

11227  
133

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA "DR. DANIEL MÉNDEZ HERNÁNDEZ"

"LA INFLUENCIA DE LA CICLOFOSFAMIDA SOBRE LA APOPTOSIS  
LEUCOCITARIA Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE INFECCIONES  
EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO."

TESIS DE POSGRADO

No. 2003-690-0067

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA  
EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

**DRA. MARICELA VALERIO MINERO**

ASESORES:

DRA. OLGA LIDIA VERA LASTRA  
DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

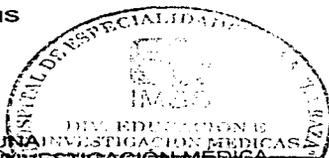
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

**PRESENTACIÓN DE TESIS**



DR. JESÚS ARENAS OSUNA  
JEFE DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN MÉDICA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN LA RAZA

FIRMA

DR. C. RAÚL ARIZA ANDRACA  
JEFE DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN LA RAZA

FIRMA

DRA. MARICELA VALERIO MINERO  
RESIDENTE DE MEDICINA INTERNA

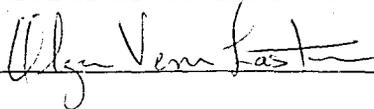
FIRMA

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
U.N.A.M.

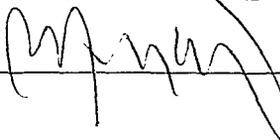
DRA. OLGA LIDIA VERA LASTRA  
MÉDICO INTERNISTA ADSCRITO AL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN LA RAZA

FIRMA



DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA  
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA E  
INFECTOLOGÍA  
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA CMN LA RAZA

FIRMA



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo científico.

NOMBRE: Mancera Valero Mineo

FECHA:

25/09/03

FIRMA:

Mancera Valero Mineo

No. DEFINITIVO DE TESIS

2003-690-0067

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TÍTULO:**

**"LA INFLUENCIA DE LA CICLOFOSFAMIDA SOBRE LA APOPTOSIS LEUCOCITARIA Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE INFECCIONES EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO."**

**PRESENTA:**

**Dra. Maricela Valerio Minero**  
Residente de Medicina Interna, HECMLR.

**LUGAR DE REALIZACIÓN:**

Departamento de Medicina Interna, Departamento de Reumatología.  
Hospital de Especialidades.  
Centro Médico Nacional La Raza.  
Seris y Zaachila s/n. Colonia La Raza, Azcapotzalco, México, D.F.

Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología.  
Hospital de Infectología.  
Centro Médico Nacional La Raza.

**INVESTIGADORES ASOCIADOS:**

**Dr. César Raúl González Bonilla.** Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología CMLR.  
**Dra. Guadalupe de los Angeles García Elorriaga.** Investigador asociado a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología CMLR.  
**Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez.** Investigador asociado a la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología CMLR.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**AGRADECIMIENTOS POR SU COLABORACIÓN EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ESTA TESIS A:**

**Dr. José Carlos Rangel Portilla**  
Médico adscrito al Servicio de Medicina Interna  
Hospital de Especialidades CMLR

**Dr. Moisés Casarrubias Ramírez**  
Médico adscrito al Servicio de Medicina Interna  
Hospital de Especialidades CMLR

**AGRADECIMIENTOS POR BRINDARME LAS FACILIDADES Y APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS A:**

**Dr. Miguel Angel Saavedra Salinas**  
Médico adscrito al Servicio de Reumatología  
Hospital de Especialidades CMLR

**Dr. Alfredo Alfaro Mejía**  
Médico adscrito al Servicio de Medicina Interna  
Hospital de Especialidades CMLR

**Dra. Alejandra Florenzano García**  
Médico adscrito al Servicio de Medicina Interna  
Hospital de Especialidades CMLR

**Dr. Ernesto Casillas Ramírez**  
Médico adscrito al Servicio de Infectología  
Hospital de Infectología CMLR

**L.C. María Esther Cervantes Flores**  
Laboratorista Clínico adscrito al Laboratorio de Inmunología  
Hospital de Especialidades CMLR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## ÍNDICE.

Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Sujetos, Mediciones e Intervenciones	23
Resultados	27
Discusión	31
Conclusiones	35
Referencias	36
Anexos	42
Tablas	47

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN.

Valeno M, Vera-Lasra O, Gonzalez CR. LA INFLUENCIA DE LA CICLOFOSFAMIDA SOBRE LA APOPTOSIS LEUCOCITARIA Y SU RELACION CON EL DESARROLLO DE INFECCIONES EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.

**Objetivo:** Determinar el efecto del tratamiento con pulsos de ciclofosfamida (CFM) sobre la apoptosis leucocitaria y su relación con la mayor frecuencia de infecciones reportada en estos pacientes.

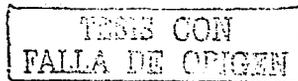
**Sujetos, Mediciones e intervenciones:** De octubre 2002 a julio 2003, se incluyeron 11 pacientes, admitidos al HECMMLR, de los Departamentos de Medicina Interna o Reumatología. Se seleccionaron pacientes con los siguientes criterios de inclusión: que cumplieran con al menos 4 criterios para LES según la clasificación del ACR, de entre 18 y 55 años, de ambos sexos, que recibieran tratamiento con pulsos de CFM por nefropatía lúpica y/o lupus neuropsiquiátrico, sin infección previa al pulso de CFM y que recibieran tratamiento con prednisona v.o.< 25mg/d. Criterios de no inclusión: Infección en al menos un mes previo al pulso de ciclofosfamida, tratamiento con pulsos de metilprednisona concomitantemente en dos meses previos al estudio, tratamiento con ciclospolina A o micofenolato de mofetilo. Criterios de exclusión: Si se perdieron por no acudir al seguimiento. Se tomaron muestras basales, a los 14 y a los 21 días posteriores al pulso de CFM de: BHC, Ac-antiDNA, ANA, C3 y C4, ESO, urocultivo, exudado faríngeo. Se tomó muestra de sangre para medir apoptosis leucocitaria tardía por TUNEL. Con examen físico se descartó cualquier infección y se estableció la actividad lúpica por SLEDAI basal y en el seguimiento. Se aplicó pulso de CFM a dosis de 1g/m<sup>2</sup> /sc. Las visitas de seguimiento fueron a los 14 y 21 días post-pulso. Se reportaron las infecciones, corroborándolas mediante cultivos o pruebas serológicas. Análisis estadístico. Se usó estadística descriptiva, con medias y desviación estándar. Pruebas de T pareada para comparación de las medias de las variables antes y después del tratamiento. En el análisis bivanado se usaron pruebas de correlación y regresión logística. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 10 para Windows.

**Resultados:** Se obtuvieron un total de 11 pacientes, 8 mujeres (72.7%) y 3 hombres (27.3%), con un rango de edad de 17 a 47 años (media = 31.36 años). La dosis de prednisona media fue 12.95mg/d +/- 9.6mg/d. La dosis acumulada de CFM media fue de 7822mg +/- 2899mg. Se encontró una diferencia de 2.35 entre el SLEDAI basal y a los 14 días (p=0.04). La diferencia entre el SLEDAI basal y a los 21 días fue de 2.043 (p=0.06). No hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar SLEDAI del día 14 con el del día 21.

Encontramos una diferencia de 2.94 entre el % de apoptosis de neutrófilos basal vs. % de apoptosis de neutrófilos al día 14 (p=0.015). La diferencia entre el % de apoptosis de neutrófilos basal vs. % de apoptosis de neutrófilos al día 21 fue de 3.063 (p=0.012). No hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar el porcentaje de apoptosis de neutrófilos al día 14 vs. el día 21. Hubo dos casos de pacientes que presentaron infección, el primero ocurrió a los 14 días de la aplicación del pulso y se trató de una rinoanginitis viral. El segundo caso fue una infección genital por herpes simple que inició 12 días después del pulso. No existió una correlación estadísticamente significativa entre el SLEDAI y el porcentaje de apoptosis de neutrófilos.

**Conclusiones:** El porcentaje de apoptosis de neutrófilos basal en pacientes con LES MCA, renal y de sistema nervioso central fue de 21.54, dicho porcentaje disminuye posterior a la administración de CFM. La actividad de la enfermedad medida por SLEDAI disminuyó con la administración de CFM aunque no se correlacionó con el porcentaje de apoptosis.

**Palabras Clave:** Lupus eritematoso sistémico, tratamiento ciclofosfamida, apoptosis leucocitaria, infecciones.



## ABSTRACT.

**Valerio M, Vera-Lastra O, González CR. THE INFLUENCE OF CYCLOPHOSPHAMIDE IN THE LEUKOCYTE APOPTOSIS AND ITS RELATIONSHIP WITH INFECTIONS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE).**

**Objective:** To assess the effect of the treatment with pulses of cyclophosphamide (CFM) on the white blood cells apoptosis and its relationship with the increased frequency of infections reported in these patients

**Subject, Measurements and Interventions:** Between October 2002 and July 2003 11 patients of the Internal Medicine or Rheumatology departments of HECMNLR were included. Patients were selected based on the following inclusion criteria: at least 4 diagnostic criteria of SLE according to ACR, age between 16 and 55 y.o., both sexes, under treatment with CFM for glomerulonephritis or neurologic activity, without infection, and prednisone at doses <25mg/d. Non-inclusion criteria: infection in at least one month before the CFM pulse, treatment with methylprednisolone two months before, treatment with cyclosporine A or mycophenolate. Exclusion criteria: if the patient did not come for the follow-up measurements. CBC, urinalysis, ANA, ADNA, C3, C4, urocultive, faringial exudate, were obtained at the day of the pulse and afterwards at days 14 and 21. A blood sample for leukocyte apoptosis by TUNEL technique was also taken in the same days. With a physical exam all kinds of infections were excluded. When one was present it was corroborated by laboratory tests. The disease activity was measured by SLEDAI. Cyclophosphamide was administrated intravenously at a dosage of 1g/ m<sup>2</sup> of body surface. The follow-up visits were at days 14 and 21. Statistical analysis: Descriptive statistic, including paired-T for the comparison of the means. The bivariate analysis was made with correlations and regressions. SPSS version 10 for Windows was used

**Results:** Eleven patients were obtained, 8 females (72.7%) and 3 males (27.3%), ages ranging from 17 to 47 years (mean = 31.36 years). The average amount of prednisone dosage was 12.95mg/d ± 9.5mg/d. The cumulative dosage of CFM was 7322mg ± 2599mg. A difference of 2.35 was found between the basal SLEDAI and the day 14 SLEDAI (p=0.04). The difference between basal SLEDAI and the day 21 SLEDAI was 2.043 (p=0.06). There was no significative statistical difference between SLEDAI at day 14 and SLEDAI at day 21. A significative difference of 2.94 was found between the basal % of apoptotic neutrophils vs. the % of apoptotic neutrophils at day 14 (p=0.015). The difference between the basal % of apoptotic neutrophils and the % of apoptotic neutrophils at day 21 was 3.068 (p=0.012). There was no significant statistical difference between the % of apoptotic neutrophils in days 14 and 21. Two infections were reported: the first was a viral rhinorhinitis at day 14 after pulse, and the second one an herpes simplex genital infection that occurred at day 12 after pulse. No correlation was found between SLEDAI and % of apoptotic neutrophils.

**Conclusions:** The percentage of apoptotic neutrophils in patients with mucocutaneous, articular, renal and neurologic SLE is of 21.54 and it decreased after the treatment with intravenous cyclophosphamide. The disease activity (SLEDAI) diminished after the treatment with intravenous cyclophosphamide, but it did not correlate with the percentage of apoptotic neutrophils.

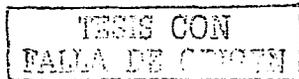
**Key words:** Systemic lupus erythematosus, treatment, cyclophosphamide, apoptotic leukocytes, infections.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN.

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos contra diversos elementos subcelulares, los cuales generan procesos de hipersensibilidad de tipo II y III. Se han descrito múltiples alteraciones del sistema inmunológicos en el LES. Las más importantes implican: a) *repertorio inmunológico limitado*, tanto en linfocitos T antígeno específicos, como en los patogénicos; b) *proporción incrementada de linfocitos circulantes productores de IL-10*, respecto a aquellos productores de INF $\gamma$  sobre todo cuando el padecimiento se encuentra activo; c) *mecanismos alterados de señalización de los linfocitos T*, debido a que hay un incremento de calcio intracelular mediado por activación de CD3; d) *expresión anormal de moléculas de adhesión tanto en endotelio como en leucocitos*; y e) *falla en la expresión de B7-1 (CD80) en células dendríticas estimuladas con IFN $\gamma$  que conduce a disminución de las respuestas secundarias* (1).

En el LES es necesaria la participación de factores ambientales y genéticos para que se desarrolle la enfermedad (2). La prevalencia mundial es de 14.6 a 50.8 casos por 100,000 habitantes. Su incidencia fluctúa entre 1.8 a 7.6 casos por 100,000 habitantes, siendo una enfermedad que afecta principalmente a personas jóvenes de entre 15 y 44 años de edad(3). Aunque inicialmente se describió que la mortalidad en LES tiene una distribución unimodal en ambos sexos, con un pico en el grupo de 45 a 54 años de edad entre personas de piel negra y de 65 a 74 años de edad en blancos, posteriormente se describió una distribución bimodal, que se caracteriza por mortalidad temprana, debida a actividad de la enfermedad y sepsis, y tardía por enfermedades crónico degenerativas (4). Sin embargo, se ha descrito un cambio en las causas de muerte en pacientes con LES dependiendo de la edad, (5). En un estudio realizado en Nueva York con 209 pacientes de 1957 a 1968 la causa principal de las 49 muertes registradas fue la uremia 39%, nefritis lúpica 27%, infecciones 22%. En un estudio multicéntrico, en el cual se analizaron 1103, pacientes, se reportaron 22 muertes entre 1965 y 1976 (6),



donde las mayores causas de muerte fueron infecciones en 18%, enfermedad renal 18%, enfermedad del sistema nervios central 7% y enfermedades cardiovasculares 6%. En un estudio de 10 años de seguimiento de 1980 a 1989, el cual incluyó 570 pacientes con LES, se encontró que las causas más comunes de muerte fueron enfermedad activa 35% sepsis 19%, enfermedad vascular cerebral 15% y enfermedad cardiovascular 9% (7).

Con estos antecedentes se puede concluir que las muertes en los pacientes con LES durante los primeros 5 años posteriores al diagnóstico se deben a actividad de la enfermedad, a infecciones asociadas, al empleo de esteroides e inmunosupresores; mientras que las del grupo de más de 10 años de evolución, tienden a morir por complicaciones de la enfermedad aterosclerótica. Entre las causas de muerte atribuibles a la actividad lúpica están el compromiso renal y del SNC, la vasculitis sistémica y las infecciones. Las infecciones pueden ser bacterianas, micóticas, virales o involucrar múltiples microorganismos, casi siempre en el contexto de un LES activo, o ser causadas por gérmenes oportunistas, en el caso de pacientes con altas dosis de esteroides y terapia citotóxica.

El LES por sí mismo, debido a la disfunción inmunológica que lo acompaña, puede explicar el incremento de la susceptibilidad a infecciones. Sin embargo, el tratamiento inmunosupresor y los corticosteroides pueden afectar también la inmunidad. En 1987, un estudio que analizó la mortalidad por LES en un período de 40 años, reportó que las infecciones representaron un 27% de las causas de muerte (8). Posteriormente, otro estudio multicéntrico reportó que un 33% de muertes se debían a infección como diagnóstico principal y en otro 10% la infección era una de las causas contribuyentes (6)

Las infecciones más frecuentemente encontradas en LES se deben a *Staphylococcus sp.* y a *Escherichia coli*, pero ocasionalmente se reportan gérmenes oportunistas, hongos, virus, protozoarios. Se ha reportado que en

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

pacientes hospitalizados por LES la infección más común es la del tracto urinario (9) y que cerca de la mitad de los pacientes que desarrollaron infecciones tuvieron múltiples episodios de las mismas, con recurrencias más frecuentes en el caso de organismos oportunistas como *Candida albicans*. Una revisión del año 1991 realizada en Toronto, Canadá, encontró que la incidencia de infección fue de 1.94 por 100 días-hospital y cerca de la mitad de estas infecciones requirieron tratamiento antibiótico, incluyendo: neumonía, artritis séptica, bacteremia, pielonefritis, abscesos abdominales, endometritis y candidiasis esofágica. (10)

Los corticoesteroides constituyen la primera opción terapéutica para la mayoría de las complicaciones no infecciosas del LES, en combinación con varios agentes inmunosupresores como la ciclofosfamida. (11). Se ha descrito que la prednisona es un factor de riesgo para desarrollar infecciones por *Salmonella*, *Candida*, *Strongyloides* y *Aspergillus sp.*(8) y que una dosis de 0 a 50 mg/d de correlaciona con incremento de infecciones (9). Sin embargo, otros estudios han encontrado que las infecciones en pacientes hospitalizados con LES están asociadas a la actividad de la enfermedad independientemente de la dosis de prednisona y que la mortalidad es mayor en los pacientes que presentan infección junto con altos índices de actividad del LES (10).

Las acciones farmacológicas de los corticoesteroides predisponen a infección porque alteran diversas funciones del sistema inmunológico. Afectan los mecanismos de tránsito de los leucocitos, promueven la liberación de neutrófilos de la médula ósea, pero disminuyen su capacidad de desplazarse al espacio intersticial, consecuentemente incrementan su número y vida media en circulación. En contraste, el resto de poblaciones leucocitarias disminuyen de la circulación debido a que son secuestrados en los órganos linfoides primarios y secundarios. El efecto más evidente es la monocitopenia pronunciada. Además del número y distribución, los esteroides también se alteran las funciones de los leucocitos. En relación a los neutrófilos, se sabe que aunque los mecanismos de quimiotaxis y la producción de enzimas lisosomales parecen no estar afectados, las enzimas

TEMAS CON  
FALLA DE ORIGEN

proteolíticas no lisosomales, como colagenasa y el activador de plasminógeno, se encuentran disminuidas (12). Las funciones de los linfocitos también se encuentran alteradas. Los corticosteroides inhiben la recirculación de linfocitos T CD4+, su proliferación e inducen apoptosis (13).

Los esteroides disminuyen la síntesis y liberación de IL-2, por los que hay mayores efectos sobre linfocitos T, aunque a dosis altas pueden causar disminución en las concentraciones de IgG y IgA circulantes. El mecanismo parece involucrar el aumento de la transcripción de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , el cual es un inhibidor del factor de transcripción NF $\kappa$ B, el cual está implicado en la transcripción de diversas citocinas (12,14).

El tratamiento con agentes inmunosupresores como la azatioprina y la ciclofosfamida se ha implicado como un factor de riesgo para infección. En pacientes hospitalizados se ha correlacionado la actividad lúpica (SLEDAI) con la incidencia de infecciones, encontrando que un 35% de los pacientes con LES estudiados eran hospitalizados por actividad de la enfermedad, y que un factor de riesgo para hospitalización por infección era la actividad de la enfermedad, el uso de drogas inmunosupresoras y dosis de prednisona mayores a 20mg diarios (15).

Se ha postulado que una saturación de los receptores Fc en el hígado y en el bazo, por inmunocomplejos circulantes, impide la depuración correcta de las bacterias opsonizadas (16). Esto podría explicar la alta incidencia de bacteremia neumocócica y el estado de portador crónico de *Salmonella* en pacientes con LES, lo cual predispone a artritis y osteomielitis por *Salmonella* (17). En los pacientes adultos de mayor edad con LES existe un riesgo mayor de muerte por infección con *Salmonella* sobre todo cuando se presentan reinfecciones.(18). En un estudio realizado en México se encontró que los pacientes que cursaban con glomerulonefritis presentaban mayor riesgo de ser portadores crónicos de *Salmonella enteritidis* y de desarrollar artritis por esta bacteria, sobre todo al recibir prednisona (19).

TOME CON  
FALLA DE ORIGEN

En 7 a 10 % de los pacientes con LES se ha identificado asplenia funcional, la cual se ha implicado en el desarrollo de septicemia por *Streptococcus pneumoniae* o *Salmonella* (20). Por otro lado, las anomalías de la inmunidad celular contribuyen al desarrollo de infecciones por gérmenes oportunistas (21).

A pesar de que las infecciones son una causa de morbilidad y mortalidad muy importante en los pacientes con LES, no existe un consenso sobre el papel de la leucopenia como factor pronóstico para infecciones. Uno de los mecanismos que propiciaría la leucopenia podría ser la apoptosis de los leucocitos.

Existe numerosa evidencia de que la apoptosis anormal juega un papel importante en la patogenia del LES. Por ejemplo, los pacientes presentan numerosos linfocitos apoptóticos en sangre. Los linfocitos T circulantes, pero no los linfocitos B, de los pacientes presentan expresión anormalmente alta de bcl-2, fenómeno que correlaciona con el grado de actividad de la enfermedad (22). Las mutaciones de Fas resultan en síndrome linfoproliferativo y desarrollo acelerado de autoinmunidad (23). Los linfocitos B y T de pacientes con LES presentan incremento en la expresión de Fas (CD95) (24) y se ha descrito que la apoptosis se presenta de manera preferencial en linfocitos T CD4+ Th1 (25). Los pacientes también presentan niveles séricos elevados de Fas soluble que parece correlacionar con la proporción de linfocitos apoptóticos y con anticuerpos contra DNA de doble cadena (26).

Se ha señalado que en LES hay un incremento de neutrófilos circulantes que expresan Fas y desarrollan apoptosis y que este fenómeno correlaciona con actividad de la enfermedad pues hay una disminución del aclaramiento de complejos inmunes (27). Aunque la mayoría de los autores concuerdan en que las células apoptóticas en LES pueden proporcionar una fuente extracelular de antígenos nucleares que estimulan la respuesta autoinmune, la inducción de autoanticuerpos y la formación de complejos inmunes. La información en cuanto a

la correlación de apoptosis con actividad y la eficacia de la medicación inmunosupresora es controversial (28).

La endocitosis no inflamatoria de células apoptóticas se encuentra reducida y se ha postulado que la persistencia de los desechos apoptóticos circulantes sirven como inmunógenos para la inducción de linfocitos autorreactivos con la consecuente formación de complejos inmunes (29). En este proceso se ha implicado a CD44, una molécula que participa en la eliminación de neutrófilos en apoptosis, pues se encuentra reducida en los monocitos y polimorfonucleares de los pacientes (30).

El papel de la apoptosis como regulador de las respuestas autoreactivas en el LES (31). Determinaron apoptosis temprana de linfocitos periféricos mediante la técnica de citometría de flujo, usando anexina V, la cual se une a los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina de la superficie celular. Previamente se tenía el conocimiento de que el LES *per se* condiciona una disfunción de las células T, predominantemente de las funciones de las Th1, como es la producción de IL-2. Se determinó apoptosis en las células Th1 de pacientes con LES, dividiendo a la población estudiada en dos grupos, los que tenían actividad de la enfermedad, y los que estaban inactivos, de acuerdo al SLEDAI, considerando un puntaje de  $6.3 \pm 3.7$  como activo y un puntaje de  $1.5 \pm 1.2$  como inactivo. Esto se comparó con controles sanos. Se analizó a las células mononucleares antes y después del tratamiento con prednisona a dosis de 30 a 50mg diarios. Finalmente, encontraron que en ambos grupos de pacientes, tanto activos como inactivos, los índices de unión a anexina V fueron significativamente mayores que en los pacientes sanos. Hubo una tendencia a mayores índices de unión a anexina V en los pacientes con LES inactivo, y a menores índices de unión en los pacientes con altos títulos de anti-DNA y en aquellos con bajos niveles de CH<sub>50</sub>. No se encontró correlación entre la cuenta leucocitaria, el número de linfocitos, la velocidad de sedimentación globular, la edad ni la dosis de adrenocorticosteroides y los índices de unión a la anexina V. Estos hallazgos son inconsistentes con lo reportado

LES CON  
FALLA DE ORIGEN

previamente en la literatura, por lo que los autores deducen que ésto podría deberse a una diferencia en la evaluación de los índices de actividad del LES. Además, estiman que dentro de su estudio no se pudo evaluar la apoptosis tardía, ya que ésta no se detecta con la técnica de unión a la anexina V. Finalmente estos autores encontraron que las células B y las células T CD4+, en especial las Th1 son más sensibles a presentar apoptosis en pacientes con LES.(31).

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que se puede llevar a cabo a través de dos vías. La primera vía corresponde a los "ligandos de muerte" y a la segunda se denomina "vía mitocondrial". En la vía de los "ligandos de muerte" el evento inicial es la unión de un ligando (TNF $\alpha$ , Fas-L, TRAIL) a un receptor de la membrana celular, lo cual desencadena el reclutamiento de un complejo de proteínas (TRADD y FADD), que al unirse a procaspasa-8 forman el llamado "complejo de muerte", que es inductor de la activación de caspasa-8. La activación de toda la cascada de caspasas (incluyendo caspasa -7 y caspasa-6), lleva a la activación de la caspasa-3, que inicia la degradación del DNA. Por otro lado, la vía mitocondrial requiere de la despolarización de la membrana mitocondrial. Esta vía también parte de la procaspasa-8 que activa la proteína BID. La despolarización de la membrana mitocondrial lleva a la liberación citoplasmática del citocromo C y de la proteína Smac/DIABLO. Estas proteínas participan en la formación del apoptosoma que finalmente activa la caspasa-9 que a su vez activa la caspasa-3.

Se sabe que la regulación de la muerte celular programada es importante en gran número de enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes y los desórdenes degenerativos. La exposición a ciertos estímulos químicos o físicos puede inducir apoptosis; por ejemplo, corticoesteroides, agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa, radiación gamma o ultravioleta. Incluso algunos estímulos como la isquemia y el peróxido de hidrógeno pueden inducir tanto necrosis como apoptosis, dependiendo de la dosis (32).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Muchos fármacos pueden tener influencia sobre las vías apoptóticas. Entre los usados para pacientes con LES están los AINES, los corticosteroides, la ciclosporina, la azatioprina y la ciclofosfamida. Los glucocorticoides a altas dosis inducen la muerte de las células linfoides, modulan la expresión de un gran número de moléculas, como las citocinas, que podrían afectar las vías apoptóticas. Los pacientes con terapia esteroidea a largo plazo son susceptibles de desarrollar osteoporosis y osteonecrosis lo que se puede explicar por pérdida ósea causada por la apoptosis de osteoblastos y osteocitos. (33) Los AINES cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), la cual reduce la producción de citocinas y prostaglandinas, también son efectivos en la quimioprevención de tumores colorectales en individuos genéticamente susceptibles. Sus propiedades antineoplásicas pueden ser explicadas por un incremento en el ácido araquidónico y en la conversión de esfingomiélin a ceramida, un lípido proapoptótico (34).

Dentro de las drogas inmunomoduladoras que se utilizan para tratar a los pacientes con LES se encuentra la ciclosporina. Este medicamento modula la respuesta inmune mediada por células T y B al interferir con la transcripción del gene de IL-2, la activación de la sintasa de óxido nítrico (NOS), la degranulación celular y la apoptosis (32). Por último, las drogas citotóxicas o inmunosupresoras que inducen el suicidio de los linfocitos vía p54, ejercen cierto efecto anti-inflamatorio.

La ciclofosfamida, un agente alquilante, es una oxazafosforina con grupos dicloroétilos, que requiere ser procesada por el citocromo P450 para producir sus metabolitos activos, mostaza de fosforamida y acroleína, las cuales alquilan DNA y proteínas, respectivamente. Este medicamento ha sido utilizado ampliamente en el tratamiento del cáncer y es especialmente tóxica para células linfoides, por lo que se utiliza también como inmunosupresor (35) La ciclofosfamida administrada por vía intravenosa por períodos prolongados, en asociación con los corticosteroides, se ha convertido es el estándar de oro en el tratamiento actual

LES CON  
FALLA DE ORIGEN

de la nefritis lúpica, sobre todo de las formas más serias como la proliferativa.(38,37).

La administración mensual intravenosa de pulsos de ciclofosfamida se asocia a disminución substancial del LES, en conjunción con discretos cambios en los marcadores para linfocitos T y la función de las células T. (38) Aunque los efectos tóxicos de la ciclofosfamida se deben a su alta reactividad química, que causa alteraciones de macromoléculas debido a entrecruzamientos covalentes, el resultado funcional no se ha aclarado totalmente y se ha postulado que depende de la célula blanco, dosis y tiempo de exposición. La información en cuanto a la inducción de apoptosis o necrosis es controversial. En células espermáticas germinales, la ciclofosfamida induce la expresión de genes de respuesta de estrés (39) y sobrevida de células dañadas que pueden causar malformaciones congénitas (40). En tanto que en células tumorales hiperproductoras de citocromo P450, y por tanto muy sensibles a la ciclofosfamida, presentan muerte por apoptosis (41) otras líneas celulares que también sobreproducen el citocromo P450, muestran muerte por mecanismos de necrosis (42).

Sin embargo, existen numerosas evidencias que demuestran que la ciclofosfamida causa apoptosis. Entre éstas, se ha descrito que ocasiona alteraciones en la membrana celular con exposición de fosfatidilserina, una de las primeras manifestaciones de apoptosis (43). Se ha demostrado que dosis relativamente bajas de ciclofosfamida son capaces de causar apoptosis en células de timo de rata, como resultado de la inducción de interacciones entre Fas y Fas-L (44). En ratones seniles las dosis bajas de ciclofosfamida también producen apoptosis de timocitos, pero sorprendentemente inducen un efecto paradójico de inmunopotenciación debido a la recuperación de la poblaciones linfocitarias (45). Los fenómenos de apoptosis contribuyen en la cardiomiopatía (46) y la alopecia (47) que se presenta posterior a la administración de ciclofosfamida.

TEMAS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las células de médula ósea y bazo son especialmente sensibles a la apoptosis inducida por ciclofosfamida (48,49). Este fenómeno ha sido evaluado en modelos animales *in vivo* mediante experimentos de incorporación de anexina V radiomarcada con  $^{99}\text{Tc}$  (50). En ensayos clínicos se ha demostrado que la incorporación de anexina V radiomarcada con  $^{99}\text{Tc}$ , después del tratamiento con medicamentos contra el cáncer, correlaciona con mejoría clínica y supervivida (51).

También se ha observado una reducción de las inmunoglobulinas *in vivo* particularmente IgM. Los datos relacionados con el efecto de la ciclofosfamida en el funcionamiento de las células T son más variables. A pesar de que la ciclofosfamida causa afección de la médula ósea afectando todas las líneas celulares, la neutropenia se toma en cuenta como parámetro de toxicidad para limitar la dosis. Se ha visto que la producción de los neutrófilos y su destrucción están reducidas en comparación a los valores iniciales antes de iniciar la ciclofosfamida (52).

La terapia de ciclofosfamida en pulsos se ha asociado con una reducción transitoria de los linfocitos circulantes y los neutrófilos posterior al pulso. Este nadir ocurre, aproximadamente dos semanas después de cada dosis, y la cuenta leucocitaria regresa a la línea basal aproximadamente 4 semanas después del pulso (52).

Los pulsos de ciclofosfamida han sido asociados a una reducción de las células T, que persiste después de completar la terapia con citotóxico; los linfocitos B regresan a los niveles previos al tratamiento, al cabo de un mes de haber descontinuado la ciclofosfamida. El riesgo de complicaciones infecciosas en pacientes con LES recibiendo pulsos de ciclofosfamida es similar al que se observa en pacientes que reciben terapia oral diaria (53).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Existen estudios que reportan como factores de riesgo significativos para la presencia de infecciones la severidad de los brotes, la glomerulonefritis lúpica, el tratamiento oral e intravenoso con corticosteroides, los pulsos de ciclofosfamida y la plasmáferesis. Pero no se han identificado predictores que puedan determinar al momento del diagnóstico la susceptibilidad a enfermedades. Sólo los corticosteroides I.V. y los inmunosupresores son factores de riesgo independiente para infecciones. Las infecciones a su vez resultaron ser el único factor de riesgo independiente para muerte después de 10 años de evolución con el diagnóstico de LES (54). Sin embargo, existen ya estudios que han encontrado un incremento de la apoptosis de los neutrófilos en sangre periférica de pacientes con LES. Un estudio de Courtney y cols. que incluyó 50 pacientes con LES, en quienes determinó apoptosis de neutrófilos mediante unión a anexina V, comparándola con 20 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y pacientes con Artritis reumatoide, al mismo tiempo lo comparó con la sangre de controles sanos. Encontrando que la apoptosis de neutrófilos en sangre periférica estaba incrementada en los pacientes con LES (media de 3.25%) vs. los controles sanos (media=1.20%) y los pacientes con Artritis reumatoide (media=1.15%) y enfermedad inflamatoria intestinal (media=1.15%). La apoptosis de neutrófilos se correlacionó positivamente con la actividad de la enfermedad medida mediante SLAM (Systemic Lupus Activity Measure). Se encontró que los pacientes con altos títulos de anticuerpos antiDNA bicatenario ( $\geq 10\text{mg/ml}$ ) tenían incremento en los neutrófilos apoptóticos. En dicho estudio se eliminaron a los pacientes que recibieron citotóxicos, pero se consideró el tratamiento con corticosteroides, no encontrando correlaciones inversamente significativas entre la dosis de corticosteroides y la apoptosis de neutrófilos. Se dividió a los pacientes en dos grupos: Aquellos con dosis menores de 7.5 mg diarios de prednisona y otro con dosis mayores a 7.5mg diarios, sin encontrar diferencias entre la apoptosis de neutrófilos de los dos grupos. Se sabe que la apoptosis de neutrófilos está mediada por Fas y el ligando de Fas, los cuales se asocian a la expresión de fosfatidilserina en la superficie celular. En los humanos con LES se ha reportado un incremento en la expresión linfocitaria de Fas, pero se piensa que ésta no es

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

específica del LES. Este mismo estudio encontró que la expresión de Fas en neutrófilos está incrementada tanto en el LES, como en la Artritis reumatoide y en la enfermedad inflamatoria intestinal, postulando así que la expresión de Fas está incrementada de manera no específica en las enfermedades inflamatorias. Se menciona también que la disminución en la actividad de la enfermedad coincide con el decremento de la expresión de Fas en los neutrófilos y en la disminución de la cuenta de neutrófilos apoptóticos. Aún así, dicho estudio señala la necesidad de buscar cuales son los efectos de los corticosteroides y los citotóxicos en la apoptosis de neutrófilos en LES (55).

Un estudio realizado en México reunió una cohorte de 200 pacientes con LES, vistos en la consulta externa, a quienes siguieron durante un promedio de  $22 \pm 7$  meses, con el fin de determinar cual era la incidencia y los factores de riesgo para infecciones evaluando parámetros sociodemográficos, actividad de la enfermedad, variables terapéuticas y de laboratorio (56). Ellos encontraron que las infecciones más comunes fueron las urinarias (26%), seguidas de las dermatológicas (23%), las sistémicas en (12%), vaginales (9%), pulmonares, del tracto gastrointestinal y de las vías respiratorias altas (6%), y las musculoesqueléticas (1%). Siendo los principales gérmenes causales los bacilos gram negativos (42%), los hongos (18%) y los cocos gram positivos en (13%). Encontraron que las infecciones oportunistas se presentaron en pacientes con actividad de la enfermedad y que el 30% de ellos recibía ciclofosfamida intravenosa. En el análisis univariado demostraron una asociación significativa entre la presencia de actividad de la enfermedad ( $p=0.01$ ), puntaje del SLEDAI ( $p<0.009$ ), actividad renal ( $p=0.002$ ), dosis de prednisona ( $p=0.03$ ) y ciclofosfamida intravenosa ( $p=0.02$ ). No se encontró asociación entre la presencia de infecciones y el uso de inmunosupresores orales, la edad, el tiempo de evolución de la enfermedad, el nivel educativo ni el estado socioeconómico. En el análisis multivariado, el único factor independiente predictor de infección fue un puntaje de SLEDAI mayor o igual a 4. Ellos reportan que las anomalías de laboratorio más frecuentemente encontradas al inicio de la enfermedad fueron anticópos menores a 1500/ $\mu$ l (64%),

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

leucocitos totales mayores a 10,000 / $\mu$ l (17%), leucocitos totales menores a 4000 / $\mu$ l (6%), velocidad de sedimentación globular mayor de 30mm/h (31%), C4 bajo (47%), C3 bajo (37%), antiDNA de doble cadena positivo (28%), depuración de creatinina menor de 80ml/min (33%), hemoglobina menor de 12mg/dL (17%) y glucemia mayor de 140mg/dL (10%) (32).

A pesar de que existe mucha información que demuestra que el LES ocasiona profundas alteraciones en el sistema inmunológico, aún quedan por aclarar los efectos del tratamiento con fármacos como la ciclofosfamida, que predispone a infecciones en estos mismos pacientes. El presente es un estudio prospectivo, longitudinal, observacional, descriptivo y abierto, que tiene como objetivo determinar el efecto del tratamiento con pulsos de ciclofosfamida sobre la apoptosis leucocitaria y su relación con la mayor frecuencia de infecciones reportada en estos pacientes. En estudios previos han encontrado que el desarrollo de infecciones en pacientes con LES en tratamiento con pulsos de ciclofosfamida está asociado fuertemente al nadir de disminución leucocitaria en menos de 3000 cel/ $\mu$ l RM=2.8, IC 95% 1.2 - 4.3) (57). Si bien es cierto que son diversos los mecanismos y las vías de la respuesta inmunitaria que se hayan afectadas tanto por el LES "per se" como por el tratamiento con ciclofosfamida, y que sería difícil establecer cuál de éstos contribuye más al final para la adquisición de infecciones. Aún así, es importante conocer si la apoptosis leucocitaria tiene un papel importante en este fenómeno. Sabemos que después de un pulso, la cuenta de linfocitos alcanza su nadir en el día 7 al 10, y que el nadir de granulocitos ocurre del día 10 al 14, además existe una pronta recuperación de la granulopenia después del día 21 a 28. Por lo que este estudio tomará como puntos de corte el basal y posteriormente un seguimiento los días 14 y 21 después del pulso para documentar lo que sucede en cuanto a la cuenta de leucocitos, la apoptosis de los mismos y la ocurrencia de infecciones, correlacionándolo adicionalmente con: los títulos de anticuerpos: ANA (Anticuerpos Antinucleares) y ADNabc (Anticuerpos Anti-DNA bicatenario) y la actividad de la enfermedad mediante la evaluación del SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Disease Activity Index) (3,58). Por lo anterior, se considera que los pacientes serán sus propios controles, al comparar cómo se encontraba la apoptosis leucocitaria antes de la aplicación de la ciclofosfamida y en dos mediciones posteriores a éste. Un estudio realizado en el año 2001 en el Hospital de Especialidades de CMNLR, reporta que la prevalencia de infecciones en pacientes con pulsos de ciclofosfamida y metilprednisolona fue del 14% (59).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## SUJETOS, MEDICIONES E INTERVENCIONES.

De octubre del 2002 a julio del 2003, se incluyeron 11 pacientes, adscritos al Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional La Raza, ya fuese al Departamento de Medicina Interna o al Departamento de Reumatología. Los pacientes fueron seleccionados con base a los siguientes criterios de inclusión: Pacientes que cumplieran con al menos 4 criterios para LES según la clasificación del ACR (Colegio Americano de Reumatología). Edad entre 16 y 55 años. Sexo masculino o femenino. Independientemente de su estado socioeconómico y su escolaridad. Candidatos a recibir terapia con pulsos de ciclofosfamida por nefropatía lúpica y/o lupus neuropsiquiátrico. Ausencia de infección previa al pulso de ciclofosfamida. Tratamiento con esteroides (prednisona) vía oral a dosis menores a 25mg diarios. Estos criterios se fundamentan en el estudio de Zona-Nacach y cols., quienes no encontraron correlación entre la edad, el nivel socioeconómico, la escolaridad ni el sexo con la predisposición a enfermedades (56). Los criterios de no inclusión fueron: La presencia de infección en al menos un mes previo al pulso de ciclofosfamida. Pacientes que tengan tratamiento con pulsos de metilprednisolona concomitantemente o que hayan recibido pulsos de metilprednisolona en por lo menos los últimos dos meses previos al estudio. Pacientes en tratamiento con ciclosporina A o con micofenolato de mofetilo. Los criterios de exclusión fueron: Pacientes que se perdieron durante el seguimiento por no acudir a los estudios subsecuentes o pacientes que no desearan continuar en el estudio.

Una vez seleccionados los pacientes que reunían los criterios de inclusión, se les solicitó un consentimiento informado, para participar en el estudio, como requisito indispensable de acuerdo a la declaración de Helsinki para los estudios en humanos (Anexo 3). Se tomaron muestras de: biometría hemática completa, anticuerpos antiDNA, anticuerpos antinucleares (ANA), complemento (C3 y C4), examen general de orina, depuración de creatinina y albúmina en orina de 24hrs.,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

urocultivo, exudado faríngeo, teleradiografía de tórax previo al pulso. Adicionalmente se tomó una muestra de 5ml de sangre en un tubo con anticoagulante para realizar la medición de apoptosis leucocitaria tardía mediante TUNEL. Se realizó un examen físico completo en búsqueda de otros sitios o datos clínicos de infección (Anexo 1). Para establecer la asociación entre apoptosis en el estado basal y actividad lúpica se determinó el SLEDAI (Anexo 2). Se descartó que existiese actividad de la enfermedad secundaria a infección descartando esta última como ya hemos descrito: mediante examen físico, cultivos y exámenes de gabinete en el caso necesario para apoyar o descartar el diagnóstico de infección en cualquier sistema.

Durante la primera visita se determinó el SLEDAI para medir el grado de actividad de la enfermedad. Una vez descartada cualquier infección, se aplicó el día 1 un pulso de ciclofosfamida a dosis de  $1g/m^2$  de superficie corporal. Se dió seguimiento mediante visitas al hospital los días 14 y 21 posterior al pulso de ciclofosfamida. En dichas visitas se realizó de nueva cuenta interrogatorio y exploración física a todos los pacientes para descartar la existencia de infecciones a cualquier nivel. Se tomaron controles de BHC, EGO, ANA, ADNA, C3, C4 en los días 14 y 21. Se tomaron urocultivo y exudado faríngeo en el día 14 y 21. Se evaluó el SLEDAI en los días 14 y 21. Se tomó una muestra de 5ml en un tubo con anticoagulante para la determinación de apoptosis leucocitaria tardía por técnica de TUNEL en los días 14 y 21.

En cuanto a la seguridad del paciente: actualmente están bien descritos los efectos adversos derivados del uso de ciclofosfamida, los más frecuentes reportados en la literatura son la náusea, el vómito y la cistitis hemorrágica, por lo que se tomaron medidas precautorias para evitarlos, como: la hiperhidratación del paciente con solución glucosada al 5% o solución mixta 1000cc previa al pulso de ciclofosfamida y una dieta con líquidos a libre demanda. Se aplicó mesna en ampulas de 400mg previo al pulso y posterior al mismo cada 8 hrs. hasta

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

completar 3 dosis. Para evitar la náusea se aplicó ondansetrón ampulas de 8mg previo al pulso y 3 dosis posteriores al mismo una cada 8hrs.

Apoptosis se define conceptualmente como "muerte celular programada", término que proviene del griego, donde *apo* significa "de", y *ptosis* significa "caída" (60). El proceso de muerte celular programada se observa durante procesos fisiológicos normales. Se caracteriza por contracción celular y condensación del núcleo, el cual se desintegra. Los leucocitos apoptóticos teñidos con Wright, muestran condensación del citoplasma con cromatina basófila y fragmentación del núcleo o colapso formando discretas vesículas (cuerpos apoptóticos) (61).

Para la determinación de apoptosis en este estudio, se utilizó la técnica de TUNEL que detecta apoptosis tardía (63) (Roche, Cat. No. 1-684-795), siguiendo las recomendaciones del productor. Se obtuvo sangre periférica para hacer frotis (1 ml células/frotis). Los frotis se trataron con solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4 y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% en amortiguador de citratos, se incubaron con la mezcla de enzima (TdT) y nucleótidos conjugados a FITC durante una hora, a 37°C en la oscuridad. Se lavaron las laminillas y se observaron por microscopía de fluorescencia (Olympus BX24). Se observaron 20 campos determinando la proporción de células fluorescentes mediante un analizador de imágenes. Como controles se utilizarán células IC21 (línea celular murina de macrófagos) tratadas con LPS (50 ng/ml) durante 48 hrs a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

La presencia de infecciones se definió como la presentación de evidencias clínicas y cultivos positivos que las documentasen. En caso de que el paciente presentase algún signo o síntoma durante el interrogatorio dirigido y la exploración física, que nos diese la sospecha de infección a cualquier sistema (respiratorio, digestivo, piel, genitourinario, sistema nervioso central, etc.) se utilizaron estudios de gabinete, laboratorio y cultivos para corroborar el diagnóstico. Se buscó en todos los casos el aislamiento del microorganismo causal.

RECIBIDO CON  
FALLA DE ORIGEN

Las infecciones virales se definieron cuando el paciente presentaba cuadro clínico para las mismas, y aumento de títulos de anticuerpos específicos para los antígenos virales, en caso de estar disponibles.

Como ya se mencionó anteriormente, los pacientes que entraban en el protocolo debían de recibir una dosis menor de 25mg/día de prednisona para evitar que ésta fuese una variable de confusión, dosis mayores a ésta se relacionan en la literatura con mayor frecuencia de infecciones.

#### Método estadístico

Se utilizó estadística descriptiva, con medias y desviación estándar. Se usaron pruebas de T pareada para comparación de las medias de las variables antes y después del tratamiento. Para el análisis bivariado se utilizaron pruebas de correlación y regresión logística que pueden identificar las diferencias entre las variables estudiadas. Usamos pruebas paramétricas y no paramétricas dependiendo de la distribución de los resultados. Se utilizó para todo esto el paquete estadístico SPSS versión 10 para Windows.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS.

Se obtuvieron un total de 11 pacientes, 6 mujeres (72.7%) y 3 hombres (27.3%), con un rango de edad de 17 a 47 años (media = 31.35 años  $\pm$  9.1 años). La dosis de prednisona diaria varió en un rango de 5 a 25mg, (media = 12.95mg  $\pm$  9.6mg). La dosis acumulada de ciclofosfamida varió en un rango de 3900mg a 13500mg (media = 7822mg  $\pm$  2899mg) (Tabla 1).

El promedio de leucocitos totales basales fue de 8597 k/uL, a los 14 días de 5177 k/uL, y a los 21 días de 5140 k/uL. El promedio de neutrófilos totales basales fue de 4560 k/uL, a los 14 días de 3584 k/uL, y a los 21 días de 4172 k/uL. El promedio de linfocitos totales basales fue de 1339 k/uL, a los 14 días de 1224 k/uL, y a los 21 días de 1177 k/uL (Tabla 2).

La diferencia entre la medición de leucocitos basales vs. leucocitos a los 14 días fue de 0.046 con una  $p < 0.05$  mediante una prueba de T pareada.

La diferencia entre la medición de leucocitos basales vs. leucocitos a los 21 días fue de 0.423 con una  $p > 0.05$  mediante una prueba de T pareada.

La diferencia entre los neutrófilos basales vs. neutrófilos a los 14 días fue de 0.08 con  $p$  no significativa mediante una prueba de T pareada.

La diferencia entre los neutrófilos basales vs. neutrófilos a los 21 días fue de 0.432 con  $p$  no significativa mediante una prueba de T pareada.

La diferencia entre los linfocitos basales vs. linfocitos a los 14 días fue de 0.65 con  $p$  no significativa mediante una prueba de T pareada.

La diferencia entre los linfocitos basales vs. linfocitos a los 21 días fue de 0.135 con  $p$  no significativa mediante una prueba de T pareada.

El promedio de anticuerpos antinucleares (ANA) fue de 260 en la medición basal, 135 a los 14 días y 285 a los 21 días. El promedio de anticuerpos antiDNA (ADNA) fue de 51 en la medición basal, 20 a los 14 días y 14 a los 21 días. Los títulos de C3 en promedio fueron de 105 para el basal, 100 para el día 14 y 121 para el día

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

21. Los títulos de C4 en promedio fueron de 26 para el basal, 25 para el día 14 y 20 para el día 21 (Tabla 3). Cuando se aplicaron las pruebas de T pareada para comprobar diferencias entre los promedios basales, y los promedios a los 14 y 21 días postpulso, de cada una de estas variables, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

El indicador usado para medir actividad de la enfermedad fue la escala de SLEDAI, ya mencionada con anterioridad, y la cual se encuentra mejor explicada en el anexo 2, los valores basales de esta fueron entre 0 y 16 puntos con un promedio de 4.54 puntos. A los 14 días fue entre 0 y 12 puntos con un promedio de 3.27 puntos. A los 21 días varió entre 0 y 8 puntos con un promedio de 2.90 puntos. Existe una clara tendencia a disminuir conforme transcurren los días después del pulso de ciclofosfamida (Tabla 4).

Se encontró una diferencia de 2.35 puntos entre el SLEDAI basal y a los 14 días con la prueba de T pareada con una  $p=0.04$ . En tanto que la diferencia entre el SLEDAI basal y a los 21 días fue de 2.043 puntos con una  $p=0.08$ . No hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar el SLEDAI del día 14 con el del día 21, dado que fue de 0.841 puntos con una  $p=0.42$ . (Mediante prueba de t pareada).

En cuanto al porcentaje de apoptosis leucocitaria sólo se encontró una tendencia clara en el porcentaje de apoptosis de los neutrófilos, en las otras subpoblaciones los porcentajes de apoptosis fueron dispares, sin mostrar una tendencia constante por lo cual no fueron tomados en cuenta en el análisis.

La apoptosis de neutrófilos basal varió en un rango de 4 a 38% (media = 21.54%), a los 14 días fue entre 4 y 33% (media = 11.81%), a los 21 días fue de entre 2 y 26% (media = 9.27%). (Tabla 5)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Encontramos una diferencia de 2.94 entre el porcentaje de apoptosis basal vs. porcentaje de apoptosis al día 14 con una  $p=0.015$ . La diferencia entre el porcentaje de apoptosis basal vs. porcentaje de apoptosis al día 21 fue de 3.068 con una  $p=0.012$ . No hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar porcentaje de apoptosis al día 14 vs. porcentaje de apoptosis al día 21, dado que fue de 1.41 con una  $p=0.188$ . (Mediante prueba de t pareada).

Hubo sólo dos casos de pacientes que presentaron infección: el primero ocurrió a los 14 días de la aplicación del pulso y se trató de una rinoфарингитis viral la cual se resolvió sólo con tratamiento sintomático en un lapso de 7 días. Esta paciente presentó una disminución en los leucocitos totales de 4,140 k/uL. El segundo caso también se identificó en la segunda visita de seguimiento, iniciando 12 días después del pulso, tratándose de una infección por herpes simple genital. Además del cuadro clínico, el diagnóstico se corroboró cuando la paciente presentó elevación de IgM en la serología de TORCH con respecto al valor basal. Es importante mencionar que en este último caso las cuentas leucocitarias se mantuvieron normales, y no existió una elevación de los linfocitos totales que se pudiese correlacionar.

Se utilizó la correlación de Pearson para buscar que existiera una relación entre el grado de actividad (medido con el SLEDAI) y el porcentaje de apoptosis de neutrófilos. Encontramos una correlación de 0.358 con una  $p=0.279$  en la medición basal, una correlación de 0.055 con una  $p=0.873$  en la medición a los 14 días y una correlación de 0.150 con una  $p=0.850$  en la medición a los 21 días.

La correlación de Spearman entre SLEDAI y el porcentaje de apoptosis de neutrófilos en la medición basal fue de 0.227 con una  $p=0.501$ , en la medición de los 14 días fue de 0.357 con una  $p=0.282$ , y en la medición de los 21 días fue de -0.44 con una  $p=0.60$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En ninguna de estas mediciones existió una correlación estadísticamente significativa debido a que el grado de variación en la escala de salida fue muy diverso, en tanto que la distribución del grado de SLEDAI fue pequeña, y sobretodo a que la muestra fue también muy pequeña.

Para analizar la relación entre la dosis acumulada de ciclofosfamida, la dosis diaria de prednisona y su efecto sobre el porcentaje de apoptosis de neutrófilos se realizó un análisis bivariado el cual demostró que no había relación alguna entre estas variables.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN.

El LES es una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de diversos autoanticuerpos, y la formación de complejos inmunes, cuya patogenia aún no está clara.

Se ha informado que existen anomalías en la apoptosis de los pacientes con LES y una disregulación de la apoptosis relacionada a moléculas como el BCL-2 y el antígeno Fas (31). También se ha demostrado que existe un incremento de la apoptosis periférica de los linfocitos, pero no hay todavía un consenso acerca del rol de la apoptosis en la patogénesis del LES. Aunque algunos investigadores consideran que la apoptosis puede ser un disparador que precipite la disrupción de la autotolerancia, siendo ésta una fuente inmunógena (31). Hart y cols. han demostrado que la fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos, mediada por macrófagos aumentaba rápidamente después de la unión de CD44 mediante anticuerpos bivalentes *in vitro*. Ésto no se pudo demostrar en linfocitos apoptóticos (30). Por otra parte, recientemente se ha informado que se presenta una disminución en la expresión de CD44 en los neutrófilos y en los monocitos en pacientes con LES, lo cual podría contribuir a una disminución en el reconocimiento y depuración de los neutrófilos apoptóticos mediante los macrófagos (30).

Los esteroides son un pilar fundamental en el tratamiento de los pacientes con LES, debido a sus diversos efectos sobre la inmunidad humoral y celular. Se ha demostrado que el tratamiento con esteroides disminuye la apoptosis de los neutrófilos. La inhibición de la apoptosis de los neutrófilos podría representar un mecanismo de acción importante en el tratamiento de la exacerbación de la enfermedad.

El tratamiento con ciclofosfamida en los pacientes con LES que cursan con actividad renal y neuropsiquiátrica ha incrementado su sobrevida, pero poco se

TEMAS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FALTA**

**PAGINA**

**32/**

p=0.015). Asimismo hubo decremento de la apoptosis de neutrófilos cuando fue medida en el día 21 posterior al pulso de ciclofosfamida (disminución de 21.54% +- 13.46% a 9.27% +- 6.88% con una p=0.012). Por lo anterior consideramos que efectivamente existe una disminución de la apoptosis de neutrófilos atribuible a la administración de ciclofosfamida, ya que las dosis de esteroide se mantuvieron constantes a lo largo de todo el estudio. Estos resultados están en relación a una disminución en la actividad de la enfermedad medida por SLEDAI, teniendo un basal de 4.54ptos. +- 4.8ptos, el cual disminuyó al día 14 a 3.27ptos. +- 3.44ptos. con una p=0.04 y al día 21 disminuyó a 2.9ptos. +- 2.5ptos. con una p= 0.06. En cuanto al número de leucocitos totales, existió una disminución significativa al día 14, de 6597 k/uL +- 2499 k/uL a 5177 k/uL +- 3497 k/uL con una p=0.046 que posteriormente se incrementó al día 21 a valores similares a los basales, 6140 k/uL +- 2163 k/uL con p>0.05.

También se observó una disminución de los títulos de ADNA de un basal de 51.25 +- 109 al día 14 de 20.0 +- 28 y a al día 21 a 14.29 +- 29. Aunque no se alcanzaron valores de p estadísticamente significativos. Ésto se debió a que el tamaño de la muestra fue pequeño.

En el análisis bivariado, no se demostró correlación significativa entre la actividad de la enfermedad medida por SLEDAI y el porcentaje de apoptosis de neutrófilos mediante el método de Spearman ni en la de Pearson. Se realizó un análisis multivariado para observar la influencia de la dosis acumulada de ciclofosfamida y la dosis diaria de prednisona en el porcentaje de apoptosis de neutrófilos, pero no se encontró relación alguna.

Finalmente nos falta mencionar que en el presente estudio se encontraron únicamente dos casos de infecciones, de etiología viral ambas, cuyo cuadro clínico inició coincidentemente en el día 14, que se considera como el nadir de la leucopenia inducida por efecto de la ciclofosfamida. No se pudo correlacionar infección con porcentaje de apoptosis porque el número de casos fue insuficiente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

dato el tamaño muestral. Cabe mencionar que en estos pacientes el porcentaje de apoptosis de neutrófilos en ambos pacientes fue de 13% al momento del inicio del cuadro clínico, lo cual sobrepasa el promedio de porcentaje de apoptosis encontrado en esta muestra que fue 11.81%. Tampoco pudimos realizar un análisis que intentase correlacionar actividad de la enfermedad con la presencia de infecciones debido nuevamente al tamaño de la muestra.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES.

El porcentaje basal de apoptosis de neutrófilos en pacientes con Lupus eritematoso sistémico mucocutáneo, articular, renal y de sistema nervioso central fue de 21.54, dicho porcentaje disminuye posterior a la administración de ciclofosfamida.

La actividad de la enfermedad medida por SLEDAI disminuyó con la administración de ciclofosfamida aunque no se correlacionó con el porcentaje de apoptosis.

Se encontraron dos episodios de infecciones cuyo inicio coincidió con el nadir del efecto máximo de la ciclofosfamida sobre la médula ósea en el día 14 posterior al pulso.

Para estudios posteriores se requiere un mayor número de pacientes para dar mayor fuerza estadística a las correlaciones entre apoptosis y actividad de la enfermedad, así como un grupo de controles sanos y de pacientes con LES sin tratamiento con ciclofosfamida para correlacionar el comportamiento del porcentaje de apoptosis en ellos y tener valores de referencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS.

1. Tsokos GC. Lymphocytes, cytokines, inflammation, and immune trafficking 62. *Curr.Opin.Rheumatol.* 1996;8(5):395-402.
2. Grendal G, Traustadottir KH, Kristjansdottir H, Lundberg I, Klareskog L, Eriendsson K et al. Increased T-lymphocyte apoptosis/necrosis and IL-10 producing cells in patients and their spouses in Icelandic systemic lupus erythematosus multigene families. *Lupus* 2002,11(7):435-42.
3. In: Wallace D.J., Hannans B., editors. *Dubois Lupus Erythematosus*. 5 ed. New York: Williams & Wilkins; 1997. p. 49-61.
4. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am.J.Med* 1976;60(2):221-5.
5. Urman JD, Rothfield NF. Corticosteroid treatment in systemic lupus erythematosus. Survival studies. *JAMA* 1977;238(21):2272-6.
6. Rosner S, Ginzler EM, Diamond HS, Weiner M, Schlesinger M, Fries JF et al. A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus. II. Causes of death. *Arthritis Rheum.* 1982;25(6):612-7.
7. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Kiinenberg JR. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin.Arthritis Rheum.* 1991;21(1):55-64.
8. Hellmann DB, Petri M, Whiting-O'Keefe Q. Fatal infections in systemic lupus erythematosus: the role of opportunistic organisms. *Medicine (Baltimore)* 1987;66(5):341-8.
9. Staples PJ, Gerding DN, Decker JL, Gordon RS, Jr. Incidence of infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1974;17(1):1-10.
10. Duffy KN, Duffy CM, Gladman DD. Infection and disease activity in systemic lupus erythematosus: a review of hospitalized patients. *J.Rheumatol.* 1991;18(8):1180-4.
11. Raj R, Murin S, Matthey RA, Wiedemann HP. Systemic lupus erythematosus in the intensive care unit. *Crit Care Clin.* 2002;18(4):781-803.
12. Imboden J, Goodwin J, Davis J, Wofsy D. Tratamiento Inmunosupresor, antiinflamatorio e inmunomodulador. In: Parslow T, Sites D, Terr A, Imboden J, editors. *Inmunología Básica y Clínica*. 10 ed. Mexico: Manual Moderno; 2002. p. 873-91.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

13. Cancedda C, Filaci G, Puppo F, Ghio M, Contini P, Indiveri F. Immune homeostasis requires several biologic factors including glucocorticoid hormones. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2002;966:49-53.
14. Boumpas DT, Paliogianni F, Anastassiou ED, Balow JE. Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1991;9(4):413-23.
15. Petri M, Genovese M. incidence of and risk factors for hospitalizations in systemic lupus erythematosus: a prospective study of the Hopkins Lupus Cohort. *J.Rheumatol.* 1992;19(10):1559-65.
16. Frenkel JK. Adoptive immunity to intracellular infection. *J.Immunol.* 1967;98(6):1309-19.
17. Lim E, Koh WH, Loh SF, Lam MS, Howe HS. Non-thyphoidal salmonellosis in patients with systemic lupus erythematosus. A study of fifty patients and a review of the literature. *Lupus* 2001;10(2):87-92.
18. Tsao CH, Chen CY, Ou LS, Huang JL. Risk factors of mortality for salmonella infection in systemic lupus erythematosus. *J.Rheumatol.* 2002;29(6):1214-8.
19. Medina F, Fraga A, Lavalle C. Salmonella septic arthritis in systemic lupus erythematosus. The importance of chronic carrier state. *J.Rheumatol.* 1989;16(2):203-8.
20. Pillero P, Furie R. Functional asplenia in systemic lupus erythematosus. *Semin.Arthritis Rheum.* 1990;20(3):185-9.
21. Nagasawa K, Yamauchi Y, Tada Y, Kusaba T, Niho Y, Yoshikawa H. High incidence of herpes zoster in patients with systemic lupus erythematosus: an immunological analysis. *Ann.Rheum.Dis.* 1990;49(8):630-3.
22. Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Klener 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.
23. Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. *Br.J.Rheumatol.* 1997;36(2):158-63.
24. 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):856-72.
25. Funouchi 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):254-8.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

26. 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.
27. 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.
28. Pernik 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.
29. Herrmann M, Voll RE, Zoller CM, 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.
30. 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.
31. 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.
32. Apoptosis. Ruddy: Kelly's Textbook of Rheumatology. 6 ed. W.B: Saunders Company; 2000. p. 291-300.
33. 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.
34. 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.
35. Bischoff PL, Holl V, Coelho D, Dufour P, Weltin D, Luu B. Apoptosis at the interface of immunosuppressive and anticancer activities: the examples of two classes of chemical inducers, oxysterols and alkylating agents. *Curr.Med.Chem.* 2000;7(7):693-713.
36. Kuiper-Geertsma DG, Derksen RH. Newer drugs for the treatment of lupus nephritis. *Drugs* 2003;63(2):167-80.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

37. Ginzler EM. Clinical trials in lupus nephritis. *Curr.Rheumatol.Rep.* 2001;3(3):199-204.
38. McCune WJ, Golbus J, Zeldes W, Bohike P, Dunne R, Fox DA. Clinical and immunologic effects of monthly administration of intravenous cyclophosphamide in severe systemic lupus erythematosus. *N.Engl.J.Med.* 1988;318(22):1423-31.
39. Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B. Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. *Mol.Reprod.Dev.* 2001;60(3):302-11.
40. Brinkworth MH, Nieschlag E. Association of cyclophosphamide-induced male-mediated, foetal abnormalities with reduced paternal germ-cell apoptosis. *Mutat.Res.* 2000;447(2):149-54.
41. Schwartz PS, Waxman DJ. Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol.Pharmacol.* 2001;60(6):1268-79.
42. Karle P, Renner M, Salmans B, Gunzburg WH. Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide. *Cancer Gene Ther.* 2001;8(3):220-30.
43. Mazur L, Augustynek A, Bochenek M. Flow cytometric estimation of the plasma membrane diversity of bone marrow cells in mice treated with WR-2721 and cyclophosphamide. *Toxicology* 2002;171(2-3):63-72.
44. Wang GJ, Cai L. Relatively low-dose cyclophosphamide is likely to induce apoptotic cell death in rat thymus through Fas/Fas ligand pathway. *Mutat.Res.* 1999;427(2):125-33.
45. Ishiyama N, Utsuyama M, Kitagawa M, Hirokawa K. Immunological enhancement with a low dose of cyclophosphamide in aged mice. *Mech.Ageing Dev.* 1999;111(1):1-12.
46. Beranck JT. Apoptosis contributes to cyclophosphamide-induced cardiomyopathy. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29(1):91.
47. Mori O, Matsuo K, Hashimoto T. Anticancer drugs induce apoptosis in mouse hair follicles. *Kurume Med.J.* 2000;47(3):193-7.
48. Mazur L, Czyzewska A, Bochenek M. Flow cytometric detection of apoptotic bone marrow cells with fractional DNA content after application of WR-2721, cyclophosphamide, cisplatin, and exposure of mice to gamma rays. *Hum.Exp.Toxicol.* 2002;21(6):335-41.

ESTA TESIS NO FALTA  
DE LA TESIS

49. Mazur L, Czyzewska A. Immunocytochemical analysis of apoptotic bone marrow cells after treatment of mice with WR-2721 and chemotherapeutic drugs. *Folia Histochem.Cytobiol.* 2001;39(2):63-6.
50. Blankenberg FG, Naumovski L, Tait JF, Post AM, Strauss HW. Imaging cyclophosphamide-induced intramedullary apoptosis in rats using 99mTc-radiolabeled annexin V. *J.Nucl.Med.* 2001;42(2):309-16.
51. Green AM, Steinmetz ND. Monitoring apoptosis in real time. *Cancer J.* 2002;8(2):82-92.
52. Segal BH, Sneller MC. Infectious complications of immunosuppressive therapy in patients with rheumatic diseases. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 1997;23(2):219-37.
53. Austin HA, III, Klippel JH, Batow JE, le Riche NG, Steinberg AD, Plotz PH et al. Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N.Engl.J.Med.* 1986;314(10):614-9.
54. Noel V, Lortholary O, Casassus P, Cohen P, Genereau T, Andre MH et al. Risk factors and prognostic influence of infection in a single cohort of 87 adults with systemic lupus erythematosus. *Ann.Rheum.Dis.* 2001;60(12):1141-4.
55. 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.
56. Zonana-Nacach A, Camargo-Coronel A, Yanez P, Sanchez L, Jimenez-Balderas FJ, Fraga A. Infections in outpatients with systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Lupus* 2001;10(7):505-10.
57. Pryor BD, Bologna SG, Kahl LE. Risk factors for serious infection during treatment with cyclophosphamide and high-dose corticosteroids for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39(9):1475-82.
58. Liang JH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989;32(9):1107-18.
59. Barrera C. Factores predictores de riesgo de infección en pacientes con lupus eritematoso sistémico. [Tesis]. Facultad de Medicina, UNAM; 2001.
60. 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.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

61. Esaki T, Hayashi T, Muto E, Kano H, Kumar TN, Asai Y et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and Fas/Fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atheromatous plaques of human coronary arteries. *Nitric Oxide*. 2000;4(6):561-71.
62. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 1997;23(3):525-31.
63. 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.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Anexo 1

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Nombre		Edad	
Nc. afiliación		Sexo	
Dx principal			
Enfermedades concomitantes:			
Tx actual:			
Historia de infecciones del último mes:			

Estudios preliminares prepulso (Fecha: )

BHC

Leucocitos totales		Hb	
Neutrófilos		Hto	
Linfocitos		VCM	
Monocitos		CMH	
Eosinófilos		CMHC	
Basófilos		Plaquetas	

EGO

ANA

AntiDNA

C3

C4

Dep. Cr.

Alb 24hr.

Urocultivo:

Hemocultivo:

Exudado faringeo:

Otros:

Apoptosis leucocitaria temprana

Apoptosis leucocitaria tardía

Examen físico

SLEDAI

Estudios a los 14 días postpulso (Fecha: )

BHC

Leucocitos totales		Hb	
Neutrófilos		Hto	
Linfocitos		VCM	
Monocitos		CMH	
Eosinófilos		CMHC	
Basófilos		Plaquetas	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

EGO

ANA AntiDNA C3 C4	Dep.Cr.  Alb 24hr.	Urocultivo: Hemocultivo: Exudado faringeo:
----------------------------	--------------------------	--

Apoptosis leucocitaria temprana  
Apoptosis leucocitaria tardía

Examen físico

SLEDAI

Estudios a los 21 días postpulso (Fecha: )

BHC

Leucocitos totales		Hb	
Neutrófilos		Hto	
Linfocitos		VCM	
Monocitos		CMH	
Eosinófilos		CMHC	
Basófilos		Plaquetas	

EGO

ANA AntiDNA C3 C4	Dep.Cr.  Alb 24hr.	Urocultivo: Hemocultivo: Exudado faringeo: Otros:
-------------------------	--------------------------	--

Apoptosis leucocitaria temprana  
Apoptosis leucocitaria tardía

Examen físico

SLEDAI

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<i>Sitio de la infección</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Virus</i>	<i>Micosis</i>	<i>Parásitos</i>
<i>Vías Respiratorias altas</i>				
<i>Vías Respiratoria bajas</i>				
<i>Otitis</i>				
<i>Sistema Nervioso Central</i>				
<i>Piel</i>				
<i>Ojos</i>				
<i>Gastrointestinal</i>				
<i>Otros</i>				

FECHA DE LLENADO: \_\_\_\_\_

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Anexo 2

SLEDAI

- Convulsiones (aparición reciente, excluir otras causas)-----8
- Psicosis (alucinaciones, incoherencia, deficiencia del contenido del pensamiento, conducta grotesca, desorganizada o catatónica)-----8
- Síndrome orgánico cerebral (desorientación, alteración de la memoria, menos capacidad de atención, trastorno de percepción, habla incoherente, somnolencia diurna, disminución o aumento de la actividad psicomotriz)-----8
- Alteraciones visuales hemorrágicas retinianas, cuerpos citoides, exudado seroso, hemorragias coroideas, neuritis óptica)-----8
- Alteración de nervios craneales (neuropatía motora o sensorial de aparición reciente en nervios craneales)-----8
- Cefalea lúpica (intensa, persistente, puede ser migrañosa, no responde a analgésicos narcóticos)-----8
- Enfermedad vascular cerebral (apoplejía reciente, excluir aterosclerosis)-8
- Vasculitis (ulceración, gangrena, nódulos dolorosos en dedos, infarto periungueal, hemorragias en astilla o pruebas de vasculitis mediante biopsia o angiografía)-----8
- Artritis (más de dos articulaciones dolorosas o con rubor, dolor, tumefacción y calor)-----4
- Miositis (dolor y debilidad de músculos proximales asociado a elevación de CK y aldolasa, alteraciones en la electromiografía o biopsia que demuestren miositis)-----4
- Cilindros urinarios (hemáticos, granulados o eritrocitarios)-----4
- Hematuria (>5 x campo, excluir litiasis)-----4
- Proteinuria (>0.5g en 24 horas o aumento de más de 0.5g en 24hr)-----4
- Piuria (>5 leucocitos por campo, excluir infección)-----4
- Exantema (aparición reciente o recurrencia de exantema inflamatorio)-----2
- Alopecia (pérdida anormal de cabello en placas o difuso)-----2
- Úlceras mucosas (orales o nasales)-----2
- Pleuritis (dolor pleurítico con frote o derrame pleural o engrosamiento pleural)-----2
- Pericarditis (dolor pericárdico, frote, derrame o confirmado por ecocardiograma o electrocardiograma)-----2
- Complemento bajo (CH50, C3, C4)-----2
- Aumento de la captación del DNA (captación de DNA>25% mediante técnica de Farr o por encima de valores normales de laboratorio)-----2
- Fiebre (más de 38°C, excluir causas infecciosas)-----1
- Trombocitopenia (>100ml)-----1
- Leucopenia (>3000, excluir causa farmacológica)-----1

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Anexo 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA.

México, D.F. a \_\_\_\_\_

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado "LA INFLUENCIA DE LA CICLOFOSFAMIDA SOBRE LA APOPTOSIS LEUCOCITARIA Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE INFECCIONES EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO" registrado ante el Comité Local de Investigación Médica con el número: 2003-690-0067. El objetivo de este estudio es investigar como se modifica la apoptosis leucocitaria a causa del tratamiento con pulsos de ciclofosfamida y si esto tiene alguna correlación con el desarrollo de infecciones en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Todo esto con la finalidad de aportar información biomédica nueva que pueda ayudar en un futuro al tratamiento de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Se me ha explicado que mi participación consistirá en que se me tomen estudios de sangre, orina, exudado faríngeo y heces antes del pulso de ciclofosfamida, después del mismo acudiré a dos visitas de seguimiento al hospital los días 14 y 21 después del pulso donde se me tomaran nuevamente las muestras mencionadas. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: la molestia de la toma de muestras que será más frecuente de lo habitual y el beneficio de detectar cualquier infección que pudiese presentar el paciente de manera oportuna. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaron a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

Testigo

\_\_\_\_\_  
Dra. Olga Lidia Vera Lastra

Testigo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLAS.

NO. PACIENTE	EDAD (años)	SEXO	TIEMPO DE EVOLUCIÓN	TIPO DE AFECCIÓN	DOSES ACUM CFM (mg)	DOSES DE PDN (mg/día)
1	47	Fem	9 meses	MCA, renal	7500	25.00mg
2	23	Fem	2 años 3 meses	MCA, renal, SNC	13600	5.00
3	44	Mas	8 meses	MCA, renal	10500	5.00
4	29	Fem	7 meses	MCA, SNC	8500	5.00
5	27	Mas	4 meses	MCA, renal	4800	25.00
6	32	Fem	1 año y medio	MCA, renal	7500	25.00
7	22	Mas	1 año 4 meses	MCA, renal	9600	25.00
8	35	Fem	1 año 8 meses	MCA, renal	7250	7.50
9	17	Fem	1 año 11 meses	MCA, renal	4000	5.00
10	37	Fem	2 años 6 meses	MCA, renal	3900	10.00
11	32	Fem	3 años 1 mes	MCA, renal	9000	5.00

TABLA 1. Datos demográficos de pacientes con LES mucocutáneo-articular (MCA), renal y de sistema nervioso central (SNC) tratados con pulsos de ciclofosfamida intravenosa.  
CFM= Ciclofosfamida  
PDN= Prednisona

Población celular	Basal (k/uL)	Día 14 (k/uL)	Día 21 (k/uL)
Leucocitos totales	6597±2499	5177±3492	6140±2363
Neutrófilos totales	4560±1582	3564±2314	4172±1611
Linfocitos totales	1339±787	1224±850	1177±723

TABLA 2. Promedio de leucocitos en sangre periférica basales y posterior al tratamiento con pulsos de ciclofosfamida.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Pruebas Inmunológicas	Basal	Día 14	Día 21
ADNA	51.25 ± 109	20 ± 38	14 ± 29
ANA	260 ± 252	135 ± 129	285 ± 460
C3	105 ± 160	100 ± 49	121 ± 50
C4	26 ± 19	25 ± 17	20 ± 12

TABLA 3. Resultados de laboratorio de inmunología en pacientes con LES basales y posterior al tratamiento con pulso de ciclofosfamida.

ADNA = Anticuerpos anti-DNA  
ANA = Anticuerpos antinucleares

Actividad del LES	Basal	Día 14	Día 21
SLEDAI (puntos)	4.54 ± 4.8	3.27 ± 3.4	2.9 ± 2.5

TABLA 4. Actividad de la enfermedad medida por SLEDAI basal y posterior al tratamiento con pulso de ciclofosfamida.

	Basal	Día 14	Día 21
% Apoptosis Neutrófilos	21.54 ± 13.46	11.81 ± 8.32	9.27 ± 6.88

TABLA 5. Porcentaje de apoptosis de neutrófilos basales y posterior al tratamiento con pulso de ciclofosfamida.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN