y rinitis alérgicas (85), sepsis (86-88), LES (lupus eritematoso sistémico) (89) e incluso se le ha relacionado con reacciones postransfusionales (90).

La apoptosis es un fenómeno que no se detecta con frecuencia en sangre. En un estudio de frotis de sangre periférica que incluyó 10 mil muestras de pacientes sin neoplasias o

quimioterapia, colectadas en un período de 5 meses, se encontró apoptosis en 49 (prevalencia de 4.9×1000), y aunque la proporción de células apoptóticas alcanzó hasta el 20 % afectando a células tanto de origen mielóide como linfóide, en todos los casos se asoció a datos clínicos de mononucleosis infecciosa y se encontró que algunos pacientes se encontraban tomando drogas citotóxicas (79). Sin embargo, cuando se examinan 60 frotis de sangre periférica con células apoptóticas, se encontró que el 55% correspondían a pacientes con algún proceso infeccioso, 17% a pacientes con SIDA y 20% a pacientes con DM (70).

Algunos autores no encuentran apoptosis de células LSP en pacientes diabéticos. En un estudio que incluyó 36 pacientes, 13 con DM1 y 23 con DM2, se determinó apoptosis de LSP mediante captación de yoduro de propidio cuantificada por citometría de flujo, aunque se encontró que los pacientes con DM2 tenían disminución de glutatión intracelular, lo que refleja mayor estrés oxidativo, presentaban menor captación de yoduro de propidio, por tanto menor permeabilidad de la membrana celular y menor grado de apoptosis (91). Los autores explican estas observaciones como un reflejo de mayor rigidez de las células en pacientes diabéticos, pero no afirman que no tienen mayor propensión a la apoptosis. Si bien estas observaciones son aparentemente contrarias a nuestra hipótesis es importante señalar que el grado de apoptosis en pacientes con diabetes debe estar relacionado al grado de control metabólico y a la presencia de complicaciones. Por otro lado, es diferente evaluar la apoptosis “espontánea”, donde se determina apoptosis inmediatamente después de purificar las células, a “inducir” apoptosis mediante LPS, hipoxia o choque térmico. Es importante señalar que la hiperglucemia potencia el efecto citotóxico del LPS y de la isquemia (18;41;59). En contraste, otro estudio demuestra apoptosis en neutrófilos en pacientes con DM1, incluso cuando se encuentran bien controlados (71). En otro estudio en el que se examinó la oxidación y el daño en el DNA de LSP de pacientes diabéticos, determinados mediante electroforesis y determinación de sensibilidad a la FPG (formamidopirimidina DNA glicosilasa) y electroforesis, respectivamente, demostró que estos pacientes tienen una mayor susceptibilidad al daño por estrés oxidativo en los neutrófilos pero no en los linfocitos ni en los mononucleares (72).

Es más probable que se encuentre apoptosis de LSP cuando se presenta cetoacidosis. Aunque se ha descrito que la acidificación del medio de cultivo *in vitro* induce activación de neutrófilos, sobreexpresión de CD18 y disminución de apoptosis (73), hay evidencia que en condiciones *in vivo* de hiperglucemia y metabolismo anaerobio con formación de cuerpos cetónicos se presenta apoptosis. En ratas hiperglucémicas se presenta daño cerebral cuando hay isquemia debido a la producción de lactato que lleva a acidosis intra y extracelular. De hecho, el daño celular intrínseco que causa la isquemia, se potencia por el incremento en la producción de radicales libres, la falla mitocondrial y la activación de endonucleasas (74). Estas observaciones concuerdan con el hecho de los pacientes con DM1 que cursan con cetosis, niveles elevados de cuerpos cetónicos de acetoacetato y triglicéridos, presentan daño oxidativo de LSP y apoptosis que puede disminuir la cantidad de monocitos de sangre periférica (75). Así mismo, se ha demostrado que las plaquetas pueden agregar fagocitos apoptóticos causando trombosis, respuesta inflamatoria y daño vascular (76). Entre los mecanismos de apoptosis que se asocian a las alteraciones arriba mencionadas se encuentran la formación de ROS (63), la desestabilización de la membrana mitocondrial con liberación de citocromo C y la inducción de citocinas proinflamatorias (64) con la activación y translocación de NF κ -B.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la presencia de apoptosis en DM2 y explorar la expresión de algunas moléculas relacionadas con la inducción de apoptosis. A diferencia de estudios anteriores, en el presente estudio se determinó apoptosis en dos condiciones, en células inmediatamente después de ser purificadas (apoptosis espontánea) y en células después de estrés térmico (apoptosis inducida). Como primer paso, evaluamos apoptosis mediante la determinación de la fragmentación de DNA, utilizando TUNEL, y la activación de enzimas proapoptóticas, empleando la medición de la caspasa 3 activa. Como segundo paso, evaluamos la densidad de la expresión para algunos marcadores que participan en los procesos de apoptosis como Fas y FasL. Como tercer y último paso, determinamos la posible correlación entre la proporción de células en apoptosis, la expresión de Fas y FasL, con los parámetros clínicos más representativos de la DM2 e infección.

TUNEL se considera el estándar de oro para la evaluación de la fragmentación del DNA, la cual denota apoptosis. Los resultados obtenidos mediante esta técnica se presentan en las

Figuras 2 y 3, en las cuales se observa que no existe una diferencia significativa en la proporción de apoptosis espontánea entre los tres grupos de estudio. El porcentaje de apoptosis en células de individuos normales es de alrededor de un 2-5% (92), lo cual correlaciona con los tres grupos; individuos sanos (2%), DM2 sin infección (5.2%) y DM2 con algún tipo de infección (5.0%). Por otro lado, el porcentaje de apoptosis inducida es claramente mayor en el grupo de pacientes DM2 con infección comparados con los otros dos grupos ($p=0.0001$). Los resultados obtenidos son consistentes con lo observado por otros autores (70), que indican que no existe diferencia significativa en el porcentaje de apoptosis entre los grupos de DM2 y DM2 con infección en LSP. Sin embargo, es muy importante notar que se trata de apoptosis espontánea. En el presente trabajo mostramos por primera vez, que a pesar de que no existe diferencia en la apoptosis espontánea en estos grupos, si observamos un aumento significativo en la apoptosis inducida, lo cual indica que las LSP de los pacientes con DM2 e infección son más vulnerables a este proceso, que las de los DM2 sin infección. Esta observación sugiere que este tipo de células son más vulnerables a sufrir muerte celular, ya que se ha demostrado en diversos estudios (69), que la apoptosis es uno de los procesos de respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre, además de que se ha observado que existen mecanismos que pueden incrementar este efecto, como lo son: producción de ROS, AGEs, LPS, TNF y elevada producción de citocinas, estos tres últimos característicos de procesos infecciosos (93;94).

Por otro lado, se evaluó la densidad de la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis, caspasa 3 activa, Fas y FasL. Estos experimentos se realizaron debido a que se sabe que la apoptosis con frecuencia está relacionada con la activación de una familia de caspasas, las cuales pueden ser activadas tanto por vía extrínseca como intrínseca. La vía extrínseca se activa mediante la unión ligando-receptor, en la cual participan receptores de membrana como Fas, TNF α , DR4/DR5, así como sus respectivos "ligandos de muerte", FasL, R-TNF 1/2 o TRAIL, con la subsecuente formación del complejo de muerte, la activación de la cascada de caspasas y la degradación de DNA. En tanto la vía intrínseca o mitocondrial es activada en respuesta a un estímulo, como el estrés, administración de drogas, radiaciones, etc. Con la subsecuente formación del apoptosoma, el cual segmenta de forma proteolítica la caspasa 9 y posteriormente la caspasa 3, que a su vez lleva a la degradación del DNA (95).

Se ha observado un incremento de apoptosis mediante análisis de caspasa 3 activa y TUNEL, en células neuronales de ratas diabéticas con neuropatía (58). además la exposición de células de insulinoma en ratones NOD con IL-1 β (68) e IFN γ induce actividad de caspasa 3 mediante interacción Fas/FasL (67). Por esta razón en este estudio decidimos evaluar estas mismas moléculas, pero evaluamos su participación en LSP de pacientes con DM2 y DM2 con infección.

Los resultados de la evaluación de caspasa 3 activa se presentan en las Figuras 4 y 5. Si bien se observa un incremento de expresión de esta proteína (espontánea como inducida), en pacientes DM2 con infección, el incremento es estadísticamente significativo ($p=0.0129$) solo en la apoptosis inducida, lo cual correlaciona con el porcentaje de apoptosis observado en la Figura 3. Esta observación sugiere que la apoptosis inducida en pacientes con DM2 e infección se produce por la vía dependiente de caspasas (96).

La vía extrínseca de la apoptosis fue evaluada mediante la expresión de Fas y FasL. Fas es un receptor transmembranal de la familia de TNF que se expresa constitutivamente en una variedad de tipos celulares (97), incluyendo linfocitos, eosinofilos, monocitos y neutrófilos, en tanto que su ligando FasL es una proteína transmembranal, que se expresa de forma inducida en algunos tipos celulares (98). Tanto Fas como su ligando FasL, son de suma importancia en la inducción de apoptosis en células que participan en la respuesta inmunitaria.

Existen evidencias de que la exposición prolongada a glucosa incrementa la expresión de Fas, llevando a un efecto deletéreo sobre las células β pancreáticas (68), en ratones diabéticos tipo NOD, la concentración de glucosa actúa de manera anti o pro-apoptotica dependiendo de las condiciones de cultivo, ya que se a observado que existe una inducción en la proliferación de este tipo de células por la glucosa en roedores como *Psammomys obesus* (99). Por otro lado, se ha observado un incremento en la expresión de Fas en células β pancreáticas de pacientes con DM2 comparados con sujetos no diabéticos, concluyendo que la apoptosis inducida por la hiperglucemia se lleva a cabo principalmente por la vía Fas-FasL (100).

La Figura 9 muestra la expresión de FasL, se observó mayor expresión de este marcador tanto en condiciones espontáneas, como inducidas en el grupo de pacientes DM2 con infección. Es importante notar que el aumento de temperatura, lo cual utilizamos para inducir apoptosis, no incrementa la expresión de FasL. Sin embargo, si induce que células sean mas susceptible a la apoptosis. Nuestros resultados sugieren que en pacientes DM2 con infección, la interacción Fas-FasL puede también estar implicada en la inducción de apoptosis.

Por último, se trató de establecer si existe alguna relación entre la proporción de células en apoptosis, la presencia de caspasa 3 activa, Fas y FasL con los parámetros clínicos de la DM2 con infección. El análisis de correlación entre el porcentaje de apoptosis tanto espontánea como inducida, con la expresión de Fas y FasL demostró que solo existe correlación entre apoptosis inducida con la expresión de FasL (Figura 10). Este resultado sugiere que el aumento de la apoptosis inducida que observamos en los pacientes DM2 con infección está mediada por un aumento en la expresión de FasL. Lo cual es consistente con lo previamente reportado (68), e indica que la interacción Fas-FasL juega un papel importante en los mecanismos de apoptosis en la DM2.

Posteriormente evaluamos la correlación entre el desenlace clínico (muerte), con el porcentaje células en apoptosis y la expresión de Fas y FasL. Los resultados demostraron que no existe correlación, estos resultados ha reserva de considerar posibles sesgos por el tamaño de muestra sugiere que el porcentaje células en apoptosis no es un indicador de gravedad de enfermedad. Sin embargo, encontramos que existe una correlación inversa entre la expresión inducida de FasL y el desenlace clínico (Figura 11).

De manera interesante, encontramos que existe correlación entre el porcentaje de apoptosis con los niveles de glucosa sanguínea (Figura 12), estudios previos han demostrado que los niveles altos de glucosa inducen la generación de especies reactivas de oxígeno como oxido nítrico, superóxido y peroxinitrito. Las cuales activan proteínas involucradas en la apoptosis como caspasas y proteínas de la familia de Bcl-2 (69). Sin embargo, no existen estudios que hayan evaluado apoptosis en LSP de pacientes con DM2 e infección. La correlación que encontramos sugiere que las concentraciones elevadas de glucosa aumentan la

susceptibilidad a la apoptosis en dichas células, ya que la apoptosis espontánea es independiente de los niveles de glucosa (Figura 13). Esta mayor susceptibilidad a sufrir apoptosis en condiciones de estrés puede contribuir a la deficiente respuesta inmune en estos pacientes. Encontramos resultados similares en relación a FasL (en condiciones inducidas) y los niveles de glucosa en sangre (Figura 14). Estos resultados en conjunto, sugieren que los niveles de glucosa en sangre, en presencia de un proceso infeccioso, inducen de manera directa o indirecta la expresión de Fas y FasL los cuales a su vez promueven apoptosis de LSP.

El índice DOQUI (insuficiencia renal crónica) evalúa una de las complicaciones más frecuentes de los pacientes DM2 con infección. Existen reportes que demuestran que existe aumento en la apoptosis a nivel local en pacientes con insuficiencia renal crónica (10). Sin embargo, no hay reportes de cómo se encuentra la apoptosis a nivel sistémico. Nuestros resultados demostraron que no existe correlación entre el porcentaje de apoptosis y el índice DOQUI, lo cual sugiere que la apoptosis en sangre periférica no es un indicador de daño renal (dato no mostrado). De manera interesante, si encontramos correlación entre la expresión espontánea e inducida de Fas y el índice DOQUI (Figura 15), lo cual sugiere que el daño renal puede estar involucrado con la inducción de la expresión de este receptor a nivel sistémico. Por otro lado, no existe correlación entre los niveles de FasL y el índice DOQUI (dato no mostrado), lo cual puede explicar que aunque existe expresión sistémica de Fas cuando hay daño renal, al no existir expresión de FasL, no se observa un incremento en la apoptosis en sangre periférica.

Otra de las complicaciones importantes en los pacientes con DM2 e infección, es la hiperosmolaridad, por lo que también evaluamos si está relacionada con el porcentaje de apoptosis y la expresión de Fas y FasL. Nuestros resultados indican que no existe correlación con el porcentaje de apoptosis, ni con la expresión de Fas (datos no mostrados). Sin embargo, si observamos una correlación entre osmolaridad sanguínea y expresión inducida de FasL (Figura 16), lo cual indica que la concentración elevada de sodio y potasio podría inducir de manera directa o indirecta la expresión de FasL. Por otro lado, la falta de correlación entre la expresión de Fas y la osmolaridad (dato no mostrado), puede explicar

que no se observe apoptosis en sangre periférica, aunque exista expresión de su ligando FasL.

9. CONCLUSIONES.

En este trabajo mostramos por primera vez, que existe un incremento en la apoptosis de LSP sometidos a choque térmico, en pacientes DM2 con infección. Esta observación sugiere que en estos pacientes hay una primera señal que desencadena el proceso de apoptosis, la cual es interrumpida por mecanismos antiapoptóticos compensadores que mantienen la homeostasis celular, hasta que se presenta un segundo estímulo, como el choque térmico. Es muy probable que estos mecanismos pro y anti apoptóticos estén relacionados con la vía mitocondrial y sería necesario explorar especialmente a las proteínas de la familia Bcl-2. La mayor susceptibilidad a la apoptosis inducida por choque térmico puede no tener ninguna implicación fisiológica o clínica, pero también puede implicar una mayor susceptibilidad a la muerte cuando los neutrófilos reciben una segunda señal como LPS u otros PAMPs durante un proceso infeccioso. En consecuencia, pudiese contribuir a la inmunosupresión que presentan los pacientes diabéticos. Por otro lado, demostramos la participación de Fas y FasL en la apoptosis de LSP, la cual es además dependiente de caspasas. Los valores de glucosa sanguínea correlacionan con la expresión de Fas y FasL, lo que sugiere que de manera directa o indirecta, la glucosa induce la expresión de estas moléculas, lo cual podría explicar el mecanismo de la inducción de la apoptosis.

10. PERSPECTIVAS.

El presente trabajo es el primer reporte del incremento en la apoptosis de células de pacientes diabéticos con infección de tejidos blandos y abre un nuevo campo a la investigación de la fisiopatología de las complicaciones de la DM2. Se espera que estas observaciones permitan identificar datos tempranos de daño celular y vascular que sirvan para tratar oportunamente a los pacientes diabéticos y disminuir la frecuencia de complicaciones.

11. INDICE.

amortiguador de fosfatos (PBS)	28
análisis de varianaza (ANOVA)	26
diabetes mellitus (DM)	3
Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)	3
diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	1
Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	3
diaminobenzidina (DAB)	27
dominio de muerte asociado a Fas (FAAD)	12
dominio de muerte asociado a TNF (TRAAD)	12
especies reactivas de oxígeno (ROS)	13
factor de necrosis tumoral (TNF)	12
Filtrado Renal Glomerular (FGR)	7
formamildopirimidina DNA glicosilasa (FPG)	14
Fundación Nacional del Riñón (NKF)	7
Fundación para la Diálisis y la Calidad (DOQUI)	21
Grupo Nacional para la Información en Diabetes (NDDG)	3
infección de tejidos blandos (ITB)	31
Infección de tejidos blandos (ITB)	31
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)	4
Insuficiencia Renal Crónica (IRC)	7
leucocitos de sangre periférica (LSP)	14
ligando de Fas (FasL)	12
ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)	12
lipopolisacárido (LPS)	13
marcaje de endiduras terminales con dUTP mediada por TdT (TUNEL)	17
Organización	3
peroxidasa de rábano (HRP)	28
polidioxanona (PDO)	29
proteína asociada a fibroblastos (Fas)	13
proteína inflamatoria 2 del macrófago (MIP-2)	8
proteína que interacciona con Bcl2 (BID)	12
proteínas transportadoras de glucosa (GLUT)	5
solución salina fisiológica (SSF)	27
virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	19

12. BIBLIOGRAFIA.

- (1) King H. Diabetes and the World Health Organization. Progress towards prevention and control. *Diabetes Care* 1993 January;16(1):387-90.
- (2) Gabir MM, Hanson RL, Dabelea D, Imperatore G, Roumain J, Bennett PH et al. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes Care* 2000 August;23(8):1108-12.
- (3) Aguilar-Salinas CA, Reyes-Rodriguez E, Ordonez-Sanchez ML, Torres MA, Ramirez-Jimenez S, Dominguez-Lopez A et al. Early-onset type 2 diabetes: metabolic and genetic characterization in the mexican population. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 January;86(1):220-6.
- (4) King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998 September;21(9):1414-31.
- (5) Ortiz-Santos A. México ocupa el segundo lugar de muerte por diabetes. *La Cronica de Hoy* 2008; Available from: URL <http://www.imss.gob.mx/dpm/dties/Indice.aspx?Srv=A2006&OPC=opc08>
- (6) Bennett PH. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. In: Kahn CR, Weir GC, editors. *Joslin's Diabetes Mellitus*. 13 ed. Joslin; 1994. p. 193-200.
- (7) Olefsky JM, Nolan JJ. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1995 April;61(4 Suppl):980S-6S.
- (8) Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001 December 13;414(6865):813-20.
- (9) Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N Engl J Med* 2000 February 10;342(6):381-9.
- (10) Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003 July 15;139(2):137-47.
- (11) National Kidney Foundation. National Kidney Foundation. <http://www.kidney.org/kidneydisease/ckd/knowGFR> cfm 2008; Available from: URL: <http://www.kidney.org/kidneydisease/ckd/knowGFR.cfm>

- (12) Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2006 September 8;23(1):3-13.
- (13) Rea WJ, Wyrick WJ, Jr. Necrotizing fasciitis. *Ann Surg* 1970 December;172(6):957-64.
- (14) Andrade-Islas S. Diabetes Mellitus. In: Andrade-Islas S, editor. *Medicina Interna*. 12 ed. Mexico: Harrison; Mc Graw-Hill International; 2002. p. 71-7.
- (15) Cook CB, Tsui C, Ziemer DC, Naylor DB, Miller WJ. Common reasons for hospitalization among adult patients with diabetes. *Endocr Pract* 2006 July;12(4):363-70.
- (16) Lerman-Barber I. *Atención Integral del Paciente diabético*. 2 ed. Mexico: Mc Graw-Hill International; 1998.
- (17) Laing P. The development and complications of diabetic foot ulcers. *Am J Surg* 1998 August;176(2A Suppl):11S-9S.
- (18) Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes Alters the Response to Bacteria by Enhancing Fibroblast Apoptosis. *Endocrinology* 2004 March 19.
- (19) Mastropaolo MD, Evans NP, Byrnes MK, Stevens AM, Robertson JL, Melville SB. Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infect Immun* 2005 September;73(9):6055-63.
- (20) Rich J, Lee JC. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection in the diabetic NOD mouse. *Diabetes* 2005 October;54(10):2904-10.
- (21) Obana Y, Nishino T. [The infectivity of *Enterococcus faecalis* in experimental urinary tract infection in mice: II]. *Kansenshogaku Zasshi* 1991 April;65(4):442-6.
- (22) Bailiff NL, Nelson RW, Feldman EC, Westropp JL, Ling GV, Jang SS et al. Frequency and risk factors for urinary tract infection in cats with diabetes mellitus. *J Vet Intern Med* 2006 July;20(4):850-5.
- (23) Martínez de Jesús F. *Pie Diabético. Atención Integral*. 2 ed. Mexico: 2003.
- (24) Kwan MK, Saw A, Chee EK, Lee CS, Lim CH, Zulkifle NA et al. Necrotizing fasciitis of the lower limb: an outcome study of surgical treatment. *Med J Malaysia* 2006 February;61 Suppl A:17-20.
- (25) Hsu CY, Fang HC, Chou KJ, Chen CL, Lee PT, Chung HM. The clinical impact of bacteremia in complicated acute pyelonephritis. *Am J Med Sci* 2006 October;332(4):175-80.
- (26) Thwaini A, Khan A, Malik A, Cherian J, Barua J, Shergill I et al. Fournier's gangrene and its emergency management. *Postgrad Med J* 2006 August;82(970):516-9.

- (27) Diabetes hoy. Órgano oficial de la Federación 2000;108(5):3.
- (28) Cainzos M, Gonzalez-Rodriguez FJ. Necrotizing soft tissue infections. *Curr Opin Crit Care* 2007 August;13(4):433-9.
- (29) Pessa ME, Howard RJ. Necrotizing fasciitis. *Surg Gynecol Obstet* 1985 October;161(4):357-61.
- (30) Howard RJ, Pessa ME, Brennaman BH, Ramphal R. Necrotizing soft-tissue infections caused by marine vibrios. *Surgery* 1985 July;98(1):126-30.
- (31) Eke N. Fournier's gangrene: a review of 1726 cases. *Br J Surg* 2000 June;87(6):718-28.
- (32) Sanchez MF, Fadil Iturralde JL, Provenzal O, Damiani H, Milman A, Bragagnolo J et al. [Fournier's gangrene. Our experience over 10 years. A review of the literature]. *Arch Esp Urol* 1999 September;52(7):721-7.
- (33) Spirnak JP, Resnick MI, Hampel N, Persky L. Fournier's gangrene: report of 20 patients. *J Urol* 1984 February;131(2):289-91.
- (34) Efem SE. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: preliminary observations. *Surgery* 1993 February;113(2):200-4.
- (35) Hejase MJ, Simonin JE, Bihle R, Coogan CL. Genital Fournier's gangrene: experience with 38 patients. *Urology* 1996 May;47(5):734-9.
- (36) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
- (37) Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002 December 27;181-182:471-4.
- (38) Elkon KB. Apoptosis. In: Wallace DJ, editor. *Dubois Lupus Erythematosus*. 5 ed. Hagerstown, MD: Lippincott, Williams & Wilkins; 1997. p. 133-42.
- (39) Rasilainen S, Ylipaasto P, Roivainen M, Lapatto R, Hovi T, Otonkoski T. Mechanisms of coxsackievirus B5 mediated beta-cell death depend on the multiplicity of infection. *J Med Virol* 2004 April;72(4):586-96.
- (40) Mellado-Gil JM, Aguilar-Diosdado M. High glucose potentiates cytokine- and streptozotocin-induced apoptosis of rat islet cells: effect on apoptosis-related genes. *J Endocrinol* 2004 October;183(1):155-62.
- (41) Wang JY, Yang JM, Wang JY, Tao PL, Yang SN. Synergistic apoptosis induced by bacterial endotoxin lipopolysaccharide and high glucose in rat microglia. *Neurosci Lett* 2001 May 25;304(3):177-80.

- (42) Ramana KV, Friedrich B, Bhatnagar A, Srivastava SK. Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *FASEB J* 2003 February;17(2):315-7.
- (43) Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F et al. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 2004 January;15 Suppl 1:S85-S87.
- (44) Kang BP, Frencher S, Reddy V, Kessler A, Malhotra A, Meggs LG. High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 March;284(3):F455-F466.
- (45) Recchioni R, Marcheselli F, Moroni F, Pieri C. Apoptosis in human aortic endothelial cells induced by hyperglycemic condition involves mitochondrial depolarization and is prevented by N-acetyl-L-cysteine. *Metabolism* 2002 November;51(11):1384-8.
- (46) Peiro C, Lafuente N, Matesanz N, Cercas E, Llergo JL, Vallejo S et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 2001 August;133(7):967-74.
- (47) Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 2001 October;50(10):2363-75.
- (48) Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 2002 June;51(6):1938-48.
- (49) Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londono I, Gingras D, Bendayan M. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest* 2003 July;83(7):1069-80.
- (50) Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Bottinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006 January;55(1):225-33.
- (51) Chu Y, Faraci FM, Ooboshi H, Heistad DD. Increase in TUNEL positive cells in aorta from diabetic rats. *Endothelium* 1997;5(4):241-50.
- (52) Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 2002 April;51(4):1076-82.
- (53) de Nigris F, Tajana G, Condorelli M, D'Armiento FP, Sica G, Lerman LO et al. Glycooxidation of low-density lipoprotein increases TUNEL positivity and CPP32 activation in human coronary cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003 December;1010:710-5.
- (54) Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol* 2003;3(3):219-28.

- (55) Takamura Y, Sugimoto Y, Kubo E, Takahashi Y, Akagi Y. Immunohistochemical study of apoptosis of lens epithelial cells in human and diabetic rat cataracts. *Jpn J Ophthalmol* 2001 November;45(6):559-63.
- (56) Klein JP, Hains BC, Craner MJ, Black JA, Waxman SG. Apoptosis of vasopressinergic hypothalamic neurons in chronic diabetes mellitus. *Neurobiol Dis* 2004 March;15(2):221-8.
- (57) Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003 January;52(1):165-71.
- (58) Guo C, Quobadari A, Shangguan Y, Hong S, Wiley JW. Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2004 June;16(3):335-45.
- (59) Li PA, Rasquinha I, He QP, Siesjo BK, Csiszar K, Boyd CD et al. Hyperglycemia enhances DNA fragmentation after transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001 May;21(5):568-76.
- (60) Mishra R, Emancipator SN, Kern T, Simonson MS. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int* 2005 January;67(1):82-93.
- (61) Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002 April;959:368-83.
- (62) Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr Metab* 1999 February;12(1):42-6.
- (63) Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 2001;82(4):674-82.
- (64) Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 2003 October 15;66(8):1433-40.
- (65) Makino N, Maeda T, Sugano M, Satoh S, Watanabe R, Abe N. High serum TNF- α level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J Diabetes Complications* 2005 November;19(6):347-55.
- (66) Ahren B. Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr Mol Med* 2005 May;5(3):275-86.
- (67) Augstein P, Bahr J, Wachlin G, Heinke P, Berg S, Salzsieder E et al. Cytokines activate caspase-3 in insulinoma cells of diabetes-prone NOD mice directly and via upregulation of Fas. *J Autoimmun* 2004 December;23(4):301-9.

- (68) Maedler K, Donath MY. Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Horm Res* 2004;62 Suppl 3:67-73.
- (69) Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem* 2005 December;16(12):705-13.
- (70) Shidham VB, Swami VK. Evaluation of apoptotic leukocytes in peripheral blood smears. *Arch Pathol Lab Med* 2000 September;124(9):1291-4.
- (71) Hannon-Fletcher MP, O'Kane MJ, Moles KW, Weatherup C, Barnett CR, Barnett YA. Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. *Mutat Res* 2000 June 30;460(1):53-60.
- (72) Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res* 2003 August 28;529(1-2):129-33.
- (73) Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, Lopez DH, Gamberale R, Minucci F et al. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J Immunol* 1999 April 15;162(8):4849-57.
- (74) Siesjo BK, Katsura KI, Kristian T, Li PA, Siesjo P. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1996;66:8-14.
- (75) Jain SK, Kannan K, McVie R. Effect of hyperketonemia on blood monocytes in type-I diabetic patients and apoptosis in cultured U937 monocytes. *Antioxid Redox Signal* 1999;1(2):211-20.
- (76) Hartz S, Menart B, Tschoepe D. Leukocyte apoptosis in whole blood involves platelet-dependent coaggregation. *Cytometry* 2003 April;52A(2):117-21.
- (77) Esaki T, Hayashi T, Muto E, Kano H, Kumar TN, Asai Y et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and Fas/Fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atheromatous plaques of human coronary arteries 1. *Nitric Oxide* 2000 December;4(6):561-71.
- (78) Savill J. Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest* 1994 November;24(11):715-23.
- (79) Lach-Szyrma V, Brito-Babapulle F. The clinical significance of apoptotic cells in peripheral blood smears. *Clin Lab Haematol* 1999 August;21(4):277-80.
- (80) Yi JM, Kim MS, Koo HN, Song BK, Yoo YH, Kim HM. *Poncirus trifoliata* fruit induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Clin Chim Acta* 2004 February;340(1-2):179-85.
- (81) Halicka HD, Seiter K, Feldman EJ, Traganos F, Mittelman A, Ahmed T et al. Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis* 1997;2(1):25-39.

- (82) Losa GA, Graber R. Spontaneous apoptosis, oxidative status and immunophenotype markers in blood lymphocytes of AIDS patients. *Anal Cell Pathol* 2000;21(1):11-20.
- (83) Carbonari M, Cibati M, Fiorilli M. Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. *Cytometry* 1995 September 15;22(3):161-7.
- (84) Taga K, Yoshida M, Kaneko M, Asada M, Okada M, Taniho M et al. Contribution of automated hematology analysis to the detection of apoptosis in peripheral blood lymphocytes. *Cytometry* 2000 June 15;42(3):209-14.
- (85) Grzegorzczak J, Kowalski ML, Pilat A, Iwaszkiewicz J. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: relation to serum markers of apoptosis. *Mediators Inflamm* 2002 August;11(4):225-33.
- (86) Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A, Uring-Lambert B, Gaub MP, Ratomponirina C et al. Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med* 2004 March;30(3):408-15.
- (87) Joshi VD, Kalvakolanu DV, Cross AS. Simultaneous activation of apoptosis and inflammation in pathogenesis of septic shock: a hypothesis. *FEBS Lett* 2003 December 4;555(2):180-4.
- (88) Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE. Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003;35(9):585-92.
- (89) Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003 October;48(10):2888-97.
- (90) Seghatchiana J, de Sousa G. Blood cell apoptosis/necrosis: some clinical and laboratory aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2003 December;1010:540-7.
- (91) Graber R, Farine JC, Fumagalli I, Tatti V, Losa GA. Apoptosis and oxidative status in peripheral blood mononuclear cells of diabetic patients. *Apoptosis* 1999 August;4(4):263-70.
- (92) Goto Y, Gallagher J, Fanning N, Wang J, McCusker S, Redmond P et al. Does chronic occupational exposure to volatile anesthetic agents influence the rate of neutrophil apoptosis? *Can J Anaesth* 2000 April;47(4):350-3.
- (93) Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 2004 April;14(4):184-93.
- (94) Alikhani M, Maclellan C, Raptis M, Vora S, Trackman P, Graves D. Advanced Glycation Endproducts Induce Apoptosis In Fibroblasts Through Activation of ROS,

MAP kinases and FOXO1 Transcription Factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 September 27.

- (95) Ferri KF, Kroemer G. Control of apoptotic DNA degradation. *Nat Cell Biol* 2000 April;2(4):E63-E64.
- (96) Sen S. Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1992 August;67(3):287-319.
- (97) Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 December;2(12):917-24.
- (98) Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995 May 19;81(4):505-12.
- (99) Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 1999 April;48(4):738-44.
- (100) Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001 August;50(8):1683-90.