UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN NORTE DEL D.F.
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MEDICA EN INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

"Apoptosis en células de sangre periférica y la expresión de YY1 en la actividad del lupus eritematoso sistémico infantil"

Tesis que para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo
Presenta el alumno:

Juan Carlos Vázquez Islas **09951665-3**

AÑO DE TÉRMINO	**2006-2**
ORIENTACIÓN	**BIOQUÍMICA CLÍNICA**
ÁREA ESPECÍFICA DEL PROYECTO	**INMUNOLOGIA**

Director de tesis IMSS: Dr. Mario I. Vega Paredes

Asesor interno de tesis FES-Z, UNAM: Dr. Rubén Marroquín Segura

Lugar donde se realizo 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
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer para mi es de gran importancia, pues significa comunicar a la otra parte lo que significa(n) para mi.

¡¡¡Dios, te doy gracias infinitamente!!! por proporcionarme vida, salud y grandes retos que, aunque algunos me han hecho tropezar, también me han hecho crecer como hombre de bien día con día.

¡¡¡Gracias con mucho cariño, amor y respeto a mi padre y a mi madre!!!, que aunque se hayan quedado dormidos eternamente, (sin poder disfrutar de los logros por los cuales tanto soñaron) su sacrificio comenzara a dar los frutos anhelados en una sociedad que es cada día demandante.

¡¡¡Gracias!!! Pánfilo y Maria De la Luz, mis segundos padres, pues creyeron en mí y brindaron apoyo en todo sentido, educándome con valores que me han guiado hasta este peldaño de la vida.

¡¡¡Gracias!!! a mis hermanas Irma, Beatriz y Ana Lilia, mujeres que me comprendieron como nadie lo supo hacer en los momentos difíciles y que han puesto grandes esperanzas en mi.

¡¡¡Gracias!!! a mis hermanos Daniel A., J. Manuel y José Blas, de quienes obtuve apoyo incondicional no obstante las diferencias que marcaron nuestro carácter y nos han unido más.

¡¡¡Gracias!!! hermano Ricardo V. M. pues eres la punta profesional de nuestra familia y de quien he tomado ejemplos de bondad y fortaleza.

¡¡¡Gracias!!! a mis primas Isabel, Laura, Jacqueline, Virginia y Elizabeth, pues han sido mi aliciente para seguir superándome.

¡¡¡Gracias!!! a mi compadre José Luis y mi comadre Marcela, por ser una pareja digna de ejemplo y quienes me han dado la esperanza de creer en la familia.

¡¡¡Gracias!!! Tío pablo, le agradezco el haberme dado confianza y fe en alcanzar esta meta, pues ha sido un gran apoyo para salvar los obstáculos que se interpusieron en el camino.

¡¡¡Agradezco especialmente!!! a los esposos de mis hermanas: Refugio, Mario y Rubén, pues son tanto familiares como amigos y han tenido a bien comprenderme en todo momento.

¡¡¡Como no agradecer!!! con gran afecto a esas mujeres abnegadas que siempre están al pendiente de la familia, Bertha y Paula, quienes han sacrificado lo propio por dedicarse al cuidado de mis primos (as), hermanos y del mío.

¡¡¡Agradezco!!! a mis tías: Fortunata, Leodegaria y sus esposos: Gilberto y Feliciano (respectivamente) quienes han velado tanto por el bienestar de sus familias como el de mi vida.

¡¡¡Gracias!!! Evelin y Elisa, amigas con las que conviví, llegando a conocer varias de sus facetas. A Bernardo, Daniel, Melisa, Guillermina, Alondra y Ángeles, compañeros (as) y amigos (as) que con su amistad, cariño, comprensión y aceptación tengo a bien finalizar esta tesis.

¡¡¡Gracias!!! Berenice por tu aceptación, cariño y consejos pues he crecido más para dedicarme a nuevos proyectos.

¡¡¡Agradezco!!! a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández" del Centro Medico Nacional "La Raza" del IMSS. ¡¡¡Agradeciendo especialmente!!! al Jefe y director General del instituto, Dr. Cesar Gonzáles Bonilla por permitirme la estancia y confianza para realizar la presente investigación. ¡¡¡Gracias!!! a mi asesor, Dr. Mario I. Vega Paredes, responsable de mi tutoría en la presente investigación, elaboración y terminación de esta tesis y de quien tengo mucho que aprender. ¡¡¡Agradezco!!! a la Dra. Sara Huerta Yepez por su tolerancia, por brindarme nuevos horizontes para nuevas metas y su asesoria para llevar a cabo esta investigación.

¡¡¡Agradezco!!! a mis profesores: Dr. Rubén Marroquín Segura, M. en C. Raquel Retana Ugalde, Q.F.B. Luz Margarita Chávez Martínez y Q.F.B. Enrique Escalera Zúñiga, quienes hicieron la revisión de esta tesis para poder complementarse satisfactoriamente.

¡¡¡Agradezco!!! a mis amigas (os) de la Universidad Edith, Sandra, Lorena, Erica, Víctor J.L., Daniel, Adán,… en fin a todos del área clínica y del área de farmacia por su amistad, cariño y bondad, puesto que compartimos penas y glorias que no se podrán olvidar.

Finalmente quiero agradecer a aquellas personas que se escapen a la lista, pero que en algún momento tuve a bien gozar de su presencia, con las que compartimos tiempo y espacio para concluir una etapa emotiva de mi vida.

¡¡¡GRACIAS!!!

INDICE

INTRODUCCIÓN 1

RESUMEN 3

1. MARCO TEORICO..... 4
- **1.1 Epidemiología**..... 4
- **1.2 Patogenia de LES** 5
- **1.3 Apoptosis** 6
- **1.4 LES y apoptosis**..... 7
- **1.5 Factor de transcripción Yin-Yang 1 (YY1)** 11

2. JUSTIFICACIÓN 13

3. OBJETIVOS 13

4. HIPÓTESIS 13

5. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO 13
- **5.1 Lugar de realización** 13
- **5.2 Diseño** 14
- **5.3Criterios de selección** 14

6. DIAGRAMA DE FLUJO 15

7. MATERIALES Y MÉTODOS 16
- **7.1 Pacientes** 16
- **7.2 Reactivos para el método de inmunohistoquímica** 16
- **7.3 Anticuerpos** 16
- **7.4 Purificación de leucocitos** 17
- **7.5 Obtención de laminillas de leucocitos purificados mediante el uso el"CITOSPIN"**..... 17
- **7.6 Citoinmunohistoquímica** 18
- **7.7 Mediada de la fragmentación de DNA mediante la técnica de "TUNEL"** 19
- **7.8 Cuantificación de células positivas inmunoteñidas** 19
- **7.9 Procesamiento de los datos** 20
- **7.10 Aspectos éticos y de bioseguridad**..... 20

8. RESULTADOS 21
- **8.1 Morfología de los hallazgos por TUNEL** 21
- **8.2 Morfología de los hallazgos inmunohistoquímico** 21
- **8.3 Evaluación del porcentaje de apoptosis** 22
- **8.4 Evaluación del porcentaje de células inmunoteñidas** 22

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES 23

10. SECCIÓN DE FIGURAS..... 26
Figura 1. Fotografía representativa de las células TUNEL-positivas.…… 27
Figura 2. Fotografía representativa de la expresión de Fas..... 28
Figura 3. Fotografía representativa de la expresión de FasL..... 29
Figura 4. Fotografía representativa de la expresión de YY1..... 30
Figura 5. Número de células positivas para TUNEL 31
Figura 6. Número de células positivas para Fas 32
Figura 7. Número de células positivas para FasL..... 33
Figura 8. Número de células positivas para YY1 ……...…… 34

11. REFERENCIAS.……..…..……..……...…… 35

INTRODUCCIÓN

El lupus Eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, multisistemica, episódica manifestada en cualquier edad, siendo más frecuente en la etapa productiva y reproductiva y es particularmente poco frecuente en edades pediátricas, esta patología autoinmune ha tenido un creciente aumento en la cual se ha reportado su inicio en etapas pediátricas. Aunque el LES se presenta en todos los grupos étnicos, es más frecuente y más grave en afroamericanos, asioamericanos e hispanoamericanos. En Estados Unidos, se ha notificado una prevalencia de 14 a 50 casos por 100,000 , en tanto que en México se desconoce exactamente su incidencia y prevalencia aunque es claro que hay un número alto de portadores de este padecimiento. El LES tiene una etiología multifactorial, en la que inciden factores genéticos, desregulación del sistema inmunitario, factores hormonales y ambientales o la exposición ocupacional a metales pesados. También se ha descrito la participación de medicamentos en la inducción de anticuerpos antinucleares y lupus.

La apoptosis es un problema que ha tomado importancia en la patogénia y relativamente en el pronóstico de padecimientos degenerativos, autoinmunes y neoplásicos y se ve influenciada por un sinnúmero de condiciones modificadoras como por ejemplo medidas terapéuticas que en el caso del LES incluyen a los corticoesteroides, los citotóxicos en todas sus formas e incluso los antiinflamatorios inhibidores de ciclooxigenasa. Se ha demostrado una correlación entre la actividad de LES y el grado de apoptosis de los linfocitos *in vitro* sugiriendo probablemente que un rango alto de apoptosis puede inducir la producción de auto-anticuerpos, desencadenando una actividad clínica. Se ha prestado mayor atención en los mecanismos de apoptosis en los pacientes con LES y hay evidencias contradictorias acerca de su participación en los mecanismos fisiopatológicos. Los pacientes con LES presentan niveles séricos elevados de Fas soluble, incremento en los neutrófilos que expresan esta molécula y que desarrollan apoptosis. También se ha encontrado la expresión de FasL y Bax en biopsias de pacientes con nefritis lúpica, lo cual es indicativo del papel importante en la patogenia de esta enfermedad. Las células involucradas en el proceso inflamatorio que desarrollan apoptosis tienen diversas disfunciones entre las que se encuentran fagocitosis y endocitosis

alteradas lo que conlleva a persistencia de antígenos circulantes, con mayor posibilidad de autoinmunidad.

El factor de trascripción YY1 participa en la regulación positiva y negativa de diversos genes en mamíferos y se ha demostrado que YY1 reprime la trascripción del gen Fas uniéndose a la región silenciadora de su promotor. La sobre expresión de Fas, induce la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor. Hasta la fecha, no existen estudios de la participación de YY1 en la fisiopatogenia del LES, sin embargo, los resultados que se han obtenido en esta tesis nos muestran que existe una baja expresión de YY1 en el grupo de controles sanos y bien un ligero incremento de esta molécula en el grupo de los pacientes con LES inactivo, sin embargo el grupo de pacientes con LES activo muestran una expresión mayor estadísticamente significativa al compararla con el grupo control o el grupo de pacientes con LES inactivo, lo que sugiere una probable correlación inversa en la presencia del factor de transcripción YY1 y la expresión de Fas y FasL.

RESUMEN

Se ha establecido la importancia de Fas en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias, sin embargo, no existen trabajos publicados que expliquen quien regula la expresión de Fas. Se sabe que el factor de trascripción Yin-Yang 1 (YY1) regula de manera negativa la expresión de Fas en un modelo de cáncer de próstata. El objetivo de este trabajo fue la de evaluar en células de sangré periférica, la expresión de YY1 y de Fas y su correlación con la apoptosis, así como con la actividad clínica en niños con LES. La hipótesis planteada en la presente tesis es que el factor de trascripción YY-1 participa en la regulación de la expresión de Fas, y esta regulación correlaciona con la apoptosis y con la actividad clínica del LES en pacientes pediátricos. Para comprobar nuestra hipótesis obtuvimos células de sangre periferica de 10 pacientes pediatricos con LES inactivo, 10 con LES activo y 5 controles sanos. Que acudieron a su consulta al servicio de Reumatologia pediatrica del CMN "La Raza". Se purificaron celulas mononucleares de sangre periferica. Posteriormente se colocaron en laminilllas mediante citocentrifugacion y fueron fijadas, se realizo citoinmunohistoquimicas para evaluar la expresion de YY1 y Fas o TUNEL para determinar apoptosis. Se revisaron los expedientes clinicos de los pacientes para valorar las condiciones clinicas al momento de la toma de muestra. Para la descripcion del estudio se elaboro una base de datos y la información se proceso utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los resultados obtenidos indican que cuando esta enfermedad no esta activa, el mecanismo por el que se esta llevando a cabo la apoptosis no es mediado por Fas ni por FasL, y en cambio, la expresión de Fas o FasL en los pacientes con LES activo se encuentra aumentados. Se sugiere que YY1 regula de manera negativa la expresión de Fas en LES activo. Los resultados indican que YY1 participa en la fisiopatología de LES, hecho que no se había explorado con anterioridad, En conclusión, el objetivo de nuestro estudio fue llevado acabo satisfactoriamente tanto en el tiempo planeado como en la expectativa que se tenia, aunado a esto, se espera que los resultados presentados en esta tesis resulten de interés medico para poder indagar mas en la etiología de esta enfermedad.

1. MARCO TEORICO

1.1 Epidemiología

El lupus Eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, multisistemica, episódica, caracterizada por la inflamación de los vasos sanguíneos y tejido conectivo así como presencia de anticuerpos antinucleares (ANAs), y anticuerpos anti-DNA. Sus manifestaciones clínicas son extremadamente variables y su curso es progresivo. Es un padecimiento autoinmune crónico con un componente inflamatorio muy importante, que cursa con periodos de remisiones y exacerbaciones, causando daño tisular mediado por mecanismos inmunológicos en diferentes órganos, aparatos y sistemas. La expresión clínica de este padecimiento es muy variable como resultado del compromiso sistémico y posiblemente de una serie de factores relacionados entre sí: genéticos, inmunológicos y ambientales (1;2). El LES es una enfermedad de distribución mundial, afecta a todas las razas aunque es de mayor gravedad en la raza negra, tiene predominio por el sexo femenino en la proporción de 9:1, se manifiesta en cualquier edad siendo más frecuente en la etapa productiva y reproductiva de la vida entre los 20 y 40 años (3;4)

La prevalencía mundial del LES es de 14.6 a 50.8 casos por 100,000 habitantes. Su incidencia anual fluctúa entre 1.8 a 7.6 casos por 100,000 habitantes, afectando principalmente a personas jóvenes de entre 15 y 44 años de edad y es particularmente poco frecuente en edades pediátricas cuyo mayor porcentaje se ubica entre los 7 y 12 años (5;6). Esta patología autoinmune ha tenido un creciente aumento en la cual se ha reportado su inicio en etapas pediátricas en 33% de los niños, los cuales inician su padecimiento antes de los 10 años de edad y el resto en la adolescencia. Aunque el LES se presenta en todos los grupos étnicos, es más frecuente y más grave en afroamericanos, asioamericanos e hispanoamericanos con un curso clínico más agresivo en el grupo de edad pediátrico. En Estados Unidos, se ha notificado una prevalencia de 14 a 50 casos por 100,000 habitantes, en tanto que en México se desconoce exactamente su incidencia y prevalencia aunque es claro que hay un número alto de portadores de

este padecimiento (7) La población pediátrica afectada en el IMSS, y particularmente en esta Unidad Médica de Alta Especialidad va en aumento, así como los costos sobre todo en el tratamiento.

1.2 Patogenia de LES

Hasta este momento no se conoce bien la etiología del LES, la información disponible sugiere causas multifactoriales las cuales para expresarse requieren de predisposición genética, desregulación del sistema inmunitario, factores hormonales y ambientales (8). Se han descrito diferentes factores que están relacionados con la patogenia del LES, dentro de los cuales destacan los factores genéticos; pues diferentes estudios señalan que se presentara mas frecuente (hasta 10 veces) en los familiares de pacientes con LES que en la población general. También se ha establecido que existe mayor concordancia entre gemelos monocigoticos comparada con gemelos dicigoticos (60% vs 9%). Así como que existe asociación de LES con antígenos HLA clase II (HLA-DR2 y DR3) tanto en raza blanca como negra, y asociación de LES con enfermedades hereditarias por deficiencia de complemento: C1r, C1s, C1, INH, C4, C2, C5 y C8, principalmente con deficiencia de C2, o por la deficiencia parcial de C2 en gemelos dicigoticos, con una frecuencia del 6% en LES vs. 1% en normales. Esta anomalía congénita se asocia con HLA-A10 y HLA-B18 (8). Por otro lado también se cree que existen factores hormonales asociados al desarrollo de LES, pues existe un predominio en mujeres, iniciando con frecuencia en los periodos cercanos a la menarquia, durante el embarazo o en el periodo posparto y su relación con anticonceptivos orales y en particular con los que contienen estrógenos. Los estrógenos aumentan la producción de autoanticuerpos y son capaces de ocasionar depresión de la inmunidad celular (8). De igual manera se ha asociado el desarrollo de LES con factores ambientales, pues existe una relación entre la exposición a la luz solar y el inicio o la exacerbación del LES, así como la relación entre infección (virus y bacterias) y la exacerbación del LES o la exposición ocupacional a metales pesados como cadmio, mercurio, oro y otros elementos relacionados con la producción de anticuerpos antinucleares como

sílice, pesticidas, polivinilo y otros. También se ha descrito la participación de medicamentos en la inducción de anticuerpos antinucleares y lupus: procainamida, hidralazina, cloropromazina, isoniazida, propiltiouracilo y anticonvulsivantes (8).

En este padecimiento participan mecanismos de hipersensibilidad predominantemente de tipos II y III con la presencia característica de auto anticuerpos dirigidos contra diversos componentes del organismo, lo cual genera vasculitis y lesiones a tejido específico. Las alteraciones celulares incluyen aumento en el número de linfocitos circulantes productores de IL-10 de manera total o relativa, en particular cuando el padecimiento se encuentra activo, condición en la que se han descrito una gran variedad de mecanismos mediadores de daño tisular incluyendo relaciones intercelulares y mecanismos de señalización entre los que destacan expresión anormal de moléculas de adhesión tanto en el ámbito celular como endotelial, que favorecen los mecanismos de auto inmunidad y daño tisular (8).

Una de las características de las enfermedades autoinmunes es una desregulación en los procesos de Apoptosis. Recientemente se ha descrito que los núcleosomas generados durante la apoptosis son los principales auto-antigénos (antoAgs) en LES y los anticuerpos nucleosomales son altamente específicos en la enfermedad (9-11). Por lo tanto, los anticuerpos IgG3 anti-núcleosomas son un selectivo marcador de LES activa y correlaciona con el daño renal (12). El reconocimiento de núcleosomas por anticuerpos y de otros componentes de la cromatina, puede ser el evento inicial que conlleva al desarrollo de anticuerpos anti-DNA de doble cadena (anti-ds-DNA) (10;11). Clonas patogénicas de linfocitos T aisladas de pacientes con LES son especificas contra antígenos nucleosomales y estas células pueden ayudar a linfocitos B al cambio de isoltipo IgG y en la maduración de la afinidad (8;13).

1.3 Apoptosis

La apoptosis es un fenómeno biológico conocido como muerte celular programada (14) La apoptosis es por lo tanto la muerte celular que se observa durante procesos fisiológicos o normales, a diferencia de la necrosis, que es la forma de

muerte celular debida a la exposición a fenómenos isquémicos y/o tóxicos. Durante la necrosis la membrana celular se vuelve permeable, lo que resulta en edema intracelular irreversible y ruptura celular. Se acompaña de cierto grado de inflamación en el sitio de necrosis. En contraste, durante la apoptosis las células mueren formando "cuerpos apoptóticos" que son fagocitados por células circunvecinas y rápidamente degradadas en los lisosomas. Una diferencia importante entre la apoptosis y la necrosis es que en la primera la célula se fragmenta y además no se observa respuesta inflamatoria circundante (15). La apoptosis puede acontecer por una serie de eventos conocidos como "ligándos de muerte" en donde un ligando, usualmente TNF alfa, FasL o TRAIL se unen a su receptor en la membrana celular y dan lugar a la formación de los complejos TRAAD y FAAD que se acoplan a la procaspasa-8 con la consecuente activación de la llamada "cascada de las caspasas" 7,6 y 3, condicionando la degradación del DNA. Otra forma de desarrollo de apoptosis es por medio de la vía mitocondrial que también incluye la función de la procaspasa-8, la cual activa a la molécula proteínica BID en la membrana mitocondrial, despolarizándose y condicionando la liberación del citocromo C y del complejo Smac/DIABLO al citosol, culminando con la formación del llamado "apoptosoma", que activa a las caspasas 9 y 3 culminando en la vía final antes descrita (16).

1.4 LES y apoptosis

La apoptosis es un evento que ha tomado importancia en la patogénia y relativamente en el pronóstico de padecimientos degenerativos, autoinmunes y neoplásicos y se ve influenciada por un sinnúmero de condiciones modificadoras como por ejemplo medidas terapéuticas que en el caso del LES incluyen a los corticoesteroides, los citotóxicos en todas sus formas e incluso los antiinflamatorios inhibidores de ciclooxigenasa (17;18) con efectos tanto facilitadores como inhibidores de la apoptosis, dependiendo de las condiciones de estudio, de la dosis e incluso del tiempo de exposición, situación que es importante considerar al enfocarse en este fenómeno.

Actualmente en modelos experimentales existe evidencia de que el incremento de apoptosis o el proceso anormal de eliminación de células en apoptosis puede contribuir a los procesos de autoinmunidad (19-26). De modo que se ha demostrado en diferentes modelos experimentales que el incremento de la apoptosis juega un papel importante en la severidad de las características del lupus (27). Así por ejemplo, en el modelo SNF de lupus en ratón, la severidad de la enfermedad correlaciona con un marcado incremento en la frecuencia de la apoptosis de esplenocitos (28). Por otro lado en diferentes modelos de murinos de lupus se ha demostrado la inhibición de ciertas citocinas inducido por la presencias de células apoptoticas (29). El incremento de apoptosis ha sido descrito en una gran variedad de células de LES (30), incluyendo linfocitos, neutrofilos y monocitos (11;30-36). Se ha demostrado una correlación entre la actividad de LES y el grado de apoptosis de los linfocitos *in vitro* sugiriendo probablemente que un rango alto de apoptosis puede inducir la producción de auto-anticuerpos, desencadenando una actividad clínica. Kalled y colaboradores (28), han reportado que en un modelo murino de LES, dependiente de la interacción CD40-CD154, la severidad de la enfermedad correlacionó con un marcado incremento en la frecuencia de apoptosis en los esplenocitos, incluyendo una alta proporción de células dendríticas apoptóticas. Este desequilibrio en la homeostasis de las células dendríticas fue reducido o normalizado por el tratamiento con anticuerpos anti-CD154, demostrándose que el CD154 participa en la regulación de la apoptosis y la homeostasis de las células dendríticas (28).

En pacientes con LES se ha demostrado un alto rango de apoptosis en linfocitos, lo que podría explicar la dificultad de estos pacientes para manejar efectivamente procesos infecciosos (37). Los monocitos de pacientes con LES también presentan una acelerada apoptosis *in vitro* y *ex vivo,* lo cual también correlaciona con la severidad de la enfermedad (35). De manera especifica los linfocitos T de pacientes con esta enfermedad presentan elevada expresión de ligandos de apoptosis como: TRAIL, TWEAK y FasL, por lo que el bloqueo de esta vía de apoptosis disminuye de manera parcial la citotoxicida de las células blancos de los

linfocitos T, aunque la vía de apoptosis independientes de ligandos se mantiene activa, induciendo una citotoxicidad residual en las células de estos pacientes (38). Diversos grupos han reportado también un nivel elevado de apoptosis de neutrofilos en pacientes con LES, el cual correlaciona con la actividad de la enfermedad (11;34). Kaplan ha propuesto que el alto nivel de apoptosis de células involucradas en la fagocitosis como monocitos y macrófagos, puede inducir un incremento en el material apoptotico en circulación por el incremento de apoptosis de estas células y por la ineficiencia en la eliminación del material apoptotico (39). De este modo se ha establecido la presencia en circulación de un gran número de células endoteliales en apoptosis (40). Este incremento correlaciona con la disfunción endotelial, un marcador de predicción importante en la acelerada y prematura arterosclerosis, así como también con un aumento en el factor tisular, el principal pro-coagulante *in vivo*.

Recientemente se ha prestado mayor atención en los mecanismos de apoptosis en los pacientes con LES y hay evidencias contradictorias acerca de su participación en los mecanismos fisiopatológicos, por ejemplo, se han descrito numerosos linfocitos apoptóticos en la sangre periférica (9;39), los linfocitos T circulantes pero no los linfocitos B de pacientes con esta enfermedad presentan expresión alta de Bcl-2 situación que correlaciona con el grado de actividad de la enfermedad (41). Las mutaciones de Fas (CD95) resultan en síndrome linfoproliferativo y desarrollo acelerado de auto inmunidad (9). Además, los linfocitos T y B de pacientes con LES presentan incremento en la expresión de Fas (42) y se ha descrito que la apoptosis se presenta de manera preferencial en linfocitos T CD4+ Th1 (10). También se ha informado que estos pacientes presentan niveles séricos elevados de Fas soluble, incremento en los neutrófilos que expresan esta molécula y que desarrollan apoptosis, situación que correlaciona con la proporción de linfocitos apoptóticos, disminución de la depuración de inmunocomplejos y con aumento de anticuerpos contra DNA de doble cadena (11;43). Se han hecho estudios midiendo la proporción de RNA mensajero para Fas de células mononucleares en sangre periférica y por otro lado se cuantifico la apoptosis en LES, encontrando que los niveles de RNA mensajero

para Fas se encuentran significativamente elevados en relación a los pacientes sanos (44). Badillo y colaboradores estudiaron la expresión de FasL y Bax en 24 biopsias de pacientes con nefritis lúpica y 30 controles normales, encontrando que el 70% de las biopsias renales mostraron una expresión alta de mRNAs para FasL o Bax no así en los controles sanos, indicando su papel importante en la patogenia de esta enfermedad (45). Betty y cols. Encontraron algunos alelos de cromosomas asociados con LES, dentro de los cuales PARP, la cual es una polimerasa poli (ADP-ribosa) codifica la proteína dedos de zinc relacionada con la reparación en el DNA y la apoptosis, sugiriendo que PARP, puede ser el gen susceptible dentro del cromosoma 1 q41-q42, la cual está relacionada a esta enfermedad (46).

Para algunos autores, incluso, la apoptosis juega un papel importante en la regulación auto-reactiva de los pacientes con LES, afectando en particular a los linfocitos T $CD4^+$ Th1 que experimentan apoptosis la cual coexiste con las disfunciones ampliamente descritas de estas células en estos pacientes (10). Las células involucradas en el proceso inflamatorio que desarrollan apoptosis tienen diversas disfunciones entre las que se encuentran fagocitosis y endocitosis alteradas lo que conlleva a persistencia de antígenos circulantes (47), con mayor posibilidad de auto inmunidad. Se ha descrito disminución en la expresión y actividad en neutrófilos y monocitos de la molécula CD44 de los pacientes con LES activo (SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) (2), misma que se ha involucrado en la remoción de los neutrófilos que desarrollan apoptosis temprana (48). Todo este cuerpo de evidencias parece ir a favor de que la apoptosis propicia mayor daño por aumento en la liberación de antígenos nucleares y consecuentemente mayor estímulo para los fenómenos auto inmunitarios en el LES, sin embargo, como ya se comentó, aún se encuentra en el terreno de la controversia.

Actualmente no se conoce con precisión cual es o son los mecanismos involucrados que inducen un incremento en el nivel de apoptosis de estas células que correlaciona con la severidad de la enfermedad, el conocer con precisión estos mecanismos nos ofrecerían herramientas importantes para el desarrollo de nuevas estrategias de control y tratamiento de esta enfermedad.

1.5 Factor de transcripción Yin-Yang 1

Yin-Yang 1 (YY1) es una proteína de 68-kDa que contiene dedos de zinc, posee la propiedad inusual de regular la transcripción en diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción (49-51). Entre los genes que activa se incluyen IFN-α, β-caseína, *c-fos* y *c-myc.* Así como también los promotores de diversos virus en los cuales se incluyen el CMV, virus de la leucemia murina, virus del papiloma humano, y el VIH (52;53).

YY1 es un factor de trascripción el cual participa en la regulación positiva y negativa de diversos genes en mamíferos (54). Recientes estudios demostraron que YY1 reprime la trascripción del gen Fas uniéndose a la región silenciadora de su promotor. El tratamiento de líneas celulares tumorales con oxido nítrico (ON) induce una sobre expresión de Fas, ya que el ON inactiva al factor de trascripción YY1 que funciona como represor de Fas (55). La manera en que el ON inactiva a YY1 es mediante S-nitrosilación de esta proteína y la subsecuente inhibición de la actividad de unión al DNA (56). La sobre expresión de Fas, induce la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor.

Diversos estudios muestran que va en aumento el número de genes celulares y virales en los cuales se han encontrado sitios de unión para YY1 en sus regiones promotoras, lo que refleja la importancia de este factor como regulador en la transcripción. Recientes estudios en nuestro laboratorio en colaboración con la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA), muestran que YY1 regula de manera negativa la expresión de Fas y de DR5 uniéndose a sus respectivos promotores e inhibiendo así su trascripción, esto en líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer de próstata (57). Por otro lado se ha descrito recientemente que YY1 regula la transcripción, acetilación y ubiquitinación de p53, el cual es un supresor de tumor y regulador del ciclo celular así como de la apoptosis en respuesta a estrés genotóxico, siendo YY1 un regulador negativo de p53 (58).

Hasta la fecha, no existen estudios de la participación de YY1 en la fisiopatogenia del LES. Recientes estudios en nuestro laboratorio en biopsias renales de

pacientes pediátricos con nefritis lupica demostró que existe expresión de YY1 y Fas en un 80 a 90% en los túbulos contorneados proximales y dístales con una expresión menor a nivel glomerular en comparación a los túbulos. El análisis de la evaluación del numero de células positivas, demostró que existe una relación inversa entre la densidad de la expresión de YY1 y Fas, en las lesiones renales tipo IV, cuando se agrupó a YY1 de acuerdo a la intensidad de la expresión en bajo (30%), mediano (60%) y alto (90-100%), por tipo de lesión histopatológica y por su expresión entre túbulos y glomérulos, con una diferenta estadísticamente significativa (p = 0.005). Estos estudios sugieren la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación de Fas, encontrando que existe una relación inversamente proporcional de este en la nefropatía lúpica con la mayor expresión en los túbulos contorneados proximales y dístales y cuando YY1 se encontró alto Fas se encuentra en menor expresión, y esto correlacionó con menores complicaciones clínicas, curso favorable, así como menores alteraciones en la función renal y un tipo menor de lesión histopatológica. Por lo que resultaría interesante el estudio de YY1 como factor pronostico de la enfermedad (59). Por otro lado en nuestro laboratorio se han desarrollado estudios preliminares que muestran la existencia de la expresión de YY1 en células de sangre periférica en tres pacientes pediátricos con LES activo, por métodos de citoinmunohistoquímica, los resultados mostraron que la expresión de YY1 se encuentra predominantemente en el núcleo. Por otro lado la expresión de Fas en los mismos pacientes, se mostró principalmente a nivel de la membrana celular y citoplasma en la mayoría de las células analizadas. En este trabajo nosotros proponemos estudiar en células de sangre periférica la expresión de YY1 y Fas y su correlación con el grado de apoptosis en pacientes pediátrico con LES.

2. JUSTIFICACIÓN

Existe gran cantidad de información acerca de las alteraciones inmunológicas que acontecen en el LES (2), situación que se mantiene en expansión constante y se buscan nuevos mecanismos de patogenicidad, susceptibles de ser modificadas y por ende, con factibilidad terapéutica, motivo por el cual hemos decidido participar en la investigación del papel que juega el factor de transcripción YY1 en la regulación de la expresión de Fas y su correlación con la apoptosis y la actividad clínica en niños con LES tanto activos como inactivos, como un paso inicial en este campo. Dada la interferencia que pueden tener los inmunodepresores en la expresión de moléculas de señalización para la interacción celular y su efecto sobre la apoptosis (17;18), se tomaron como uno de los grupos de estudio, a niños con el mismo proceso patológico ya inactivo, preferentemente sin medicamentos inmunodepresores y con la menor dosis de esteroide posible o de ser factible, sin ellos, y se averiguo la ocurrencia de estos fenómenos en ambos grupos.

3. OBJETIVOS

Evaluar en células de sangré periférica la expresión de YY1 y de Fas y su correlación con la apoptosis en niños LES activo e inactivo.

4. HIPÓTESIS

El factor de trascripción YY1 participa en la regulación de la expresión de Fas, y esta regulación correlaciona con la apoptosis en pacientes pediátricos con LES.

5. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

5.1 Lugar de realización

Servicio de Reumatología Pediátrica, Dirección de Educación e Investigación en Salud y la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología, Unidad Médica de Alta Especialidad General del Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS.

5.2 Diseño

Tipo de Estudio prolectivo, transversal, observacional, comparativo y abierto, realizado en una muestra de 10 pacientes pediátricos con LES activo y 10 de LES inactivo en etapa escolar y adolescente, manejados en el servicio de Reumatología Pediátrica del Centro Médico Nacional "Dr. Gaudencio González Garza" La Raza México D.F. UMAE, así como 5 controles sanos otorgados por el servicio de laboratorio clínico del mismo Hospital.

5.3 Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Pacientes que cumplan con al menos 4 criterios para LES según la clasificación del ACR (Colegio Americano de Reumatología).
- Masculinos o femeninos.
- Entre 6 y 16 años de edad.
- Con LES activo o Inactivo.
- Que acepten participar en el estudio previa explicación y firma de carta de consentimiento bajo información completa y exhaustiva.

Criterios de no inclusión:

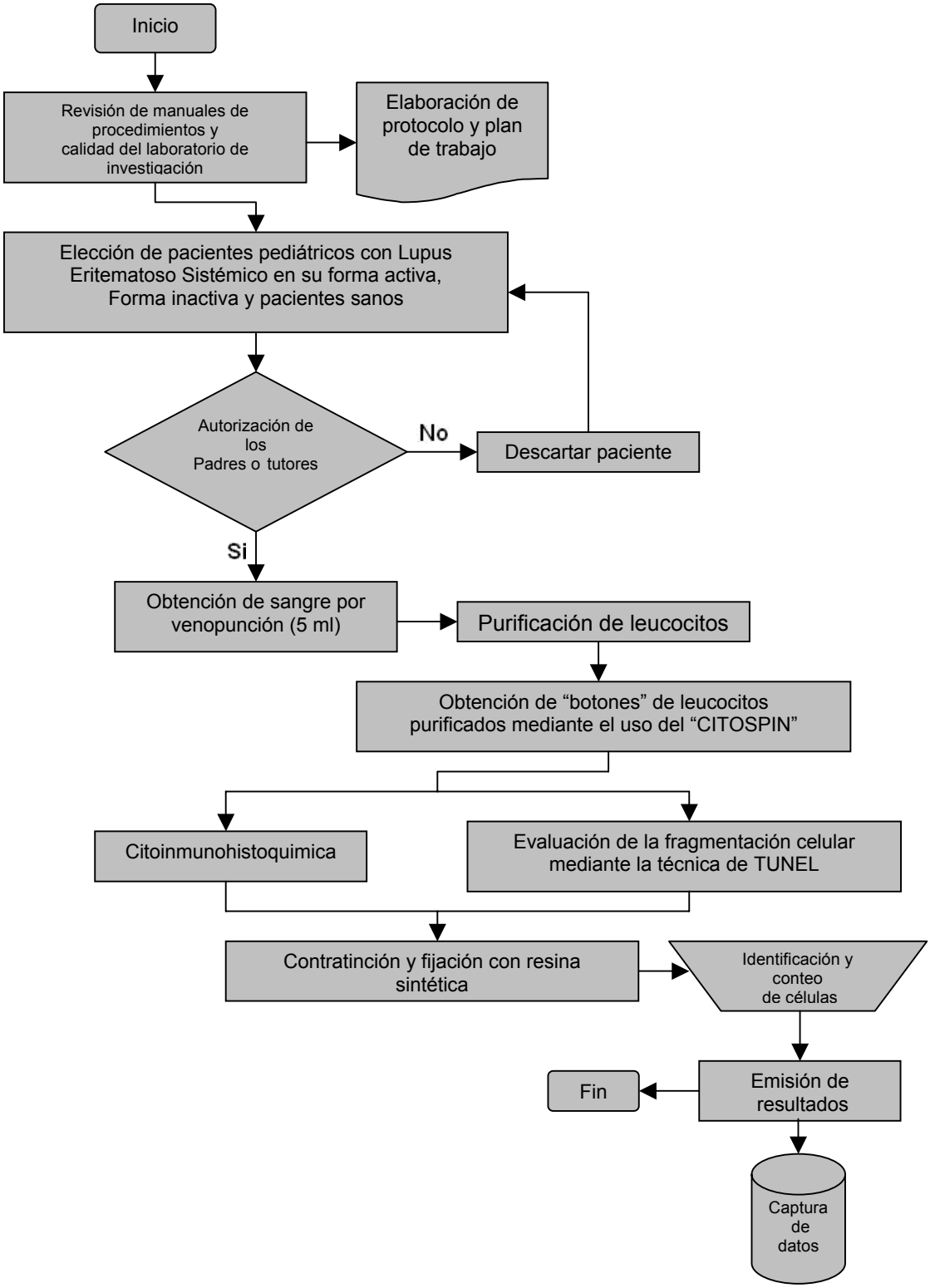
- Presencia de infección en cualquier sitio del organismo o que la haya padecido en al menos las dos semanas previas.
- Pacientes que tengan tratamiento con prednisona a dosis superior a 5 mg por día.
- Pacientes que tengan tratamiento con pulsos de metilprednisolona o que los hayan recibido dentro de los 60 días previos al estudio.

- Pacientes con tratamiento a base de Ciclosporina A, Ciclofosfamida o Metotrexate, o que reciban azatioprina a dosis superior a 1 mg. por Kg. de peso.

Criterios de exclusión:

- Pacientes que decidan en cualquier momento ya no participar en el estudio.

6. DIAGRAMA DE FLUJO



7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Pacientes

El presente estudio se efectuó en una muestra de la población de pacientes pediátricos con Lupus Eritematoso Sistémico atendidos en el Servicio de Reumatología Pediátrica de la Unidad Médica de Alta Especialidad "Dr. Gaudencio González Garza" del Centro Médico Nacional "La Raza" del IMSS. Una vez seleccionados los pacientes que reúnan los criterios de inclusión y carezcan de los de no inclusión, se les informará a los padres o tutores legalmente responsables de los menores, de manera clara y amplia acerca del estudio y previa aceptación y firma de carta de consentimiento bajo información. Acto seguido, se les tomo muestras para estudios de biometría hemática completa, proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG), Anticuerpos antiDNA, Anticuerpos antinucleares (ANA), complemento (CH50, C3 y C4), examen general de orina, depuración de creatinina y albúmina en orina de 24hr, urocultivo, exudado faríngeo y telerradiografía de tórax. Además, se practicaron los estudios complementarios pertinentes a la afectación y grado de actividad del padecimiento o que la condición clínica así lo requiera. Se incluyeron la toma de 5ml de sangre en un tubo con anticoagulante (EDTA) con el fin de realizar la medición de apoptosis en células de sangre periférica con la técnica de TUNEL, así como para la determinación de Fas, FasL y YY1 (Ver descripción completa de la técnica para evaluar apoptosis, así como la expresión de Fas, FasL y de YY1 en el apartado de variables).

7.2 Reactivos para el método de inmunohistoquímica

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

7.3 Anticuerpos

- Anti-YY1 (Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-Fas (Santa Cruz, Biotechnology)
- Anti-FasL (Santa Cruz, Biotechnology)

- Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR) (DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).

7.4 Purificación de leucocitos

Se realizo una mezcla 1:1 de sangre problema con solución salina (S.S) 0.9 % de NaCl. Al mismo tiempo se midió el volumen de "limphoprep" estéril de acuerdo al volumen total de mezcla sangre/S.S., guardando la relación de 3 ml de limphoprep por 10 ml de mezcla sangre/SS colocándose en un tubo Falcon de 15 ml. La cantidad adecuada de limphoprep se adicionara primero para que lentamente, por las paredes del tubo, se vierta la mezcla sangre/S.S. quedando por encima, esto se realiza con mucho cuidando procurando no romper el gradiente de densidad. Posteriormente, se centrifugo a 1500 r.p.m. por 30 minutos. Después se separo la capa de leucocitos con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y se coloco en otro tubo Falcon, se adiciono una cantidad igual de S.S. a la capa extraída y se centrifugo nuevamente por 20 minutos a 1500 r.p.m., finalmente se decanto el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 ml de S.S.

7.5 Obtención de laminillas de leucocitos purificados mediante el uso del "CITOSPIN"

Después de la purificación, los leucocitos fueron contados en un pozo con una mezcla de 50 µl de leucocitos totales con 50 µl de azul de tripano. Se colocaron 10 µl de la mezcla de leucocitos/azul de tripano en una cámara de Neubauer y las células se contaron bajo microscopia de luz (20X), se realizo el calculo para obtener $5x10^4$ células/ µl.

Para la obtención de una laminilla a una concentración de $5 X 10^4$, se realizo la regla:

de células - 1000 µl

$5 X 10^4$ - X

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

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

Después de dejar secar las laminillas fueron rotuladas y se fijaron con formaldehído al 4% por 20 minutos. Después de haber transcurrido el tiempo se dejaran secar a temperatura ambiente y finalmente se almacenaron para su posterior inmunotinción.

7.6 Citoinmunohistoquimica

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

Posteriormente las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos anti-YY1 (1:200), anti-FAS (1:200) y anti-FasL (1:200). Al otro día se lavo con PBS 1X, las laminilla se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a Biotina por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS se adiciono streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HPR), por último el color se genero mediante la adición del substrato DAB (diamino benzidina) durante 1-4 minutos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiño con hematoxilina por 15 seg.

La muestras fueron deshidratas bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y Xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejan secar a temperatura ambiente.

7.7 Mediada de la fragmentación de DNA mediante la técnica de “TUNEL”

Partiendo de las laminillas obtenidas mediante citocentrifugación, se procedió a realizar la evaluación de la fragmentación celular mediante la técnica de TUNEL. Brevemente, se incrementara la permeabilidad de la membrana

celular mediante la adición de citrato de sodio (pH= 6, 0.01M) el cual se adiciona por 20 minutos en baño María. Se elimino la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. Se bloqueo la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en suero normal de cerdo al 2%. Posteriormente se procedió a adicionar la enzima; se hace una mezcla de 50 µl de enzima con 450 µl de buffer el cual contiene oligonucleotidos conjugados con fluoresceína, la cual se incuba con las muestras por 60 minutos a 37ºC, protegidos de la luz. Se lava 5 veces 5 minutos con PBS 1X. Posteriormente se realizo la incorporación del anticuerpo anti-fluoresceina (PDO), para lo cual se adicionan 20 µl del reactivo PDO y se incuba a 37 ºC/30 min, se lava 5 minutos con PBS 1X en 3 ocasiones. El desarrollo de color se realizo con la adición de DAB, monitoreando bajo el microscopio de luz. Cuando se observo la coloración café en las células se detuvo el registro del tiempo y se elimino el exceso de DAB e inmediatamente se lavo con agua corriente para detener la reacción, se contratiño con hematoxilina (1:1 con agua destilada) por 30 segundo, se deshidrato y monto con resina sintética, se dejo secar por 24 horas para hacer el análisis en el microscopio.

7.8 Cuantificación de células positivas inmunoteñidas

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

7.9 Procesamiento de los datos

Se elaboro una base de datos y la información se proceso utilizando el programa de análisis estadístico Prisma© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada

grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizaron mediante ANOVA de una vía. Utilizando un análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre los grupos. $p \leq 0.05$ será considerada como significativa.

7.10 Aspectos éticos y de bioseguridad

El presente estudio se apega al manual de buenas prácticas clínicas y se inscribe dentro de la normativa en relación a la investigación en seres humanos de la Coordinación de Investigación en Salud, así como a las disposiciones contenidas en el Código Sanitario en materia de Investigación, acordes a la Declaración de Helsinki y a sus adecuaciones posteriores (Hong Kong y Tokio), en cuyo marco conceptual se basan la información amplia y minuciosa acerca del proyecto y las aclaraciones en todos sentidos a las dudas de los padres o tutores legales de los candidatos a participar, así como la elaboración de la carta de consentimiento bajo información, que además de incluir las razones y justificación del proyecto contempla los posibles riesgos y los beneficios.

8. RESULTADOS

8.1 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 LES activo (incisos e 40X y f 100X) se encontró un incremento significativo, en la apoptosis determinada por fragmentación de ADN, la cual se evidencio por el color café que se encontró en el núcleo de las células. Además se observan también cuerpos apoptoticos en algunas muestras, lo cual nos indica una apoptosis tardía. En los casos de pacientes con LES inactivo se encontró una moderada tinción para TUNEL (incisos c 40X y d 100X). Para los casos de las muestras de los controles sanos (incisos a 40X y b 100X), la tinción para TUNEL es prácticamente negativa en todos los casos. Algunas células TUNEL positivas muestran morfología característica de neutrófilos y otras más de linfocitos.

8.2 Morfología de los hallazgos inmunohistoquímicos

Los resultados en la detección en la expresión de Fas se muestran en la figura 2. En el caso de las células de sangre periférica provenientes de pacientes con LES activo (incisos e 40X y f 100X) se muestra un incremento en la expresión de esta molécula, en comparación con los controles sanos (incisos a 40X, b 100X) y los pacientes con LES inactivo (incisos c 40X y d 100X). Le expresión de Fas se presenta preferentemente en el citoplasma y con menor intensidad en la membrana celular.

La expresión inmunohistologica de FasL se muestra en la figura 3. La expresión de esta molécula en células de sangre periférica de pacientes con LES activo (incisos e 40X y f 100X), se encontró incrementada en comparación con los controles sanos (incisos a 40X y b 100X) y los pacientes con LES inactivo (incisos c 40X y d 100X). Los resultados muestran una expresión principalmente en membrana celular y con menor intensidad en el citoplasma.

La determinación de la expresión de YY1 se muestra en la figura 4. En células de pacientes con LES activo (incisos e 40X y f 100X) se observa una disminución importante si se compara con los pacientes controles sanos (incisos a 40X y b 100X) y los pacientes con LES inactivo (incisos c 40X y d

100X). La tinción se encontró principalmente a nivel nuclear, sin embargo, en muchas de las muestras también se observa una importante tinción citoplásmica.

8.3 Evaluación del porcentaje de apoptosis

La determinación de la apoptosis fue evaluada mediante el conteo del número de células positivas a TUNEL. En la figura 5 se muestra los resultados de la apoptosis en cada una de los grupos analizados, en donde se observa que existe una clara diferencia entre los tres grupos. Encontrándose un incremento estadísticamente significativo en el grupo de LES activo (p= 0.048) si se compara con LES inactivo a los controles sanos.

8.4 Evaluación del porcentaje de células inmunoteñidas

El número de células positivas para Fas se muestra en la figura 6, en donde se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de pacientes con LES activo e inactivo o controles sanos. Se muestra un incremento gradual de la expresión de Fas, encontrándose un pico máximo en el grupo de células provenientes de pacientes con LES activo. (p= 0.044). No encontrándose diferencia significativa entre el grupo con LES inactivo y el grupo de controles sanos.

En cuanto a la expresión de FasL en la figura 7 se presenta un incremento estadísticamente significativo en el grupo de pacientes con LES activo, si se compara con LES inactivo o los controles sanos. (p= 0.011). No encontrándose diferencia significativa entre el grupo con LES inactivo y el grupo de controles sanos.

La expresión de YY1 se muestra en la figura 8, en la cual se observa una disminución estadísticamente significativa entre el grupo de LES inactivo y los controles sanos (p= 0.011), sin embargo esta disminución es mayor si se compara el grupo de LES activo con los controles sanos (p= 0.011).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La apoptosis o muerte celular programada consiste en una serie de sucesos bioquímicos que tienen como finalidad el control de los eventos celulares. 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 (14).

La apoptosis es un evento que ha tomado importancia en la patogenia y relativamente en el pronóstico de padecimientos degenerativos, autoinmunes y neoplásicos y se ve influenciada por un sin número de condiciones modificadoras como por ejemplo medidas terapéuticas que en el caso del LES incluyen a los corticoesteroides, los citotóxicos en todas sus formas e incluso los anti-inflamatorios inhibidores de ciclooxigenasa (17;18) con efectos tanto inductores como inhibidores de la apoptosis, dependiendo de las condiciones de estudio, de la dosis e incluso del tiempo de exposición, situación que es importante considerar al enfocarse en este fenómeno.

Actualmente en modelos experimentales existe evidencia de que el incremento de apoptosis o el proceso anormal de eliminación de células en apoptosis puede contribuir la patogenia del LES (19-26). Xue y colaboradores demostraron mediante ensayos de citometría de flujo que la apoptosis de linfocitos T $CD4^+$ se encuentra aumentada en pacientes con LES activo y en menor proporción en pacientes con LES inactivo, si se compara con controles sanos. En este mismo estudio se demostró que la apoptosis de los linfocitos es mediada por Fas-FasL y además que el grado de apoptosis correlaciona con las concentraciones de anticuerpos anti-núcleosomas. Con lo anterior los autores concluyen que la apoptosis de los linfocitos T $CD4^+$ mediada por Fas-FasL contribuye a la patogénesis del LES. Sin embargo, el estudio anterior se llevo acabo en adultos y hasta el momento no existen reportes que indique la importancia de este mecanismo en LES infantil. Por lo que resulta interesante el estudio de la apoptosis mediada por Fas-FasL en una población infantil, debido a que existen evidencia que muestran que algunos procesos inmunológicos son diferentes en pacientes adultos en comparación con niños. Los resultados que obtuvimos en este trabajo son consistentes con lo reportado en poblaciones de adultos. Nosotros observamos que la apoptosis de células

de sangre periférica se encuentra aumentada en pacientes con LES activo (5.5%) y en menor proporción en pacientes con LES inactivo (9.8 %) si se compara con muestras de controles sanos (1.2%), figura 5. Además, encontramos que existe un aumento significativo en la expresión de Fas y FasL en el grupo de pacientes con LES activo (17% y 12% respectivamente). Pero a diferencia de los resultados obtenidos en adultos, no encontramos un aumento en la expresión de Fas y FasL en el grupo de pacientes con LES inactivo. Lo cual sugiere que el aumento de la apoptosis en los pacientes con LES activo puede estar mediado por la vía extrínseca, en donde Fas-FasL muy probablemente están participando. Sin embargo, la apoptosis observada en los pacientes con LES inactivo (aunque es menor que la observada en los pacientes con LES activo) es significativa. Si se compara con controles sanos, nuestros resultados sugieren que cuando esta enfermedad no esta activa, el mecanismo por el que se esta llevando a cabo la apoptosis no es mediado por Fas-FasL, ya que la expresión encontrada de Fas o FasL en este grupo fue mínima (figuras 6 y 7).

Por otro lado diversos estudios demuestran la importancia que tiene Fas en la patogenia de LES. Sin embargo, no se conoce qué factores regulan su expresión durante el desarrollo de esta enfermedad. YY1 es un factor de trascripción el cual participa en la regulación positiva y negativa de diversos genes en mamíferos (50). Se ha demostrado que YY1 reprime la trascripción del gen Fas uniéndose a la región silenciadora de su promotor (55). La sobre expresión de Fas, induce la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor. Hay trabajos que muestran la participación de YY1 en la regulación de genes en líneas celulares tumorales tratadas con óxido nítrico, algunos genes del VIH y ciertos hálelos de cromosomas relacionados a LES (52-56). No se tienen reportes hasta la fecha de la participación de YY1 en la fisiopatogenia del LES. Por lo que en este trabajo evaluamos si YY1 puede estar relacionado a la expresión de Fas y, la apoptosis, por tanto tenga alguna participación en la patogenia de esta enfermedad.

Como ya mencionamos recientes estudios muestran que YY1 regula de manera negativa la expresión de Fas en un modelo de cáncer de ovario y próstata (55). Sin embargo, no existen reportes sobre la participación de YY1 en la fisiopatogenia de LES y si este factor de trascripción regula de manera negativa la expresión de Fas, proteína que juega un papel central en fisiopatogenia de esta enfermedad.

El análisis de las muestras de los controles sanos y los pacientes con LES inactivo muestra que el porcentaje de células positivas para la expresión de YY1 es inversa a la expresión de Fas (figuras 6 y 8). Es interesante que, cuando se encontró un mayor numero de células positivas para YY1, la cantidad de células positivas para Fas fue menor, lo cual correlacionó con un menor grado de apoptosis (figuras 5, 6 y 7). El hecho de encontrar esta relación inversa de expresión entre YY1 y Fas en los controles sanos sugiere que YY1 juega un papel importante en el control de la homeostasis, lo cual hasta la fecha no había sido reportada. Es interesante resaltar que cuando los niveles de células positivas para YY1 fue bajo, la expresión de Fas se encontró elevada y además correlaciono con un aumento de la apoptosis, el cual se observo en los pacientes con LES activo.

Estos hallazgos sugieren que YY1 regula de manera negativa la expresión de Fas en LES activo y es consistente con los reportes de que existe esta regulación en algunas células neoplásicas. Lo resultados indican que YY1 participa en la fisiopatología de LES, hecho que no se había explorado con anterioridad. Sin embargo es importante establecer un estudio de correlación del estadio clínico en cada uno de los grupos de estudio, para tener mayor evidencia que apoye la participación de YY1 en este padecimiento. Además se requiere de un estudio más extenso de YY1 para valorar su utilidad como factor pronóstico en esta enfermedad.

10. SECCIÓN DE FIGURAS

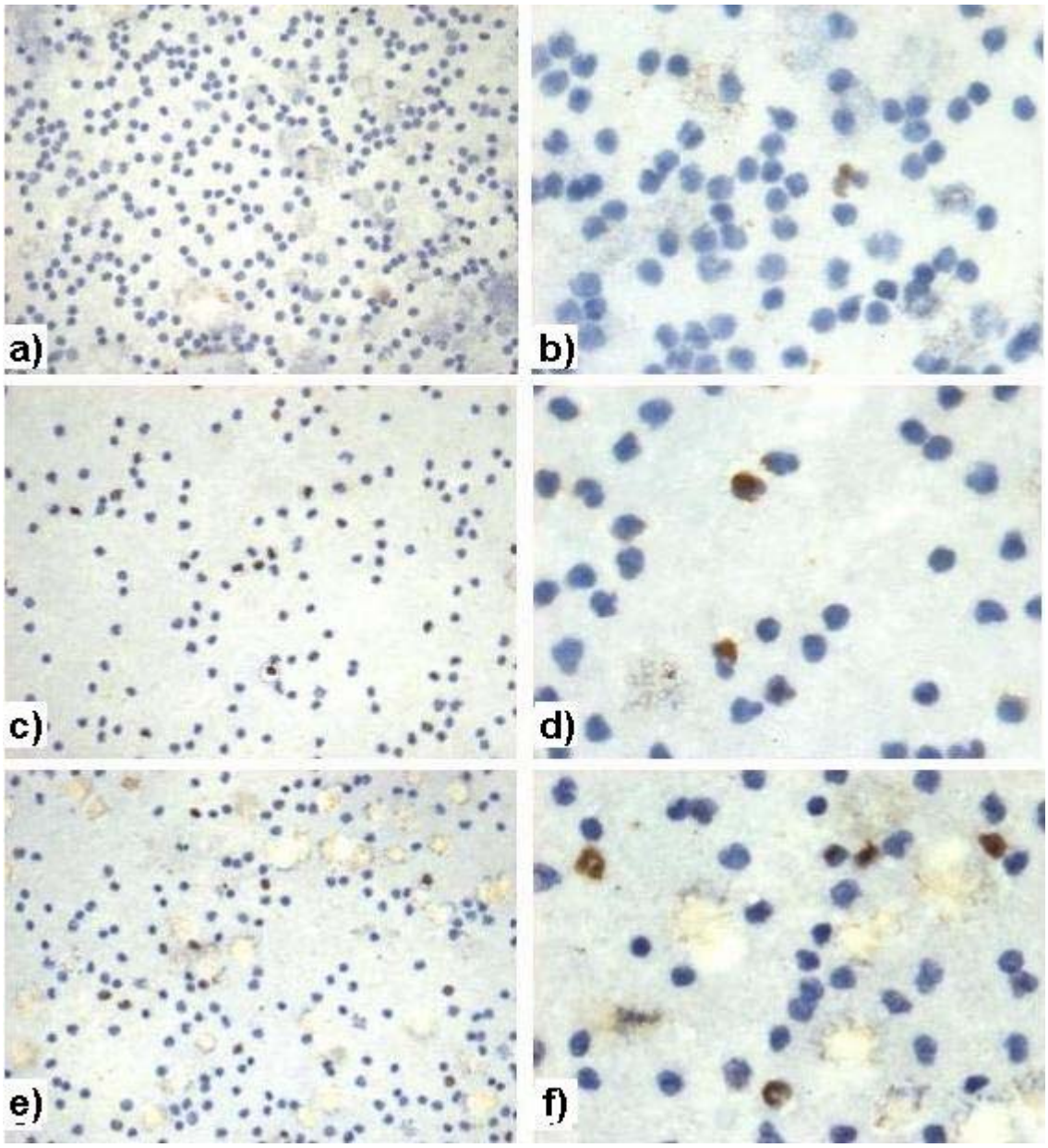


Figura 1. **Fotografías representativas de las células TUNEL-positivas**. Los controles sanos (incisos a 40X y b 100X), se muestran negativos para la detección de la fragmentación de DNA (TUNEL), lo cual representa la apoptosis celular. En la muestras de pacientes con LES inactivo (incisos c 40X y d 100X), se puede observa una discreta presencia de células positivas para TUNEL, lo cual indica apoptosis de las células. En contraste, las muestras que corresponden a los pacientes con LES activo (incisos e 40X y f 100X), se muestra claramente la presencia de apoptosis en células, principalmente en el núcleo y citoplasma de las células.

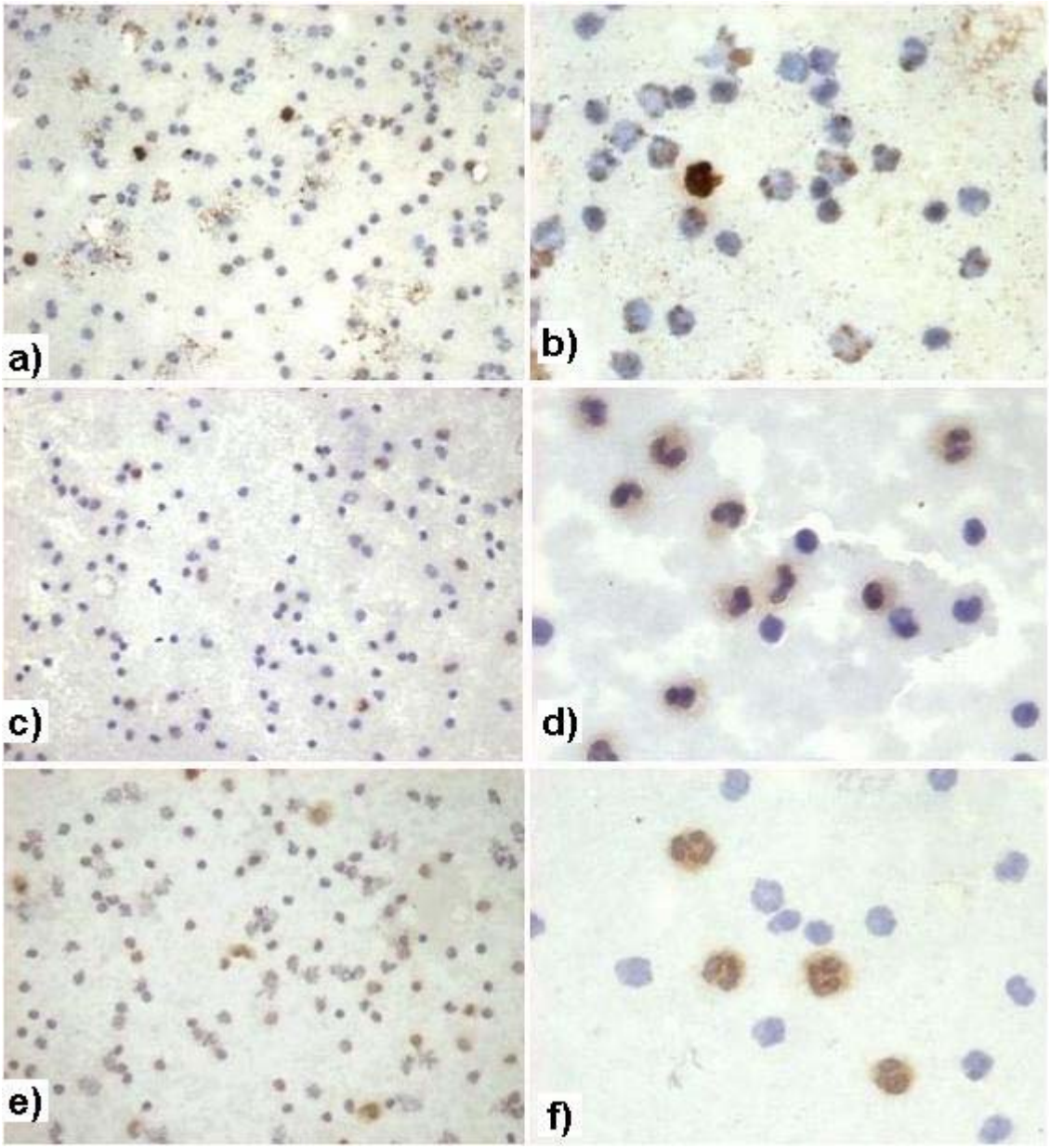


Figura 2. **Fotografías representativas de la expresión de Fas**. Los controles sanos (incisos a 40X y b 100X), muestra expresión basal de este receptor de muerte, principalmente a nivel citoplásmico. En la muestras de pacientes con LES inactivo (incisos c 40X y d 100X), se puede observa una expresión muy similar que en los controles sanos. En contraste, las muestras que corresponden a los pacientes con LES activo (incisos e 40X y f 100X), se muestra claramente una diferenciasignificativa en la expresión de Fas principalmente en el membrana celular y citoplasma.

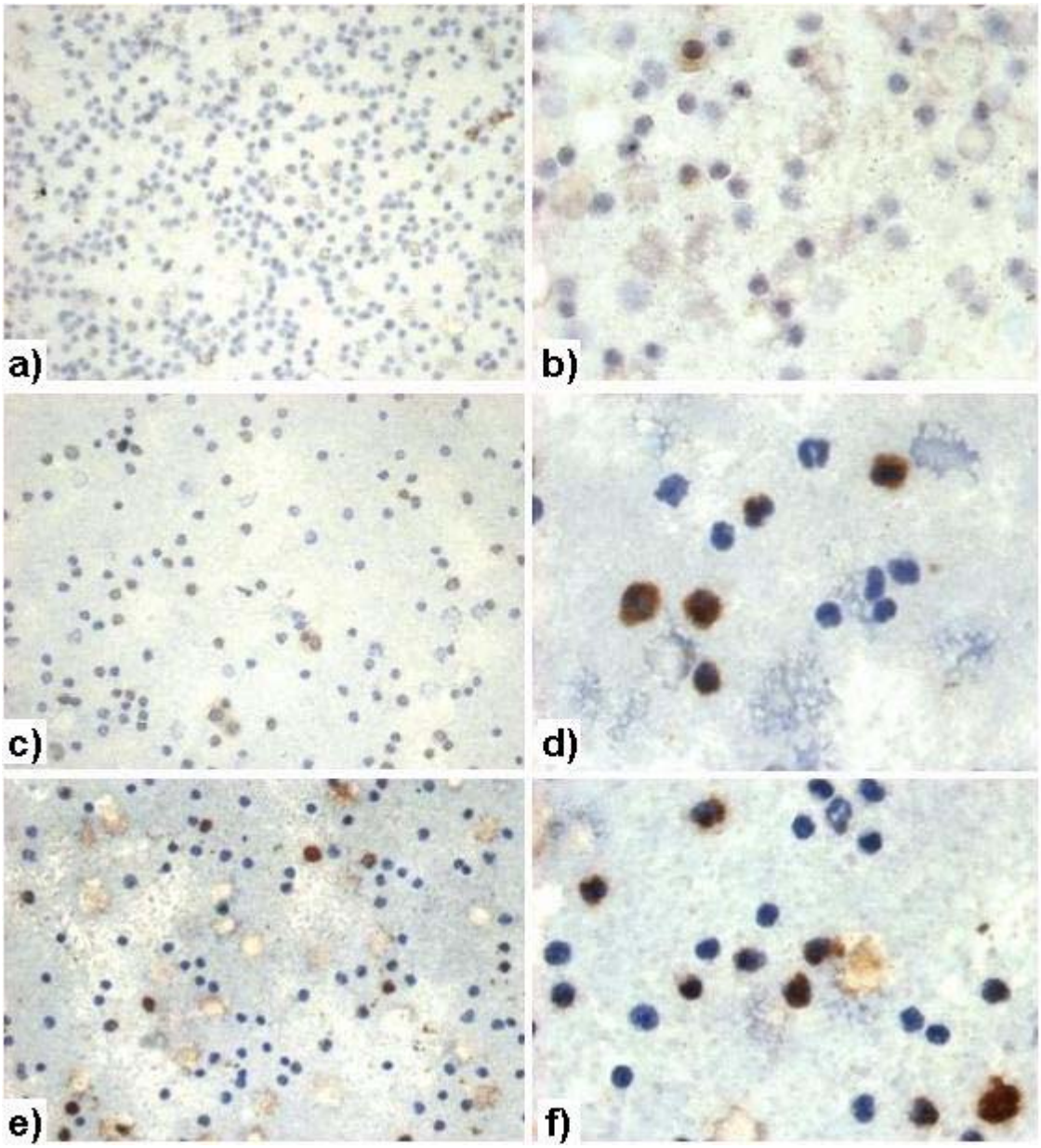


Figura 3. **Fotografías representativas de la expresión de FasL**. Los controles sanos (incisos a 40X y b 100X), muestran expresión basal de este ligando de muerte, principalmente a nivel citoplásmico. En la muestras de pacientes con LES inactivo (incisos c 40X y d 100X) se puede observa una expresión muy similar que en los controles sanos. En contraste, las muestras que corresponden a los pacientes con LES activo (incisos e 40X y f 100X), se muestra claramente un aumento en la expresión de FasL, principalmente en el membrana celular y citoplasma. Similar a lo que ocurre con el la expresión de Fas.

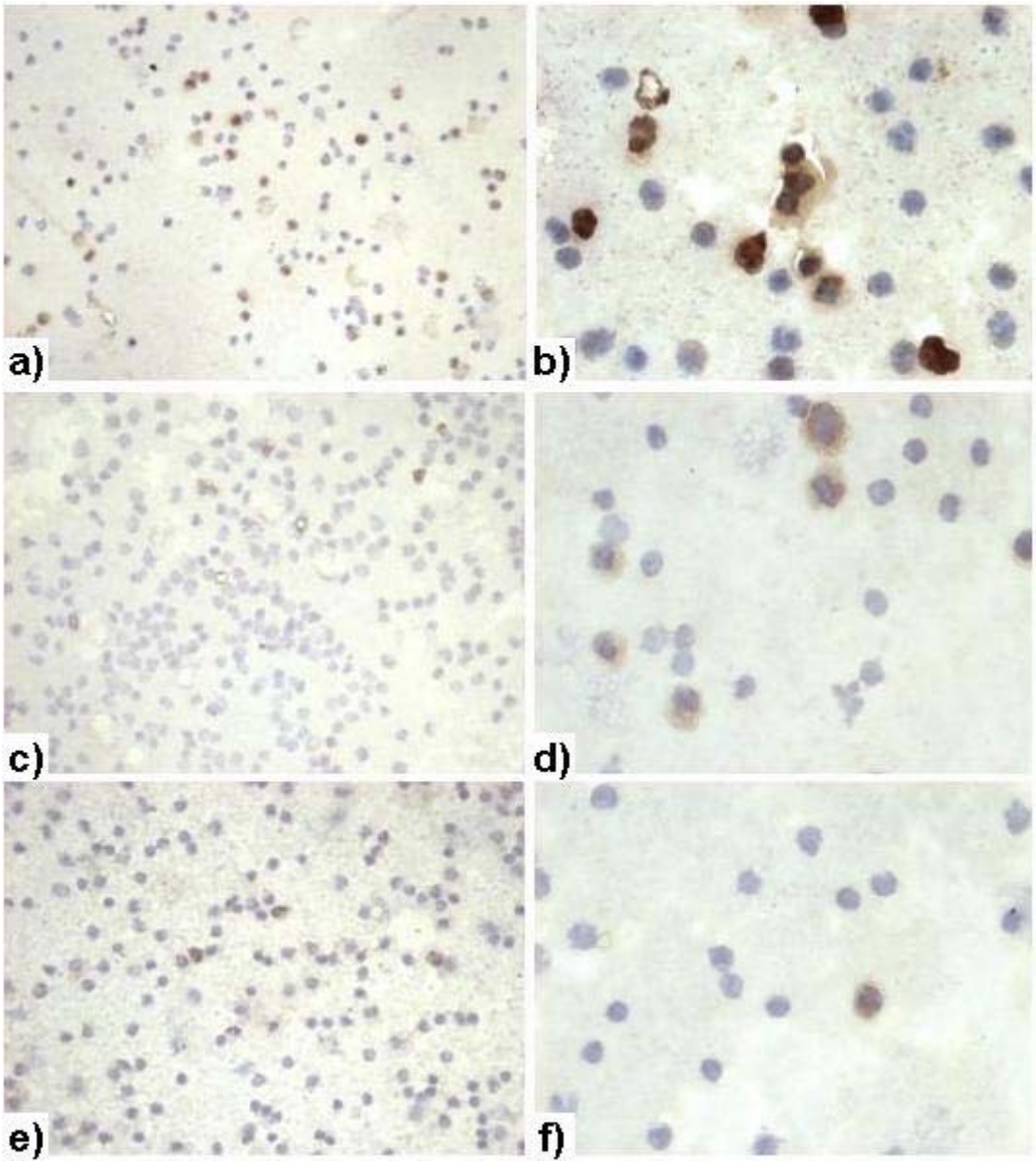


Figura 4. **Fotografías representativas de la expresión de YY1**. Los controles sanos (incisos a 40X y b 100X), muestran expresión basal alta si se compara con Fas y FasL, la expresión es primordialmente en citoplasma y núcleo. En la muestras de pacientes con LES inactivo (incisos c 40X y d 100X), se puede observa una expresión disminuida si se compara con los controles sanos. Mientras que en las muestras que corresponden a los pacientes con LES activo (incisos e 40X y f 100X), se muestra una clara disminución de esta proteína encontrada, la cual es principalmente a nivel de citoplasma celular.

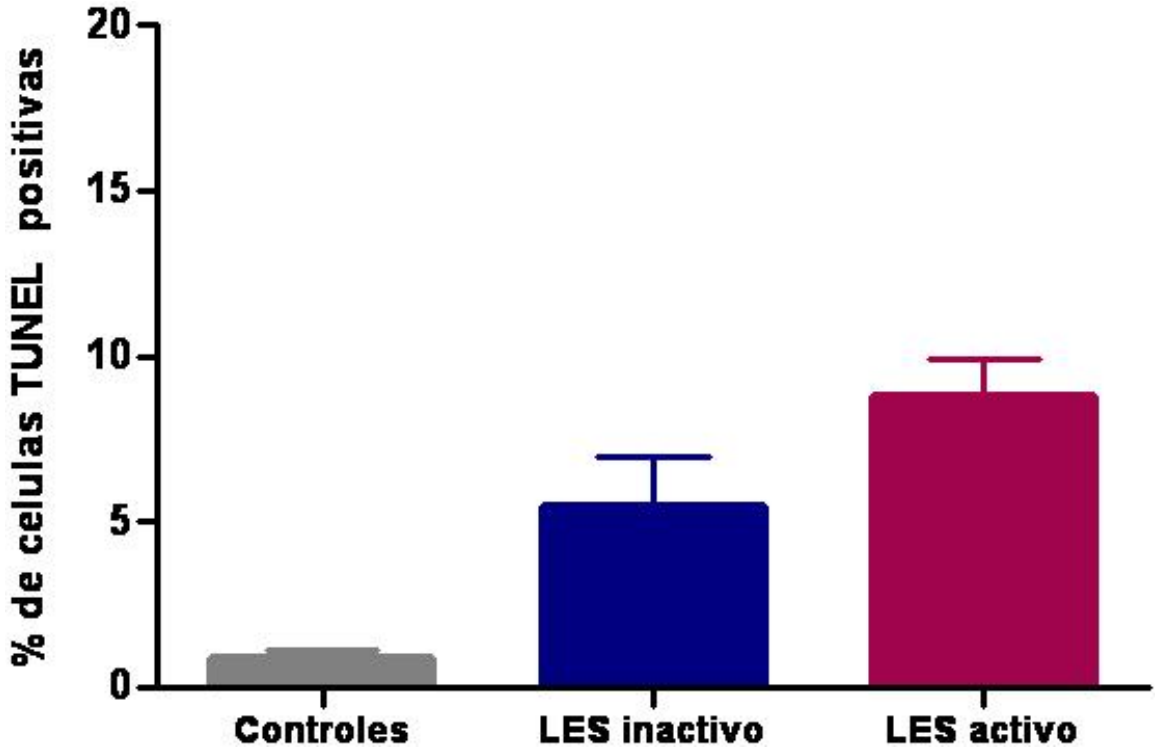


Figura 5. Número de células positivas para TUNEL. Cada Barra representa la media de cada uno de los grupos del número de células positivas (las células teñidas de color café). Después de la tinción de TUNEL, se contaron 200 células por laminilla, y se calculo el porcentaje de positividad. Se observa un aumento significativo en el número de células TUNEL positivas en el grupo de LES activo en comparación con LES inactivo, siendo mas notoria la diferencia de LES activo en comparación con los controles. (*p= 0.048, LES activo *vs* Controles, y para LES activo vs LES inactivo la *p > 0.05. Análisis de variancia, ANOVA).

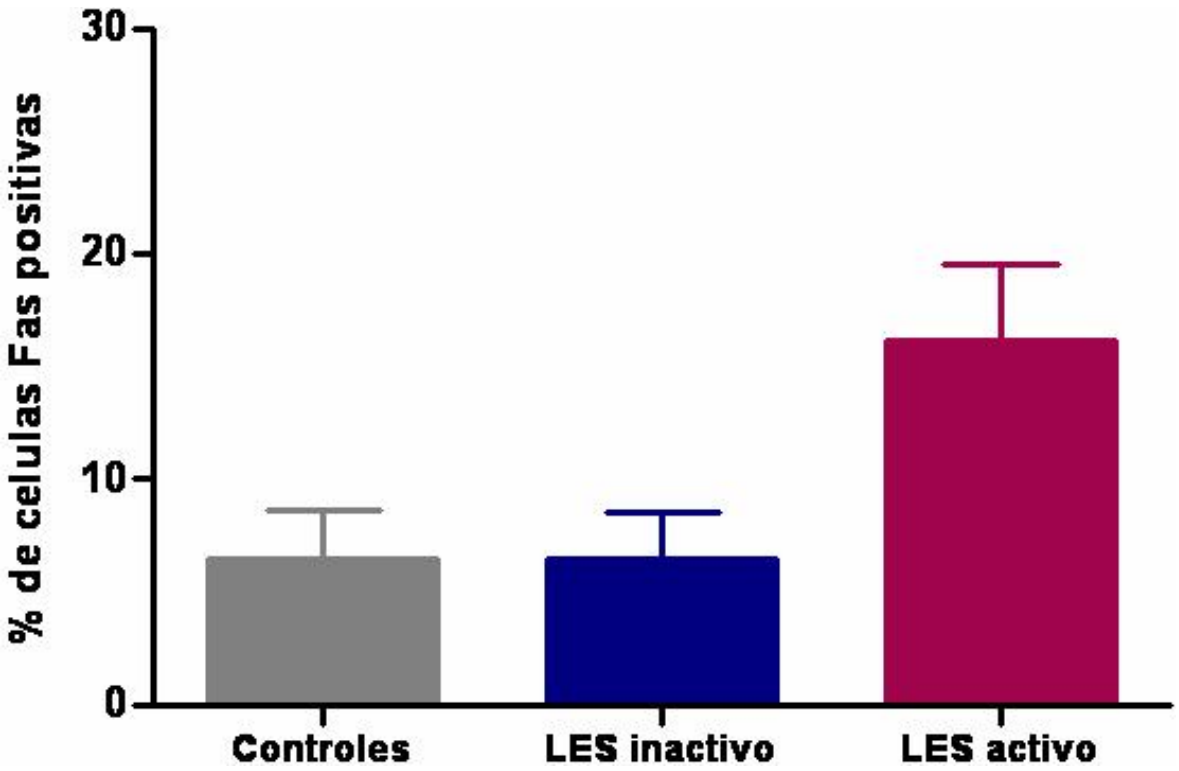


Figura 6. Número de células positivas para Fas. Cada Barra representa la media de cada uno de los grupos del número de células positivas (las células teñidas de color café). Después de la citoinmunohistoquimica, se contaron 200 células por laminilla, y se calculo el porcentaje. Se observa un aumento en el número de células positivas para Fas en el grupo de LES activo, el cual es estadísticamente significativo (**p*= 0.044, LES activo *vs* LES inactivo o Controles. Análisis de variancia, ANOVA).

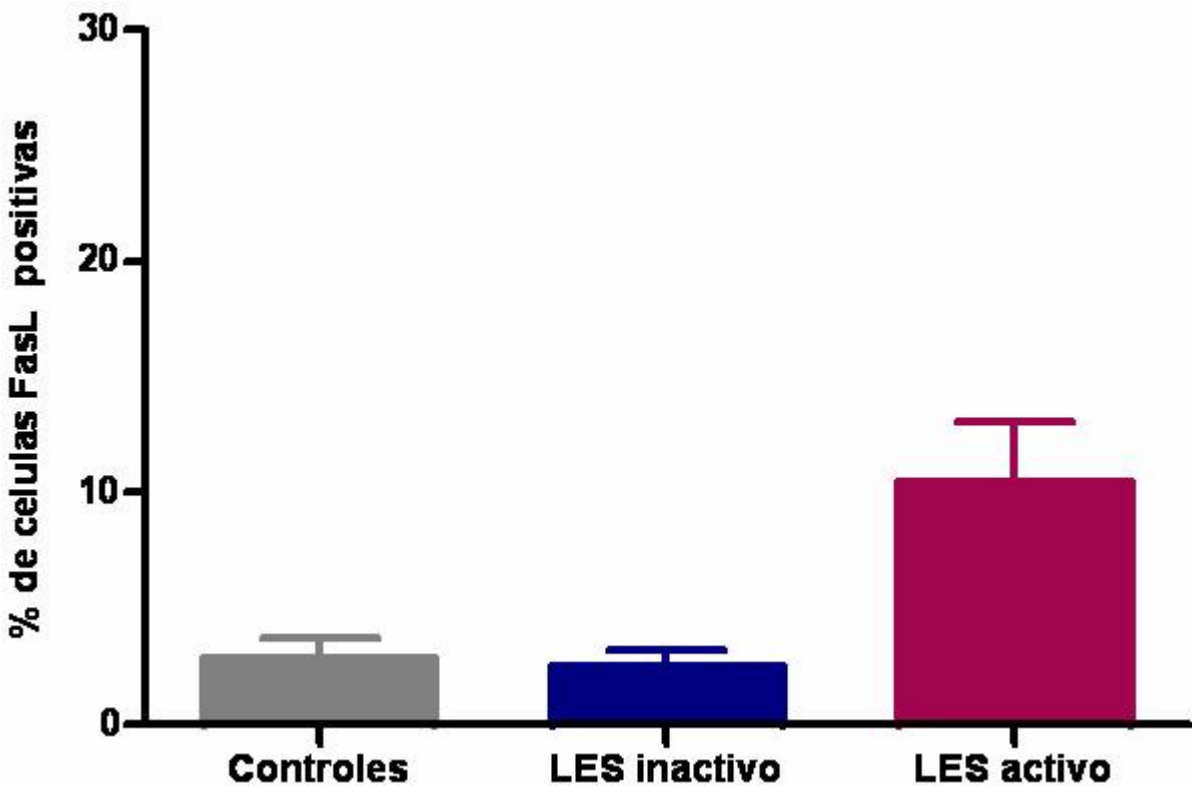


Figura 7. Número de células positivas para FasL. Cada Barra representa la media de cada uno de los grupos del número de células positivas (las células teñidas de color café). Después de la citoinmunohistoquimica, se contaron 200 células por laminilla, y se calculo el porcentaje. Se observa un aumento en el número de células positivas para FasL en el grupo de LES activo, el cual es estadísticamente significativo *(*p*= 0.011, LES activo *vs* LES inactivo o Controles. Análisis de variancia, ANOVA).

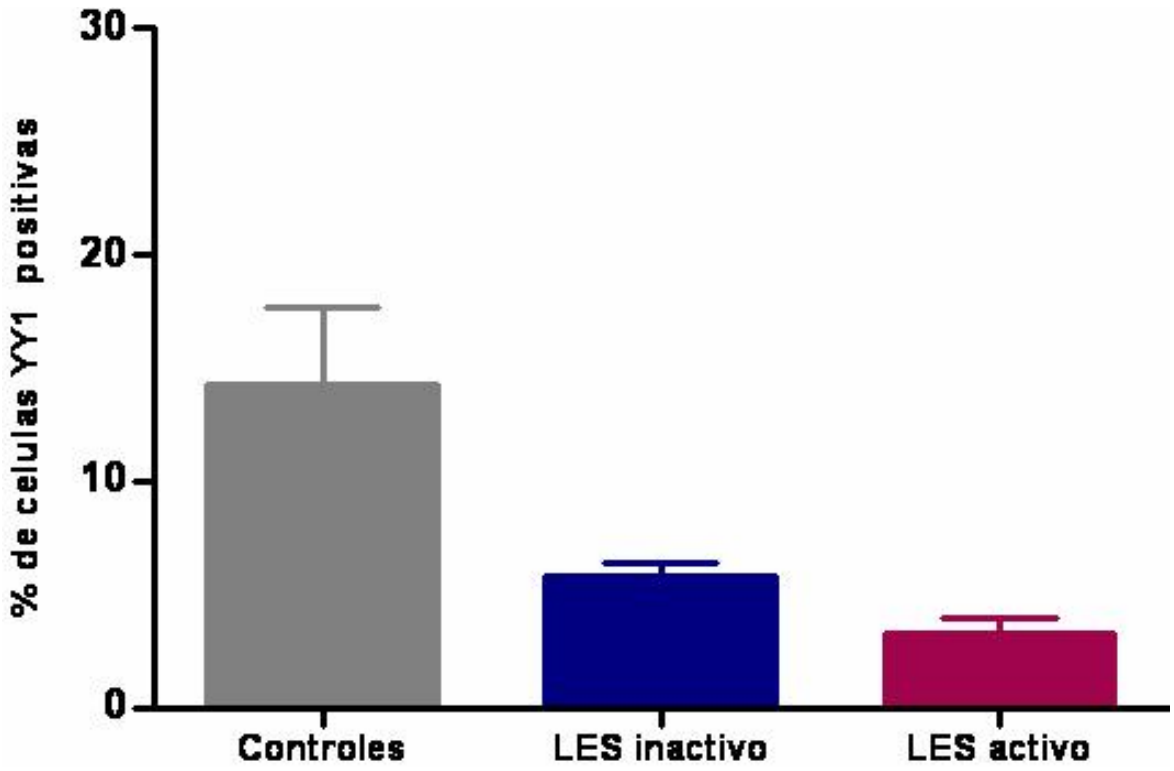


Figura 8. Número de células positivas para YY1. Cada Barra representa la media de cada uno de los grupos del número de células positivas (las células teñidas de color café). Después de la citoinmunohistoquimica, se contaron 200 células por laminilla, y se calculo el porcentaje. Se observa una disminución en el número de células positivas para YY1 en el grupo de LES inactivo, el cual es mas evidente en el grupo de LES activo *(*p*= 0.01 LES inactivos *vs* Controles, ***p*= 0.001, LES activos vs Controles. Análisis de variancia, ANOVA).

11. REFERENCIAS

1. James T.Cassidy, Ross E.Petty. Texbook of Pediatric Rheumatology. 5thed. 2005.

2. Wallace D.J., Hannahs B. Dubois`Lupus Erythematosus. 5ed. New York: 1997.

3. Sallmann DS, Fiebig B, Hedrich CM, Heubner G, Gahr M. [Systemic lupus erythematosus in children and adolescents.]. Z.Rheumatol. 2006.

4. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. Lupus 2006;15(5):308-18.

5. Sawhney S, Magalhaes CS. Paediatric rheumatology--a global perspective. Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol. 2006;20(2):201-21.

6. Beresford MW, Davidson JE. Adolescent development and SLE. Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol. 2006;20(2):353-68.

7. Javier Orozco Alcala. Reumatologia en niños. 1ed. 2003.

8. Childs SG. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Orthop.Nurs. 2006;25(2):140-5.

9. Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. Br.J.Rheumatol. 1997;36(2):158-63.

10. Funauchi M, Sugiyama M, SukYoo B, Ikoma S, Ohno M, Kinoshita K et al. A possible role of apoptosis for regulating autoreactive responses in systemic lupus erythematosus. Lupus 2001;10(4):284-8.

11. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. Ann.Rheum.Dis. 1999;58(5):309-14.

12. Makino H, Sugiyama H, Yamasaki Y, Maeshima Y, Wada J, Kashihara N. Glomerular cell apoptosis in human lupus nephritis. Virchows Arch. 2003;443(1):67-77.

13. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2000;43(1):76-84.

14. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br.J.Cancer 1972;26(4):239-57.

15. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. Blood 1996;88(2):386-401.

16. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. Toxicology 2002;181-182:471-4.

17. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. J.Clin.Invest 1998;102(2):274-82.

18. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1998;95(2):681-6.

19. Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, Galati G, Nebbia G, Tincani A et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. II. Role of beta2-glycoprotein I. Arthritis Rheum. 1998;41(2):215-23.

20. Bickerstaff MC, Botto M, Hutchinson WL, Herbert J, Tennent GA, Bybee A et al. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. Nat.Med. 1999;5(6):694-7.

21. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. Nat.Genet. 1998;19(1):56-9.

22. Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA et al. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. J.Exp.Med. 2002;196(1):135-40.

23. Paul E, Carroll MC. SAP-less chromatin triggers systemic lupus erythematosus. Nat.Med. 1999;5(6):607-8.

24. Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. J.Exp.Med. 1998;188(2):387-92.

25. Trebeden-Negre H, Weill B, Fournier C, Batteux F. B cell apoptosis accelerates the onset of murine lupus. Eur.J.Immunol. 2003;33(6):1603-12.

26. Yung R, Kaplan M, Ray D, Schneider K, Mo RR, Johnson K et al. Autoreactive murine Th1 and Th2 cells kill syngeneic macrophages and induce autoantibodies. Lupus 2001;10(8):539-46.

27. Seery JP, Cattell V, Watt FM. Cutting edge: amelioration of kidney disease in a transgenic mouse model of lupus nephritis by administration of the caspase inhibitor carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(beta-o-methyl)-fluoromethylketone. J.Immunol. 2001;167(5):2452-5.

28. Kalled SL, Cutler AH, Burkly LC. Apoptosis and altered dendritic cell homeostasis in lupus nephritis are limited by anti-CD154 treatment. J.Immunol. 2001;167(3):1740-7.

29. Koh JS, Wang Z, Levine JS. Cytokine dysregulation induced by apoptotic cells is a shared characteristic of murine lupus. J.Immunol. 2000;165(8):4190-201.

30. Perniok A, Wedekind F, Herrmann M, Specker C, Schneider M. High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. Lupus 1998;7(2):113-8.

31. Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J.Immunol. 1994;152(7):3685-92.

32. Grondal G, Traustadottir KH, Kristjansdottir H, Lundberg I, Klareskog L, Erlendsson K et al. Increased T-lymphocyte apoptosis/necrosis and IL-10 producing cells in patients and their spouses in Icelandic systemic lupus erythematosus multicase families. Lupus 2002;11(7):435-42.

33. McConnell JR, Crockard AD, Cairns AP, Bell AL. Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage. Clin.Exp.Rheumatol. 2002;20(5):653-60.

34. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2003;48(10):2888-97.

35. Kaplan MJ, Lewis EE, Shelden EA, Somers E, Pavlic R, McCune WJ et al. The apoptotic ligands TRAIL, TWEAK, and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells. J.Immunol. 2002;169(10):6020-9.

36. Shoshan Y, Shapira I, Toubi E, Frolkis I, Yaron M, Mevorach D. Accelerated Fas-mediated apoptosis of monocytes and maturing macrophages from patients with systemic lupus erythematosus: relevance to in vitro impairment of interaction with iC3b-opsonized apoptotic cells. J.Immunol. 2001;167(10):5963-9.

37. Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T, Herrmann M, Kuhnel A, Manger B et al. In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. Arthritis Rheum. 1997;40(2):306-17.

38. Kaplan MJ, Lu Q, Wu A, Attwood J, Richardson B. Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4+ lupus T cells. J.Immunol. 2004;172(6):3652-61.

39. Kaplan MJ. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. Clin.Immunol. 2004;112(3):210-8.

40. Karsan A, Yee E, Harlan JM. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. J.Biol.Chem. 1996;271(44):27201-4.

41. Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Kiener H, Presterl E, Jaeger U et al. High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1994;37(10):1423-30.

42. Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. Lupus 2001;10(12):866-72.

43. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, McConnell J, Kennedy RJ, Bell AL. Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. Lupus 1999;8(7):508-13.

44. Papo T, Parizot C, Ortova M, Piette JC, Frances C, Debre P et al. Apoptosis and expression of soluble Fas mRNA in systemic lupus erythematosus. Lupus 1998;7(7):455-61.

45. Badillo-Almaraz I, Daza L, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R. Glomerular expression of Fas ligand and Bax mRNA in lupus nephritis. Autoimmunity 2001;34(4):283-9.

46. Tsao BP, Cantor RM, Grossman JM, Shen N, Teophilov NT, Wallace DJ et al. PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. J.Clin.Invest 1999;103(8):1135-40.

47. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1998;41(7):1241-50.

48. Cairns AP, Crockard AD, McConnell JR, Courtney PA, Bell AL. Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. Ann.Rheum.Dis. 2001;60(10):950-5.

49. Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. Cell 1991;67(2):377-88.

50. Seto E, Shi Y, Shenk T. YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. Nature 1991;354(6350):241-5.

51. Flanagan JR, Becker KG, Ennist DL, Gleason SL, Driggers PH, Levi BZ et al. Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. Mol.Cell Biol. 1992;12(1):38-44.

52. Shrivastava A, Saleque S, Kalpana GV, Artandi S, Goff SP, Calame K. Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. Science 1993;262(5141):1889-92.

53. Shrivastava A, Calame K. An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. Nucleic Acids Res. 1994;22(24):5151-5.

54. Shi Y, Lee JS, Galvin KM. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... Biochim.Biophys.Acta 1997;1332(2):F49-F66.

55. Garban HJ, Bonavida B. Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. J.Immunol. 2001;167(1):75-81.

56. Hongo F, Garban H, Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi AR, Mizutani Y et al. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. Biochem.Biophys.Res.Commun. 2005;336(2):692-701.

57. Huerta-Yepez S, Vega M, Garban H, Bonavida B. Involvement of the TNF-alpha autocrine-paracrine loop, via NF-kappaB and YY1, in the regulation of tumor cell resistance to Fas-induced apoptosis. Clin.Immunol. 2006;120(3):297-309.

58. Gronroos E, Terentiev AA, Punga T, Ericsson J. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2004;101(33):12165-70.

59. Huerta-Yepez S, Matamoros t.Jose, Solis-Vallejo E, Gonzalez-Bonilla C.R. Participacion del factor de transcripcion Yin-Yang-1 (YY-1) en la regulacion de Fas asi como su correlacion con el tipo de lesion histopatologica en las biopsias renales de niños con nefritis lupica. Reumatologia 2006.