



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DELEGACIÓN NORTE DEL DF  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

---

**DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA  
EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 CON INFECCIONES EN TEJIDOS  
BLANDOS.**

Tesis que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo presentan:

**Martha Elisa González García** 40101129-4  
**Rosa Evelin Guzmán Valencia** 40106621-8

**AÑO DE TÉRMINO** 2005-2  
**ORIENTACIÓN** BIOQUÍMICA CLÍNICA  
**ÁREA ESPECÍFICA DEL** INMUNOLOGIA  
**PROYECTO**

**Tutor IMSS:** Dr. Mario I. Vega Paredes  
**Tutor FES-Z, UNAM** Dr. Rubén Marroquín Segura

**Lugar donde se realizó el proyecto:**

Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de  
Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández", Centro Médico Nacional "La Raza",  
IMSS.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

CON GRATITUD...

DIOS: Hoy Dios quiero que sepas que eres lo único que nunca podré dejar de amar, Gracias por ser mi Padre, mi guía y Protector.

A TI: A la mujer que me dio la vida y es un lindo ángel en el cielo yo sé que de alguna forma siempre me has cuidado. Hoy tú sonríes como yo...

PAPÁ: Tu ejemplo tanto bueno como malo me ha enseñado a crecer y en cierta forma a madurar, gracias por recuperarme y sin mas hoy quiero que sin resentimientos sientas este logro como tuyo no es lo máximo pero es un pasito que tu como yo anhelábamos dar. Te amo papi.

MAMÁ: Sabe mami Dios no se equivoca, cruzo nuestros caminos distintos que poco a poco se vinieron emparejando. Hoy con todo no podría pagar lo que hizo para enderezarme, lagrimas, angustias y a veces tristezas... Hoy solo pasado

Pero hoy mami quiero que sepa bien que siempre será mas que una amiga es una gran madre y no importa ya lo que digan, la verdad no es otra, solo lo que usted y yo sabemos porque sin importar la critica y demás usted con forje y amor me instruyo, rompiendo los esquemas que otros creían inalcanzables mama MIL gracias la AMO con todo mi Corazón.

MARNIE: Tu si que eres como una joya caída del cielo que llego inesperadamente... yo no se cuanto Dios nos permita vivir pero se que nos tenemos la una para la otra en lo que sea cuentas conmigo así como yo espero siempre contar contigo, hoy mira este logro mío como un ejemplo de amor y superación para ti y por ti. Te amo.

CLAU: Ma !! Gracias a Dios por regalarme una amiga como tu, tú formas un escalónete importante en este gran paso que hoy doy; tus consejos y tus regañitos valieron la pena, amiga por todo Gracias ahora si te ganaste el Diploma de primer lugar pero esta vez uno unico y muy original claro asi como eres tu... el de "Como guiar a los chilihuitos"... T.Q.M.

EVE: Comadre, Amiga hoy no hay palabras para describir lo que siento diversión, alegrías, tristezas, desánimos y hasta desaires todo hoy resumido en un enorme GRACIAS por ese tiempo que me soportaste, hoy no acabamos nada solo es el comienzo de algo nuevo y ambas sabemos que con la ayuda de Dios y la madurez del tiempo podremos lograr mas de lo que algún día soñamos T.Q.M.

LORE: Nonita compañera de años tu sabes todo lo que podría decirte ahora ya no necesito escribirlo sencillamente Gracias por los gratos momentos que hemos disfrutado, de alguna manera tu y yo nos vimos crecer en nuestras carreras y como no en nuestras caídas... T.Q.M.

A las familias NOVELO VILLARRUEL y ZAYAS PACHECO que juntas son mi familia, gracias por creer en mi (jodi), por los consejos (clau), los jaloncitos de oreja necesarios (laura) y por cada detalle que han marcado mi vida(ley y karla) y que me han mostrado su confianza(tia zayas y becky) y su sinceridad(Mickey)... pero sobre todo que en nosotros reyna el significado de la verdadera amistad, porque nos tenemos en las buenas y en las malas, entre nosotros todo es igual y no hay nada que perder los amo a todos.

Q.F.B. MARTHA ELISA GONZALEZ GARCIA

CON AGRADECIMIENTO...

Primeramente a DIOS por haberme dado el privilegio de llegar hasta aquí y por llenar mi vida de alegrías y tristezas, pero sobre todo por haberme mandado el regalo mas preciado que es mi MADRE.

A mi MADRE por ser el pilar del cual siempre me sostuve y por haber hecho de mí lo que hasta ahora soy, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas contando con tu apoyo incondicional.

A mis HERMANAS y CUÑADO por sus palabras de aliento y comprensión en los momentos mas difíciles.

A mi NOVIO por haber compartido conmigo este sueño y por hacerme una mejor persona. Gracias por las palabras reconfortantes en los momentos que más lo necesitaba. T.A.M.J.C.S.M.

A mi AMIGA Elisa por ser mi brazo derecho en este proyecto y por haber compartido tantos momentos buenos y malos en el transcurso de este tiempo que pasamos juntas. Gracias por tus consejos.

A TODA MI FAMILIA por haber confiado en mí y darme ánimos para seguir adelante.

A la MAESTRA GINA de la clínica multidisciplinaria " Los Reyes" FES Zaragoza por su gran apoyo y paciencia en la recolección de muestras, muchas pero muchas gracias maestra, sin su apoyo no se que hubiéramos hecho.

Q.F.B. ROSA EVELIN GUZMAN VALENCIA

Y ES QUE NO PODIAN FALTAR.....

Gracias al "tio" por aguantarnos tanto, a elena, vicky y lucha gracias compañeras por su amistad pero sobre todo por mostrarnos que diferente pueden ser las cosas... jaja, a la Dra Bekker, gracias doctora por sus consejos, a nancy vecinita te voy a extrañar...!, a javier, rafa y angeles por sus palabras y dani tu si que eres un ejemplo de querer vivir a la doctora lupita y a Alice por estar ahí cuando nos surgian las dudas y las ganas de suplir la escasez de material (por no decir otra cosa jaja) GRACIAS y a ti Lety hijole tu si

que te mereces un Gracias algo grande por soportarnos a nosotras y a los de allá y a los que escapan de mi mente de la unidad MUCHAS GRACIAS, sin dejar de lado a todas las personas que de cierta forma influyeron en esta tesis.

BERNA: Choco te admiro eres una gran persona y un gran Doctor no tendrás ese papel pero... tú eres zaragozano... y me entiendes; solo quiero agradecerte por tu apoyo en este tiempo, por tratar de comprendernos y demás GRACIAS (ah y gracias por la música).

MELI -YU: Adivinen adivinadores- Un platillo japonés no es pero bien jarocho si es... claro yumei, thank you por tu apoyo que de cierta forma nos brindaste.

Meli que lastima que no nos hallamos conocido mas pero sé que aunque muchos crean que no eres muy grande sé que como persona eres muy grandotota... muchos thank's por comprendernos y por compartir el espacio del peine con nosotras por ser sincera cuando algo no te parecía pero sobre todo eso por ayudarnos y apoyarnos cuando lo necesitábamos GRACIAS

YIYE y BERE: Vaya hasta en los textos uno no las puede separar jaja... Un sincero agradecimiento por el apoyo brindado y por la manita de gato hay no perdón por la manita de bere brindada cuando se nos juntaba el trabajo, y por enseñarnos algunas muchas mas cosas que se nos olvidaban ¿verdad guille? GRACIAS.

Un sincero agradecimiento a la Dra. Guzmán por conseguimos a los pacientitos mil GRACIAS fue uno de los pilares para poder realizar nuestra tesis y claro sin olvidar a la Dra. Paty ahora si que como se llama... Gracias por lidiar día, día con nuestra chamba.

#### UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO A LOS DOCTORES CESAR, MARIO Y A LA DOCTORA SARA

Gracias por la oportunidad que nos brindaron para realizar el trabajo experimental, de este trabajo pero sobre todo por su amistad y confianza depositada en cada una de nosotras porque aunque juntos son nuestros asesores siempre los consideraremos mas que un gran apoyo gracias por hacernos entender lo mucho que valemos, por esos detalles que nos hicieron sentir muy bien y por el gesto de gentileza, comprensión y paciencia que mostraron cada vez que nos equivocábamos, hoy apremia solo una cosa el resultado de muchos de esos consejos, platicas y demás que alguna vez no llegamos a creer, entender o imaginar...

# INDICE

	Pag
ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCION.....	5
1. Diabetes Mellitus.....	5
1.1. Definición.....	5
1.2. Mecanismo de acción de la insulina.....	6
1.3. Panorama Epidemiológico.....	7
1.4. Complicaciones Diabéticas.....	8
2. Infecciones en tejidos blandos.....	9
2.1. Clasificación de la infección.....	9
2.1.1. Celulitis Anaeróbica.....	10
2.1.2. Fascitis Necrosante.....	10
2.1.3. Gangrena de Fournier.....	11
3. Diabetes Mellitus e Infecciones.....	11
4. Apoptosis.....	13
4.1. Historia de la Apoptosis.....	13
4.2. Definición.....	13
4.2.1. Muerte celular.....	13
4.2.1.1. Necrosis.....	13
4.2.1.2. Apoptosis.....	14
4.2.2. Diferencias entre necrosis y apoptosis.....	14
4.3. Características morfológicas celulares en la apoptosis.....	15
4.3.1. Fase de iniciación.....	16
4.3.2. Fase efectora.....	16
4.3.3. Fase de degradación.....	16
4.4. Inducción de apoptosis en los linfocitos.....	17
4.4.1 Las caspasas y su participación en el proceso.....	17
4.5. Vías de activación de caspasas.....	18
4.5.1. Vía intrínseca.....	18
4.5.2. Vía extrínseca.....	19
5. Diabetes Mellitus y Apoptosis.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
HIPÓTESIS.....	25
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
METODOLOGÍA.....	28
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSION.....	44
PERSPECTIVAS.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	46

## 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
BH	Bcl-2 homology domain
CARD	Death-fold caspase recruitment domain
DAB	Diaminobencidina
DAG	Diacylglicerol
DD	Death domains
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low pI
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DR3/TNF	Death receptor 3/TNF
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
FADD	Fas associated death domains
FN	Fascitis necrosante
FPG	Formamidopirimidina DNA glicosilasa
GLUT	Glucose transporter
GLUT-4	Glucose transporter-4
GF	Gangrena de Fournier
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LPS	Lipopolisacárido
NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOD	Diabéticos no obesos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Amortiguador de fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SS	Solución Salina
SSA	Secretaría de Salud
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor- alpha
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TUNEL labelling.	Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end

## RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constituye un problema de salud pública mundial creciente, esta enfermedad se caracteriza por deficiente secreción o utilización de insulina que lleva a graves alteraciones en el metabolismo y al daño orgánico múltiple, sin embargo la ocurrencia de infecciones en los tejidos blandos en diabéticos son muy frecuentes. Los pacientes con DM que cursan un estado continuo de hiperglucemia pueden presentar un incremento de apoptosis en células de sangre periférica debido a mecanismos desencadenados por la hiperglucemia por lo que son incapaces de enfrentar una infección. Por lo tanto se realizará un estudio transversal para establecer si existe o no apoptosis en células de sangre periférica de pacientes diabéticos DM2 con infecciones en tejidos blandos. Se evaluará la proporción de células en apoptosis “espontánea” e “inducida” mediante la expresión de Caspasa-3 activa, Fas y FasL por inmunocitoquímica, además de la fragmentación de DNA por el método de TUNEL. Como conclusiones se observó un incremento de la apoptosis tanto inducida como espontánea mediada vía Fas-FasL en células de pacientes diabéticos con infección en tejidos blandos, lo cual sugiere se relaciona con la incapacidad de contrarrestar la infección en este tipo de pacientes.



# INTRODUCCIÓN

## 1. Diabetes Mellitus

### 1.1. Definición

La diabetes mellitus, 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 fisiopatológicamente 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 estándar de glucosa e incluso en ayunas conforme existe mayor descompensación de la secreción de insulina<sup>1</sup>.

La diabetes es un grupo de enfermedades que se caracteriza por los altos niveles de glucosa en la sangre causados por defectos en la producción de insulina, en la acción de la insulina, o en ambas. La diabetes puede provocar graves complicaciones y muerte prematura, pero las personas con diabetes pueden tomar medidas para controlar la enfermedad y disminuir el riesgo de sufrir complicaciones<sup>2</sup>.

La diabetes es una enfermedad crónica debida a que el páncreas no produce insulina suficiente o a que el organismo no la puede utilizar eficazmente. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre (glucemia). La hiperglucemia (aumento de la glucemia) es un efecto frecuente de la diabetes no controlada, y con el tiempo produce importantes lesiones en muchos sistemas orgánicos, y en particular en los nervios y los vasos sanguíneos<sup>3</sup>.

La diabetes se clasifica de la manera siguiente:

Diabetes tipo 1.

Diabetes tipo 2.

Diabetes gestacional.

Otros tipos de diabetes.<sup>2</sup>

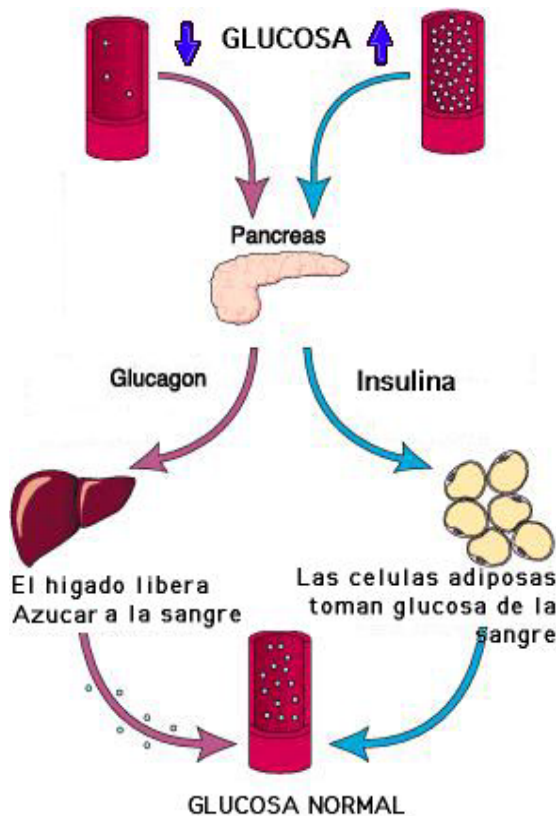


FIGURA 1. En un paciente normal alcanzar la normoglucemia en la circulación puede darse de dos formas, en la hipoglucemia el páncreas es capaz de liberar el glucagón, lo cual hace que el hígado responda con una liberación de glucosa al torrente sanguíneo y por lo tanto los niveles sean estabilizados, para el caso de la hiperglucemia el páncreas libera insulina, permitiendo que la mayoría de las células (incluyendo las adiposas) tomen la glucosa de la circulación, estabilizando así la concentración sanguínea. [www.geosalud.com](http://www.geosalud.com)

## 1.2. Mecanismo de acción de la insulina

La insulina ejerce su efecto sobre el transporte de glucosa al interior de la célula a través del receptor de insulina. Este receptor está compuesto por una subunidad alfa ( $\alpha$ ), que se localiza en el exterior de la membrana y que se une por puentes disulfuro a la subunidad beta ( $\beta$ ), que es una proteína transmembranal. La insulina se une a la subunidad  $\alpha$  y esto propicia de inmediato una autofosforilación de la subunidad  $\beta$ , que tiene lugar en residuos de tirosina y serina, de modo que se considera que la subunidad  $\beta$  tiene una función de cinasa tirosina. La autofosforilación de la tirosina parece estar en estrecha relación con el transporte de glucosa hacia las células. Ver figura 1. Se ha demostrado que los adipositos de pacientes con diabetes tipo 2 tienen una reducción de 50 a 80% en la actividad de cinasa de tirosina 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 diabetes tipo 2 se relaciona con las proteínas transportadoras de glucosa. La exposición de las células a la insulina da como resultado 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 diabetes tipo 2 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 se designan como GLUT 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 <sup>4</sup>.

En la diabetes tipo 2 el páncreas es incapaz de mantener una producción adecuada de insulina ante una demanda que se incrementa 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 <sup>4</sup>.

El factor que con mayor consistencia se relacionan con aumento en la frecuencia de aparición de hiperglucemia en ayunas es la edad; conforme se alcanza mayor edad el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 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 a la hormona.

La obesidad se caracteriza también por ser un estado de resistencia a la insulina; el riesgo de que una diabetes tipo 2 se manifieste en un individuo obeso disminuye cuando este logra reducir su peso corporal. La dieta alta en carbohidratos es difícil de separar de la obesidad como factor de riesgo para diabetes tipo 2. Sin embargo, y aunque parezca paradójico, parece propiciar bien un aumento en la sensibilidad a la insulina por el músculo y por el tejido adiposo.

El ejercicio físico mejora la sensibilidad a la insulina, pero es cuestionable el papel del sedentarismo en el desarrollo de la diabetes tipo 2. El embarazo por su parte, propicia una serie de cambios hormonales y, en sus últimos meses, una resistencia a la insulina que pueden favorecer la aparición de hiperglucemia en ayunas y diabetes tipo 2 <sup>4,5</sup>.

Los principales factores adquiridos que contribuyen a la presentación de este tipo de diabetes son aquellos que se relacionan con aumento a la resistencia a la insulina. Los mejor identificados son obesidad, inactividad física, embarazo y edad avanzada <sup>5</sup>.

### **1.3. Panorama epidemiológico**

A principios del siglo XXI destaca la emergencia de la diabetes mellitus como el prototipo de las enfermedades crónicas ligadas al proceso de envejecimiento de la población, al incremento de la obesidad y a la adopción de nuevos patrones de comportamientos como los cambios en la dieta y la reducción de la actividad física.

En el mundo existen alrededor de 171 millones de diabéticos y se estima que llegarán a 370 millones en 2030 <sup>6</sup>. La mayoría vive en países en desarrollo y cerca del 80% de los años de vida perdidos por discapacidad son a causa de la diabetes mellitus que ocurre en los países pobres. Para el año 2000 se calculó que el número de diabéticos en América era de 35 millones, cifra que se

incrementará a 64 millones en 2025; 52% de los diabéticos en el continente vive en América Latina y el Caribe, y esa proporción crecerá a 62% en 2025 <sup>7</sup>.

Por otro lado, la Encuesta Nacional de Salud (ENSA -2000) registró una prevalencia general de diabetes mellitus de 7.5% en la población mayor de 20 años <sup>8</sup>. Como causa de morbilidad, la diabetes mellitus tipo 2 produjo 287 180 casos nuevos en el año 2000, ocupando el décimo segundo lugar dentro de las veinte principales causas de enfermedad en el país <sup>9</sup>. La mortalidad por diabetes mellitus en México se elevó de 39 a 49 por cada 100 mil habitantes entre 1985 y el año 2000, y hoy ocupa los primeros lugares como causa de muerte tanto en hombres como en mujeres, y provoca una cantidad muy importante de años de vida saludables perdidos <sup>10</sup>.

En el Instituto Mexicano del Seguro Social, la diabetes fue responsable de 5% de las consultas de medicina familiar durante 2002; generó 62 745 egresos, lo que representa 3% del total de los egresos y provocó 17 042 defunciones, equivalente a 18% del total de las defunciones en la institución. La diabetes ocupó el primer sitio como causa de muerte en las mujeres y fue responsable de 20% en este grupo, mientras que en los hombres se ubica en el segundo lugar y es responsable del 15% de las defunciones <sup>11</sup>.

Los costos derivados para la atención de los pacientes diabéticos en los ámbitos ambulatorio y hospitalario junto con la pérdida de productividad de la población afectada, coloca a la diabetes mellitus dentro de las enfermedades de mayor costo social y carga financiera para las instituciones de salud. En México se estima que el costo de su atención puede ser entre 5 y 14% de los gastos dedicados a la atención médica, y los costos directos e indirectos de la atención de la diabetes puede ascender a 2618 millones de dólares anualmente <sup>12</sup>.

#### **1.4. Complicaciones Diabéticas**

Algunas de las complicaciones más frecuentes en la diabetes son la nefropatía, retinopatía y neuropatía.

La hiperglucemia es uno de los factores de riesgo reconocidos para la aparición y progresión de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus. La elevación mantenida en las concentraciones de glucosa provoca cambios en las proteínas plasmáticas y tisulares con efectos indeseables sobre la salud del paciente diabético. El aumento en la vía del poliol, del proceso de glucosilación no enzimáticos, del estrés oxidativo y del estrés carbonílico son algunos de los mecanismos que tratan de explicar el daño vascular inducido por la glucosa <sup>13</sup>.

Las complicaciones de la diabetes son aquellos problemas médicos que ocurren más a menudo en personas con diabetes que en personas que no son diabéticas. A menudo, estas complicaciones se inician debido a cambios en los vasos sanguíneos o en los nervios.

Entre las complicaciones diabéticas más comunes están:

**Las enfermedades vasculares.** Esta complicación se desarrolla a medida que los vasos se hacen más gruesos, lo que provoca que la sangre tenga más dificultad pasando a través de los mismos. Esto puede conducir a problemas cardíacos y derrames cerebrales.

**Daño de los vasos sanguíneos.** Los diabéticos pueden sufrir daños en los vasos sanguíneos de los ojos y los riñones, lo que puede conducir a la ceguera y a las enfermedades renales.

**Daño nervioso.** La neuropatía es una complicación diabética en la cual los nervios, más a menudo los de las piernas y los pies, son afectados. Esta complicación nerviosa puede conducir a amputaciones en las piernas o los pies, cuando algún rasguño o cortadura se infecta y la persona no acude al médico para recibir tratamiento adecuado <sup>14</sup>.

## **2. Infecciones en tejidos blandos**

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

### **2.1. Clasificación de la infección**

La infección se clasifica desde un punto anatómico como superficial cuando esta 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 2 cm 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 <sup>15</sup>.

Así la celulitis necrotizante monomicrobiana afecta primariamente a la piel y tejido celular subcutáneo; la fascitis necrotizante 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 necrotizante sinérgica por gramnegativos se extiende hasta la fascia más profunda y puede afectar al músculo y finalmente la mionecrosis por clostridios se inicia en el músculo y se puede extender a capas más superficiales.

La clave en el manejo de estas infecciones necrotizantes es un diagnóstico precoz y un tratamiento agresivo inmediato. Factores de riesgo para las

infecciones necrotizantes son la edad, presencia de ciertas enfermedades de base como diabetes mellitus, alcoholismo, enfermedad vascular, neoplasia, inmunodepresión, obesidad, insuficiencia renal crónica, etc <sup>16</sup>.

En relación con la infección de tejidos blandos su manifestación depende del grado de profundidad de la lesión y del tipo de germen que la causen; por lo general son infecciones polimicrobianas aunque en ocasiones se han descrito como tipo monobacteriana. Puede haber participación de anaerobias, y la más grave de estas es la fascitis necrosante con sus múltiples sinónimos: 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, la mucormicosis cutánea y la polimiositis. Sin lugar a dudas las infecciones de tejidos blandos se presentan 25% más en la población diabética que en la no diabética <sup>17</sup>.

### 2.1.1. CELULITIS ANAERÓBICA

La producen bacterias anaeróbicas que no forman esporas, como bacteroides, peptoestreptococo y peptococo, ya sea sola o combinada. 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 mal oliente y, por supuesto, siempre crepitación por la presencia de gas en tejido celular subcutáneo <sup>18</sup>.

El tratamiento consiste en debridación 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 la vinculación.

### 2.1.2. FASCITIS NECROSANTE

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 y heridas posquirúrgicas, el sitio de entrada puede ser un sitio de traumatismo o de diversos procedimientos quirúrgicos, sobre todo de abordaje abdominal al principio el área afectada se presenta eritematosa y edematosa, con márgenes nítidos y dolorosa. La introducción del patógeno dentro del espacio subcutáneo puede ocurrir por alguna disrupción de la piel, abrasiones, quemaduras, contusiones, laceraciones, inyecciones, mordeduras o incisiones quirúrgicas.

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 bolas de contenido necrótico. En este punto el área afectada ya no es dolorosa sino que al 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 sobre todo en pacientes con DM. En estos momentos la toxicidad sistémica es muy importante. En cuanto a exámenes de laboratorio lo habitual es la leucocitosis y en las tinciones de Gram llama la atención la diversidad de microorganismos sin presencia de leucocitos. El tratamiento consiste en una debridación 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 <sup>19-21</sup>.

### 2.1.3. GANGRENA DE FOURNIER

Cuando la Fascitis Necrosante (FN) afecta a los genitales masculinos se llama Gangrena de Fournier (GF), llamada así por un caso de gangrena escrotal descrita por Jean Alfred Fournier en 1843. Algunos autores extienden la definición de Gangrena de Fournier a la FN de la región perineal tanto en hombres como en mujeres <sup>22-24</sup>.

La gangrena de Fournier se inicia con ataque al estado general y dolor a nivel escrotal. Si progresa sin diagnóstico, en cinco días el paciente se puede encontrar séptico, el conocimiento de la diseminación de esta infección es crucial para el manejo quirúrgico ya que se inicia a nivel peneano y puede progresar hacia la pared abdominal. Su origen puede localizarse a nivel perirectal y diseminarse a los glúteos o muslos. La cobertura antimicrobiana es muy importante, recordando que los gérmenes mas frecuentes en estos pacientes son Gram negativos entéricos. La mortalidad es elevada y en diferentes series se informa con valores del 7 al 95%, con un promedio del 20% <sup>25</sup>.

El alcoholismo en un 25-50% de los casos y la diabetes mellitus en un 40-60% se encuentran con bastante frecuencia en estos casos <sup>26;27</sup>.

## 3. Diabetes Mellitus e infecciones

Las infecciones son comúnmente asociadas como lo es la diabetes, en especial cuando se presenta algún desequilibrio metabólico, como la cetoacidosis. La relación entre el control glucémico y el riesgo de adquirir infecciones no se conoce bien, sin embargo se ha visto que los pacientes diabéticos presentan una alta predisposición a adquirir infecciones intrahospitalarias, principalmente en situaciones post- operatorias o cuando se encuentran en terapia intensiva <sup>21;28</sup>.

Un estudio en el periodo 1998- 2001 con pacientes diabéticos, mostró que las causas mas comunes de hospitalización fueron: las enfermedades en el sistema circulatorio con un 33%, así como los desordenes inmunitarios, metabólicos, nutricionales y endocrinos con un 13%, sin embargo las infecciones fueron clasificadas como la segunda causa mas frecuente en estos pacientes con un 14% <sup>18;29</sup>.

Las manifestaciones asociadas a la diabetes que contribuyen a incrementar la susceptibilidad a las infecciones son: enfermedades vasculares periféricas

(acompañada generalmente por isquemia), neuropatía y disfunción del sistema inmune<sup>30,31</sup>.

Las infecciones polimicrobianas son difíciles de controlar ya que existen una gran variedad de especies de bacterias, las cuales día a día presentan resistencia a muchos de los antibióticos utilizados<sup>32,33</sup>. Un estudio realizado en el 2005 con ratones diabéticos obesos (DM2) mostró que algunas bacterias presentan un efecto sinérgico en los ratones diabéticos infectados en comparación con los ratones prediabéticos, por lo que sugieren que la diabetes es un factor importante en la severidad de las infecciones polimicrobianas<sup>34</sup>.

Aunque las infecciones que amenazan las extremidades son frecuentemente polimicrobianas, *S. aureus* es el patógeno mayor implicado en éstas<sup>35</sup>. Un estudio previo comparo el proceso de infección por *S. aureus* en modelos de ratones diabéticos tipo 1 (NOD) y controles no diabéticos. Los ratones diabéticos mostraron una disminución en la inflamación del tejido en respuesta a la inoculación, comparado con los controles, esto fue consistente con el resultado de una disminución en los niveles de quimiocinas y MIP-2 en el tejido. El daño severo de *S. aureus* en este modelo, se correlacionó con una disminución en el estallido respiratorio de células mononucleares de sangre periférica en respuesta al patógeno<sup>36</sup>.

Obana y colaboradores publicaron dos artículos muy interesantes, en uno de ellos evalúan la patogénesis de la adhesión de *Serratia marcescens* a las células epiteliales de la vejiga en infecciones de tracto urinario, la evaluación se llevo a cabo en ratones NOD tratados con aloxan los cuales fueron comparados con ratones normales tanto *in vivo* como *in vitro* y como conclusión se estableció que la susceptibilidad de los ratones diabéticos a las infecciones en tracto urinario se debe a un aumento en la capacidad adhesiva de la bacteria a las células epiteliales de la vejiga<sup>37</sup>.

Por otro lado, se han realizado estudios con gatos diabéticos en los cuales se observó la frecuencia de las infecciones tracto urinarias, la infección fue identificada en 18 de los 141 gatos y *E. coli* fue el patógeno mas comúnmente aislado (67%), se concluyó que las infecciones de este tipo son comunes en gatos diabéticos a pesar del control glucémico<sup>38</sup>.

En un estudio realizado por Kwan y colaboradores, se observó que en una población de 36 pacientes que presentaban fascitis necrosante en la extremidad inferior, el factor comúnmente asociado a estas fue la diabetes mellitus, además sugirieron que al presentar una inadecuada respuesta inmunitaria puede haber mas probabilidades de muerte en el paciente diabético<sup>39</sup>. También se ha relacionado a la diabetes en casos de bacteremia,<sup>40</sup> y gangrena de Fournier<sup>41</sup>.



## **4. Apoptosis**

### **4.1. Historia de la apoptosis**

Dentro de la literatura científica del siglo XIX se encuentran reportes de anatomistas que comentan la muerte celular usualmente relacionada a la metamorfosis de los renacuajos e insectos. Lo que actualmente conocemos como apoptosis fue descrito por primera vez por Walter Flemming en 1885 como alteraciones nucleares que recibieron diferentes denominaciones como por ejemplo, picnosis. Otras variantes morfológicas de muerte celular también fueron descritas entre las que destaca la degeneración vacuolar. En 1951 luego de una serie de estudios embriológicos se estableció que la muerte celular tiene un papel especial durante la ontogenia normal de los vertebrados y de algunos invertebrados. En la década de los 60's aparecieron numerosas publicaciones sobre la muerte celular en embriones la cual se sospechaba que pudiera ser un proceso genéticamente programado <sup>42</sup>.

Pero a pesar de todos estos reportes, hasta antes de 1970 solo se aceptaba la existencia de una forma de muerte celular que se denominaba necrosis y que se consideraba la consecuencia del daño celular inducido por hipoxia, agentes físicos como la radiación, agentes químicos diversos, así como procesos inmunológicos anormales <sup>43</sup>.

El término apoptosis que fue introducido por vez primera en una publicación de Kerr y Willie en 1972 <sup>44</sup>, se ha empleado para describir las características morfológicas de un mecanismo controlado (por genes) de muerte celular en el desarrollo embrionario y de recambio tisular en tejidos normales y en circunstancias nocivas y/o patológicas celulares <sup>45</sup>.

### **4.2. Definición de apoptosis**

#### **4.2.1. Muerte celular**

La muerte celular desempeña un papel fundamental en multitud de fenómenos biológicos y en procesos patológicos variados. Junto con la proliferación y diferenciación, la muerte celular es indispensable en la homeostasis tisular, en la embriogénesis, en la metamorfosis y en la modulación del aparato inmune. En los procesos patológicos es el resultado final del daño celular irreversible inducido por numerosos agentes endógenos y exógenos y representa una forma de escape al daño genético irreparable <sup>46</sup>.

Hay dos tipos de muerte celular claramente diferenciadas: la NECROSIS y la APOPTOSIS ó muerte celular programada.

##### **4.2.1.1. Necrosis**

Del griego "necros": muerte y "sis": estado. La necrosis se considera un tipo de muerte celular resultante de un daño exógeno a consecuencia de agentes dañinos y que puede afectar a grupos de células contiguas, tejidos y a veces órganos. Morfológicamente, el primer cambio es el hinchamiento del citoplasma de las células afectadas y la alteración irreversible de los organelos celulares.

Dos procesos esencialmente concurrentes traen en consecuencia los cambios de la necrosis: la digestión enzimática de la célula (autólisis) y la desnaturalización de las proteínas debida por lo general a la liberación de enzimas lisosomales <sup>46</sup>. Ver Tabla 1.

Debido a la característica de hinchamiento que sufre la célula necrótica, se ha propuesto llamar a este tipo de muerte celular "Oncosis" y reserva el término necrosis únicamente al proceso de destrucción del cuerpo celular, fenómeno que se comparte con la etapa final de la apoptosis <sup>47</sup>.

#### **4.2.1.2. Apoptosis**

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 altamente regulada 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 hacia la muerte celular. El proceso puede ser iniciado por estímulos provenientes del interior o del exterior de la célula entre los que se encuentran: la unión de ligandos a receptores de la superficie celular, daño al ADN como resultado de defectos en los mecanismos de reparación, tratamiento por fármacos citotóxicos, irradiación ó la supresión de factores de supervivencia <sup>48</sup>.

Esta analogía hace un especial énfasis a que la muerte en los seres vivos es parte integral y necesaria de los ciclos de vida de los organismos. Se habla de un programa controlado de muerte celular debido a que la célula tiene una participación activa y un control de tipo genético en su propia muerte celular. Los procesos apoptóticos tienen en general, un significado biológico ampliamente conocido. De esta manera una disfunción o regulación ineficiente del programa apoptótico, esta implicado en una variedad de condiciones patológicas ya sean degenerativas, por infección o de autoinmunidad <sup>15</sup>.

#### **4.2.2. Diferencias entre necrosis y apoptosis**

La apoptosis y necrosis presentan características diferenciales entre ellos, la regulación y el equilibrio de estos procesos mantienen al organismo en un estado verdaderamente homeostático. Algunas de las características importantes se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1. Características diferenciales de necrosis y apoptosis <sup>49</sup>

NECROSIS	APOPTOSIS
<p><b>CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de la integridad de la membrana</li> <li>• Inflamación de mitocondrias y citoplasma</li> <li>• No hay formación de vesículas, lisis completa</li> <li>• Desintegración de organelos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expansión de membrana, pero no hay pérdida de integridad.</li> <li>• Agregación de la cromatina en la membrana nuclear</li> <li>• Comienza una contracción del citoplasma y una condensación del núcleo</li> <li>• Fragmentación de células terminando en pequeños cuerpos</li> <li>• Formación de fragmentos rodeados de membrana (cuerpos apoptóticos).</li> </ul>
<p><b>CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de la regulación de iones.</li> <li>• No hay requerimiento de energía (proceso pasivo, también ocurre a 4°C).</li> <li>• Degradación de ADN al azar</li> <li>• Fragmentación de ADN post-lítica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso altamente regulado</li> <li>• Dependiente de energía ATP (Proceso activo, no ocurre a 4°C)</li> <li>• Fragmentación de ADN, no al azar (Patrón de escalera en gel de electroforesis).</li> <li>• Fragmentación pre-lítica de ADN</li> <li>• Liberación de varios factores (citocromo C, AIF) en el citoplasma de la mitocondria.</li> <li>• Activación de caspasas</li> <li>• Alteración de la asimetría de la membrana.</li> </ul>
<p><b>SIGNIFICADO FISIOLÓGICO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta grupos de células contiguas</li> <li>• Evocado por disturbios patológicos (ataque al complemento, virus líticos, hipotermia, hipoxia, isquemia, venenos metabólicos).</li> <li>• Fagocitosis por macrófagos</li> <li>• Respuesta inflamatoria significativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta células individuales</li> <li>• Inducidos por estímulos fisiológicos (perdida de factores de crecimiento, cambios de ambientes hormonales).</li> <li>• Fagocitosis por células adyacentes o macrófagos</li> <li>• No hay respuesta inflamatoria.</li> </ul>

#### 4.3 Características morfológicas celulares en la apoptosis

Los cambios morfológicos que caracterizan a las células en apoptosis se pueden ver claramente en microscopia de luz <sup>48</sup>. Las imágenes características son:

La célula disminuye de tamaño (se encoge).

Se modifica su citoesqueleto, lo cual refleja en que la membrana celular se arruga.

La cromatina se condensa en varias zonas del núcleo (fenómeno de picnosis).

Al final, la célula se descompone en varios trozos, los llamados cuerpos apoptóticos, los macrófagos finalmente fagocitan y degradan los cuerpos apoptóticos, de esta forma se logra que el contenido de las células viejas no se libere al exterior, con lo que se evita la respuesta inflamatoria. Ver figura 2

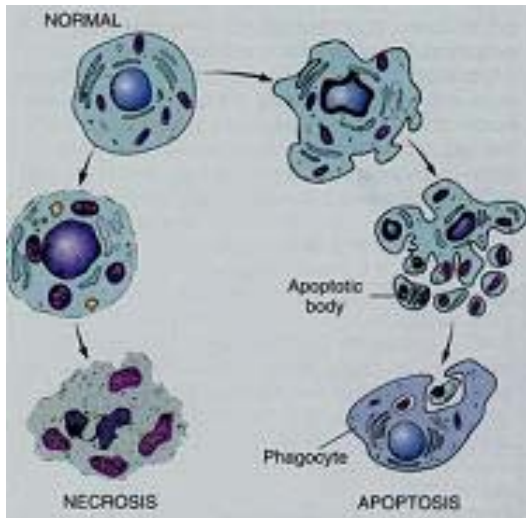


FIGURA 2. Nos muestra como en la apoptosis se forman los cuerpos apoptóticos hasta que el fagocito los engulle, así mismo el proceso de necrosis. Nótese las diferencias morfológicas celulares en cada tipo de muerte celular. [www.politedissent.com](http://www.politedissent.com)

El proceso de apoptosis se divide en tres fases:

#### 4.3.1 Fase de iniciación

La señal de muerte activa una cascada intracelular de procesos que comprenden el incremento en los niveles de radicales de oxígeno y  $\text{Ca}^{2+}$ , la producción de Par-4 y la translocación de los miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 (Bax, Bak, Bid, Bad y Bim) a la membrana mitocondrial<sup>50;51</sup>.

#### 4.3.2. Fase efectora

Hay un incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y los niveles de radicales de oxígeno, la formación de los poros de permeabilidad transicional en la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo C al citosol.

La liberación del citocromo C esta controlada por proteínas de la familia bcl-2: las inhibidoras de la apoptosis (Bcl-2 y Bcl-xL) previenen la liberación, mientras que las promotoras de la apoptosis (ya mencionadas) inducen la liberación. La liberación del citocromo C es un evento rápido (menos de 5 minutos) completo y cinéticamente invariable. Se sabe que siempre es anterior a la exposición de la fosfatidilserina y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática<sup>52;53</sup>. El citocromo C se une con el factor activador de proteasas 1 (APAF-1), la procaspasa 9 y el ATP ó dATP formando un complejo llamado apoptosoma. Dentro del apoptosoma se activa la caspasa 9, la que a su vez activa a la caspasa 3 con lo que se inicia la ultima fase de la apoptosis.

#### 4.3.3. Fase de degradación

La activación de las procaspasas puede ser prevenida por la unión a estas de las proteínas inhibidoras de la apoptosis, las cuales a su vez son inhibidas por la proteína Smac/DIABLO que permite la continuidad del proceso<sup>54</sup>. Las caspasas son activadas, dando como resultado cambios característicos en la membrana plasmática que forman vejigas y se expone la fosfatidilserina en la superficie celular, la cual es una señal que estimula la fagocitosis por los macrófagos<sup>55-57</sup>. En la fase de degradación, la cromatina nuclear se condensa

y se fragmenta. Esta fragmentación se lleva a cabo en dos pasos, el primero es la escisión en fragmentos de alrededor de 50,000 pares de bases (50 Kpb) y después se generan fragmentos de 180 pares de bases (pb) <sup>58</sup>. Esta fragmentación del ADN se debe a la activación de endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  principalmente la ADNasa activada por caspasas (CAD) presente en la célula apoptótica <sup>59-61</sup> y por las catepsinas y la DNAasa II de la célula fagocítica <sup>62-64</sup> (fig. 2). En última instancia las vejigas de la membrana plasmática se separan y forman los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas o los macrófagos por lo que no queda ninguna evidencia del proceso ni desencadenan fenómeno inflamatorio alguno a diferencia de la necrosis.

Como se puede ver la apoptosis es un fenómeno complejo que requiere de la activación secuencial de genes celulares específicos por lo que se considera un fenómeno genéticamente programado <sup>65</sup>.

#### **4.4. Inducción de apoptosis en los linfocitos**

##### **4.4.1. Las caspasas y su participación en el proceso**

La apoptosis en células de mamíferos es mediada por una familia de cistein proteasas llamadas caspasas, del inglés (cystein-dependent aspartate-specific proteases). La mayoría de los cambios morfológicos característicos que han sido observados en el programa de apoptosis son causados por este grupo de cistein - proteasas y son activadas específicamente en las células apoptóticas. Para mantener el programa de muerte bajo control, las caspasas son inicialmente expresadas como precursores inactivos llamados "procaspasas". Dentro de este grupo las caspasas presentan semejanzas estructurales entre sí y constituyen una larga familia de proteínas, que han sido altamente conservadas en el paso de la evolución, ya que se pueden encontrar desde el ser humano hasta los insectos y nematodos donde se han encontrado diversos homólogos de ellas. Hasta el año 2000 se habían identificado casi una docena de ellas en los humanos, y dos tercios de ellas habían sido sugeridas como funcionales, en el programa de muerte celular apoptótico <sup>66</sup>.

Las caspasas proapoptóticas pueden dividirse en dos grupos. El grupo de caspasas iniciadoras que incluye a las procaspasas 2,8,9 y 10 y el grupo de las caspasas ejecutantes del programa de muerte que incluyen a las procaspasas 3, 6 y 7. Las caspasas ejecutantes del programa de muerte poseen solo predomios cortos, mientras que las caspasas iniciadoras poseen predomios largos. En el caso de las procaspasas 8 y 10 contienen dominios efectores de muerte (DED) o los dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) como en el caso de las procaspasas 9 y 2 <sup>67</sup>.

Algunas caspasas, particularmente las efectoras, son capaces de inactivar ciertas proteínas celulares vitales mediante escisión, tales como la enzimas reparadoras del DNA, laminita, gelsolina, MDM2 (un inhibidor de p53) y la proteína cinasa C $\delta$  <sup>68</sup>.

#### 4.5 Vías de activación de caspasas

En los linfocitos, la activación de las caspasas y la subsiguiente apoptosis puede inducirse por dos vías:

La vía extrínseca o tipo I (Mecanismo mediado por receptores de muerte).

La vía intrínseca o tipo II (Mecanismo mediado por la mitocondria).

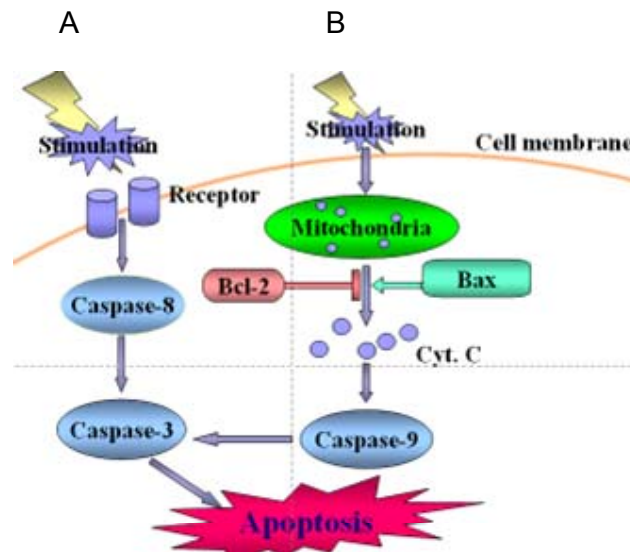


FIGURA 3. Representación esquemática de las dos principales vías de señalización de la apoptosis. a) Vía intrínseca, b) vía extrínseca. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

#### 4.5.1 Vía intrínseca

La vía intrínseca, también conocida como la muerte celular pasiva a consecuencia de la pérdida de estímulos para la supervivencia. Los estímulos para que se lleve a cabo la activación de la vía intrínseca, tales como el daño al ADN, inician el proceso de apoptosis por alteración del delicado balance de las proteínas de la familia de Bcl-2, las cuales controlan la integridad de la membrana mitocondrial externa y si se priva a los linfocitos de los estímulos necesarios para la supervivencia, como los factores de crecimiento o los coestimuladores (para las células T), el resultado es el rápido aumento de la permeabilidad de las membranas mitocondriales y la liberación del citocromo C al citoplasma (el mejor mediador apoptótico caracterizado), el cual forma un complejo citosólico llamado "apoptosoma", que consta del factor de activación de proteasas de la apoptosis 1 (Apaf-1) y la procaspasa 9. La formación de apoptosoma facilita el procesamiento de la procaspasa 9, que inicia el proceso de activación de las caspasas efectoras, siendo la más importante la caspasa 3. La desestabilización mitocondrial también da como resultado la liberación de proteínas que se enlazan y antagonizan a los miembros de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) denominada comúnmente Smac/DIABLO<sup>69</sup>.

La irradiación, los glucocorticoides y ciertos quimioterápicos pueden inducir la apoptosis de células diana por el mismo mecanismo bioquímico<sup>70</sup>.

#### 4.5.2 Vía Extrínseca (Mecanismo mediado por receptores de muerte)

La segunda vía de apoptosis en los linfocitos también conocida como muerte celular inducida por la activación mediada por los receptores de Fas/TNF; esta desencadenada por la unión de ligandos a receptores de membranas inductores de muerte. Los receptores inductores de muerte mejor definidos pertenecen a la familia de proteínas con dominios extracelulares ricos en cisteína homólogos. Los primeros miembros de esta familia que se identificaron fueron los receptores de la citosina denominada factor de necrosis tumoral (TNF), y esta familia incluye a varias proteínas como Fas y DR5<sup>71</sup>.

Con los métodos actuales de biología molecular, inmunohistoquímica y microscopía electrónica es posible diferenciarlas dos vías de la apoptosis y con ello estudiar el papel que desempeñan en los procesos biológicos normales y patológicos<sup>47</sup>.

### 5. Diabetes Mellitus y Apoptosis

A la apoptosis le concierne la regulación de varios eventos secuenciales, incluyendo la eliminación de células inflamatorias así como la buena cicatrización de las heridas.

La apoptosis es evaluada principalmente por la expresión de proteínas involucradas en este proceso (antiapoptóticas y proapoptóticas) así como la

fragmentación de DNA. Un estudio previo de la apoptosis en epidermis de pacientes diabéticos con úlceras, mostró que existe un incremento en la expresión de proteínas proapoptóticas en comparación con las antiapoptóticas, ya que estas últimas no presentaron alguna diferencia significativa en su expresión<sup>72-74</sup>.

La capacidad para secretar una cantidad adecuada de insulina, depende de la masa y función de células  $\beta$  pancreática, la hiperglucemia crónica causa daño en la secreción de la insulina y juega un papel esencial en la regulación de las células  $\beta$ , esto a consecuencia de la apoptosis, mediada por la interacción Fas- FasL<sup>75</sup>. Además la exposición de células de insuloma en ratones NOD a IL- $\beta$  e IFN- $\gamma$  por 24 horas induce actividad de caspasa 3 mediante interacción Fas-FasL<sup>76</sup>.

Las concentraciones elevadas de glucosa inducen estrés oxidativo que en muchos tipos celulares causan la generación de especies reactivas de oxígeno como son: súper óxidos, óxido nítrico y peroxinitritos, entre otros derivados. Se sabe que estos reactivos juega un papel muy importante en los mecanismos de apoptosis<sup>77</sup>. Por otro lado se sabe que la hiperglucemia en humanos causa la activación de varias proteínas involucradas en la apoptosis, incluyendo miembros de las familias de las caspasas (pro- caspasa 9 y pro- caspasa 3), así como de la familia de Bcl-2<sup>78</sup>.

En la DM2 humana, los desordenes metabólicos están asociados con la producción de mediadores inflamatorios, como los son el aumento en los niveles de IL-6 y TNF que promueven la resistencia de los tejidos a la insulina<sup>79</sup>.

Se realizaron estudios en podocitos de ratones diabéticos con nefropatía, se observó un incremento de la apoptosis cuando las concentraciones de glucosa aumentan tanto *in vivo* como *in vitro*, debido a la elevada producción de ROS, lo cual sugiere que la apoptosis de los podocitos representa un mecanismo fisiopatológico que conduce a una nefropatía diabética tipo 1 y 2 en modelos murinos<sup>80</sup>.

Además estudios con pacientes diabéticos complicados con: nefropatías, neuropatías y retinopatías, presentaron un incremento significativo en las concentraciones de TNF- $\alpha$  y su receptor en suero, en este estudio también se observó la apoptosis en células endoteliales de venas umbilicales en el cual se demostró existe un aumento significativo en comparación con individuos control<sup>81;82</sup>.

Como sabemos las infecciones virales pueden provocar o acelerar la muerte de células  $\beta$  pancreáticas y pueden conducir al desarrollo de DM tipo I<sup>83</sup>.

Se ha observado en un estudio con islotes  $\beta$  pancreáticos de ratas, los cuales fueron cultivados a diferentes concentraciones de glucosa, presentaron un incremento en la apoptosis lo cual llevó al desarrollo de una diabetes tipo 1,



además se observó un incremento en la expresión de Fas, pero no hubo diferencia significativa en la expresión de Bcl-2 y Bcl-x<sup>84</sup>.

Se ha estudiado la apoptosis en células mesangiales de ratones diabéticos y se observó que existe un incremento de caspasa-9 activa lo cual indica que este proceso se lleva a cabo mediante la activación de la vía intrínseca, y por lo tanto juega un papel determinante en el daño microvascular en la neuropatía diabética *in vivo*<sup>85</sup>. Además se ha observado un incremento de apoptosis mediante análisis de caspasa-3 activa y TUNEL, en células neuronales de ratones diabéticos con neuropatía<sup>86</sup>.

Por otro lado, en un estudio con líneas celulares epiteliales de cristalino cultivadas con altas concentraciones de glucosa se presenta apoptosis<sup>87</sup>; observación consistente con el modelo de ratas diabéticas, en las cuales se observa apoptosis en células epiteliales de cristalino. Sin embargo, en los pacientes diabéticos, aunque hay apoptosis de estas células no parece correlacionar con el desarrollo y extensión de catarata<sup>88</sup>. En células de túbulo proximal de riñón humano cultivadas con altas concentraciones de glucosa también se presenta apoptosis<sup>89</sup>, condición que es consistente con la nefropatía que se presenta *in vivo* en ratas diabéticas<sup>90</sup>. Así mismo *in vitro* las de células mesangiales murinas y humanas<sup>91</sup>, las células endoteliales<sup>92</sup> o de músculo liso<sup>93</sup> de aorta humana, los miocitos de corazón<sup>94</sup>, y el miocardio de ratones diabéticos<sup>95</sup> sufren de apoptosis si se cultivan en presencia de altas concentraciones de glucosa, lo cual es consistente con el hecho de que en ratas diabéticas se encuentran células apoptóticas en la aorta<sup>96</sup> y que la perfusión *ex vivo* de corazones de rata causa apoptosis<sup>97</sup>. Por ello, se considera que la apoptosis participa en la aterogénesis<sup>98</sup> y en la cardiomiopatía dilatada<sup>99</sup>.

Finalmente, debe destacarse que entre los mecanismos de apoptosis que se asocian a las alteraciones arriba mencionadas se encuentran la formación de ROS<sup>100</sup>, la desestabilización de la membrana mitocondrial con liberación de citocromo C y la inducción de citocinas proinflamatorias<sup>79</sup> con la activación y translocación de NFκ-B.

En un estudio que incluyó 36 pacientes, 13 DM1 y 23 con DM2, se determinó apoptosis de células de sangre periférica mediante ensayos de citometría de flujo con tinción de yoduro de propidio, aunque se encontró que los pacientes con DM2 tenían disminución de glutatión intracelular, lo que refleja mayor estrés oxidativo, presentaban menor grado de apoptosis<sup>101</sup>. Los autores explican estas observaciones como un reflejo de mayor rigidez de las células en pacientes diabéticos, pero no afirman que tenga correlación con la apoptosis. Si bien estas observaciones son aparentemente contrarias a nuestra hipótesis (ver más adelante) 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 (lipopolisacárido), hipoxia o choque térmico. Es

importante señalar que la hiperglucemia potencia el efecto citotóxico del LPS y de la isquemia <sup>31;102;103</sup>. En contraste, otro estudio demuestra apoptosis en neutrófilos de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1, incluso cuando se encuentran bien controlados <sup>104</sup>. En otro estudio en el que se examinó la oxidación y el daño en el DNA de leucocitos de sangre periférica de pacientes diabéticos, determinados mediante electroforesis y determinación de sensibilidad a la FPG (formamildopirimidina 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 células mononucleares <sup>105</sup>.

Es más probable que se encuentre apoptosis de células de sangre periférica cuando se presenta cetoacidosis. Aunque se ha descrito que la acidificación del medio de cultivo *in vitro* induce activación de neutrófilos, esto aumento la regulación de CD18 y disminuye la apoptosis <sup>106</sup>, 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 <sup>107</sup>. Estas observaciones concuerdan con el hecho de los pacientes con diabetes tipo 1, que cursan con cetosis, niveles elevados de cuerpos cetónicos de acetoacetato y triglicéridos, presentan daño oxidativo de células de sangre periférica y apoptosis que puede disminuir la cantidad de monocitos de sangre periférica <sup>108</sup>. Así mismo, se ha demostrado que las plaquetas pueden agregar fagocitos apoptóticos causando trombosis, respuesta inflamatoria y daño vascular <sup>109</sup>.

Existe además evidencia de que la apoptosis participa en diversos procesos fisiopatológicos en la diabetes. Se le ha relacionado a neurodegeneración, pues se ha observado que en ratas diabéticas se presenta apoptosis de neuronas productoras de vasopresina <sup>110</sup>, de neuronas corticales, del hipotálamo <sup>102</sup> y de ganglios espinales <sup>111</sup>. En cultivos primarios de microglia de rata se presenta apoptosis en presencia de altas concentraciones de glucosa, con un efecto sinérgico si además se agrega LPS <sup>103</sup> y 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 <sup>112</sup>.

## **JUSTIFICACION**

Las infecciones de tejidos blandos son complicaciones graves de la diabetes que se presentan en pacientes que no han llevado un control adecuado, que requieren de un manejo hospitalario integral y que a pesar de las intervenciones terapéuticas, tienen una alta letalidad. La finalidad de este proyecto fue evaluar la existencia de apoptosis espontánea e inducida en PBMC de pacientes con DM2 e infecciones en tejidos blandos. El aumento de la apoptosis y sus diferencias con respecto a los pacientes sin estas complicaciones, son parámetros que se pretende utilizar como base para que en el futuro sea posible investigar los mecanismos de apoptosis implicados en el proceso, evaluar su utilidad como un indicador de pronóstico clínico y encontrar medidas terapéuticas más efectivas.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los pacientes con DM2 son más susceptibles a infecciones de tejidos blandos, probablemente por un elevado índice de apoptosis inducido por el estado hiperglucémico, es entonces importante conocer el grado de apoptosis en células de sangre periférica de pacientes con DM2 e infecciones de tejidos blandos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar si existe un aumento de la apoptosis espontánea e inducible, así como un aumento en la expresión de los marcadores C-3 activa, Fas y Fas-L en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de pacientes con DM2 e infecciones en tejidos blandos en comparación con DM2 controlados e individuos sanos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar si existe diferencia en la proporción de PBMC en la apoptosis tanto espontánea como inducida de pacientes con DM2 con infecciones de tejidos blandos en comparación con DM2 controlados e individuos sanos.

Determinar si la apoptosis observada es dependiente de caspasa mediante la cuantificación de C-3 activa.

Evaluar la expresión de proteínas relacionadas con la vía extrínseca de la apoptosis ( Fas y Fas-L ) en PBMC de los diferentes grupos de estudio.

## **HIPÓTESIS**

Existe un incremento de apoptosis espontánea e inducible y moléculas involucradas en la apoptosis ( Fas y Fas-L ) en PBMC de pacientes con DM2 e infecciones en tejidos blandos comparados con DM2 controlados e individuos sanos, por lo cual la apoptosis puede relacionarse con la fisiopatología de la enfermedad.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **a) Población de estudio.**

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de DM2 mayores de 30 años con infección en tejidos blandos que se hospitalizaron en terapia intensiva en el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS, así como se obtuvieron muestras de pacientes con DM2 controlada que asistieron a la consulta en la clínica multidisciplinaria “Los Reyes” de la FES Zaragoza UNAM y de individuos sanos del banco de sangre de este mismo Hospital. Se tomaron signos vitales, peso, talla, temperatura corporal, presión arterial y frecuencia cardiaca. Se revisó el expediente general del paciente tomando en cuenta los datos clínicos más importantes. No se requiere una evaluación posterior. Los pacientes se dividieron en tres grupos:

Grupo A, individuos sanos.

Grupo B, pacientes con DM2 controlados.

Grupo C, pacientes con DM2 con infecciones en tejidos blandos.

### **b) Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.**

#### **Criterios de inclusión.**

Pacientes que aceptaron participar en el estudio, previo consentimiento informado por escrito. Se incluyeron a pacientes diabéticos mayores de 30 años de edad que tengan por lo menos 5 años de diagnóstico, de cualquier género, en tratamiento con hipoglucemiantes orales o insulina,

#### **Criterios de exclusión.**

Pacientes con diabetes mellitus tipo 1, acidosis láctica, coma hipoglucémico, trombosis mesentérica, pancreatitis aguda, cetoacidosis alcohólica, cetoalcalosis diabética., enfermedad terminal, cáncer, insuficiencia renal crónica, encefalitis, cardiopatía isquemia aguda, hematuria. Sospecha de infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana). Uso previo de glucocorticoides, cimetidina, clorpromacina, difenilhidantoína e inmunodepresores, complicaciones como la hipoglucemia, hipopotasemia grave, bronco aspiración, edema cerebral, alcalosis de rebote, neumotórax, neumomediastino espontáneos.

#### **Criterios de eliminación**

Pacientes con información incompleta o aquellos que no aceptaron continuar en el estudio. 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 o yatrogenia.

### **c) Variables.**

#### **Independientes:**

Control metabólico de la diabetes.  
Infecciones

#### **Dependientes:**

Proporción de células en apoptosis, determinadas por Caspasa-3 activa, TUNEL, expresión de Fas y ligando de Fas.

#### **Confusoras:**

Estado nutricional del paciente, medicación previa, insuficiencia renal crónica, alcoholismo, tabaquismo. Los pacientes con alguna complicación metabólica como cetoacidosis y estado hiperosmolar.

### **d) Materiales.**

Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica de 25 pacientes de los diferentes grupos con tubos con EDTA. Se utilizó un equipo especial para la determinación de TUNEL, (TUNEL POD Roche Applied Science 68298 Mannheim Germany), además se utilizaron diferentes anticuerpos para la evaluación de expresión de Caspasa-3, Fas y ligando de Fas.

### **e) Método.**

Obtención de muestra de sangre periférica.

Purificación de leucocitos. Esto se realizó mediante un gradiente de densidad utilizando el método de gradiente Ficoll-Hypaque<sup>113</sup>

Obtención de laminillas de muestras a través de una cito centrífuga.

Realización de inmunocitoquímica para los diferentes marcadores

### **f) Diseño estadístico.**

Para establecer si existen diferencias de la proporción de células apoptóticas entre los grupos experimentales, se utilizaron pruebas paramétricas (t de Student para muestras independientes) y ANOVA de una cola que se calculó con apoyo del programa PRISMA® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).



## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **a) Población de estudio.**

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de DM2 mayores de 30 años con infección en tejidos blandos que se hospitalizaron en terapia intensiva en el Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS, así como se obtuvieron muestras de pacientes con DM2 controlada que asistieron a la consulta en la clínica multidisciplinaria “Los Reyes” de la FES Zaragoza UNAM y de individuos sanos del banco de sangre de este mismo Hospital. Se tomaron signos vitales, peso, talla, temperatura corporal, presión arterial y frecuencia cardiaca. Se revisó el expediente general del paciente tomando en cuenta los datos clínicos más importantes. No se requiere una evaluación posterior. Los pacientes se dividieron en tres grupos:

Grupo A, individuos sanos.

Grupo B, pacientes con DM2 controlados.

Grupo C, pacientes con DM2 con infecciones en tejidos blandos.

### **b) Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.**

#### **Criterios de inclusión.**

Pacientes que aceptaron participar en el estudio, previo consentimiento informado por escrito. Se incluyeron a pacientes diabéticos mayores de 30 años de edad que tengan por lo menos 5 años de diagnóstico, de cualquier género, en tratamiento con hipoglucemiantes orales o insulina,

#### **Criterios de exclusión.**

Pacientes con diabetes mellitus tipo 1, acidosis láctica, coma hipoglucémico, trombosis mesentérica, pancreatitis aguda, cetoacidosis alcohólica, cetoalcalosis diabética., enfermedad terminal, cáncer, insuficiencia renal crónica, encefalitis, cardiopatía isquemia aguda, hematuria. Sospecha de infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana). Uso previo de glucocorticoides, cimetidina, clorpromacina, difenilhidantoína e inmunodepresores, complicaciones como la hipoglucemia, hipopotasemia grave, bronco aspiración, edema cerebral, alcalosis de rebote, neumotórax, neumomediastino espontáneos.

#### **Criterios de eliminación**

Pacientes con información incompleta o aquellos que no aceptaron continuar en el estudio. 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 o yatrogénia.

### **c) Variables.**

#### **Independientes:**

Control metabólico de la diabetes.  
Infecciones

#### **Dependientes:**

Proporción de células en apoptosis, determinadas por Caspasa-3 activa, TUNEL, expresión de Fas y ligando de Fas.

#### **Confusoras:**

Estado nutricional del paciente, medicación previa, insuficiencia renal crónica, alcoholismo, tabaquismo. Los pacientes con alguna complicación metabólica como cetoacidosis y estado hiperosmolar.

### **d) Materiales.**

Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica de 25 pacientes de los diferentes grupos con tubos con EDTA. Se utilizó un equipo especial para la determinación de TUNEL, (TUNEL POD Roche Applied Science 68298 Mannheim Germany), además se utilizaron diferentes anticuerpos para la evaluación de expresión de Caspasa-3, Fas y ligando de Fas.

### **e) Método.**

Obtención de muestra de sangre periférica.

Purificación de leucocitos. Esto se realizó mediante un gradiente de densidad utilizando el método de gradiente Ficoll-Hypaque<sup>113</sup>

Obtención de laminillas de muestras a través de una cito centrífuga.

Realización de inmunocitoquímica para los diferentes marcadores

### **f) Diseño estadístico.**

Para establecer si existen diferencias de la proporción de células apoptóticas ente los grupos experimentales, se utilizaron pruebas paramétricas (t de Student para muestras independientes) y ANOVA de una cola que se calculó con apoyo del programa PRISMA® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## METODOLOGÍA

### Purificación de leucocitos.

Se mezcla la sangre problema con solución salina (0.9 %NaCl) en proporción 1:1, mientras que se mide el volumen de "limphoprep" estéril de acuerdo al volumen total de mezcla sangre/S.S., guardando la relación 3 mL limphoprep-10 mL mezcla y se coloca en un tubo Falcon de 15 mL la cantidad adecuada de limphoprep se adiciono lentamente por las paredes del tubo la mezcla sangre/S.S., cuidando no se rompa el gradiente de densidad se centrifuga a 1500 r.p.m. por 30 minutos separando la capa de leucocitos con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y se coloca en otro tubo Falcon para esto se adicionó una cantidad igual de S.S. a la capa extraída y se centrifuga por 20 minutos a 1500 r.p.m. finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de S.S.

### Obtención de laminillas de leucocitos purificados mediante el uso del Citocentrífuga "CITOSPIN".

Después de la obtención de leucocitos purificados se contó el numero de células obtenidas, realizando en un pozo una mezcla de 50 µL de PBMC con 50 µL de Azul tripano se llena una cámara de Neubauer con 10 µL de la mezcla y se procede a contar células a 20x bajo microscopia de luz y se realizo el calculo para obtener  $5 \times 10^4$  células/ mL.

Para la obtención de una laminilla a una concentración de  $5 \times 10^4$ , se realiza la regla:

$$X = \frac{5 \times 10^4 * 1000}{\#Cel}$$

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

Este valor se multiplico por el numero de laminillas a elaborar el valor obtenido se completo con SS de tal forma que a cada celda de la cito centrifuga se le adicionó 200 µL de muestra para cada laminilla.

Después de dejar secar las laminillas y rotularlas se procedió a fijar las células y esto se realizó al sumergirlas en una solución de formaldehído al 4% por 20 minutos.

Después de haber transcurrido el tiempo se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente y finalmente se almacenaron en cajas para portaobjetos.

### INMUNOCITOQUÍMICA

## **Fundamento de la técnica de Inmunocitoquímica.**

El fundamento de esta técnica es la utilización de un pH adecuado (pH=6.0) que con ayuda de una temperatura elevada, se logra un incremento de la permeabilidad de la membrana o en caso de antígenos a identificar, una buena exposición antigénica, después se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena con la mezcla metanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para que después de varios lavados se bloquea con OVA (ovoalbumina de gallina) con el fin de cubrir los sitios inespecíficos de la reacción. El primer anticuerpo es muy importante ya que reconoce el antígeno o la proteína que es de nuestro interés, para después adicionar el segundo anticuerpo que reconoce al primero, este último va marcado con biotina la cual posteriormente es reconocida por la estreptavidina con peroxidasa de rábano y cuando es adicionado el sustrato de esta última que es el DAB (Diaminobencidina) esta es reducida, observándose una coloración café como resultado de la expresión del anticuerpo y como muestra de la positividad.

Una vez seleccionadas las laminillas a procesar el siguiente paso fue lavar 2 veces con PBS por 5 minutos a 130 r.p.m. se hizo la recuperación del antígeno con una solución de Citrato de Sodio ( pH 6.0, 0.01M) por 20 minutos a 130 r.p.m. se hicieron 3 lavados PBS por 5 minutos c/u a 130 r.p.m. enseguida se realizó la eliminación de la peroxidasa endógena con MetOH/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (45 mL/ 5 mL) por 30 minutos a 130 r.p.m. se lava con agua destilada por 5 minutos a 130 r.p.m. y luego se hace un lavado mas con PBS por 5 minutos a 130 r.p.m., el siguiente paso es el bloqueo con OVA (ovoalbúmina de gallina) 0.05g/10 mL PBS por 1h. en cámara húmeda a 40 r.p.m., se agregó el primer anticuerpo (250 µL >1 µL Ab) el cual se incubó en cámara húmeda y se mantiene en agitación toda la noche a 40 r.p.m. y una vez mas se lavó la muestra con 5 lavados de 8 min. c/u con PBS a 110 r.p.m., se adicionó un 2do. Ab Link (amarillo) por 30 min. a 40 r.p.m. y de igual forma se lavaron las muestra con 3 lavados de PBS de 5min. c/u a 130 r.p.m. finalmente se agrego la Streptavidina (rojo) por 30 min. a 40 r.p.m. se hicieron 3 lavados con PBS de 5 min. c/u a 130 r.p.m., la muestra se revelo con DAB 1 gota cromógeno + 1 mL DAB, se lavó con suficiente agua corriente y se llevó a cabo la contratinción: Hematoxilina (1:1) por aproximadamente 45 seg. Se enjuagó con agua muy bien y se procede a deshidratar la muestra de la siguiente forma:

Agua destilada – 5 min c/u  
EtOH 70% -- 5 min c/u  
EtOH 90% -- 5 min c/u  
EtOH 100% -- 5 min c/u  
Xilol -- 5 min  
Montar en portaobjetos

## **Técnica de “TUNEL”**

### **Fundamento de la técnica de “TUNEL”.**

Las células apoptóticas pueden detectarse mediante inmunocitoquímica, TUNEL que se caracteriza por el marcaje de los extremos terminales del 3' OH (oxidrilo) del DNA fragmentado de doble cadena o una sola cadena de las células apoptóticas con la polimerasa Terminal Deoxinucleotidil Transferasa, se realiza con nucleótidos marcados con fluoresceína en la dirección 3' a 5'. La fluoresceína puede ser detectada inmediatamente, pero por el tiempo de vida que presenta es mejor adicionarle un anticuerpo antifluoresceína que a su vez es marcado con peroxidasa de rábano, la cual, posteriormente oxida al DAB y este es detectado por presentar una coloración café <sup>114</sup>.

La prueba de TUNEL para la detección de células apoptóticas es confiable, sensible y específica acorde al tejido utilizado además permite una mayor sensibilidad cuando existe un mayor grado de fragmentación del DNA <sup>114</sup>.

### **PROCEDIMIENTO**

Se lleva a cabo un pretratamiento celular el cual consiste en colocar las laminillas en vasos koplín, para lavarlas 2 veces con PBS (pH=7.4), cada lavado de 5 minutos, después se incrementa la permeabilidad de la membrana celular mediante la adición de citrato de sodio (pH= 6, 0.01M) por 20 minutos a 95°C en baño María, se lava 5 minutos 3 veces con PBS, posteriormente se lleva a cabo la eliminación de la peroxidasa con una mezcla de peróxido de hidrógeno (1:9), se le adicionan 20 mL aproximadamente a cada vaso koplín y se agita a 130 r.p.m. por 30 minutos, se hace un lavado con agua destilada por 5 minutos y otro con PBS también por 5 minutos.

El siguiente paso es adicionar el bloqueador universal a cada muestra, esto se hace delimitando la muestra con un plumón hidrofóbico, enseguida se adiciona una gota de bloqueador universal y se incuban las muestras en cámaras húmedas a 40 r.p.m. por 1 hora. Posteriormente se adiciona la enzima; se hace una mezcla de 50 µL de enzima con 450 µL de buffer, la cual se incuba por 20 minutos en un baño de hielo y se colocan 20 µL de la mezcla a cada muestra, esto se incuba a 37°C por 1 hora, se lavan por 5 minutos con PBS 5 veces a 130 r.p.m.

Como penúltimo paso se hace la incorporación del anticuerpo antifluoresceína (PDO), para esto se adicionan 20 µL del reactivo PDO a cada laminilla y se incuba a 37 °C por 30 minutos, después de la incubación se lava 5 minutos con PBS en 3 ocasiones. El desarrollo de color se realiza con la adición de DAB (Diaminobencidina) esto se hace bajo microscopía de luz, se enfocan las células y se aplica DAB hasta cubrir completamente la muestra. Registrando el tiempo de aplicación del DAB. Cuando se observa la coloración café en las células se detiene el registro del tiempo y se elimina el exceso de DAB e inmediatamente se lava con suficiente agua corriente para detener la reacción, se hace la contra tinción colocando las laminillas en racks se contratiñe con hematoxilina (1:1 con

agua destilada) por 30 segundos e inmediatamente se lavan con agua corriente finalmente se hace la deshidratación y montaje de las muestras colocando la rejilla en una solución de agua destilada por 5 minutos después se pasa por alcoholes graduales ( 70%, 90% y absoluto) cada uno por 5 minutos y finalmente se coloca la rejilla en xilol por 5 minutos y se fija ó monta con resina sintética la cual se deja secar mínimo 24 horas para hacer el análisis en el microscopio.

#### **Analisis morfométrico.**

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 con el programa Imagen-Pro® Plus Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA.

## RESULTADOS

### Morfología de los hallazgos por TUNEL.

Los hallazgos de tinción por TUNEL en los diferentes grupos de pacientes se presentan en la Figura 1. En el caso de los pacientes con DM2 e infección de tejidos blandos se encontró un incremento en la apoptosis inducida por choque térmico (F) en comparación con la apoptosis espontánea en los mismos pacientes (E). En los casos de DM2 sin infección se encontró una leve tinción para TUNEL (D), en las células purificadas de sangre periférica y sometidas a choque térmico, en comparación con las células de los mismos pacientes pero sin recibir choque térmico (C). Para los casos de las muestras de los controles sanos, la tinción para TUNEL en el caso de las muestras sometidas a choque térmico fue mínimo (B), en comparación con las mismas muestras sin choque térmico (A).

Los hallazgos inmunocitoquímicos de la figura 2 presentan la expresión de Caspasa-3 activa. En los casos de las muestras que no fueron sometidas al choque térmico (A, C, y E), no muestran expresión de Caspasa-3 activa en las células de sangre periférica de pacientes con DM2 con o sin infección de manera muy similar a los controles. En el caso de las células de sangre periférica proveniente de pacientes con DM2 e infección y sometida a choque térmico (F), muestran una clara expresión de Caspasa-3 activa, en comparación con las células provenientes de los pacientes con DM2 sin infección o los controles (B y D).

Los resultados en la detección en la expresión de Fas se muestran en la figura 3. En el caso de las células de sangre periférica sometidas a choque térmico se muestra un incremento en la expresión de Fas (B, D y F), en comparación con su respectivo control de células sin el choque térmico (A, C y D). De manera muy interesante dicha expresión detectada en las células sometidas a choque térmico es significativamente mayor en las células de sangre periférica provenientes de pacientes con DM2 e infección (F).

La expresión inmunocitoquímica de Fas-L se muestra en la figura 4. La expresión de Fas-L en células de sangre periférica de pacientes con DM2 pero sin infección fue mínima, tanto en las tratadas o no con choque térmico (C y D), muy parecidas a la expresión mostradas en las células de los controles (A y B). Sin embargo, en las células de sangre periférica de pacientes con DM2 e infección, se encontró una expresión elevada tanto en las células tratadas o no con choque térmico (E y F).

### Análisis morfométrico de los hallazgos inmunocitoquímicos.

La determinación del número de células positivas a TUNEL o a cada uno de los diferentes marcadores (C-3, Fas y Fas-L) anticuerpos y la densidad de la expresión en ellas fueron analizadas y los resultados se muestran en las figuras 5, 6, 7 y 8. En la figura 5 se muestra los resultados del análisis cuantitativo en la

positividad para TUNEL. En la figura 5A es claro que no existe una diferencia significativa entre los diferentes grupos de pacientes en el caso donde las células no fueron tratadas con choque térmico; sin embargo, en las células tratadas con choque térmico (5B), es clara la diferencia y estadísticamente significativa ( $p=0.0001$ ) en el caso de las células provenientes de pacientes con DM2 e infección.

Los resultados en la expresión de Caspasa-3 activa (6), muestran claramente un comportamiento parecido que correlaciona con la tinción para TUNEL.. Donde una vez mas las células provenientes de los diferentes grupos de pacientes que no fueron sometidas a choque térmico (6A), no muestran una diferencia significativa en la expresión de Caspas-3 activa. Y de igual manera a la figura anterior, las células de pacientes con DM2 e infección que fueron sometidas al tratamiento con choque térmico (6B), muestran un claro incremento en la expresión de Caspasa-3 activa en comparación con las células de pacientes con DM2 sin infección o los controles sanos ( $p=0.0129$ ).

El número de células positivas para Fas se muestra en la figura 7, en donde no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de células de pacientes que fueron sometidos a choque térmico (7B). Cuando se compararon los grupos de células las cuales no fueron tratadas con choque térmico (7A), si bien se denota una disminución en la expresión de Fas comparada con el grupo control y por lo contrario se muestra un ligero incremento en el grupo de células provenientes de pacientes con DM2 e infección comparadas con las de los pacientes con DM2 sin infección ( $p=0.0053$ ).

En cuanto a la expresión de Fas-L en la figura 8 se presenta la diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de células tratadas con choque térmico (8B) y sin tratamiento (8A). La densidad de expresión en las células no tratadas con choque térmico de los pacientes con DM2 e infección muestran un claro incremento ( $p=0.0002$ ), al ser comparadas con las de los pacientes con DM2 sin infección o con el grupo control. De igual manera en el caso de las células tratadas con choque térmico de pacientes con DM2 e infección se muestra un claro incremento en la expresión de Fas-L en comparación con los pacientes con DM2 sin infección y los del grupo control ( $p=0.0021$ ).



Positividad para TUNEL en células de sangre periférica de manera espontánea (A, C y E) o inducida por choque térmico (B, D y F). Nótese el incremento en la apoptosis inducida.

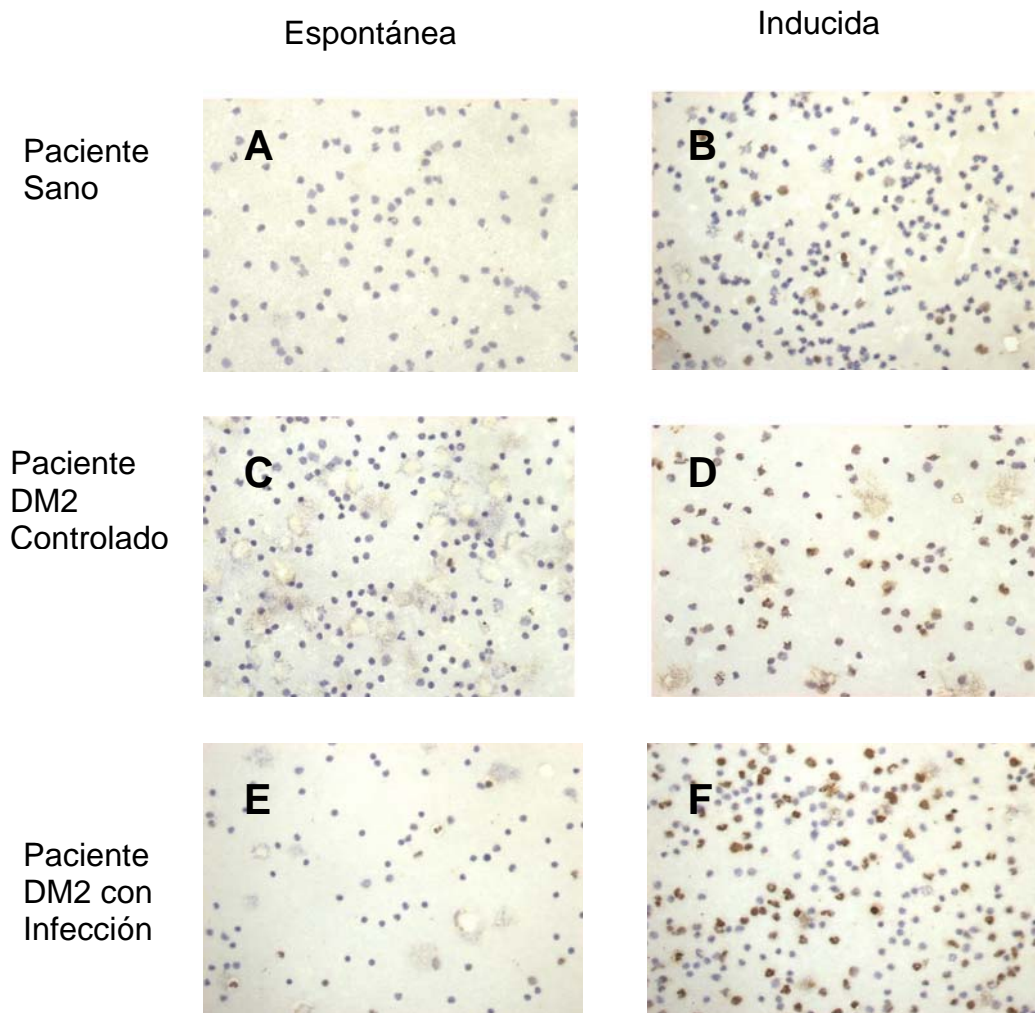


Figura 1. Hallazgos de Apoptosis por TUNEL

**Apoptosis determinada por la expresión de Caspasa-3 activa en células de sangre periférica de manera espontánea (A, C y E) o inducida por choque térmico (B, D y F). Nótese el incremento en la apoptosis inducida.**

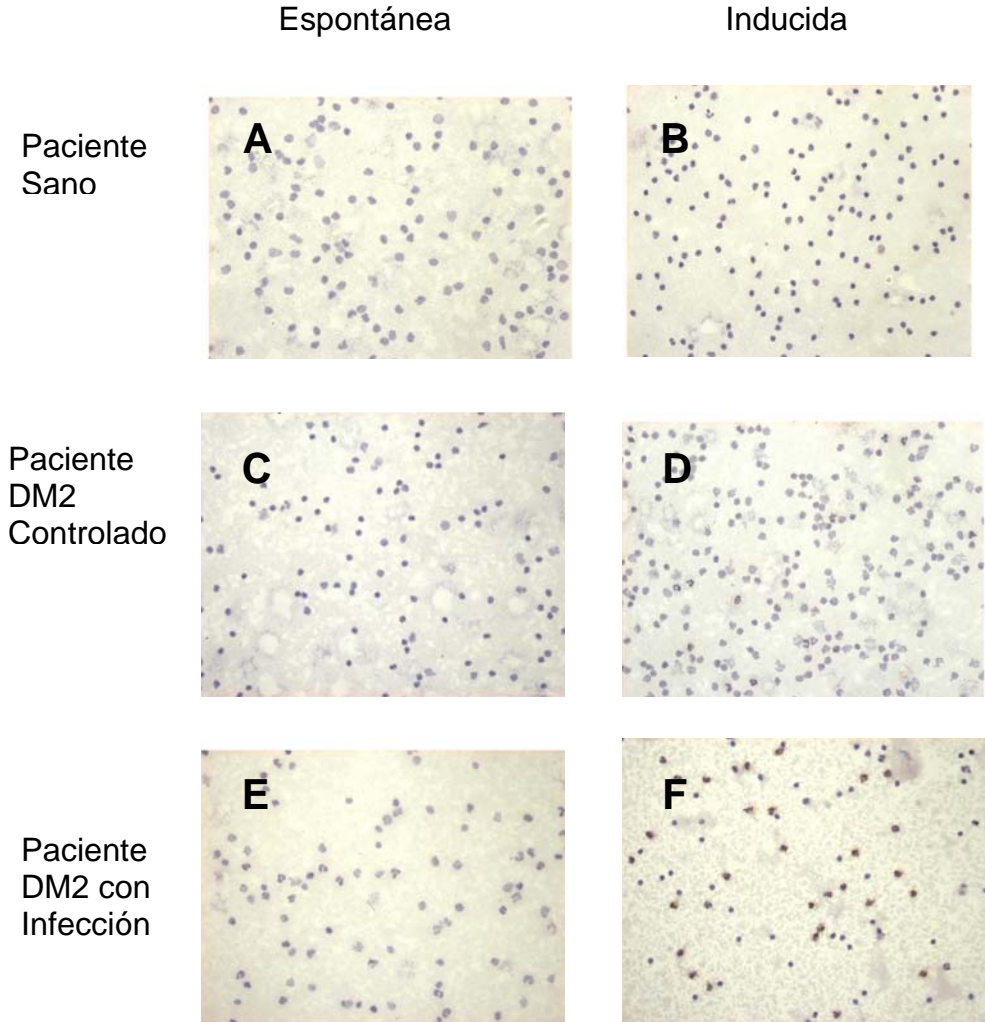


Figura 2. Hallazgos inmunocitoquímicos de Caspasa 3

Expresión de Fas en células de sangre periférica de los diferentes pacientes, las cuales fueron no tratadas (A, C y E) o tratadas con choque térmico (B, D y F). Nótese el incremento en la apoptosis inducida.

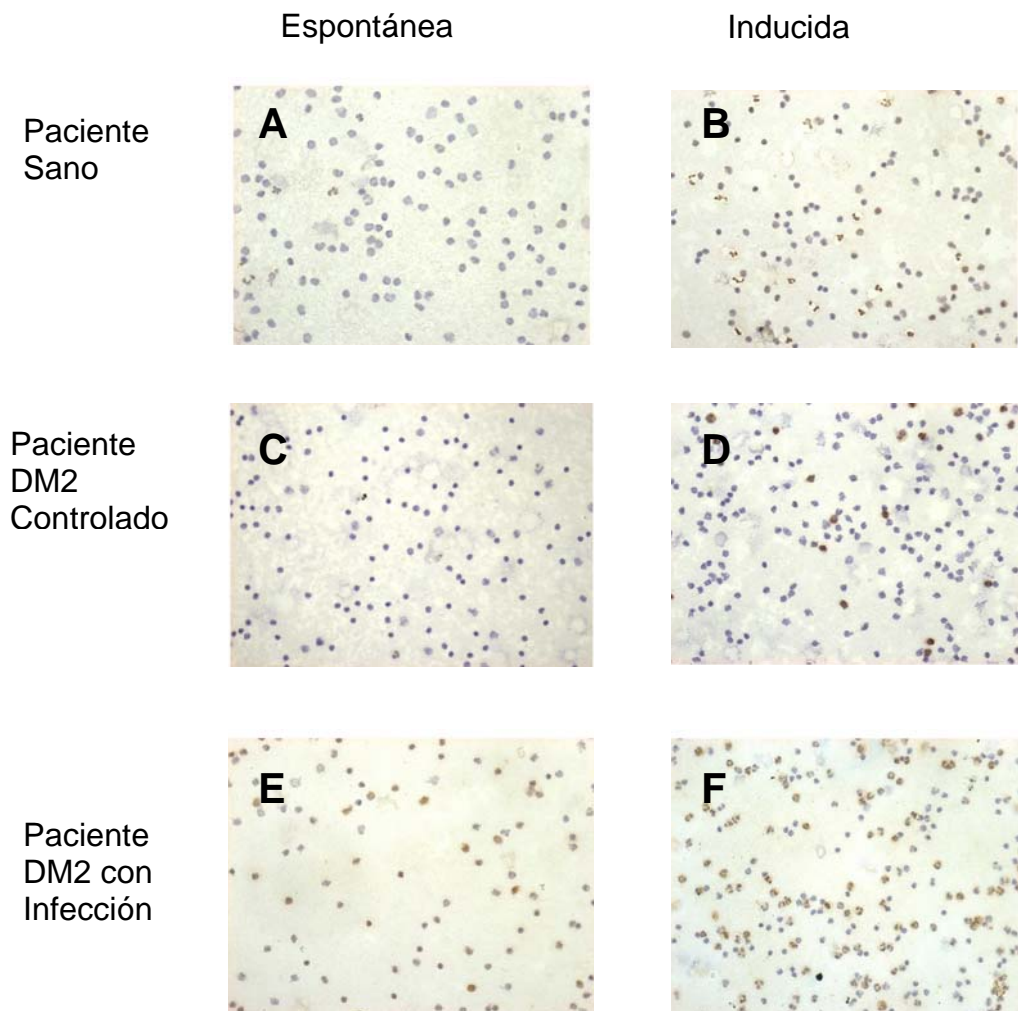


Figura 3. Hallazgos inmunocitoquímicos de Fas

**Expresión de Fas-L en células de sangre periférica de los diferentes pacientes, las cuales fueron no tratadas (A, C y E) o tratadas con choque térmico (B, D y F). Nótese el incremento en la apoptosis inducida.**

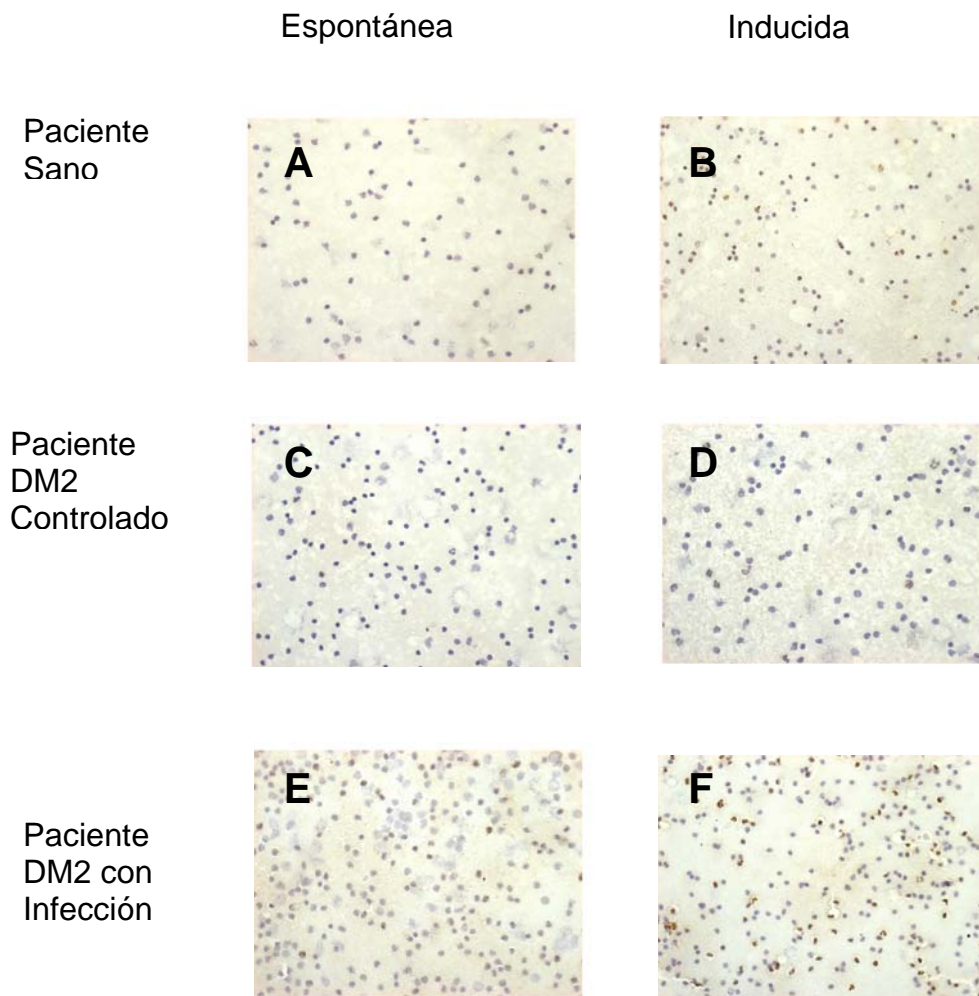
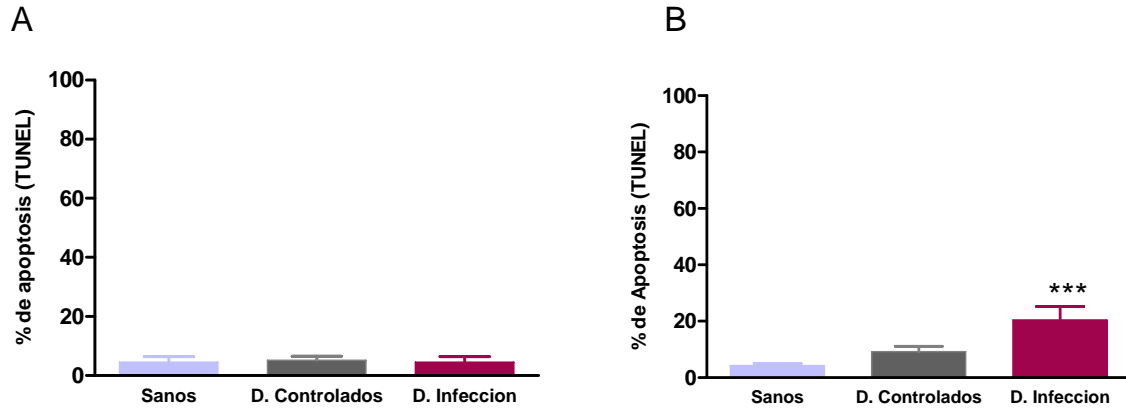


Figura 4. Hallazgos inmunocitoquímicos de Fas-L

Figura 5

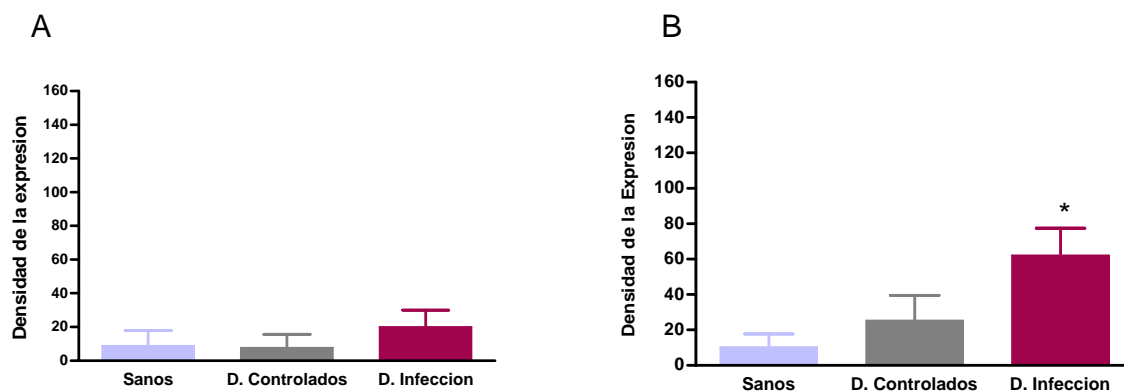
### Análisis cuantitativo de apoptosis por TUNEL



Porcentaje de células positivas para TUNEL en células de sangre periférica de la apoptosis espontánea (A) y apoptosis inducida (B). Cada barra representa la media del número de células de cada uno de los pacientes. Se observa claramente un incremento en el porcentaje de células de los pacientes del grupo de Diabéticos con infección ( $p=0.0001$ ).

Figura 6

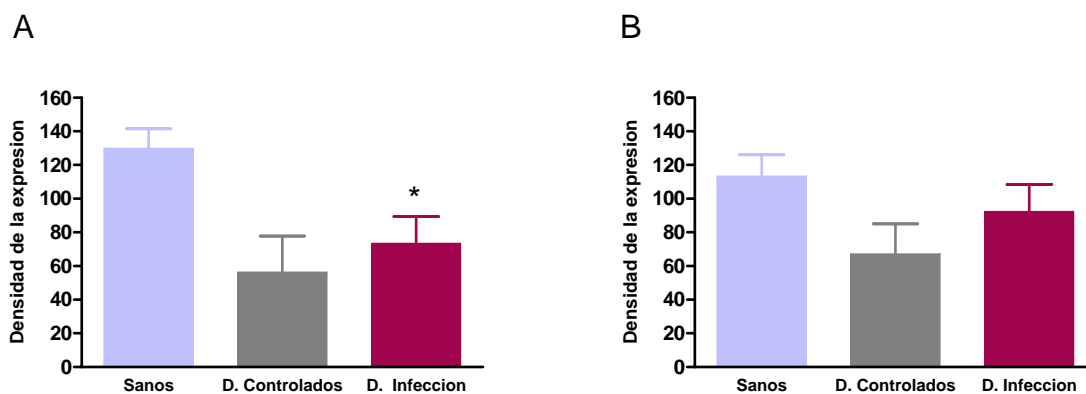
### Análisis cuantitativo de apoptosis por Caspasa 3 Activa



Densidad de la expresión del marcador Caspasa-3 activa (apoptosis), cada barra representa la media de los diferentes pacientes analizados por inmunocitoquímica para C-3 activa en células de sangre periférica de la apoptosis espontánea (A) y apoptosis inducida (B). Se observa claramente un incremento en la densidad de células de los pacientes del grupo de Diabéticos con algún tipo de infección ( $p=0.0129$ ) en la apoptosis inducida.

Figura 7

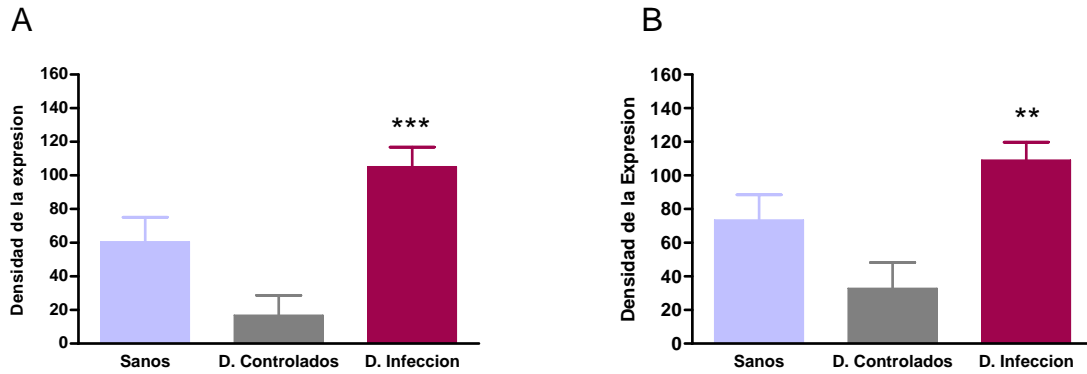
### Análisis cuantitativo de la expresión de Fas



Densidad de células positivas para la expresión del marcador Fas. Cada barra representa la media de los diferentes pacientes analizados por inmunocitoquímica para Fas en células de sangre periférica de la apoptosis espontánea (A) y tratamiento con calor (B). Se observa un incremento de la expresión en células de pacientes del grupo de Diabéticos con algún tipo de infección ( $p= 0.0053$ ), de manera espontánea mas no inducida.

Figura 8

### Análisis cuantitativo de la expresión de Fas-L



Densidad de células positivas para la expresión del marcador Fas-L. Cada barra representa la media de los diferentes pacientes analizados por inmunocitoquímica para Fas-L en células de sangre periférica de la apoptosis espontánea (A) y apoptosis inducida (B). Se observa claramente un incremento en la expresión de células de los pacientes del grupo de Diabéticos con algún tipo de infección, tanto de apoptosis espontánea ( $p=0.0002$ ) como inducida ( $p=0.0021$ ).



## DISCUSION

La apoptosis es la muerte celular programada altamente regulada 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 hacia la muerte celular <sup>115</sup>. La apoptosis es un proceso fisiológico que ocurre de manera normal cuando las células presentan algún tipo de daño, aunque no necesariamente; uno de las principales atribuciones a esta, es la eliminación de células activas B y T después del transcurso de una infección, lo cual conlleva a una respuesta inmune <sup>115</sup>.

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 <sup>110</sup>, de neuronas corticales, del hipotálamo <sup>102</sup> y de ganglios espinales <sup>116</sup>. En cultivos primarios de microglia de rata se presenta apoptosis en presencia de altas concentraciones de glucosa y sí se le agrega LPS existe un efecto sinérgico <sup>103</sup>, 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 <sup>112</sup>.

En estudios previos han demostrado que existe una respuesta inflamatoria sostenida en ratones diabéticos con infecciones <sup>117</sup>, lo cual induce un aumento de la apoptosis en fibroblastos así como en osteoclastos, además de que entre mayor es la apoptosis mayor es la inmunodeficiencia <sup>31</sup>. Los PMN son las células efectoras más importantes en la defensa inicial del organismo frente a la infección, (inmunidad innata) estas células liberan de forma indiscriminada enzimas proteolíticas y radicales libres que controlan la infección pero también afectan el tejido circundante, este representa un mecanismo por el cual el mecanismo de apoptosis puede desencadenarse y entonces jugar un papel importante en el daño celular <sup>118</sup>.

En otro estudio realizado por Shidham y colaboradores en el 2000, se evaluó la morfología de leucocitos de sangre periférica en un grupo de pacientes, de los cuales presentaban apoptosis en un 85% los Neutrófilos, el 18% linfocitos y 2% eosinófilos. El diagnóstico más frecuentemente asociado a la apoptosis fue la infección (55%), además de que otras enfermedades más asociadas con apoptosis de leucocitos son la diabetes mellitus y enfermedades neoplásicas <sup>101</sup>.

Sin embargo, no existe a la fecha, reportes de cómo se encuentra la apoptosis inducida en PBMC (Células mononucleares de sangre periférica) de pacientes diabéticos con infección, comparado con pacientes diabéticos controlados e individuos sanos, el presente trabajo muestra el aumento de la apoptosis inducida en PMBC en este grupo de pacientes. Este estudio comparó la fragmentación de DNA mediante la técnica de TUNEL (Apoptosis), así como la densidad de la

expresión para los marcadores que participan en los procesos de apoptosis como C-3 activa, Fas y FasL en los grupos antes mencionados.

TUNEL es el estándar de oro utilizada para la evaluación de la fragmentación del DNA, ya que marca los extremos terminales del 3'OH (oxidrilo) de la cadena de DNA, este marcaje utiliza nucleótidos marcados con fluoresceína en la dirección 3' a 5'. La fluoresceína puede ser detectada inmediatamente, pero por el tiempo de vida que presenta es mejor adicionarle un anticuerpo antifluoresceína que a su vez es marcado con peroxidasa de rábano, la cual, posteriormente oxida al DAB y este es detectado por presentar una coloración café <sup>114</sup>.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de TUNEL se muestran en la figura 5, En la apoptosis espontánea (A) se observa que no existe una diferencia significativa del porcentaje de apoptosis entre los tres grupos de estudio. Como sabemos el porcentaje de apoptosis en células de individuos normales es de alrededor de un 2-5% <sup>119</sup>, lo cual correlaciona con los tres grupos, individuos sanos (2%), diabéticos controlados (5.2%) y diabéticos con algún tipo de infección (5.0%); sin embargo cabe mencionar que los resultados obtenidos son consistentes con lo ya reportado en el 2000 <sup>101</sup>. Por otro lado el porcentaje de apoptosis inducida (B), se muestra claramente un incremento significativo ( $p=0.0001$ ) en el grupo de pacientes diabéticos con infección comparados con los otros dos grupos. En relación a esto podemos sugerir que este tipo de células son más vulnerables a sufrir muerte celular, ya que se ha demostrado en diversos estudios <sup>78</sup>, que la apoptosis es uno de los procesos de respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre teniendo graves consecuencias, además de que se ha observado que existen mecanismos que pueden sinergizar este efecto, como lo son: producción de ROS, AGEs, LPS, TNF y elevada producción de citocinas estos tres últimos característicos de procesos infecciosos <sup>120,121</sup>.

Por otro lado, se evaluó la densidad en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis, las cuales fueron C-3 activa, Fas y FasL. Al respecto se sabe que la apoptosis con frecuencia va relacionada con la activación de una familia de caspasas, las cuales pueden ser activadas tanto por vía extrínseca como intrínseca. La vía extrínseca es activada mediante la unión Ligando- Receptor, en la cual participan receptores de membrana como Fas, TNF $\alpha$ , DR4/DR5, así como sus respectivos ligandos ("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 lo es, el estrés, administración de drogas, radiaciones, etc. Con la subsecuente formación del apoptosoma, el cual segmenta de forma proteolítica a C-9 y posteriormente de la C-3, que a su vez es activada y conlleva a la degradación del DNA <sup>62</sup>. Existe una vía independiente de caspasas en la que se encuentra involucrado el oncogen p53 mediada por NMDA (N-metil-D-aspartato) el cual también juega un papel importante en la expresión de genes que conducen a la apoptosis <sup>120</sup>.

Se ha observado en estudios anteriores un incremento de apoptosis mediante análisis de C-3 activa y TUNEL, en células neuronales de ratas diabéticas con neuropatía<sup>86</sup>. además la exposición de células de insuloma en ratones NOD a IL $\beta$ <sup>75</sup> e IF $\gamma$  por 24 horas induce actividad de C-3 mediante interacción Fas/FasL<sup>76</sup>. En el presente trabajo evaluamos la expresión de C-3 activa y los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 6, en los cuales observamos existe un aumento de la expresión en el grupo de pacientes diabéticos con infección tanto en espontánea A como inducida B, sin embargo solo encontramos un aumento estadísticamente significativo ( $p=0.0129$ ) en la apoptosis inducida en el grupo de pacientes diabéticos con infección, lo cual correlaciona con el porcentaje de apoptosis observado en la fig. 5B. Que se haya encontrado expresión de C-3 activa sugiere que la apoptosis observada es mediada por la vía dependiente de caspasas<sup>58</sup>

La vía extrínseca fue evaluada mediante la expresión de Fas y FasL, de los cuales sabemos Fas es un receptor de transmembrana de la familia de TNF que se expresa constitutivamente en una variedad de tipos celulares<sup>122</sup>, incluyendo linfocitos, eosinófilos, monocitos y neutrófilos. También se sabe que FasL es una proteína transmembranal, este ligando pertenece a la familia de TNF sin embargo cabe mencionar que solo se expresa de forma inducible en algunos tipos celulares<sup>123</sup>.

Fas y su ligando son de suma importancia en la inducción de apoptosis en células que participan en la respuesta inmunitaria, se ha demostrado que las retinas de pacientes diabéticos muestran inmunoreactividad citoplasmática para C-3, Fas y Bax en células ganglionares<sup>124</sup>. En islotes humanos la concentración elevada de glucosa interfiere en la proliferación de células  $\beta$  pancreáticas e induce apoptosis vía Fas<sup>125</sup>.

Sin embargo existen evidencias de que la prolongada exposición de glucosa incrementa la expresión de Fas, llevando a un efecto dañino sobre las células  $\beta$  pancreáticas<sup>75</sup>, en ratones diabéticos tipo NOD, la concentración de glucosa se ha visto actúa de manera anti proapoptótica dependiendo de las condiciones de cultivo, ya que se ha observado en estudios anteriores existe una inducción en la proliferación de este tipo de células por la glucosa en roedores como *Psammomys obesus*<sup>126</sup>, por otra parte se ha observado una sobre regulación de Fas en células  $\beta$  pancreáticas de pacientes diabéticos tipo 2 comparados con sujetos no diabéticos, concluyendo que la apoptosis inducida por hiperglucemia es llevada a cabo principalmente por interacción entre Fas- FasL<sup>127</sup>.

Como sabemos Fas se expresa de manera constitutiva en varios tipos celulares, en la figura 7., tanto en A como en B, se observa claramente la expresión en el grupo de Individuos sanos, mientras que existe una disminución en los diabéticos controlados y diabéticos con infección, nosotros sugerimos que la disminución en la expresión de Fas se deba al aumento de apoptosis observada por TUNEL (Fig. 5), esto probablemente es debido a que la molécula de Fas esta siendo ocupada

por su ligando y por lo tanto el anticuerpo Anti-Fas es incapaz de reconocer el receptor, en la membrana, lo cual es consistente con los resultados obtenidos con el grupo control (sanos), ya que la apoptosis es menor debido a que la molécula de Fas no está siendo ocupada y por lo consiguiente es reconocido más fácilmente por el anticuerpo.

Por otro lado se sabe que Fas-L es una proteína inducible, los resultados muestran una sobre expresión (tanto en A como en B) en el grupo de pacientes diabéticos con infección la cual correlaciona con un incremento en la apoptosis (Fig. 5 ) con respecto a los otros 2 grupos. Como se observa el choque térmico no regula la expresión de FasL, únicamente sugiere que la célula es más susceptible a la apoptosis. Nuestros resultados muestran que la molécula que regula de manera directa la apoptosis en pacientes diabéticos con infección es FasL, mediante vía ligando- receptor, lo cual es consistente con los resultados obtenidos de la expresión de estas moléculas (fig.8).

## CONCLUSIÓN

- Existe un incremento significativo en la apoptosis inducible en el grupo de pacientes diabéticos con infección comparado con los otros dos grupos.
- La actividad de Caspasa – 3 activa es mayor en pacientes diabéticos con infección, lo cual correlaciona directamente con los resultados obtenidos por TUNEL y sugiere que la apoptosis observada es dependiente de caspasas.
- Se observó claramente la expresión constitutiva de Fas así como la expresión inducible de FasL en los grupos de estudio.
- Los pacientes diabéticos con infecciones presentan un incremento en el porcentaje de apoptosis en sus células de sangre periférica mediada probablemente por la vía extrínseca; además de que son aún más vulnerables a sufrir apoptosis.
- Este estudio sugiere que el aumento en el porcentaje de la apoptosis en células de sangre periférica de pacientes diabéticos con infección, podría ser un factor determinante para contrarrestar la infección, debido a la falta de células efectoras de la respuesta inmune.

## **PERSPECTIVAS**

El presente trabajo es el primer reporte del incremento en la apoptosis de células mononucleares de sangre periférica de pacientes diabéticos con infección en tejidos blandos lo cual es importante ya que abre un nuevo campo a la investigación molecular y celular de la diabetes mellitus, pero sobre todo ayuda a entender aún más los mecanismos implicados, relacionados con la fisiopatología de las complicaciones y sin olvidar que la apoptosis es un proceso sumamente importante e implicado en estos pacientes y que aunque en los últimos años solo se ha estudiado con fines teóricos, se espera que pronto sirva para identificar datos tempranos de daño celular y vascular que sirvan para alertar a los pacientes diabéticos a disminuir la frecuencia de complicaciones diabéticas, mejorando sus métodos de control.

Mucho falta, el tiempo pasa y cada día a cada hora nacen más diabéticos y otros más enferman, es por eso que solo resta una cosa, investigar y si hay algo que hallar, que sirva para ayudar.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana, NOM-015-SSA2-1994, Para la prevencion, tratamiento y control de diabetes mellitus en la atencion primaria. Diario Oficial de la Federacion 2000.
- (2) American Diabetes Association. Diabetes Mellitus. [http://www diabetes org/home.jsp](http://www.diabetes.org/home.jsp) 2007.
- (3) Organizacion Mundial de la Salud. Diabetes Mellitus. [http://www who int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html) 2000.
- (4) Bennett PH. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. In: Kahn CR, Weir GC, editors. Joslin's Diabetes Mellitus. Joslin, 1994: 193-200.
- (5) Olefsky JM, Nolan JJ. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. Am J Clin Nutr 1995; 61(4 Suppl):980S-986S.
- (6) Wild S, Roglic G, Green A et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27(5):1047-1053.
- (7) Barcelo A, Rajpathak S. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. Rev Panam Salud Publica 2001; 10(5):300-308.
- (8) Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ et al. Prevalence and characteristics of early-onset type 2 diabetes in Mexico. Am J Med 2002; 113(7):569-574.
- (9) Secretaria de Salud. Morbilidad, 2000. México. Mexico: 2003; 25-51.
- (10) Barquera S, Tovar-Guzman V, Campos-Nonato I et al. Geography of diabetes mellitus mortality in Mexico: an epidemiologic transition analysis. Arch Med Res 2003; 34(5):407-414.
- (11) IMSS. Principales causas de muerte en el grupo de edad general, según sexo (total Nacional 2002). División Técnica de Información Estadística en Salud 2002.
- (12) Villarreal-Rios E, Salinas-Martinez AM, Medina-Jauregui A et al. The cost of diabetes mellitus and its impact on health spending in Mexico. Arch Med Res 2000; 31(5):511-514.
- (13) Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001; 414(6865):813-820.

- (14) 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; 342(6):381-389.
- (15) Martínez de Jesús F. Pie Diabético. *Atención Integral*. 2 ed. Mexico: 2003; 5-11.
- (16) Diabetes hoy. Órgano oficial de la Federación 2000; 108(5):3.
- (17) Andrade Islas Sergio. Diabetes Mellitus. In: Harrison, Mc Graw-Hill International, editors. *Medicina Interna*. Mexico: 2002: 71-77.
- (18) Lerman Barber Israel. *Atención Integral del Paciente diabético*. 2 ed. Mexico: 1998; 7-23.
- (19) Pessa ME, Howard RJ. Necrotizing fasciitis. *Surg Gynecol Obstet* 1985; 161(4):357-361.
- (20) Howard RJ, Pessa ME, Brennaman BH et al. Necrotizing soft-tissue infections caused by marine vibrios. *Surgery* 1985; 98(1):126-130.
- (21) Rea WJ, Wyrick WJ, Jr. Necrotizing fasciitis. *Ann Surg* 1970; 172(6):957-964.
- (22) Eke N. Fournier's gangrene: a review of 1726 cases. *Br J Surg* 2000; 87(6):718-728.
- (23) Roca B, Simon E. [Fournier's gangrene]. *An Med Interna* 1996; 13(12):608-611.
- (24) Sanchez MF, Fadil Iturralde JL, Provenzal O et al. [Fournier's gangrene. Our experience over 10 years. A review of the literature]. *Arch Esp Urol* 1999; 52(7):721-727.
- (25) Spirnak JP, Resnick MI, Hampel N et al. Fournier's gangrene: report of 20 patients. *J Urol* 1984; 131(2):289-291.
- (26) Efem SE. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: preliminary observations. *Surgery* 1993; 113(2):200-204.
- (27) Hejase MJ, Simonin JE, Bihle R et al. Genital Fournier's gangrene: experience with 38 patients. *Urology* 1996; 47(5):734-739.
- (28) Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2006.



- (29) Cook CB, Tsui C, Ziemer DC et al. Common reasons for hospitalization among adult patients with diabetes. *Endocr Pract* 2006; 12(4):363-370.
- (30) Laing P. The development and complications of diabetic foot ulcers. *Am J Surg* 1998; 176(2A Suppl):11S-19S.
- (31) Liu R, Desta T, He H et al. Diabetes Alters the Response to Bacteria by Enhancing Fibroblast Apoptosis. *Endocrinology* 2004.
- (32) Ginunas VJ, Canawati HN, Sapico FL. Anaerobic bacteria isolated from foot infections in diabetic patients: in vitro susceptibility to nine antibiotics. *Clin Ther* 1984; 6(4):457-460.
- (33) Jungas T, Verbeke P, Darville T et al. Cell death, BAX activation, and HMGB1 release during infection with Chlamydia. *Microbes Infect* 2004; 6(13):1145-1155.
- (34) Mastropaolo MD, Evans NP, Byrnes MK et al. Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infect Immun* 2005; 73(9):6055-6063.
- (35) Breen JD, Karchmer AW. Staphylococcus aureus infections in diabetic patients. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9(1):11-24.
- (36) Rich J, Lee JC. The pathogenesis of Staphylococcus aureus infection in the diabetic NOD mouse. *Diabetes* 2005; 54(10):2904-2910.
- (37) Obana Y, Nishino T. [The infectivity of Enterococcus faecalis in experimental urinary tract infection in mice: II]. *Kansenshogaku Zasshi* 1991; 65(4):442-446.
- (38) Bailiff NL, Nelson RW, Feldman EC et al. Frequency and risk factors for urinary tract infection in cats with diabetes mellitus. *J Vet Intern Med* 2006; 20(4):850-855.
- (39) Kwan MK, Saw A, Chee EK et al. Necrotizing fasciitis of the lower limb: an outcome study of surgical treatment. *Med J Malaysia* 2006; 61 Suppl A:17-20.
- (40) Hsu CY, Fang HC, Chou KJ et al. The clinical impact of bacteremia in complicated acute pyelonephritis. *Am J Med Sci* 2006; 332(4):175-180.
- (41) Thwaini A, Khan A, Malik A et al. Fournier's gangrene and its emergency management. *Postgrad Med J* 2006; 82(970):516-519.
- (42) Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(7):545-550.

- (43) Velázquez Rosa Alberto. Caracterización del tipo de muerte celular (apoptosis, necrosis o autofagia) inducida en cultivos cortos de células de carcinoma mamario por diferentes agentes antineoplásicos. Facultad de Ciencias UNAM, 2002.
- (44) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-257.
- (45) Salgado Delgado RC. Relación entre apoptosis y el mecanismo de atresia folicular en ovario de rata. UNAM Facultad de Ciencias, 2004.
- (46) Yasuda M, Okabe T, Itoh J et al. Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation: application of acute liver injury models induced by carbon tetrachloride (CCL4) and dimethylnitrosamine (DMN). *J Histochem Cytochem* 2000; 48(10):1331-1339.
- (47) Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146(1):3-15.
- (48) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306.
- (49) Huerta Magaña I. Citotoxicidad y apoptosis en líneas celulares tumorales tratadas con nuevos derivados de furano. UNAM Facultad de Química, 2005.
- (50) Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM et al. Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J Biol Chem* 2003; 278(22):19995-20005.
- (51) Rangnekar VM. Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4. *Apoptosis* 1998; 3(2):61-66.
- (52) Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P et al. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3):156-162.
- (53) Goldstein JC, Kluck RM, Green DR. A single cell analysis of apoptosis. Ordering the apoptotic phenotype. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 926:132-141.
- (54) De L, V, Melino G. Apoptosis. The little devil of death. *Nature* 2000; 406(6792):135-136.
- (55) Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3):E41-E43.

- (56) Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(2):120-129.
- (57) Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(1):67-71.
- (58) Sen S. Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1992; 67(3):287-319.
- (59) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391(6662):43-50.
- (60) Liu X, Zou H, Slaughter C et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89(2):175-184.
- (61) Meyn RE, Stephens LC, Milas L. Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15(1):119-131.
- (62) Ferri KF, Kroemer G. Control of apoptotic DNA degradation. *Nat Cell Biol* 2000; 2(4):E63-E64.
- (63) McIlroy D, Tanaka M, Sakahira H et al. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 2000; 14(5):549-558.
- (64) Wu YC, Stanfield GM, Horvitz HR. NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev* 2000; 14(5):536-548.
- (65) Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996; 236(1):1-26.
- (66) Khanin MA, Lobanov AN, Kaufmann SH. Apoptosis: an optimization approach. *Comput Biol Med* 2004; 34(5):449-459.
- (67) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999; 189(2):381-394.
- (68) Hotti A, Jarvinen K, Siivola P et al. Caspases and mitochondria in c-Myc-induced apoptosis: identification of ATM as a new target of caspases. *Oncogene* 2000; 19(19):2354-2362.
- (69) Labeledzka K, Grzanka A, Izdebska M. [Mitochondria and cell death]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2006; 60:439-446.

- (70) Abbas AK, MBBS L. Inmunología celular y molecular tolerancia inmunológica. 5 ed. España: 2004; 216-237.
- (71) Singh A, Ni J, Aggarwal BB. Death domain receptors and their role in cell demise. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18(7):439-450.
- (72) Galkowska H, Olszewsk WL, Wojewodzka U et al. Expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers. *Surgery* 2003; 134(2):213-220.
- (73) Otton R, Soriano FG, Verlengia R et al. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. *J Endocrinol* 2004; 182(1):145-156.
- (74) Zuniga E, Acosta RE, Montes C et al. [Lymphocyte apoptosis associated to infections]. *Medicina (B Aires)* 2002; 62(2):189-196.
- (75) Maedler K, Donath MY. Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Horm Res* 2004; 62 Suppl 3:67-73.
- (76) Augstein P, Bahr J, Wachlin G et al. Cytokines activate caspase-3 in insulinoma cells of diabetes-prone NOD mice directly and via upregulation of Fas. *J Autoimmun* 2004; 23(4):301-309.
- (77) Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr Metab* 1999; 12(1):42-46.
- (78) Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem* 2005; 16(12):705-713.
- (79) Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8):1433-1440.
- (80) Susztak K, Raff AC, Schiffer M et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55(1):225-233.
- (81) Makino N, Maeda T, Sugano M et al. High serum TNF-alpha level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J Diabetes Complications* 2005; 19(6):347-355.
- (82) Ahren B. Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr Mol Med* 2005; 5(3):275-286.

- (83) Rasilainen S, Ylipaasto P, Roivainen M et al. Mechanisms of coxsackievirus B5 mediated beta-cell death depend on the multiplicity of infection. *J Med Virol* 2004; 72(4):586-596.
- (84) 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; 183(1):155-162.
- (85) Mishra R, Emancipator SN, Kern T et al. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int* 2005; 67(1):82-93.
- (86) Guo C, Quobadari A, Shanguan Y et al. Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16(3):335-345.
- (87) Ramana KV, Friedrich B, Bhatnagar A et al. Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *FASEB J* 2003; 17(2):315-317.
- (88) Takamura Y, Sugimoto Y, Kubo E et al. Immunohistochemical study of apoptosis of lens epithelial cells in human and diabetic rat cataracts. *Jpn J Ophthalmol* 2001; 45(6):559-563.
- (89) Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B et al. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 Suppl 1:S85-S87.
- (90) Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londono I et al. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest* 2003; 83(7):1069-1080.
- (91) Kang BP, Frencher S, Reddy V et al. High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(3):F455-F466.
- (92) Recchioni R, Marcheselli F, Moroni F et al. Apoptosis in human aortic endothelial cells induced by hyperglycemic condition involves mitochondrial depolarization and is prevented by N-acetyl-L-cysteine. *Metabolism* 2002; 51(11):1384-1388.
- (93) Peiro C, Lafuente N, Matesanz N et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 2001; 133(7):967-974.
- (94) Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 2001; 50(10):2363-2375.

- (95) Cai L, Li W, Wang G et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 2002; 51(6):1938-1948.
- (96) Chu Y, Faraci FM, Ooboshi H et al. Increase in TUNEL positive cells in aorta from diabetic rats. *Endothelium* 1997; 5(4):241-250.
- (97) Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 2002; 51(4):1076-1082.
- (98) de Nigris F, Tajana G, Condorelli M et al. Glycooxidation of low-density lipoprotein increases TUNEL positivity and CPP32 activation in human coronary cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010:710-715.
- (99) Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol* 2003; 3(3):219-228.
- (100) Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 2001; 82(4):674-682.
- (101) Shidham VB, Swami VK. Evaluation of apoptotic leukocytes in peripheral blood smears. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(9):1291-1294.
- (102) Li PA, Rasquinha I, He QP et al. Hyperglycemia enhances DNA fragmentation after transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(5):568-576.
- (103) Wang JY, Yang JM, Wang JY et al. Synergistic apoptosis induced by bacterial endotoxin lipopolysaccharide and high glucose in rat microglia. *Neurosci Lett* 2001; 304(3):177-180.
- (104) Hannon-Fletcher MP, O'Kane MJ, Moles KW et al. Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. *Mutat Res* 2000; 460(1):53-60.
- (105) Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G et al. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res* 2003; 529(1-2):129-133.
- (106) Trevani AS, Andonegui G, Giordano M et al. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J Immunol* 1999; 162(8):4849-4857.
- (107) Siesjo BK, Katsura KI, Kristian T et al. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1996; 66:8-14.

- (108) 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):211-220.
- (109) Hartz S, Menart B, Tschoepe D. Leukocyte apoptosis in whole blood involves platelet-dependent coaggregation. *Cytometry* 2003; 52A(2):117-121.
- (110) Klein JP, Hains BC, Craner MJ et al. Apoptosis of vasopressinergic hypothalamic neurons in chronic diabetes mellitus. *Neurobiol Dis* 2004; 15(2):221-228.
- (111) Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003; 52(1):165-171.
- (112) Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:368-383.
- (113) Hart DN, McKenzie JL. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med* 1988; 168(1):157-170.
- (114) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3):493-501.
- (115) Savill J. Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest* 1994; 24(11):715-723.
- (116) Lach-Szyrma V, Brito-Babapulle F. The clinical significance of apoptotic cells in peripheral blood smears. *Clin Lab Haematol* 1999; 21(4):277-280.
- (117) Feit-Leichman RA, Kinouchi R, Takeda M et al. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11):4281-4287.
- (118) Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 1996; 275(6):80-87.
- (119) Goto Y, Gallagher J, Fanning N et al. Does chronic occupational exposure to volatile anesthetic agents influence the rate of neutrophil apoptosis? *Can J Anaesth* 2000; 47(4):350-353.
- (120) Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 2004; 14(4):184-193.
- (121) Alikhani M, Maclellan C, Raptis M et al. Advanced Glycation Endproducts Induce Apoptosis In Fibroblasts Through Activation of ROS, MAP kinases and FOXO1 Transcription Factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006.

- (122) Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(12):917-924.
- (123) Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81(4):505-512.
- (124) Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L et al. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(8):2760-2766.
- (125) Maedler K, Fontana A, Ris F et al. FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(12):8236-8241.
- (126) Donath MY, Gross DJ, Cerasi E et al. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 1999; 48(4):738-744.
- (127) Maedler K, Spinass GA, Lehmann R et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001; 50(8):1683-1690.