



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Participación de Fas, YY-1 y Bcl-2 en la  
regulación de apoptosis en leucocitos de  
sangre periférica de niños con sepsis”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A N**

**VANESSA MAYEN RETANA**

**BRENDA VIRIDIANA REVILLA GONZALEZ**



**MÉXICO, D.F**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB. Saturnino de León Chapa  
VOCAL: Dra. Rosario Muñoz Clares  
SECRETARIO: Dr. Mario Israel Vega Paredes  
1<sup>er</sup> SUPLENTE: M.C. Mireya Rodríguez Penagos  
2<sup>o</sup> SUPLENTE: Dr. Enrique Ortega Soto

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Unidad de Investigación de Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS y en la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez”.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mario Israel Vega Paredes\_\_\_\_\_

SUSTENTANTES:

Vanessa Mayen Retana\_\_\_\_\_

Brenda Viridiana Revilla Gonzalez\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario I. Vega Paredes director de este trabajo por habernos permitido ser parte de esta investigación y por su asesoría.

A la Dra. Sara Huerta Yépez por su apoyo en el trabajo experimental- y su asesoría.

A Miriam Hernández Atenógenes, Bernardo Martínez Miguel, Guillermina Baay Guzmán por sus enseñanzas, su apoyo en el trabajo experimental y por su amistad.

A nuestros amigos quienes nos han brindado su apoyo incondicional y siempre han confiado en nosotras.

## DEDICATORIAS

A nuestros padres por darnos la vida y las herramientas para salir adelante, por habernos impulsado a lograr nuestros objetivos y por su apoyo incondicional en los momentos mas difíciles.

A nuestros hermanos con quienes hemos compartido nuestras alegrías y tristezas, gracias por su ayuda y su apoyo.

Vanessa dedica a:

Gustavo

Por brindarme su amor, darle razón y sentido a mi ser, por el tiempo que hemos caminado juntos y que nos falta por recorrer.

Brenda dedica a:

Rubén

Por su gran apoyo y paciencia, y espero que esto te sirva como aliciente en tu vida para saber que puedes lograr todo lo que te propongas sin importar cuantas sean las adversidades.

Gracias a todos, sin ustedes no lo habiéramos logrado.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

1. INTRODUCCIÓN
2. MARCO TEÓRICO
  - 2.1 Epidemiología
  - 2.2 Patogenia de la sepsis
  - 2.3 Apoptosis
    - 2.3.1 Vía intrínseca de la apoptosis
    - 2.3.2 Vía del retículo endoplasmático de la apoptosis
    - 2.3.3 Vía extrínseca de la apoptosis
    - 2.3.4 Entrecruzamiento de la vía intrínseca y la vía extrínseca
    - 2.3.5 Ejecución de la vía intrínseca y la extrínseca
  - 2.4 Factor de transcripción YY-1
3. JUSTIFICACIÓN
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN
5. HIPÓTESIS
6. OBJETIVOS
  - 6.1 Objetivo general
  - 6.2 Objetivos específicos
7. POBLACIÓN DE ESTUDIO
  - 7.1 Criterios de inclusión
  - 7.2 Criterios de no inclusión
  - 7.3 Criterios de exclusión
8. MATERIALES Y MÉTODOS
  - 8.1 Separación de leucocitos
  - 8.2 Obtención de laminilla de leucocitos separados mediante el uso de "CITOESPIN"

- 8.3 Determinación de la fragmentación del DNA mediante la técnica de TUNEL
- 8.4 Inmunocitoquímica
- 8.5 Análisis morfométrico
- 8.6 Procesamiento de los datos
- 9. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD
- 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
  - 10.1 Características clínicas de los pacientes
  - 10.2 Evaluación de apoptosis por TUNEL
  - 10.3 Expresión de Fas y Fas-L y su correlación con la apoptosis
  - 10.4 Expresión de YY-1
  - 10.5 Correlación entre la expresión de Fas y YY-1 con la apoptosis
  - 10.6 Expresión de la caspasa-8 y su correlación con la apoptosis
  - 10.7 Expresión de la caspasa-9 y su correlación con la apoptosis
  - 10.8 Expresión de la caspasa-3 y su correlación con la apoptosis
  - 10.9 Expresión de Bcl-2 y su correlación con la apoptosis
- 11. CONCLUSIONES
- 12. PERSPECTIVAS
- 13. GLOSARIO
- 14. REFERENCIAS

## ABREVIATURAS

Ags	Antígenos
AICD	Muerte celular inducida por activación
Apaf-1	Factor apoptótico de activación de proteasas
Bad	Antagonista de Bcl-2 de muerte celular
Bak	Homicida antagonista de Bcl-2
Bax	Proteína Bcl-2 asociada al cromosoma X
Bid	Agonista que interacciona con el dominio homólogo 3 de Bcl-2 (BH3)
Bik	Proteína de interacción de muerte con Bcl-2
Bim	Proteína de interacción de Bcl-2
Bcl-2	Proteína de linfoma de células B 2
Bcl-x	Parecido a Bcl-2
Bcl-x <sub>L</sub>	Proteína relacionada a Bcl-2, isoforma larga de la proteína Bcl-x
Bcl-x <sub>S</sub>	Proteína relacionada a BCL2, isoforma corta de la proteína Bcl-x
Caspasa	Cisteína ácido aspártico proteasa
C-3	Caspasa 3 activa
C-8	Caspasa 8 activa
C-9	Caspasa 9 activa
CAD	DNasa activada por caspasa
c-FLIP	Proteína Inhibidora de pro-caspasa-8
c-Myc	Oncogene Myc
DAB	Diamino benzidina
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DOM	Disfunción orgánica múltiple
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
Fas	Receptor ácido graso sintetasa
Fas-L	Ligando del receptor ácido graso sintetasa
FLD	Dominio del asa flexible

HtrA2/Omi	Serina proteasa de requerimiento de temperatura alta
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
iNOS	NO sintetasa inducible
LPS	Lipopolisacárido
M $\phi$	Macrófagos
MPT	Potencial transmembranal mitocondrial
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa de linfocitos B
NO	Óxido nítrico
PARP	Poli [ADP-ribosa] polimerasa
PMNs	Neutrófilos polimorfonucleares
Smac/DIABLO	Activador mitocondrial secundario de caspasas/proteína de unión directa a IAP con bajo ioduro de propidio
SS	Solución salina
TCR	Receptor de células T
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alpha
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento tumoral beta
TRAIL	Ligando de inducción asociado al receptor de TNF
TUNEL	Marcaje de los fragmentos con dUTP por la desoxinucleotidil transferasa terminal
UCI	Unidades de cuidados intensivos
YY-1	Yin Yang 1
z-VAD-FMK	Inhibidor de caspasa de amplio espectro (benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp fluorometilcetona)

## Resumen

**Introducción.** La apoptosis desencadena procesos de complicaciones letales en niños con sepsis; tal es el caso como la disfunción orgánica múltiple, que entre otros factores se asocia a niveles altos de expresión de Fas y una disminución de Bcl-2. También se sabe que el factor de transcripción YY-1 regula negativamente la expresión de Fas en modelos de cáncer y nefritis lúpica e incluso correlaciona con la evolución clínica de los pacientes. Sin embargo, no existe información en pacientes con sepsis. Por lo anterior, es necesario establecer la participación de YY-1 y Bcl-2 en la expresión de Fas y su correlación con la apoptosis en células de sangre periférica (SP) de pacientes con sepsis. **Hipótesis.** El nivel de apoptosis, en leucocitos de sangre periférica de niños con sepsis, tiene una directa relación con la expresión de Fas y una disminución en la expresión de Bcl-2 y YY-1. **Objetivo General.** Determinar la participación de Fas, YY-1 y Bcl-2 en la inducción de apoptosis, así como la vía de inducción en leucocitos de SP de niños con sepsis. **Metodología.** La población de estudio fue de 30 pacientes menores de 15 años, que ingresaron a terapia intensiva con diagnóstico de sepsis y 4 pacientes controles. Se obtuvo una muestra de SP y se determinó en leucocitos el porcentaje de expresión de factor de transcripción YY-1, Fas/Fas-L, Bcl-2, C-3, C-8 y C-9, y apoptosis mediante las técnicas estandarizadas de Inmunocitoquímica y TUNEL, respectivamente. **Resultados y Discusión.** Se observó que la muerte celular de los pacientes con sepsis fue por apoptosis, mediante la técnica de TUNEL. La expresión de Fas/Fas-L, YY-1, C-8, C-9 y C-3 en pacientes fue mayor (estadísticamente significativo) comparada con la de los controles; a lo contrario en la expresión de Bcl-2 en donde no se observó un cambio significativo. Se realizó una correlación de la expresión de Fas, Fas-L y C-8 con apoptosis en donde se observó que hay una correlación positiva y que es estadísticamente significativa; lo cual nos dice que la apoptosis es por la vía extrínseca. También se observó una correlación de YY-1 con apoptosis, pero en esta, fue negativa. Lo que sugiere que la expresión de Fas se regula negativamente por YY-1. **Conclusiones.** La apoptosis en leucocitos de SP de pacientes con sepsis es mediada por Fas mediante la regulación de YY-1. La apoptosis observada se llevó

acabo por medio de las vías intrínseca y extrínseca, pero principalmente por la vía extrínseca. Bcl-2 no tuvo papel protector anti-apotótico en las células de estos pacientes.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La sepsis se define como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, el cual es causado por una infección, es el caso más común de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos. La sepsis desencadena la secreción de citocinas pro-inflamatorias, la activación de leucocitos, entre otras. La sepsis también permite llegar a un estado inmunocomprometido con la disminución de linfocitos T y linfocitos B debida a la apoptosis.

Varios estudios han mostrado que el pre-tratamiento de animales con esplenocitos apoptóticos empeora la respuesta de sepsis y que la sobreexpresión de Bcl-2 o la administración de inhibidores de caspasas protegen a los linfocitos de la apoptosis y mejora la supervivencia en sepsis.

La apoptosis desencadena procesos que puede llevar a complicaciones como es el caso de la sepsis severa, choque séptico y disfunción orgánica múltiple, que entre otros factores, se asocia a niveles altos de expresión de Fas y una disminución de Bcl-2. Por lo tanto, la apoptosis correlaciona con la severidad de la sepsis.

También se sabe que el factor de transcripción YY-1 regula negativamente la expresión de Fas en modelos de cáncer y nefritis lúpica e incluso correlaciona con la evolución clínica de los pacientes. Sin embargo, no existe información en pacientes con sepsis. Por lo anterior, es necesario establecer la participación de YY-1 y Bcl-2 en la expresión de Fas y su correlación clínica en niños con sepsis.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Epidemiología**

La sepsis es una de las principales causas de muerte y es responsable de 250 000 muertes en EUA. Los datos sobre la morbilidad y la mortalidad de la sepsis y la infección en las unidades de cuidados intensivos (UCI) están creciendo, y estos datos no son nada alentadores. Se analizaron más de 6 millones de registros de alta hospitalaria de siete estados de los EUA y se calcula que 751,000 casos de

sepsis grave se producen anualmente, con una tasa de mortalidad de 28,6% con estimaciones similares para Europa<sup>1;2</sup>.

En México, en una encuesta de 21 hospitales con una muestra de 1039 niños reportan una incidencia de sepsis del 16% con el grupo de edad más vulnerable de 1 a 5 años<sup>3</sup>. En un estudio prospectivo, en el Servicio Pediátrico del Hospital General Regional (HGR) No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) durante 18 meses, la tasa de incidencia de bacteremia/sepsis fue de 26 eventos por 1000 días a exposición de catéteres. Los microorganismos Gram positivos (61.11%) predominaron sobre los Gram negativos (38.88%)<sup>4</sup>. En el Instituto Nacional de Perinatología (INP) se reporta una incidencia de sepsis de 19 por cada 1000 recién nacidos vivos. En el estudio realizado en el Hospital General de 1A los Venados del IMSS, entre enero del 2004 y septiembre del 2005, se observó que la incidencia de sepsis neonatal en esta población estudiada fue de 3.4/1000 recién nacidos vivos<sup>5</sup>. En una revisión retrospectiva de expedientes de un grupo de recién nacidos con sepsis neonatal, atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud de México, entre los años de 1992 al 2000, en México se ha reportado una incidencia de 4 a 15.4 casos por 1000 nacidos vivos y ocupa la cuarta parte de morbilidad entre los neonatos hospitalizados, y el tercer lugar como causa básica de muerte<sup>6</sup>. En México se reportaron los resultados de una encuesta realizada en 18 unidades de terapia intensiva y la sepsis fue una de las primeras causas de ingreso en 85% de estas unidades. La principal causa de sepsis en la mayoría de los casos fue la neumonía (44%), seguida por la pancreatitis aguda grave (11%) y las infecciones de heridas quirúrgicas (11%). El choque séptico fue la primera causa de defunción en 8 de las 18 unidades de medicina crítica. En una unidad de cuidados intensivos de la Ciudad de México, la sepsis y el choque séptico ocuparon el primer lugar en diagnóstico de ingreso, egreso y defunción durante el año 2005<sup>7</sup>.

## 2.2 Patogenia de la sepsis

La sepsis se puede definir como una respuesta inflamatoria sistémica que ocurre durante una infección severa que puede manifestarse de diferentes maneras, incluyendo aumento o disminución de la temperatura corporal, incremento en el ritmo cardiaco, elevación en la cuenta leucocitaria, ritmo respiratorio elevado, estatus mental alterado. La sepsis puede clasificarse de acuerdo a sus etapas de gravedad en sepsis severa, la cual esta asociada con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión y puede incluir acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental, el choque séptico, que se caracteriza por la hipotensión inducida por sepsis a pesar de reanimación adecuada con líquidos, con anomalías de la irrigación sanguínea que pueden incluir acidosis láctica, oliguria y alteración aguda del estado mental y la disfunción orgánica múltiple (DOM), que se presenta cuando fallan dos o mas órganos, tales como, riñón, hígado, corazón, etc. La sepsis representa una respuesta inflamatoria sobre expresada en la cual los mecanismos de defensa del hospedero mediados por citocinas inducen lesiones celulares y orgánicas, tales como la apoptosis<sup>2:8</sup>.

En varias partes del mundo, se ha reportado que las bacterias más prevalentes identificadas en casos de sepsis en pacientes pediátricos han sido principalmente, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp* y *Streptococcus sp*<sup>2:9-12</sup>.

Durante la sepsis el sistema inmune está expuesto a productos bacterianos, antígenos (Ags) como el lipopolisacárido (LPS) que dañan los tejidos. Así, un posible mecanismo para la inducción de apoptosis de células T y la pérdida de la función inmune en la sepsis es la muerte celular inducida por activación (AICD, por sus siglas en inglés), en la cual el receptor de células T (TCR) reconoce a los Ags, permitiendo la proliferación y apoptosis. AICD es una forma de apoptosis desencadenada por señales originadas en los receptores de muerte celular presentes en la membrana. Los linfocitos T CD4+ responden a un Ag presentado por una célula presentadora de Ag normal secretando IL-2, proliferando y diferenciándose. La re-estimulación de un linfocito T por un Ag induce la co-

expresión de los receptores de muerte Fas y su ligando Fas-L; la unión de Fas con su ligando conlleva a la muerte del linfocito T por apoptosis<sup>8;13;14</sup>.

El LPS bacterial, como constituyente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, es el principal agente causante del choque séptico. Durante la sepsis, el LPS desencadena una compleja cascada de eventos de respuesta en las células, particularmente en monocitos, macrófagos (Mφ), y neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) que permiten la producción de mediadores intermediarios. El LPS inicia un flujo rápido y activación de leucocitos, acoplado con la sobreproducción de mediadores pro-inflamatorios, tales como TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 e IFN-γ, eicosanoides, NO y radicales libres, los cuales se encargan de dañar los tejidos, lo que precede el síndrome de DOM (es decir, pérdida de la integridad capilar, choque séptico y muerte). Posteriormente, se da un cambio en la producción de citocinas pro-inflamatorias a citocinas anti-inflamatorias Th2 (como IL-2, IL-4, IL-5 y principalmente IL-10), y también la desactivación de monocitos y apoptosis de linfocitos y células dendríticas, lo que da como resultado el estado inmuno-comprometido del paciente<sup>2;15-17</sup>.

Todos estos procesos, principalmente la pérdida de linfocitos, inducidos por sepsis pueden ser particularmente importantes no sólo por la extensa eliminación de células efectoras críticas del sistema inmune, sino también por la apoptosis masiva en órganos linfoides como el timo, el bazo, nódulos linfáticos y tejido linfoide gastrointestinal debido al efecto potencial inmuno-supresivo de células apoptóticas sobre el sistema inmune<sup>14;15</sup>.

La apoptosis se lleva a cabo en subpoblaciones de células linfoides como células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, incluyendo células B y células dendríticas. Además, se ha observado que la baja regulación en la respuesta inmune por células T regulatorias, así como la desactivación de la respuesta inmune tipo Th1, contribuye a la baja del sistema inmune en la sepsis<sup>2;14;18</sup>.

### **2.3 Apoptosis**

La apoptosis se define como la muerte celular programada, la cual es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis de las células (para mantener un

balance entre las nuevas células formadas y las células que mueren). Se caracteriza por rupturas en el DNA, condensación y fragmentación del núcleo, formación de vesículas en la membrana plasmática y alteraciones en la distribución lipídica de la membrana. Al final, la célula se descompone en cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados y degradados por los Mφ, por lo que el contenido de las células no se libera al medio y no hay una respuesta inflamatoria. La apoptosis es activada patológicamente en ciertas enfermedades, incluyendo desórdenes neurodegenerativos y sepsis<sup>2;14;15;19;20</sup>.

La inducción de la apoptosis supone la activación de unas enzimas citosólicas denominadas caspasas, las cuales pueden ser activadas por estímulos internos o externos. Las caspasas son cisteína proteasas (es decir, proteasas con aminoácidos de cisteína en su región catalítica) llamadas así porque cortan sus sustratos en las regiones de los residuos de ácido aspártico. Las caspasas están presentes como una forma inactiva (zimógeno, o enzima inactiva) en el citoplasma de la mayoría de las células. En esta forma inactiva, una caspasa está compuesta de una única cadena polipeptídica que incluye un pre-dominio y un dominio catalítico. Las caspasas se activan a sí mismas mediante la escisión de residuos de ácido aspártico, de forma que la caspasa activa que se genera es un dímero con dos subunidades catalíticas. Algunas caspasas actúan como iniciadoras del proceso de la apoptosis, a menudo escindiendo y, por tanto, activando a otras caspasas que actúan como efectoras, degradando múltiples sustratos que provocan la fragmentación nuclear y el resto de los cambios característicos de la apoptosis. La apoptosis puede llevarse a cabo por tres diferentes vías: la vía mediada por receptores de muerte (vía extrínseca), la vía mitocondrial (intrínseca) y la vía del retículo endoplasmático<sup>2;8;20;21</sup>.

Las 10 principales caspasas que han sido identificadas se clasifican de acuerdo a su función en las siguientes categorías: las iniciadoras (caspasas -2, -8, -9, -10), las efectoras o ejecutoras (caspasas -3, -6, -7) y las caspasas inflamatorias (caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14)<sup>8;20;21</sup>.

### **2.3.1 Vía intrínseca de apoptosis**

Esta vía implica estímulos que producen señales intracelulares que actúan directamente dentro de la célula y son iniciados por los acontecimientos en la mitocondria. Los estímulos que inician la vía intrínseca producen señales intracelulares que pueden actuar tanto en modo positivo como negativo. Las señales negativas implican la ausencia de factores de crecimiento, hormonas y citocinas que pueden conducir a que se lleven a cabo los programas de muerte, iniciando así la apoptosis. Los estímulos que actúan de una manera positiva son la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y los radicales libres. Todos estos estímulos provocan cambios en la membrana mitocondrial interna que se traduce en una apertura del poro de la membrana, lo que permite la permeabilidad mitocondrial, la pérdida del potencial transmembranal mitocondrial (MPT) y la liberación de las proteínas pro-apoptóticas, Smac/DIABLO y la serina proteasa HtrA2/Omi, al citosol. Estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas. Además existe un co-factor pro-apoptótico llamado citocromo C, el cual se une y activa Apaf-1, así como a la procaspasa-9, formando un complejo conocido como "apoptosoma". La agrupación de procaspasa-9 de esta manera conduce a la activación de la caspasa-9. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi participan promoviendo la inhibición de las IAP's (proteínas inhibidoras de apoptosis), originando de esta manera que se lleve a cabo la apoptosis. Las proteínas pro-apoptóticas, tales como Bax, Bad, Bak, Bim y Bik, se translocan del citosol a la membrana mitocondrial, provocando la formación de poros en la membrana, permitiendo la salida de factores pro-apoptóticos y así la activación de las caspasas efectoras. De esta manera se da la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina nuclear periférica<sup>1;8;20</sup>.

El control y la regulación de la apoptosis mitocondrial se produce a través de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2, los cuales regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y pueden ser pro-apoptóticas o anti-apoptóticas incluyendo Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-xS, entre otras. Estas proteínas tienen especial importancia ya que pueden determinar si la célula se compromete a la apoptosis o aborta el proceso<sup>1;8;20;22</sup>.

Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica de 25 kDa, fue descubierta en la translocación t(14;18) del oncogén de fusión expresado en linfomas foliculares y es responsable de prolongar la sobrevivida de las células. Un mecanismo por el cual Bcl-2 bloquea la apoptosis y promueve la sobrevivida celular es por medio de los factores de crecimiento (por ejemplo, IL-3, eritropoyetina) que son regulados por los miembros de Bcl-2 positivamente por fosforilación y regulan negativamente las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bad. Para Bcl-2, la regulación se da por el dominio del asa flexible (FLD) donde ocurren mono- o múltiples fosforilaciones. Se cree que el principal mecanismo de acción de la familia de proteínas Bcl-2 es la regulación de la liberación del citocromo C de la mitocondria a través de la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Bad se puede heterodimerizar con Bcl-x<sub>L</sub> o Bcl-2 neutralizando su efecto protector y la promoción de la muerte celular. Cuando no son secuestrados por Bad, tanto Bcl-2 como Bcl-x<sub>L</sub> pueden inhibir la liberación de citocromo C de la mitocondria, lo que impide la apoptosis<sup>1;8;13;20;22</sup>. Varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 en linfocitos ayuda a la supervivencia en sepsis. También se ha demostrado que la sepsis disminuye el nivel de expresión de Bcl-2 por los linfocitos y esta disminución en la expresión de Bcl-2 podría ser el mecanismo responsable o que contribuye a la apoptosis de los linfocitos<sup>19;23</sup>.

### **2.3.2 Vía del retículo endoplasmático de apoptosis**

Además de la mitocondria, el retículo endoplasmático (ER) es el segundo compartimento que participa en la vía intrínseca de la apoptosis. En el ER, mecanismos de control garantizan que solamente proteínas plegadas correctamente pasen a lo largo de la vía secretoria. El estrés para el ER incluyendo el estrés oxidativo, la toxicidad química, el tratamiento con ionóforos de Ca<sup>2+</sup> o la exposición a inhibidores de glicosilación, puede resultar en proteínas no-plegadas y perturba la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>. En muchos casos, la liberación del calcio del ER al citosol se requiere para la apoptosis inducida por estrés. El ER es el principal compartimento intracelular para el almacenaje de los iones Ca<sup>2+</sup>. El flujo de los iones Ca<sup>2+</sup> del ER está frecuentemente asociado con su entrada a la mitocondria. El calcio actúa como un mensajero que coordina, la señalización

entre la mitocondria y el ER. Una pequeña cantidad de citocromo C es liberado de la mitocondria al ER adyacente y se une a los receptores InsP3, permitiendo la apertura de los canales de calcio y aumentando la liberación del calcio del ER causando la salida masiva del citocromo C de toda la mitocondria. Finalmente, la retroalimentación positiva entre la mitocondria y el ER da como resultado la activación de las caspasas<sup>20;24</sup>.

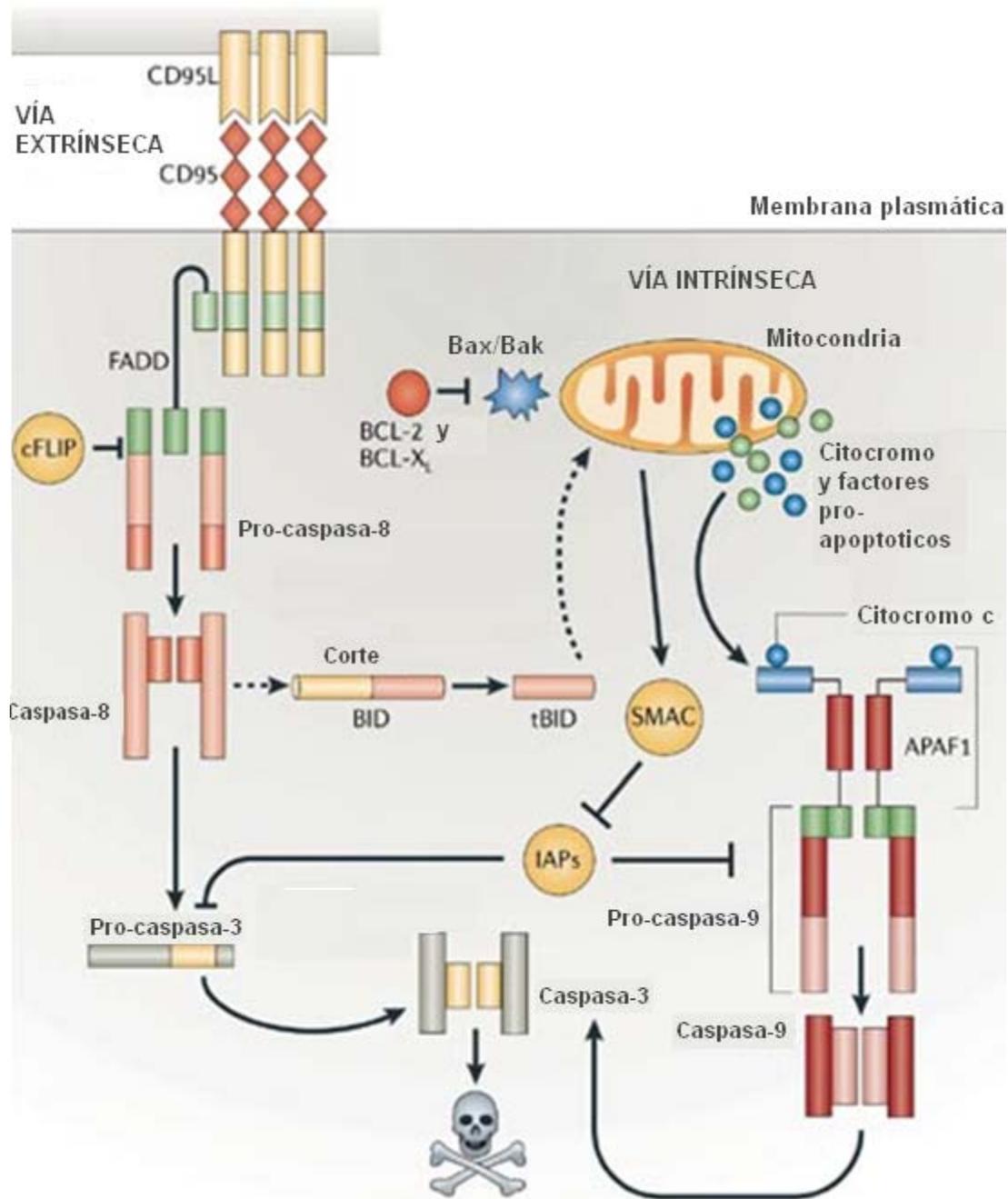
### **2.3.3 Vía extrínseca**

La vía extrínseca implica iniciar la apoptosis mediada por la interacción de receptores y ligandos transmembranales, y se trata de la muerte mediada por los receptores que son miembros de la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), los cuales comparten dominios extracelulares ricos en cisteína y tienen un dominio citoplasmático de alrededor de 80 aminoácidos llamado "dominio de muerte (DD)". Este dominio de muerte desempeña un papel fundamental en la transmisión de la señal de muerte de la superficie de la célula a la vía de señalización intracelular. La vía de receptores de muerte puede estar mediada por varios receptores de muerte; incluyendo Fas, receptor TNF tipo 1, receptor de muerte 3, receptor TRAIL tipo 1, entre otros; que resulta en la activación de la caspasa-8. Los receptores tienen que interactuar con sus correspondientes ligandos para activarse. Estos ligandos y sus correspondientes receptores de muerte incluyen Fas-L/Fas (conocidos también como CD95/CD178 y Apo1/TNFSF6), TNF- $\alpha$ /TNFR1, entre otros. Fas está expresado en muchos tipos celulares incluyendo leucocitos. El ligando de Fas (Fas-L) es una proteína transmembranal homotrimérica que se expresa fundamentalmente en los linfocitos T (activados por su antígeno e IL-2), monocitos y M $\phi$ . Esta activación induce la expresión de Fas-L resultando en la homotrimerización del receptor de muerte Fas, para que estos puedan unirse y así reclutar a la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas) la cual se asocia con la procaspasa-8 a través de la dimerización con el dominio efector de muerte (DED). En este punto, se forma DISC (complejo de señalización e inducción de muerte), dando lugar a la auto-activación catalítica de la procaspasa-8. Una vez que la caspasa-8 está

activada, la fase de ejecución de la apoptosis se activa ya que la caspasa-8 es capaz de activar a caspasas efectoras como la caspasa-3 (C-3) y desencadenar la apoptosis<sup>1;8;15;20;21;25;26</sup>.

### **2.3.3 Entrecruzamiento de la vía intrínseca y la vía extrínseca**

A pesar de la diferencia de inicio de la vía intrínseca y la extrínseca, éstas convergen en la activación de caspasas efectoras. Además, existe un entrecruzamiento de las dos vías, en donde la muerte por vía extrínseca puede llevar también a la muerte por la vía intrínseca. En algunas células, solamente una pequeña cantidad de FADD y C-8 son reclutados al DISC, por lo que la activación de C-8 es insuficiente para llevar a cabo la apoptosis; por esto, se requiere el involucramiento de la mitocondria para generar la apoptosis. La señalización apoptótica mediada por el receptor de muerte puede activar la vía mitocondrial a través de la proteína Bid. La C-8 activada en el DISC es suficiente para procesar (o "cortar") a Bid en el citosol generando a tBid (Bid procesada) el cual se transloca a la mitocondria permitiendo la disfunción mitocondrial y la formación del apoptosoma y finalizando en la apoptosis<sup>20</sup>.



Esquema 1. Vías de apoptosis: la vía extrínseca (por receptores de muerte) y la vía intrínseca (mitocondrial). La vía extrínseca es mediada por la caspasa-8, mientras que la vía intrínseca está mediada por la caspasa-9. FADD es una proteína adaptadora que se acopla a los receptores de muerte, tales como CD95, y también a C-8. Las dos vías son interconectadas por tBid que se forma cuando Bid es cortada por la C-8 activa. Bcl-2 inhibe la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, mientras que el dominio de Bax induce su pérdida. Al perderse este potencial, se libera el citocromo C de la mitocondria, que junto con Apaf-1 y la procaspasa-9 forman el apoptosoma. También, la mitocondria libera Smac y bloquea el efecto de las IAP's para prevenir la activación de caspasas. Las dos vías convergen en la activación de la caspasa-3, provocando la muerte celular<sup>2</sup>.

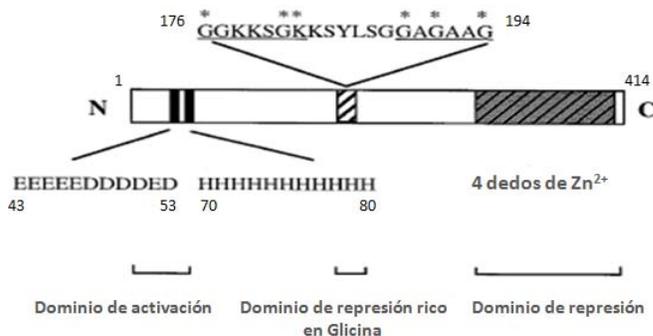
### 2.3.4 Ejecución de la vía intrínseca y extrínseca

Tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca tienen el mismo final en la vía de apoptosis, es decir, convergen en la activación de la C-3 efectora; la cual activa la endonucleasa citoplasmática CAD (DNasa activada por caspasa) que degrada material nuclear, proteínas nucleares y del citoesqueleto, provocando una reorganización en éste. CAD degrada al DNA cromosomal en el núcleo y ocasiona la condensación de la cromatina. La C-3 también induce la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos<sup>19;20</sup>.

Todas las caspasas efectoras, como son la C-3, C-6 y C-7, cortan varios sustratos incluyendo citoqueratinas, PARP (Poli [ADP-ribosa] polimerasa), lo que causa cambios bioquímicos y morfológicos observados en las células apoptóticas<sup>19;20</sup>. En la etapa temprana de apoptosis ocurre una externalización de la fosfatidilserina sobre la superficie de las células y un cambio en la simetría de los fosfolípidos, lo que permite el reconocimiento fagocítico sin ocasionar una respuesta inflamatoria<sup>19</sup>.

### 2.4 Factor de transcripción YY-1

La proteína YY-1 (Yin Yang 1), también conocida como  $\delta$ , NF-E1, UCRBP y CF, de aproximadamente 68 kDa, es un factor de transcripción ubicuo y multifuncional que posee cuatro dedos zinc tipo  $C_2H_2$  con dos dominios específicos que determinan su función como represor o activador. La represión transcripcional la lleva a cabo el dominio C-terminal mientras que el N-terminal actúa como un potente dominio activador<sup>9;27;28</sup>.



Esquema 2. Diagrama esquemático de la proteína YY-1. Se muestra los cuatro dedos de zinc tipo  $C_2H_2$  en la región C-terminal de la proteína y la secuencia de aminoácidos en las posiciones 176 a 194. Los aminoácidos que determinan la unión a nucleótidos en la región consenso están subrayados, los aminoácidos conservados están marcados con un asterisco. En la siguiente región se muestran los 11 aminoácidos ácidos y de histidina. Los dominios de activación y represión están indicados como rectángulos negros<sup>1</sup>.

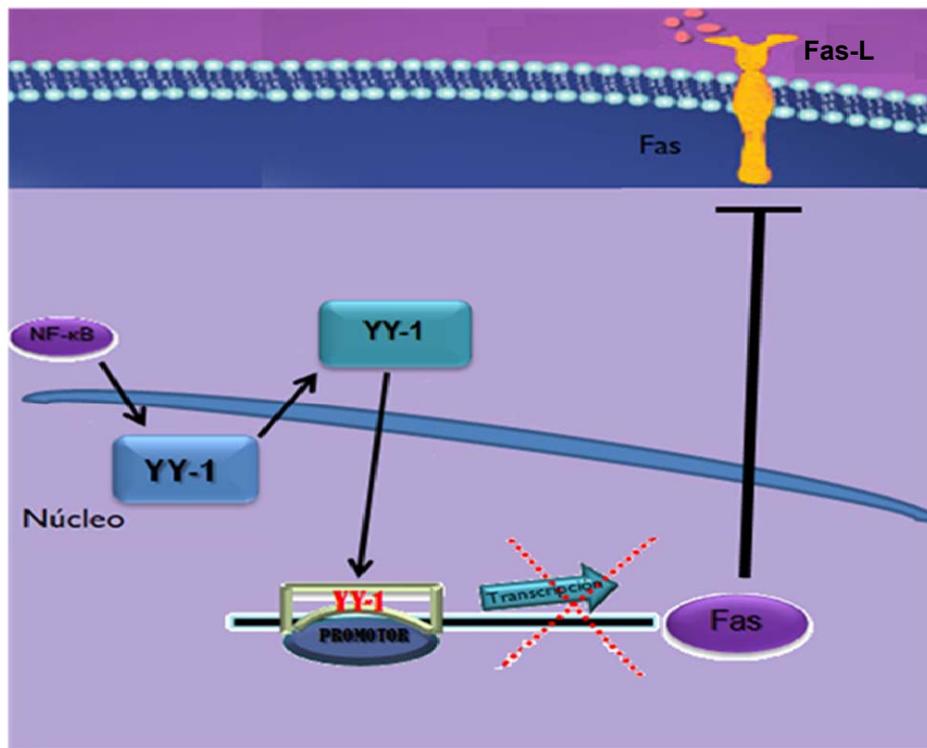
Se ha estimado que más del 7% de los genes de los vertebrados tienen sitios de unión a YY-1 el cual está involucrado principalmente en los procesos normales biológicos como la embriogénesis, diferenciación, replicación y proliferación celular. La acumulación nuclear de YY-1 coincide con el incremento en la actividad de YY-1 en la unión al DNA y una alta regulación de genes de histonas. Además, la expresión y función de YY-1 está asociada a la resistencia a estímulos apoptóticos, tumorigénesis y potencial metastásico. También regula citocinas pro-inflamatorias y otras moléculas involucradas en la apoptosis, tales como iNOS (NO sintasa inducible), IL-1, NO y TNF- $\alpha$ , entre otras<sup>27-29</sup>.

Aunque YY-1 está altamente expresado en las células del sistema inmune, la función de este factor en las respuestas inmunes está empezando a comprenderse. La pérdida temprana de YY-1 en el desarrollo de células B y la eliminación del locus de inmunoglobulinas, resulta en la reducción profunda de células B maduras en la periferia. Varias regiones en el promotor de genes de citocinas en células T incluyendo IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-5, tienen una secuencia consenso de sitios de unión de YY-1. YY-1 regula la expresión de los genes de citocinas en las células T, específicamente de las citocinas que promueven una respuesta tipo Th2 (en un modelo de alergia)<sup>30</sup>.

La inducción de apoptosis resulta en la rápida redistribución de YY-1 del citoplasma al núcleo celular. Además, YY-1 es un sustrato para las caspasas efectoras intracelulares de la apoptosis. Se ha observado en el dominio de transactivación dos distintos sitios de corte que resulta en YY-1 truncado en células apoptóticas que es deficiente en transactivación y aumenta la apoptosis inducida por Fas<sup>28;29</sup>.

TNF- $\alpha$  media la regulación de la resistencia a apoptosis mediada por Fas. La unión de TNF- $\alpha$  a TNFR1 activa a NF- $\kappa$ B que a su vez activa la expresión de los genes de TNF- $\alpha$  y YY-1 dando como resultado la unión de YY-1 a la región silenciadora del promotor de Fas, bloqueando la expresión de Fas y aumentando la resistencia a apoptosis mediada por Fas. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un importante regulador de apoptosis en las células. NF- $\kappa$ B coordina la expresión de muchos genes involucrados en la regulación de la inflamación, respuesta inmune,

proliferación celular y apoptosis. En su capacidad anti-apoptótica, NF- $\kappa$ B atenúa la apoptosis mediada por TNF- $\alpha$  a través del aumento en la producción de genes anti-apoptóticos. La regulación en la transcripción de Fas se ha demostrado que depende de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, la regulación negativa en la expresión de Fas puede ocurrir indirectamente vía un represor de transcripción como YY-1<sup>27;31</sup>.



Esquema 3. Regulación de la expresión de Fas mediada por YY-1. NF- $\kappa$ B activa la expresión del gene de YY-1 dando como resultado la unión de YY-1 a la región silenciadora del promotor de Fas bloqueando y disminuyendo la expresión de Fas y la resistencia de las células a apoptosis mediada por Fas.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La apoptosis tiene un papel importante en la patogénesis y en el desarrollo de complicaciones en pacientes con sepsis, por lo que es importante identificar la vía particular involucrada en la apoptosis de los linfocitos en la sepsis, debido a que ésta puede proveer factores potenciales responsables para iniciar el “suicidio celular” y podría permitir el desarrollo de una terapia más específica.

Algunos reportes han demostrado que la alta expresión de Bcl-2 protege a los linfocitos de la apoptosis y mejora la supervivencia en sepsis. Además, se ha observado que una disminución en la expresión de Bcl-2, genera un aumento en la apoptosis, lo que causa las complicaciones en la sepsis. Sin embargo, no se ha establecido la participación de Bcl-2 en una población infantil con sepsis, por lo que es necesario saber el papel que juega Bcl-2 en esta población.

Fas participa en la inducción de apoptosis en estos pacientes. También se sabe que el factor de transcripción YY-1 regula negativamente la expresión de Fas en modelos de cáncer de ovario y gastrointestinales, e incluso correlaciona con la evolución clínica de los pacientes. Sin embargo, no existe información sobre el papel del factor de transcripción YY-1 en la expresión de Fas en pacientes con sepsis. Por lo anterior, es necesario establecer la participación de YY-1 en la expresión de Fas.

Ante la falta de estudios que demuestren la participación del factor YY-1 como regulador de la apoptosis en sepsis en una población infantil, consideramos conveniente demostrar su posible participación en esta patogénesis.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

1. ¿Cuál es la relación entre la expresión de Fas, YY-1, Bcl-2 y la inducción de apoptosis en leucocitos de sangre periférica en niños con sepsis?

## **5. HIPÓTESIS**

- El nivel de apoptosis en leucocitos de SP de niños con sepsis está directamente relacionado con la expresión de Fas y con una disminución en la expresión de Bcl-2 y YY-1.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

- ✓ Conocer la relación entre la expresión de Fas, Bcl-2, YY-1 y el porcentaje de apoptosis en leucocitos de SP en niños con sepsis.

### **6.2 Objetivos específicos**

- ✓ Determinar el porcentaje de apoptosis en leucocitos de SP de niños con sepsis.
- ✓ Determinar la expresión de Fas, Bcl-2 y de YY-1 en leucocitos de SP de niños con sepsis.
- ✓ Determinar la vía de inducción de apoptosis en leucocitos de SP de niños con sepsis.
- ✓ Determinar la correlación entre la apoptosis y la expresión de Fas, YY-1 y Bcl-2 en leucocitos de SP de niños con sepsis.

## **7. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

El estudio se realizó con una población de 30 pacientes pediátricos con diagnóstico de sepsis, provenientes del servicio de terapia intensiva del Hospital General de Centro Médico Nacional (HGCMN) “La raza”, IMSS. Además, se consideraron 4 individuos sanos como grupo control, provenientes del Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez”.

### **7.1 Criterios de inclusión**

1. Pacientes de 2 meses a 15 años de edad.
2. Pacientes con diagnóstico de sepsis.
3. Que acepten participar en el estudio con una carta de consentimiento bajo información completa y exhaustiva, que sea otorgada por los padres ó el responsable legal del menor.

### **7.2 Criterios de no inclusión**

1. Pacientes que tengan tratamiento con inmunomoduladores
2. Pacientes con quimioterapia y procesos malignos.
3. Pacientes con trasplante.
4. Pacientes con enfermedades inmunológicas.
5. Pacientes con alguna infección de tipo viral (como VIH).

### **7.4 Criterios de exclusión**

1. Pacientes que decidan en cualquier momento ya no participar en el estudio.
2. Pacientes que mueran en las primeras 24 horas de su ingreso a terapia intensiva pediátrica del HGCMN “La Raza”, IMSS.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Separación de leucocitos**

Se realizó una mezcla 1:1 de sangre periférica problema con solución salina (SS) 0.9% NaCl, al mismo tiempo se midió el volumen de “Lymphoprep” estéril de acuerdo al volumen total de mezcla sangre/SS, guardando la relación 3 mL “Lymphoprep” por cada 10 mL de mezcla, colocándose en un tubo Falcon de 15 mL, la cantidad adecuada de “Lymphoprep” se adicionó lentamente por las paredes del tubo a la mezcla sangre/SS, cuidando que se estratificara y no se rompiera el gradiente de densidad. Posteriormente se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 30 minutos. En seguida se retiró el plasma y se separó la capa de leucocitos con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. Después se realizó una

mezcla 1:1 de los leucocitos obtenidos con SS y se centrifugó durante 20 minutos a 1500 r.p.m.; finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de SS.

## **8.2 Obtención de laminillas de leucocitos separados mediante el uso del “CITOSPIN”**

Después de la separación, los leucocitos se contaron agregando 50  $\mu\text{L}$  de leucocitos totales más 50  $\mu\text{L}$  de azul de tripano y se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de leucocitos/azul de tripano en una cámara de Neubauer y las células se contaron bajo microscopio con objetivo de 40x. Se realizó el cálculo para obtener  $5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  para la obtención de una laminilla a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ , se realizó la regla:

$$X = \frac{(5 \times 10^4 \text{ células}) (1000 \mu\text{L SS})}{\text{No. de células cuantificadas}}$$

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

Este valor se multiplicó por el número de laminillas a elaborar y el valor obtenido se completó con SS de tal forma que a cada celda de la cito-centrifuga se le adicionó 200  $\mu\text{L}$  de muestra para cada laminilla y se centrifugó 7 min. Después de haber transcurrido el tiempo, se dejaron secar a temperatura ambiente. Y finalmente se fijaron las células a las laminillas con formaldehído al 10% en vasos copplin a 4 °C por 20 min y se almacenaron para su posterior inmunotinción.

## **8.3 Determinación de la fragmentación de DNA mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxinucleotidyl transferasa Biotin-dUTP Nick End Labeling)**

Partiendo de las laminillas obtenidas mediante cito-centrifugación, se procedió a realizar la evaluación de la fragmentación del DNA mediante la técnica de TUNEL. Brevemente, se incrementó la permeabilidad de la membrana celular mediante la adición de citrato de sodio (pH= 6, 0.01 M) a 90 °C en baño María por 20 min. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%

por 25 min. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos a las células, sumergiéndolas durante 120 min en suero normal de cerdo al 2%. Posteriormente se realizó una mezcla adicionando 450  $\mu$ L de amortiguador; el cual contiene dUTPs marcados con fluoresceína con 50  $\mu$ L de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt); la cual se encarga de agregar los dUTPs en el extremo 3'OH del DNA. Después, se colocaron 25  $\mu$ L de la mezcla a cada muestra, la cual se incubó por 30 min en una cámara húmeda en oscuridad a 37 °C, después del tiempo, se lavó por 5 min con PBS 1x 5 veces a 100 rpm. Posteriormente, se agregó 20  $\mu$ L del anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a la peroxidasa de rábano y se incubó a 37 °C por 30 min en oscuridad. A continuación se lavó 5 minutos con PBS 1x 3 veces. El desarrollo de color se realizó con la adición de diamino bencidina (DAB) bajo microscopio con un objetivo de 40x registrando el tiempo de reacción. Cuando se observó la coloración café en las células se registró el tiempo y se detuvo la reacción eliminando el exceso de DAB e inmediatamente se lavó con suficiente agua corriente para detener la reacción, se contra tiñó con hematoxilina e inmediatamente se lavaron con agua corriente y finalmente se hizo la deshidratación de las muestras colocándolas en una rejilla y ésta se sumergió en una solución de agua destilada por 5 min. Después se pasó por alcoholes graduales (70%, 90% y absoluto) cada uno por 5 min. y finalmente se colocó la rejilla en xilol-etanol y xilol por 5 min. Por último, se procedió a montar con resina cada una de las laminillas; las cuales se dejaron secar mínimo 24 horas para el posterior análisis en el microscopio.

#### **8.4 Inmunocitoquímica**

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 procedió a efectuar la inmunotinción. Brevemente, se agregó citrato de sodio (pH= 6.0 a 0.01 M) por 20 min a 90 °C en baño María). El citrato de sodio se encarga de permeabilizar la membrana celular y cambiar la conformación de las proteínas para dejar más expuestos los epítopes de los ags, permitiendo de esta manera la unión entre los anticuerpos y los ags.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1x a 100 rpm para eliminar el exceso de citrato de sodio. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% por 25 min dos veces. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos a las células, sumergiéndolos durante 120 min en suero normal de cerdo al 2%. Posteriormente en laminillas independientes se agregaron los anticuerpos primarios anti-YY-1, anti-Fas, anti-Fas-L, anti-Bcl-2 (anticuerpos policlonales hechos en conejo), anti-C-8, anti-C-9 y anti-C-3 (anticuerpos policlonales dirigidos a las caspasas activas, hechos en cabra), a una dilución 1:250 a excepción de anti-Fas-L (1:100), con sus respectivos controles de isotipo (anticuerpo de la misma clase de inmunoglobulina de cadena pesada y la misma concentración que el anticuerpo primario, para asegurar que no haya una unión inespecífica de los anticuerpos primarios con las proteínas de interés). Se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas. Después se incubaron durante 30 min en cámara húmeda con un anticuerpo secundario que tiene especificidad para inmunoglobulinas de conejo y cabra, el cual está conjugado a biotina. A continuación se lavaron 5 veces con PBS 1x por 5 min a 100 rpm. Después se agregó estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano por 30 min en cámara húmeda. Por último se reveló, por una reacción de oxidación, mediante la adición del sustrato DAB, durante el tiempo necesario para originar la coloración café característica (el tiempo fue variable para cada marcador) y la reacción se detuvo con agua corriente. Se contra-tiñeron las laminillas con hematoxilina. Las muestras fueron deshidratadas bajo el siguiente esquema: agua, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100%, Xilol-Etanol y Xilol en baños de 5 min cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior análisis al microscopio.

### **8.5 Análisis morfométrico**

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y se cuantificaron 200 células, tomando en cuenta como positivas las que tuvieran un color café y las negativas con ausencia de la coloración café. Se utilizó un analizador de imágenes

con el programa Imagen-Pro Plus de Media Cybernetics, Silver Spring, MD. USA.

### **8.6 Procesamiento de los datos**

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prisma de GraphPad Software, Inc., San Diego, Ca. Los datos se presentaron mediante proporciones, desviación estándar y correlaciones.

## **9. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD**

El presente estudio se apegó al Manual de Buenas Prácticas Clínicas y se inscribió 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 contempló los posibles riesgos y los beneficios.

## **10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **10.1 Características clínicas de los pacientes**

Se estudiaron 30 pacientes con diagnóstico de sepsis (**Tabla 1**) y 4 individuos sanos como control. Los pacientes tuvieron una edad entre 2 y 180 meses teniendo un promedio de edad de 41 meses. De esta población, 16 niños fueron del género masculino y 14 niños fueron del género femenino. Además, 10 desarrollaron sepsis severa, 10 choque séptico y 12 con DOM. De los 12 pacientes que desarrollaron DOM, 10 de ellos fallecieron.

## 10.2 Evaluación de apoptosis por TUNEL

La apoptosis es una forma activa de auto-destrucción celular que juega un papel esencial en la homeostasis tisular, desarrollo embriogénico y el control de la respuesta inmune<sup>32;33</sup>. Los inductores de esta apoptosis incluyen a los esteroides, las citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-1, e IL-6, radicales libres de oxígeno, NO y linfocitos T que expresan Fas-L en su superficie<sup>34</sup>. Sin embargo, la apoptosis posee un lado oscuro: si esta es encendida en el momento inadecuado puede ocasionar la muerte de células cruciales. Este suicidio programado fue originalmente definido por la morfología de las células teñidas<sup>35;36</sup>. La apoptosis se caracteriza por una serie de eventos morfológicos que ocurren en diferentes periodos de tiempo<sup>37;38</sup>. El tiempo requerido por las células para sufrir muerte programada es usualmente definido por el estímulo que desencadena la apoptosis (Ej. Glucocorticoides, Fas-L, ausencia o disminución de factores de crecimiento, etc.), y varía con el tipo de célula<sup>36;39;40</sup>.

Las células apoptóticas frecuentemente se contraen y sufren cambios en la membrana citoplasmática, condensación rápida de la cromatina y agregación alrededor de la membrana nuclear, y formación de pequeños cuerpos apoptóticos<sup>38;41;42</sup>. En la mayoría de las células la condensación de la cromatina se debe a la acción de nucleasas específicas que cortan el DNA para producir el característico corte en escalera<sup>43</sup>.

La apoptosis de los linfocitos juega un importante papel en la adecuada función de la respuesta inmune<sup>44</sup>, ya que está implicada en la selección positiva y negativa de los linfocitos B y T. La apoptosis también regula la intensidad y la duración de la respuesta inmune, ya que los linfocitos activados son eliminados después de que se elimina exitosamente un proceso infeccioso<sup>45</sup>. Sin embargo, cuando la apoptosis tiene un mal funcionamiento, el resultado puede ser un severo daño al organismo.

La apoptosis puede ser otro importante mecanismo en la fisiopatología de DOM en sepsis. Todas las células tienen un lapso normal de vida; una vez completado, pueden sufrir apoptosis. Estas células en apoptosis son fagocitadas por los M $\phi$ . Se ha reportado un evento temprano de apoptosis en neutrófilos y linfocitos

durante la sepsis y la DOM. La vida media de un neutrófilo en circulación es de 6 a 20 horas y puede sobrevivir más de 48 horas en sitios de inflamación<sup>46</sup>. Se sabe que existe un elevado número de linfocitos en apoptosis tanto en órganos específicos como en la periferia en pacientes que desarrollaron DOM y murieron por sepsis. La mayoría de niños que mueren por sepsis severa y DOM no erradicaron la infección. Esto puede ser evidencia de que los componentes celulares del sistema inmune pueden estar comprometidos en todos estos pacientes con DOM, ya que como lo ha demostrado Hotchkiss y col.<sup>47</sup> la apoptosis de los linfocitos está relacionada al desarrollo de sepsis severa y DOM y en un modelo experimental la inhibición de esta apoptosis reduce la bacteremia e incrementa la sobrevivencia<sup>48</sup>. Aunque se sabe que existe correlación con la apoptosis en células periféricas u órgano específica con la severidad de la sepsis y el desarrollo de DOM y que esta apoptosis puede ser inducida por la expresión de Fas y su ligando, no se conocen los posibles mecanismos que regulen la expresión del sistema Fas/Fas-L.

En este estudio nosotros evaluamos la apoptosis de células mononucleares de sangre periférica (CMN SP) de pacientes con sepsis y determinamos diferentes marcadores para tratar de correlacionar y explicar los mecanismos que intervienen en la inducción de esta apoptosis.

Se observó la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. En la **Fig. 1** se muestran los resultados con los siguientes hallazgos: la apoptosis en las muestras de los pacientes fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) cuando fueron comparadas con las muestras de los controles sanos. Las **Fig. 1 A-C** muestran las inmunotinciones representativas de un individuo de cada grupo. En la **Fig. 1 D** se muestra el análisis de la inmunotinción del total de los pacientes en los dos grupos. Durante la apoptosis, la actividad de la DNasa genera fragmentos de DNA de bajo peso molecular y cortes de alto peso molecular; este proceso se identificó con la técnica de TUNEL. Con estos resultados, se puede afirmar que la muerte de los linfocitos de los pacientes con sepsis fue por apoptosis.

En la fotocomposición de los pacientes con sepsis se observa un cambio en la morfología de las células del paciente con respecto al control sano. En el control

sano se observan células con núcleos normales, escaso citoplasma y cromatina laxa; mientras que el paciente muestra células con abundante citoplasma, vacuolas y el núcleo se observa fragmentado como vesículas (cuerpos apoptóticos) (**Fig. 1 B y C**).

Como lo hemos venido señalando, diferentes estudios sugieren que el incremento de apoptosis en sepsis y su correlación con la severidad y la DOM son mediados por el sistema Fas/Fas-L. Esto sucede tanto por la expresión de Fas en órganos específicos como hígado, pulmones y tracto gastrointestinal y en células que conforman el sistema inmunitario y células no inmunitarias, como en la expresión de Fas-L de manera soluble o en células activadas. Sin embargo no se conoce hasta el momento cuales podrían ser los mecanismos que regulen la expresión de Fas en sepsis. Estudios realizados por nosotros y por otros investigadores han demostrado que el factor de transcripción YY-1 puede regular de manera negativa la expresión de Fas y la disminución en la expresión de YY-1 conlleva a un incremento en la expresión de Fas, teniendo como consecuencia un incremento en la susceptibilidad a la apoptosis en células malignas<sup>29;49</sup>.

### **10.3 Expresión de Fas, Fas-L y su correlación con la apoptosis**

En este estudio nosotros determinamos la expresión de Fas (**Fig. 2**) y la expresión de Fas-L (**Fig. 3**) en CMN SP de pacientes pediátricos con sepsis, mediante la técnica de Inmunocitoquímica. Los resultados muestran que existe un incremento estadísticamente significativo en la expresión de Fas en las células de los pacientes con sepsis ( $P < 0.05$ ), al ser comparado con la expresión de las células controles. Como se muestra en la fotocomposición en la **Fig. 2 A-C** es notable el incremento en la expresión de Fas en las células de los pacientes con sepsis. Al realizar el análisis de expresión en todos los pacientes (**Fig. 2 D**) se observa claramente que los pacientes expresan el doble de Fas que los controles. Estos datos son consistentes con reportes previos<sup>50</sup>. Es importante señalar que la expresión es principalmente citoplasmática en estas células. Al analizar la expresión del ligando de Fas, es notable también un incremento en las células de los pacientes con sepsis al ser comparados con los controles sanos ( $P < 0.05$ )

(Fig. 3). Al igual que para Fas se muestra la fotocomposición de una muestra representativa de cada grupo (Fig. 3 A-C) y el análisis de expresión de todos los pacientes analizados (Fig. 3 D). Es importante señalar que, en cuanto a intensidad, es más alta la expresión de Fas que la de su ligando en estas células y de igual manera que para Fas, el ligando se expresa abundantemente en el citoplasma. También, la expresión de Fas-L en células de pacientes con sepsis ha sido analizada previamente en tejidos órgano específicos y en su manera soluble, pero ésta es la primera vez que se muestra la expresión de Fas-L en células de sangre periférica donde al parecer, al igual que en el tejido órgano específico, correlaciona con la inducción de apoptosis<sup>50</sup>. Esta observación es corroborada al realizar un análisis de correlación entre la expresión de Fas y Fas-L con apoptosis (Fig. 11), donde se observa que existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de estos receptores y la muerte celular por apoptosis ( $P < 0.05$ , con una  $r = 0.5013$  y  $0.4003$  respectivamente).

Es importante considerar que la expresión de Fas es constitutiva en los linfocitos T y B, y que al llevarse a cabo un proceso de infección los linfocitos reciben señales de citocinas que hacen que se estimule aun más la expresión del receptor, provocando la apoptosis<sup>8</sup>. Mientras que la expresión del ligando de Fas es inducible en células activadas principalmente en linfocitos T, lo que podría explicar de cierta manera las diferencias en la intensidad de expresión entre Fas y su ligando. Pues como ya se mencionó en los controles la expresión del ligando de Fas es apenas del 7-10% mientras que para Fas es del 30%. Datos similares se observaron en las muestras de los pacientes con un 30% para la expresión del ligando de Fas y de 60% para Fas (Fig. 2 y 3).

#### 10.4 Expresión de YY-1

El factor de transcripción YY-1 está implicado en un gran número de procesos del desarrollo y maduración celular, siendo de gran importancia en estos procesos ya que se sabe que el ratón “Knockout” para este gene no es viable<sup>30</sup>. Dentro de los diferentes procesos de desarrollo y maduración celular están los relacionados a la apoptosis y como ya hemos mencionado muchas veces el receptor inductor de

muerte Fas está regulado de manera negativa por este factor de transcripción, en diferentes modelos de padecimientos malignos y autoinmunidad como el lupus sistémico eritematoso<sup>27</sup>. En la **Fig. 4** se muestra la fotocomposición y el análisis de expresión y comparación de YY-1 en CMN SP de pacientes con sepsis y los controles. Los resultados muestran que existe un ligero incremento en la expresión de este factor de transcripción YY-1 en las células de los pacientes comparadas con la de los controles. Es importante resaltar que este ligero incremento en la expresión es estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ). Esta expresión se observa importantemente en el núcleo, pero existe también expresión citoplasmática (**Fig. 4 C**). Las células de los controles sanos muestran una morfología normal; es decir, el núcleo es redondo, tiene escaso citoplasma y la cromatina es compacta. Mientras que las células de los pacientes tienen morfología característica de una célula en un proceso de infección, donde se observan vacuolas, núcleo en forma de bandas, cromatina laxa y abundante citoplasma.

Diferentes estudios han demostrado que la expresión de YY-1 es constitutiva en diferentes tejidos y tipos celulares<sup>51</sup>. Sin embargo, parece ser que la actividad transcripcional o expresión de YY-1 en linfocitos T y B, es baja<sup>52</sup>, pero durante el proceso de diferenciación de linfocitos B, no es baja<sup>53</sup>. Nuestros resultados parecen corroborar que la expresión de este factor transcripcional nuclear constitutivo miembro de la familia de GLI-Krüppel se expresa pobremente en CMN SP. Como se muestra claramente en la **Fig. 4 D** el nivel de expresión en los controles sanos es de apenas el 5%, y de 15% en los pacientes con sepsis. Estos resultados parecieran estar en contradicción con lo reportado por otros autores<sup>52</sup>, que muestran que linfocitos T tienen un elevado nivel de expresión de YY-1. Si consideramos que la sepsis induce un estado de activación por infección en linfocitos T, sería de esperar el encontrar una alta expresión de YY-1 en las células de estos pacientes, pero debemos considerar que el proceso de sepsis representa una progresión de un estado pro-inflamatorio hacia un estado anti-inflamatorio y finalmente una condición predominantemente apoptótica, pero también se ha considerado la posibilidad de que estos estadios ocurran de manera simultánea<sup>54</sup>. Por lo que la expresión de YY-1 contribuye, de alguna manera, con

el estado apoptótico de estas células, lo que causa un estado de inmuno supresión, provocando de esta manera que la sepsis evolucione a sepsis severa, choque séptico y DOM.

### **10.5 Correlación en la expresión de Fas y de YY-1 con la apoptosis**

Para tratar de definir el posible papel de YY-1 en la regulación de Fas en estas células realizamos un estudio de correlación entre la expresión de YY-1 y la expresión de Fas y el nivel de apoptosis. (**Fig. 10 A y 12**, respectivamente). Los resultados muestran que existe una correlación inversa entre el porcentaje de apoptosis y la expresión de YY-1 (**Fig. 10 A**), lo que sugiere fuertemente que la expresión de YY-1 en estas células juega un papel protector frente a la apoptosis, probablemente por la regulación negativa de la expresión de moléculas pro-apoptóticas como lo es Fas. Aunque en nuestro estudio no se establece claramente una correlación negativa entre la expresión de YY-1 y la de Fas (**Fig. 12**), creemos que esto es posiblemente debido a los bajos niveles de YY-1 encontrados en las muestras, que hace difícil el establecer esta correlación negativa con los niveles altos de expresión de Fas. O bien, que en estos pacientes, el estadio transitorio pro-inflamatorio a anti-inflamatorio no permita establecer esta correlación. Sin embargo, en este estudio logramos establecer la importancia de YY-1 en la inducción de apoptosis en estas células, ya que como se ha reportado anteriormente YY-1 inhibe la apoptosis inducida por Fas y la disminución en su expresión incrementa la susceptibilidad a Linfoma no Hodgkin (una línea celular de linfocitos B)<sup>55</sup>. Otros autores han demostrado también que la expresión de YY-1 en biopsias de pacientes con Linfoma Difuso de Células B correlaciona con el desenlace de estos pacientes<sup>56;56;57</sup>, lo que pareciera sugerir que la expresión de YY-1 juega un papel importante y pudiera ser empleado como un marcador pronóstico y dependiendo del padecimiento, pudiera predecir la evolución y desenlace del paciente.

Como se ha dicho, la apoptosis es un mecanismo importante para el mantenimiento en la homeostasis de tejidos. La activación y ejecución de la apoptosis son dependientes de caspasas. Una de las principales alteraciones en

el núcleo, durante la apoptosis, es la fragmentación del DNA. Este proceso induce una respuesta de reparación del DNA. Se piensa que la función de PARP es la de ser un sensor de corte y, por la ADP-ribosilación las proteínas en la vecindad del DNA se cortan, para generar un ambiente adecuado para el proceso de reparación. YY-1 es una de las pocas proteínas que ha demostrado estar modificada por PARP en respuesta al daño del DNA. La función de PARP esta estimulada por YY-1, sugiriendo el papel de esta proteína en el DNA para su reparación. La actividad de YY-1 en la respuesta a un estímulo apoptótico es la eficiente translocación de YY-1 al núcleo, independientemente del estado del ciclo celular de las células blanco y la ruptura específica de la molécula de YY-1 en dos sitios en el dominio de transactivación por las caspasas. Esto sugiere que YY-1 posee, además de su efecto en la proliferación y diferenciación, funciones durante la apoptosis. Además, la ruptura resulta en una proteína YY-1 que todavía puede unirse al DNA pero que es deficiente en la transactivación. La inducción de la apoptosis resulta en la rápida redistribución de YY1 del citoplasma al núcleo celular; además YY-1 es un sustrato para las caspasas efectoras intracelulares de la apoptosis. Y se ha observado en el dominio de transactivación dos distintos sitios de corte que resulta en YY-1 truncado en células apoptótica que es deficiente en la transactivación y aumenta la apoptosis inducida por Fas<sup>29</sup>. Por todo lo anterior, es posible explicar el aumento de la expresión de YY-1 en las células de los pacientes con sepsis en comparación con la expresión en las células de los controles sanos (**Fig. 4D**).

### **10.6 Expresión de la caspasa-8 y su correlación con la apoptosis**

Como ya hemos mencionado anteriormente la muerte celular por apoptosis puede ocurrir principalmente por tres diferentes vías: la vía extrínseca, la vía intrínseca y la vía inducida por el ER. Fas es una de las moléculas responsables de la inducción de apoptosis por la vía extrínseca. Fas esta expresado en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo timocitos, linfocitos B y T, monocitos, Mφ, neutrófilos, así como en una gran variedad de células no inmunes<sup>57</sup>. En este estudio y de acuerdo a trabajos previos que muestran que la apoptosis en sepsis

esta mediada por la vía extrínseca, nosotros determinamos la expresión de caspasa-8 como un marcador de esta vía de inducción de apoptosis en las CMN SP de pacientes con sepsis. Como se muestra en la **Fig. 5** nuestros resultados muestran claramente un incremento en la expresión de caspasa-8 activa en las muestras de pacientes con sepsis al compararlos con los controles. Como lo muestra el análisis de expresión este incremento en las muestras de los pacientes es estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Diferentes grupos de investigación han reportado que la apoptosis en sepsis esta relacionada a la vía Fas/Fas-L<sup>2;30</sup>, lo que es consistente con nuestros resultados donde vemos claramente un incremento de caspasa-8 activa en las muestras de pacientes con sepsis que mostraron un elevado nivel de apoptosis.

Para establecer si existe en estos pacientes una asociación entre el nivel de apoptosis y la expresión de caspasa-8 activa realizamos un análisis de correlación entre estas dos variables (**Fig. 9 A**). Los resultados muestran que existe una asociación entre la apoptosis y la expresión de caspasa-8 activa en las muestras de los pacientes con sepsis. Lo que sugiere fuertemente que la apoptosis que encontramos en las CMN SP de estos pacientes es mediada por la vía extrínseca y muy probablemente por la participación de Fas.

### **10.7 Expresión de la caspasa-9 y su correlación con la apoptosis**

Como se ha reportado previamente<sup>58</sup>, la vía extrínseca juega un papel importante en la apoptosis y severidad de la sepsis. Sin embargo también se ha reportado que la expresión de moléculas anti-apoptóticas como los miembros de la familia de Bcl-2 participa en la patogenia de la sepsis en modelos murinos. Lo que sugiere también el posible papel de la vía intrínseca en la inducción de apoptosis en sepsis<sup>59</sup>. Por lo que en este trabajo también determinamos la expresión de la caspasa-9 activa como un posible marcador de la vía intrínseca de apoptosis en sepsis. En la **Fig. 6** se muestra la fotocomposición y el análisis de la expresión de caspasa-9, mostrando que existe un importante incremento en la expresión de caspasa-9 si lo comparamos con los controles ( $P < 0.05$ ). De igual manera analizamos si existe correlación entre la expresión de caspasa-9 y la apoptosis en

estos pacientes (**Fig. 9 B**). Los resultados muestran que no existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de la caspasa-9 y la apoptosis. Sin embargo existe una tendencia de agrupación de las diferentes muestras con un elevado nivel de apoptosis y expresión de caspasa-9 activa (57%) (**Fig. 6**), lo que sugiere que al menos en la mitad de la población estudiada la participación de apoptosis de la vía intrínseca es importante y que en el resto de la población no fuera así, probablemente a que el mecanismo principal de apoptosis en ellos es la vía extrínseca. Por otro lado, sabemos que el proceso de sepsis es multifuncional y que implica, como ya lo comentamos, un estatus transitorio del estado pro-inflamatorio al estado anti-inflamatorio lo que podría también explicar parte de la diversidad en cuanto al comportamiento en la expresión de caspasa-9 y apoptosis en nuestra población de estudio. Aunque por otro lado, reportes indican que la vía intrínseca de la apoptosis juega un papel en la severidad de la sepsis<sup>60</sup>, lo que puede sugerir entonces que probablemente una vía no descarte la activación de la otra vía o bien durante la apoptosis en sepsis de una activación simultánea de las dos vías mediante un mecanismo que involucra la participación de Bid<sup>61;62</sup>. Estas dos vías apoptóticas pueden interconectarse por la activación de Bid mediado por la caspasa-8, lo cual desencadena la activación de la vía mitocondrial.

### **10.8 Expresión de la caspasa-3 y su correlación con la apoptosis**

Como ya se mencionó anteriormente las caspasas son una familia de proteasas de cisteína intracelulares que juegan un importante rol como mediadores esenciales de la apoptosis y son responsables de las alteraciones morfológicas asociadas con la apoptosis. La caspasa-3 es la principal desencadenante de la apoptosis entre todas las caspasas<sup>63</sup>. En este trabajo también determinamos la expresión de la caspasa-3 activa en las CMN SP de los pacientes con sepsis (**Fig. 7**). Los resultados son consistentes con los hallazgos al determinar apoptosis y muestran un claro incremento en la expresión de caspasa-3 en los pacientes con sepsis comparados con los controles ( $P < 0.05$ ). Al analizar si existía una correlación entre la apoptosis determinada por TUNEL y la expresión de caspasa-3, encontramos que existe una correlación significativa entre estos marcadores

(dato no mostrado) ( $P < 0.05$ ). La expresión de la caspasa-3 activa se observa en el citoplasma celular (**Fig. 7**). Para los controles sanos, se distingue una expresión muy baja en el citoplasma de las células, mostrando células con núcleo redondo, cromatina laxa y escaso citoplasma. En los pacientes se ve la misma morfología, pero se alcanzan a distinguir algunas vacuolas en la periferia de la célula y cuerpos apoptóticos, presentes solo en células que expresan la caspasa-3. Es importante mencionar que como se muestra en la **Fig. 7** también los controles muestran un nivel considerable de caspasa-3 activa por lo que la diferencia con las muestras es apenas estadísticamente significativa. Nosotros creemos, y como se menciona en la literatura, que existe la participación de otras caspasas efectoras en la apoptosis en sepsis como la caspasa-1. Recientemente Delogu et al. mostraron resultados similares con los que nosotros encontramos en este estudio<sup>64</sup>. Ellos adicionalmente analizaron la expresión de caspasa-1 en suero y mostraron un incremento significativo de esta caspasa en suero de los pacientes con sepsis, lo que sugiere un posible papel en la inducción de apoptosis en estas células. La importancia de la cascada de las caspasas en la apoptosis en sepsis ha quedado confirmada por los estudios realizados por Hotchkiss y col., ya que ellos demostraron que al emplear un inhibidor de amplio espectro de caspasas (z-VAD-FMK), previene la apoptosis de los linfocitos e incrementa drásticamente los rangos de supervivencia en un modelo murino de sepsis<sup>15</sup>.

### **10.9 Expresión de Bcl-2 y su correlación con la apoptosis**

Como se ha dicho, existen estudios que muestran evidencia de la importancia de la expresión de Bcl-2 en la inhibición de apoptosis con sepsis y su importancia en la patogénesis de este padecimiento<sup>65</sup>. Nosotros en este estudio analizamos la expresión de Bcl-2 en las CMN SP de pacientes con sepsis. En la **Fig. 8** se muestra el análisis de la expresión de Bcl-2 en los pacientes con sepsis, estos resultados muestran que hay un ligero incremento en la expresión en los pacientes con sepsis al ser comparados con nuestros controles, sin embargo esta expresión no es estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). La expresión de Bcl-2 se puede observar en el citoplasma celular (**Fig. 8**). Se puede observar que la morfología

entre los pacientes es característica de células que están cursando por una infección, mientras que las células de los controles sanos tienen células con características morfológicas normales, (descritas anteriormente). Nosotros no encontramos diferencias significativas en la expresión de Bcl-2 entre los pacientes y los individuos control debido a que como lo demostró Bilbault<sup>65</sup>, la expresión de Bcl-2 en estos pacientes es tiempo dependiente. En ese estudio se muestra que existe una disminución en la expresión de Bcl-2 en los pacientes con sepsis severa que mueren en comparación con los pacientes con sepsis que sobreviven. En este estudio solo comparamos la expresión basal de Bcl-2 en individuos sanos y es muy similar a la que se observa en los pacientes con sepsis, esto debido, probablemente, a que las muestras de los pacientes fueron tomadas dentro de las primeras horas del padecimiento, sin embargo podríamos encontrar diferencias entre los pacientes con los diferentes desenlaces (deceso y sobrevivida). De igual manera que con los demás marcadores, en este trabajo analizamos si existía una correlación inversa entre la expresión de Bcl-2 y la apoptosis en estas muestras (**Fig. 10 B**). Nuestros resultados muestran que no existe una correlación entre la expresión de Bcl-2 y la apoptosis. La falta de correlación, en este sentido, creemos que posiblemente se debe a que la expresión tiempo dependiente de Bcl-2 en sepsis no sea lo suficientemente alta para neutralizar el efecto de las proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak. O bien, a que en esos casos la apoptosis no sea principalmente inducida por la vía intrínseca, ya que como se ha reportado anteriormente, la apoptosis en sepsis puede ocurrir por ambas vías<sup>15</sup>. Por otro lado, también se sabe que la protección frente a la apoptosis en sepsis mediada por la expresión de Bcl-2 es célula dependiente, ya que se sabe que los linfocitos T muestran mayor expresión de Bcl-2 en comparación con los linfocitos B y esta expresión de Bcl-2 les confiere resistencia a la apoptosis en sepsis<sup>66</sup>.

**Tabla 1. Características clínicas de los pacientes pediátricos**

PACIENTES	EDAD/MESES	SEXO	SEPSIS	SEPSIS SEVERA	CHOQUE SEPTICO	DOM	DESCENLACE
P-1	8	Masc	si	no	si	si	defunción
P-2	8	Fem	si	no	no	no	mejoría
P-3	12	Masc	si	si	si	si	defunción
P-4	3	fem	si	si	no	si	defunción
P-5	2	masc.	si	si	si	si	defunción
P-6	120	masc.	si	no	no	no	mejoría
P-7	12	fem.	si	no	no	no	mejoría
P-8	3	masc.	si	no	no	no	mejoría
P-9	180	masc.	si	si	si	si	defunción
P-10	4	fem	si	si	no	si	mejoría
P-11	8	fem	si	no	no	no	mejoría
P-12	96	fem	si	no	no	no	mejoría
P-13	3	masc.	si	si	no	si	defunción
P-14	8	fem	si	no	no	no	mejoría
P-15	12	fem	si	no	no	no	mejoría
P-16	108	masc.	si	no	no	no	mejoría
P-17	3	masc.	si	si	si	si	defunción
P-18	12	fem	si	no	no	no	mejoría
P-19	12	masc.	si	no	no	si	defunción
P-20	3	fem	si	si	si	si	mejoría
P-21	84	masc.	si	no	no	no	mejoría
P-22	3	fem	si	si	si	si	defunción
P-23	180	fem	si	no	no	no	mejoría
P-24	108	masc.	si	si	si	si	defunción
P-25	108	masc	si	no	si	no	mejoría
P-26	12	fem	si	no	no	no	mejoría
P-27	84	masc.	si	no	no	no	mejoría
P-28	3	masc.	si	no	no	no	mejoría
P-29	3	masc.	si	no	no	no	mejoría
P-30	12	fem	si	no	si	no	mejoría

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes pediátricos. La población consta de 30 niños diagnosticados con sepsis teniendo una edad promedio de 41 meses; de los cuales, 16 fueron del género masculino y 14 fueron del género femenino. De esta población 10 desarrollaron sepsis severa, 10 choque séptico y 12 disfunción orgánica múltiple. Y solo una tercera parte de la población sucumbió.

## TUNEL

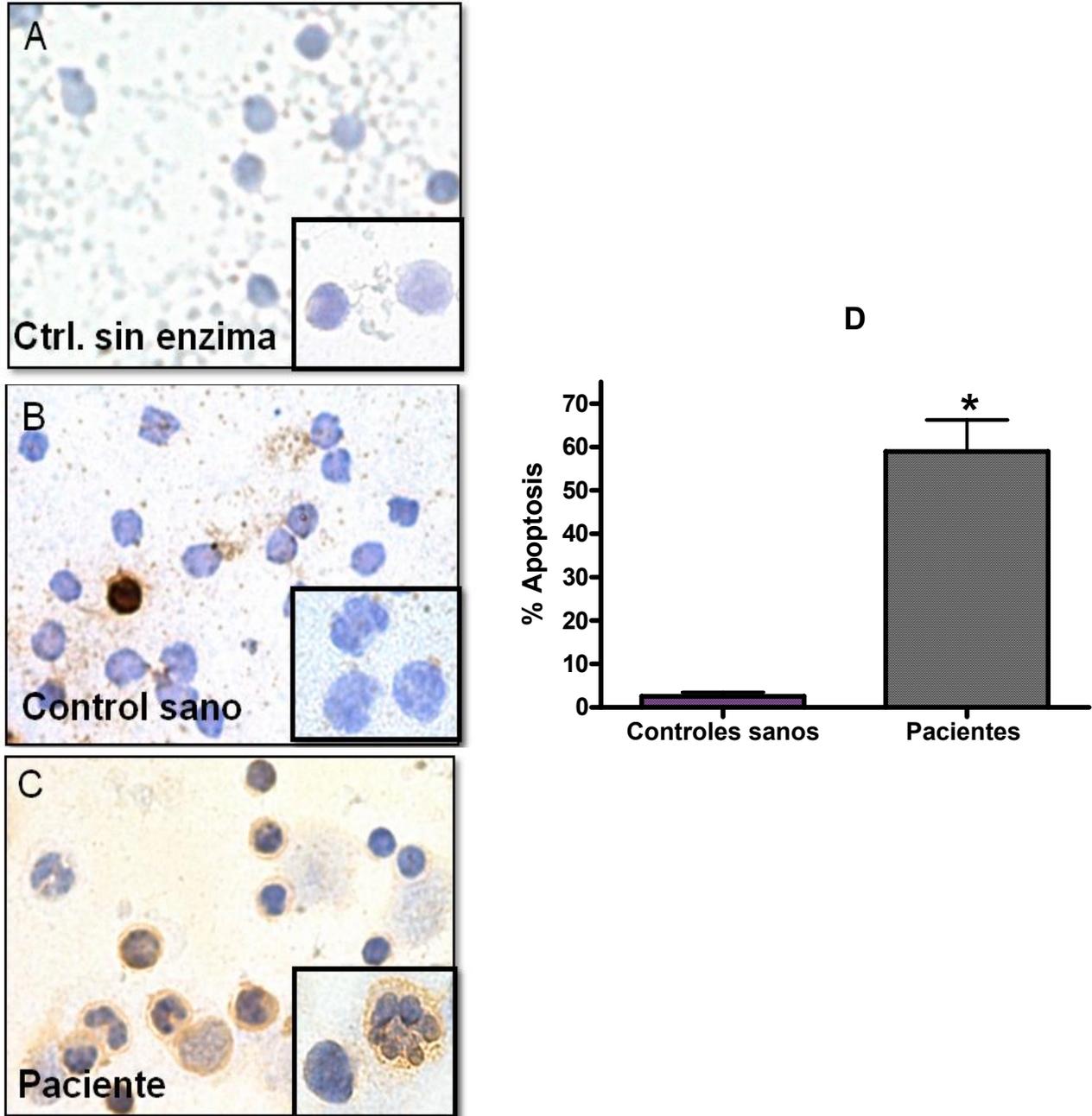


FIGURA 1. Determinación de apoptosis en CMN SP de niños con sepsis. A) Control sin enzima. B) Fragmentación de DNA en CMN SP de niños sanos y C) Fragmentación de DNA en CMN SP de niños con sepsis medidas con TUNEL a 40x y en el límite inferior derecho a 100x en cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la fragmentación de DNA en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n= 4/Controles sanos y n=25/Pacientes); \*,  $p < 0.05$ .

### Expresión de Fas

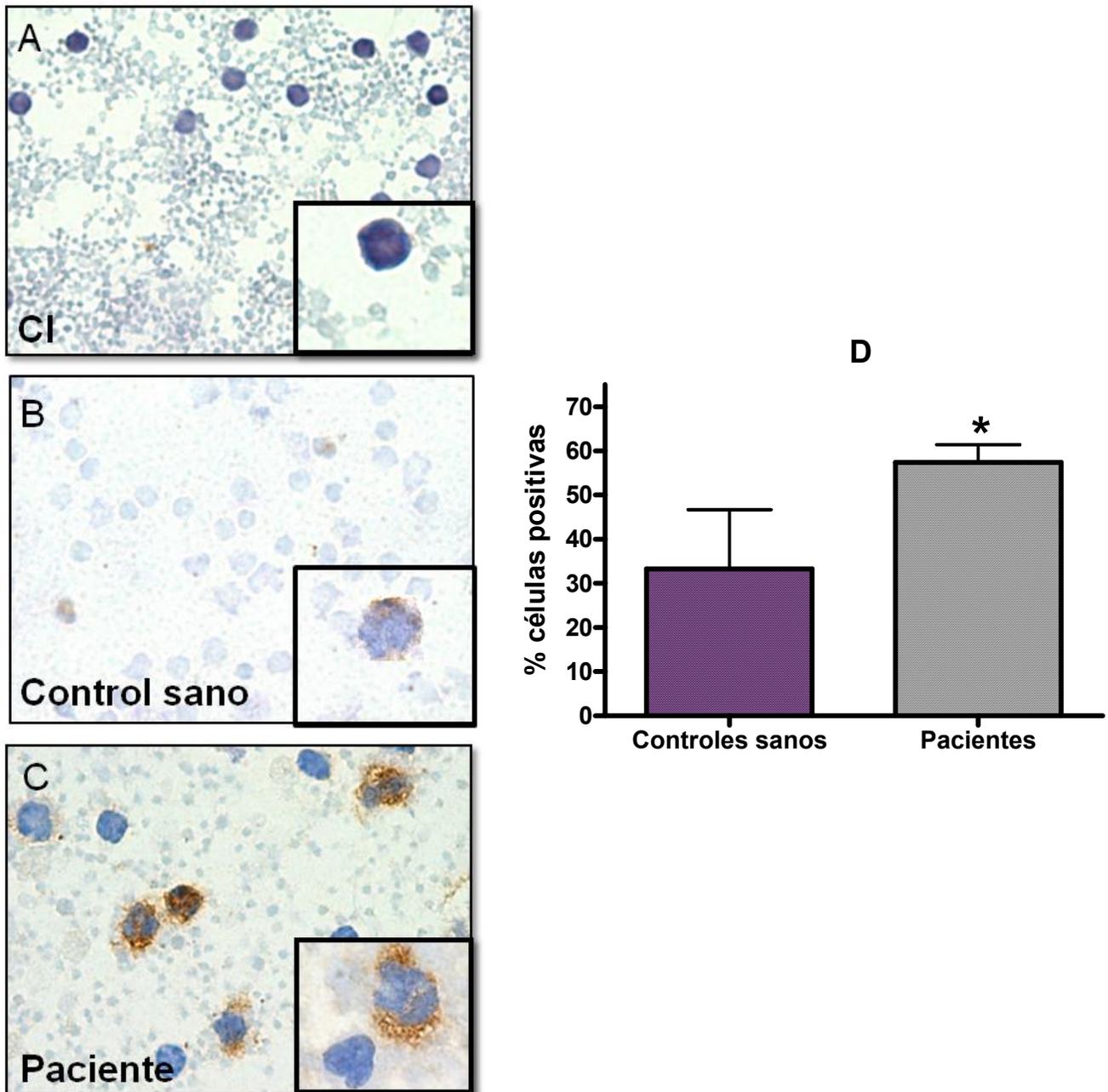


FIGURA 2. Determinación de la expresión del receptor de muerte Fas en CMN SP de niños con sepsis. A) Control de Isotipo. B) Expresión de Fas en CMN SP de niños sanos. C) Expresión de Fas en CMN SP de niños con sepsis medida con inmunocitoquímica a 40x y en el límite inferior derecho a 100x en cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la expresión de Fas en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n= 4/Controles sanos y n=27/Pacientes); \*, p<0.05.

### Expresión de Fas-L

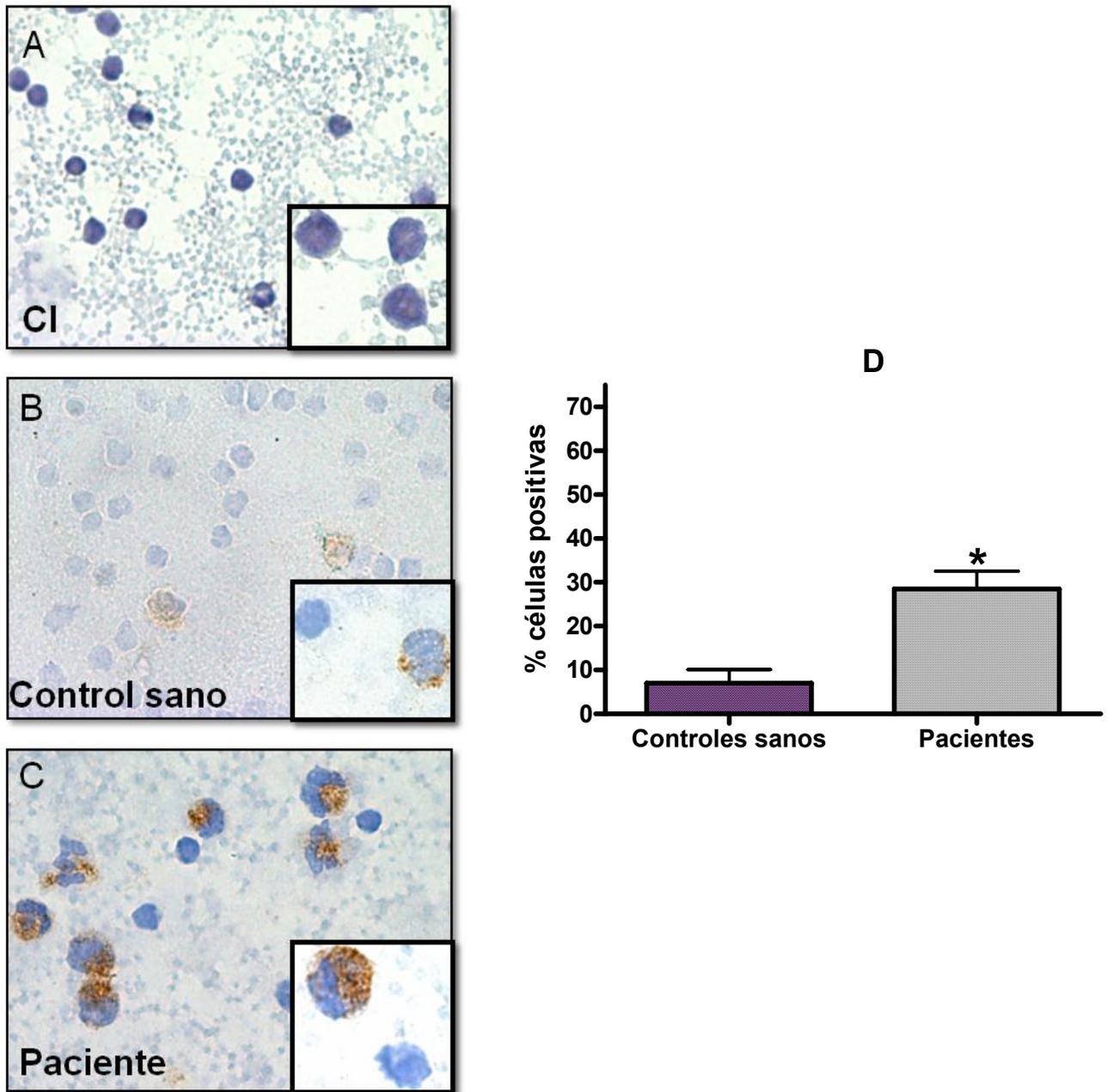


FIGURA 3. Determinación de la expresión del ligando de Fas en CMN SP de niños con sepsis. A) Control de Isotipo. B) Determinación de Fas-L en CMN SP de niños sanos. C) Determinación de Fas-L en CMN SP de niños con sepsis medida con inmunocitoquímica y observado a 40x y en el límite inferior derecho a 100x de cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la fragmentación de DNA en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n= 4/Controles sanos y n=29/Pacientes);\*, p<0.05.

### Expresión de YY1

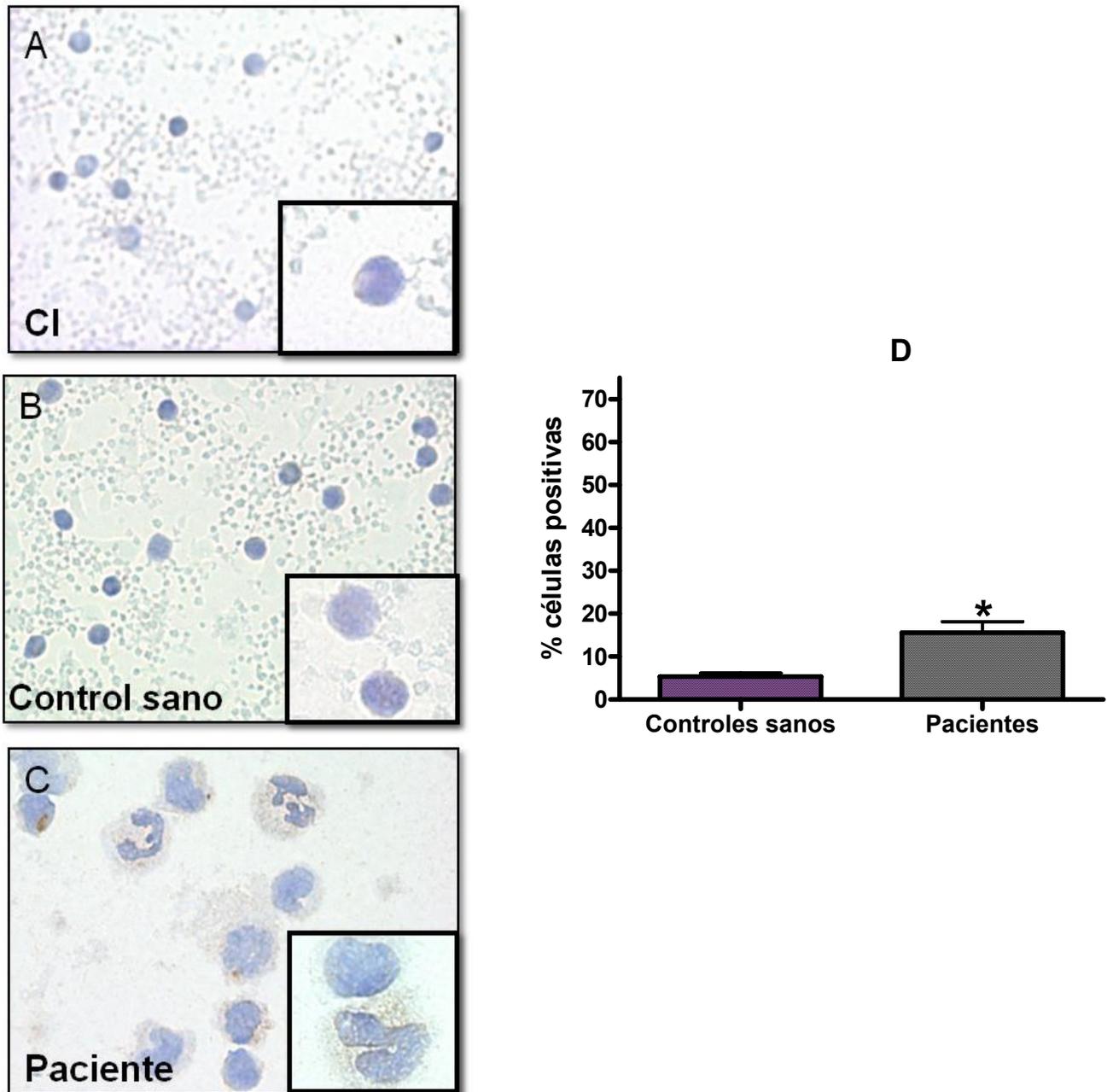


FIGURA 4. Determinación de la expresión del factor de transcripción YY1 en células de sangre periférica de niños con sepsis. A) Control de Isotipo. B) Expresión de YY1 en CMN SP de niños sanos. C) Expresión de YY1 en CMN SP de niños con sepsis medida con inmunocitoquímica y observado a 40x y en el límite inferior derecho a 100x de cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la expresión de YY1 en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n= 4/Controles sanos y n=23/Pacientes);\*, p<0.05

### Expresión de C-8 activa

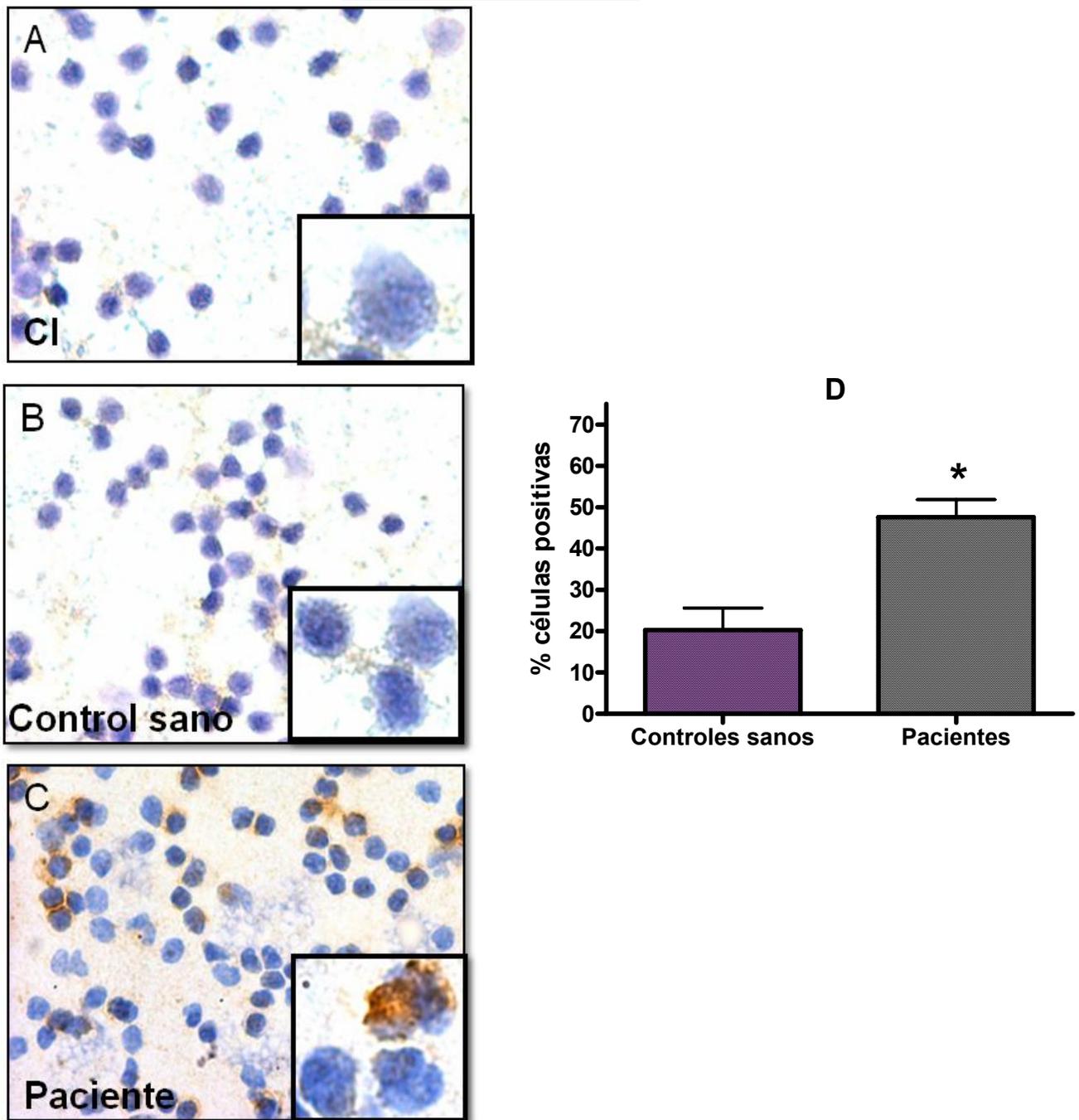


FIGURA 5. Determinación de la expresión de la caspasa-8 activa en CMN SP de niños con sepsis. A) Control de Isotipo. B) Expresión de C-8 activa en CMN SP de niños sanos. C) Expresión de C-8 activa en CMN SP de niños con sepsis medida con inmunocitoquímica y observado a 40x y en el límite inferior derecho a 100x de cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la expresión de C-8 activa en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n=4/Controles sanos y n=26/Pacientes); \*,  $p < 0.05$ .

### Expresión de C-9 activa

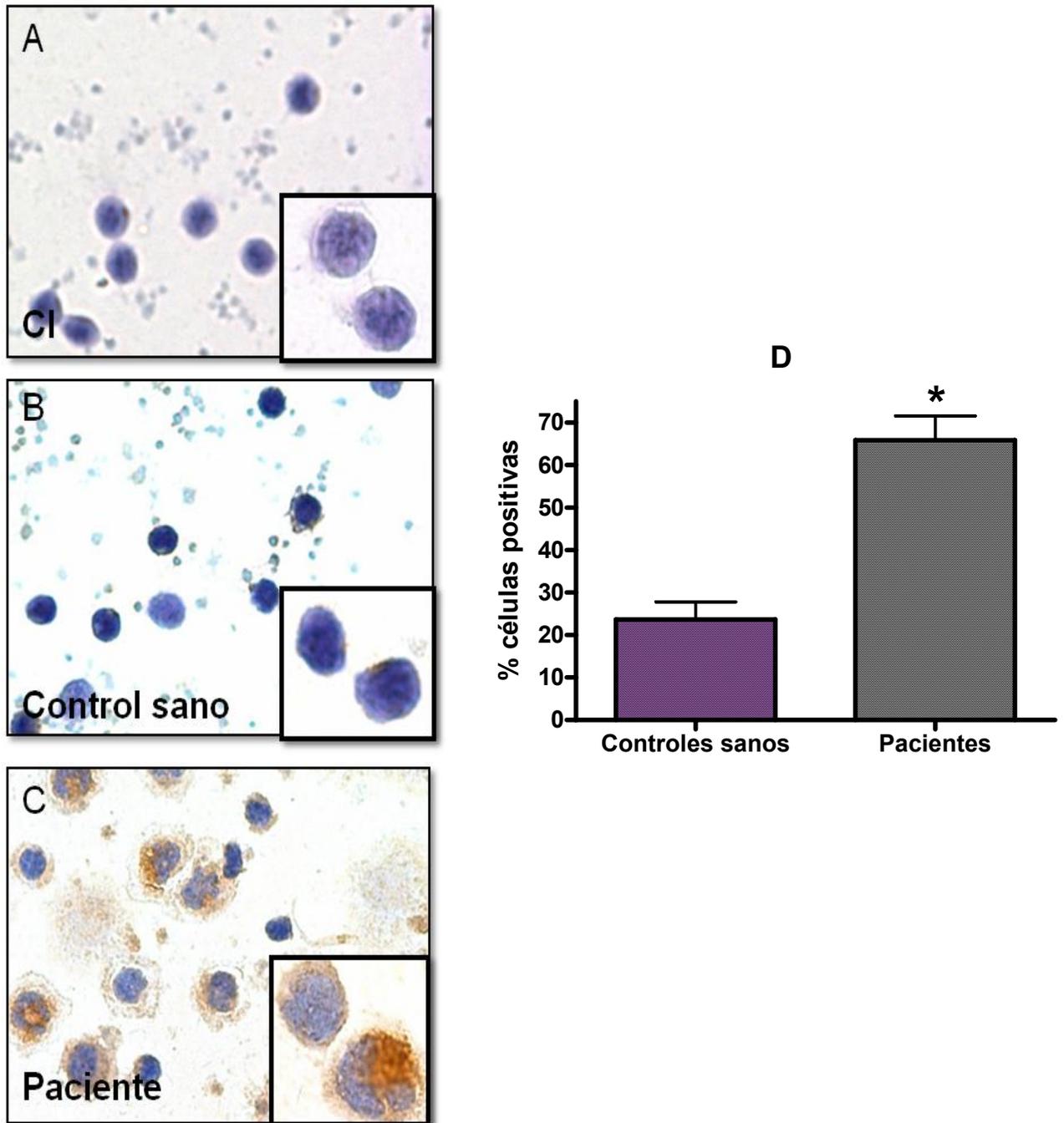


FIGURA 6. Determinación de caspasa-9 activa en CMN SP de niños con sepsis. A) Control de Isotipo. B) Expresión de C-9 activa en CMN SP de niños sanos. C) Expresión de C-9 activa en CMN SP de niños con sepsis medida con inmunocitoquímica observado a 40x y en el límite inferior derecho a 100x de cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la expresión de C-9 activa en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n= 4/Controles sanos y n=26/Pacientes); \*, p<0.05.

### Expresión de C-3 activa

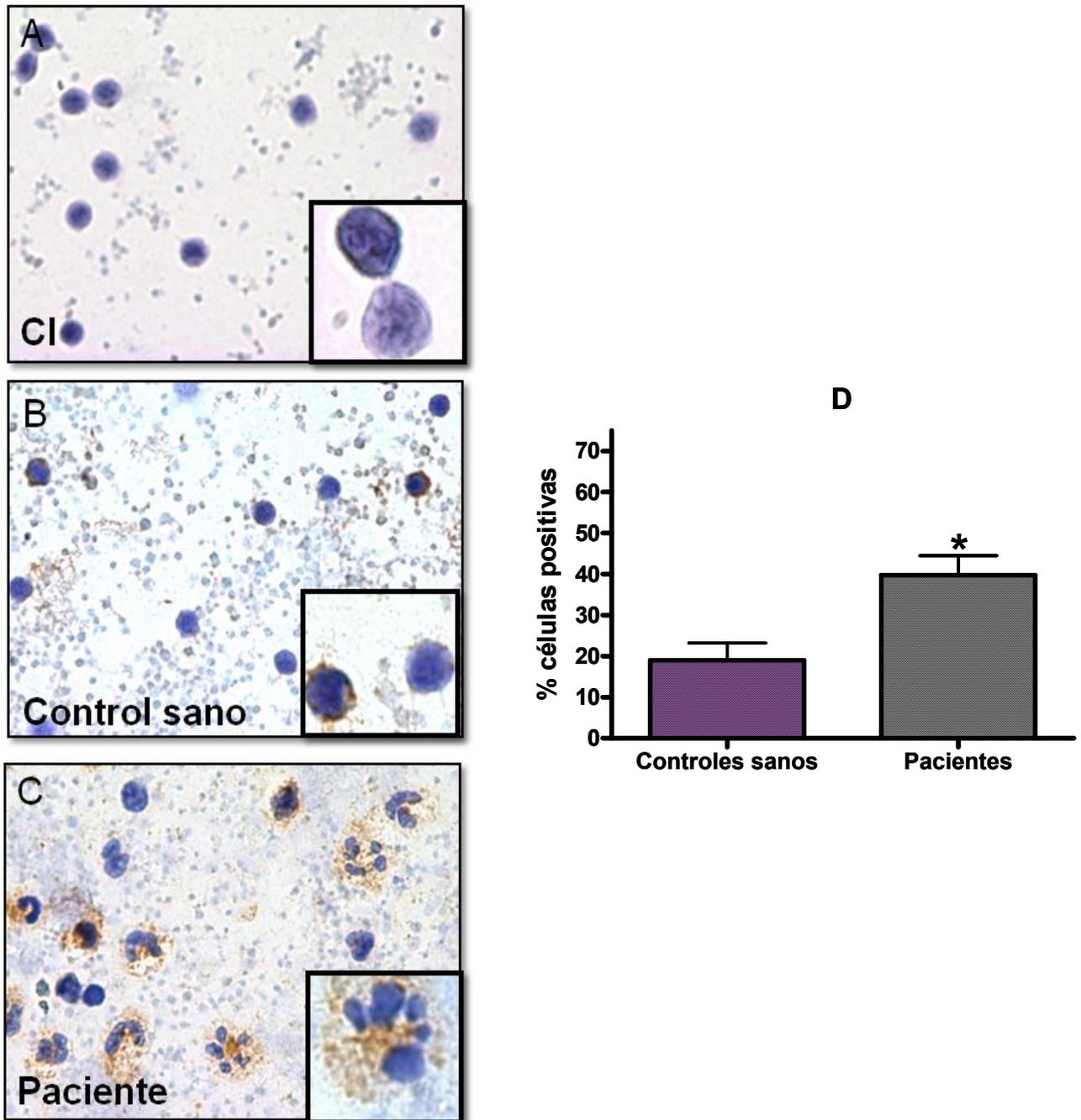


FIGURA 7. Determinación de la expresión de caspasa-3 activa en CMN SP de niños con sepsis. A) Control de Isotipo. B) Expresión de C-3 activa en CMN SP de niños sanos. C) Expresión de C-3 activa en CMN SP de niños con sepsis medida con inmunocitoquímica observado a 40x y en el límite inferior derecho a 100x de cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la expresión de C-3 activa en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n=4/Controles sanos y n=28/Pacientes); \*,  $p < 0.05$ .

### Expresión de Bcl-2

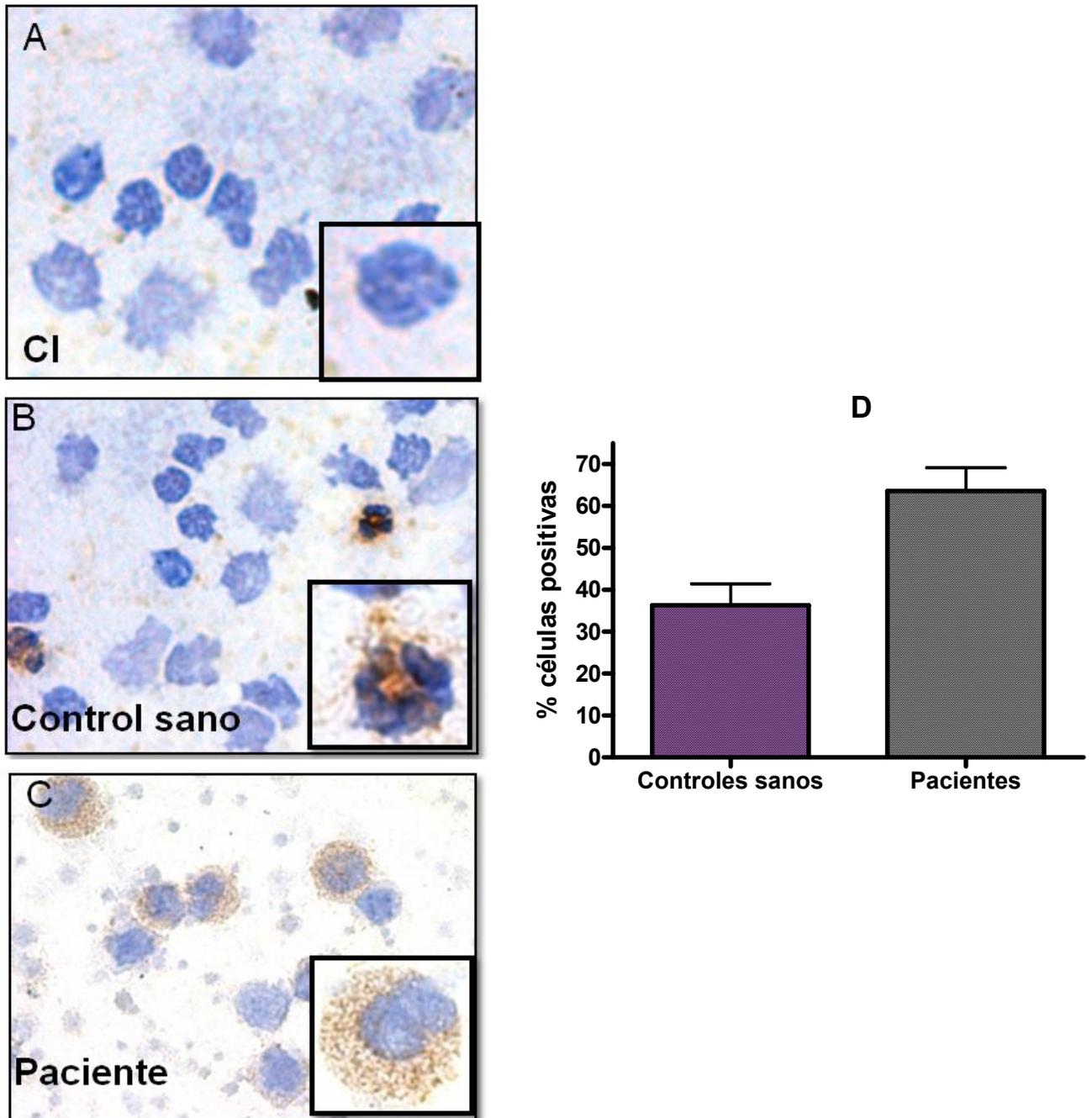
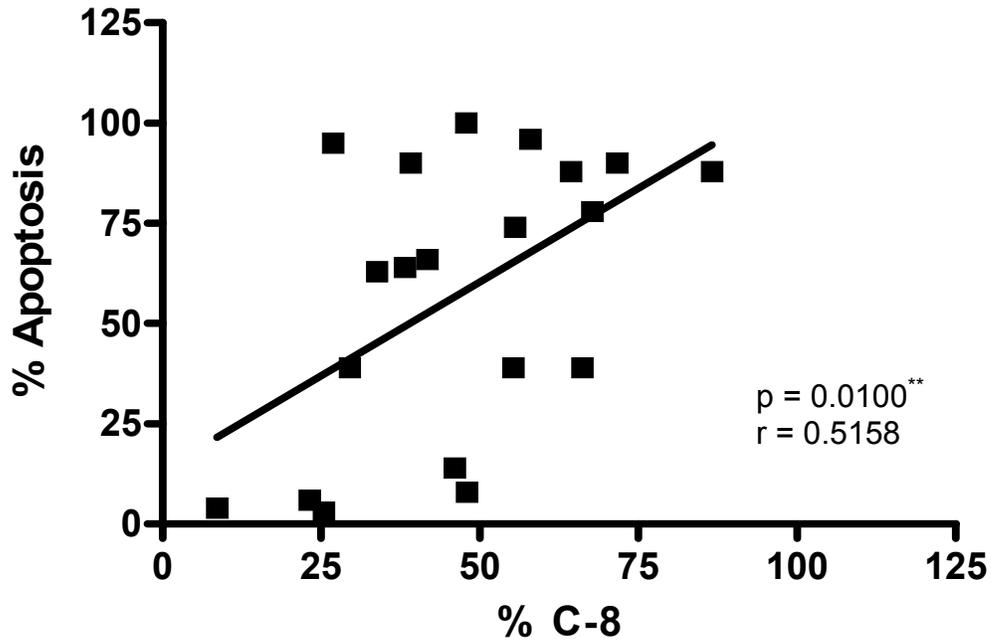


FIGURA 8. Determinación de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en CMN SP de niños con sepsis. A) Control de Isotipo. B) Expresión de Bcl-2 en CMN SP de niños sanos. C) Expresión de Bcl-2 en CMN SP de niños con sepsis medida con inmunocitoquímica observada a 40x y en el límite inferior derecho a 100x de cada una de las imágenes. D) Análisis cuantitativo de la expresión de Bcl-2 en CMN SP de niños con sepsis (Pacientes) y en CMN SP de niños sanos (Controles sanos). Los datos son analizados con una prueba de t de Student (n= 4/Controles sanos y n=26/Pacientes);  $p > 0.05$ .

### A. Correlación entre la C-8 y la apoptosis



### B. Correlación entre la C-9 y la apoptosis

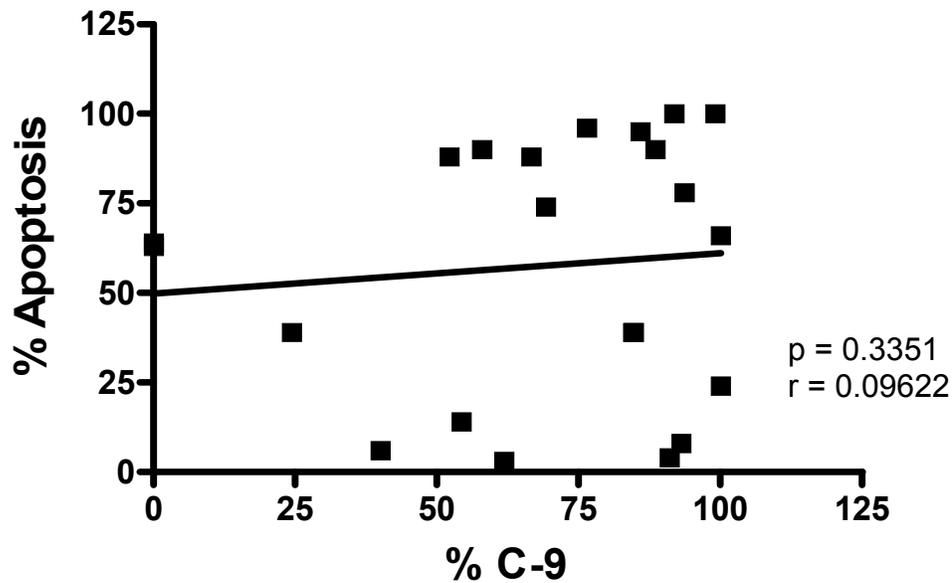
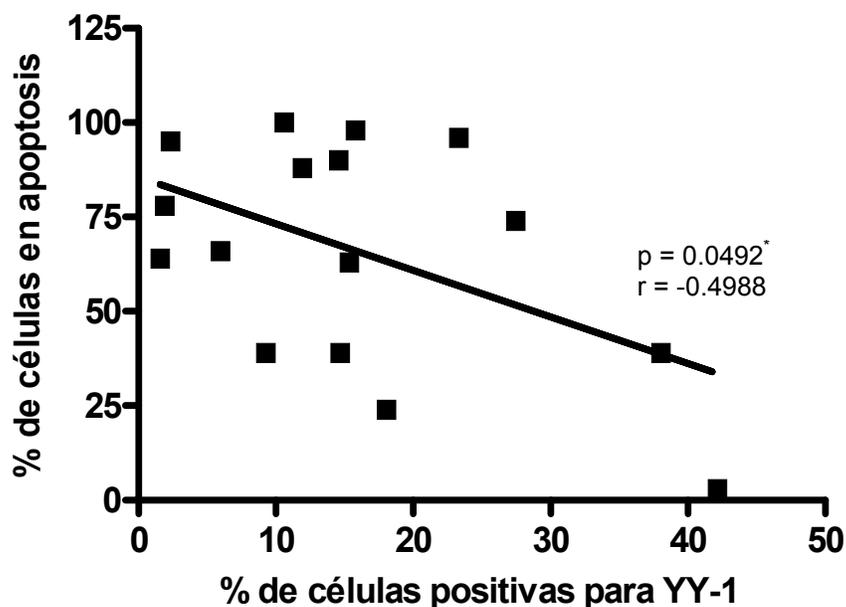


FIGURA 9. Correlación entre la apoptosis y la expresión de las caspasas activas 8 y 9, respectivamente en CMN SP de niños con sepsis. Analizado con una prueba de Pearson ( $n=20/C-8$  y  $n=22/C-9$ );  $** p<0.01$

### A. Correlación entre YY-1 y la apoptosis



### B. Correlación entre Bcl-2 y la apoptosis

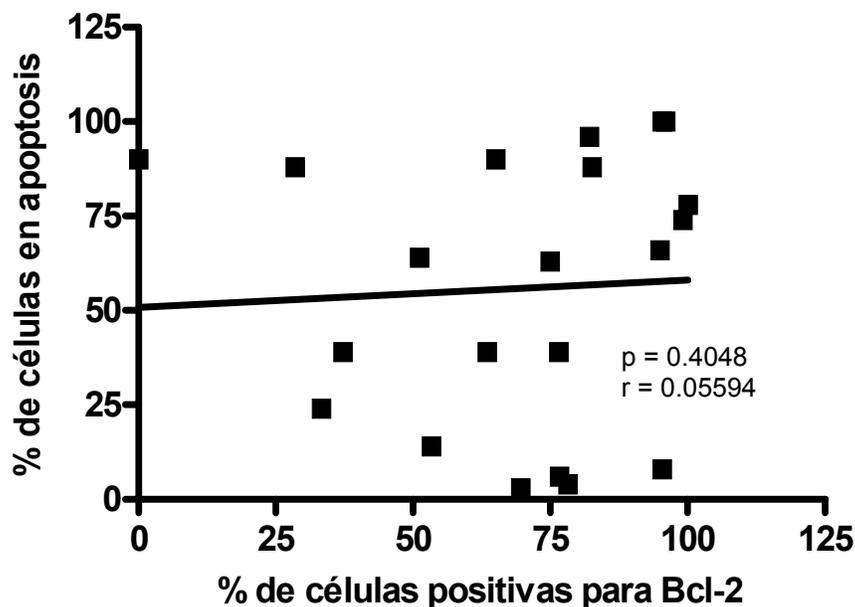
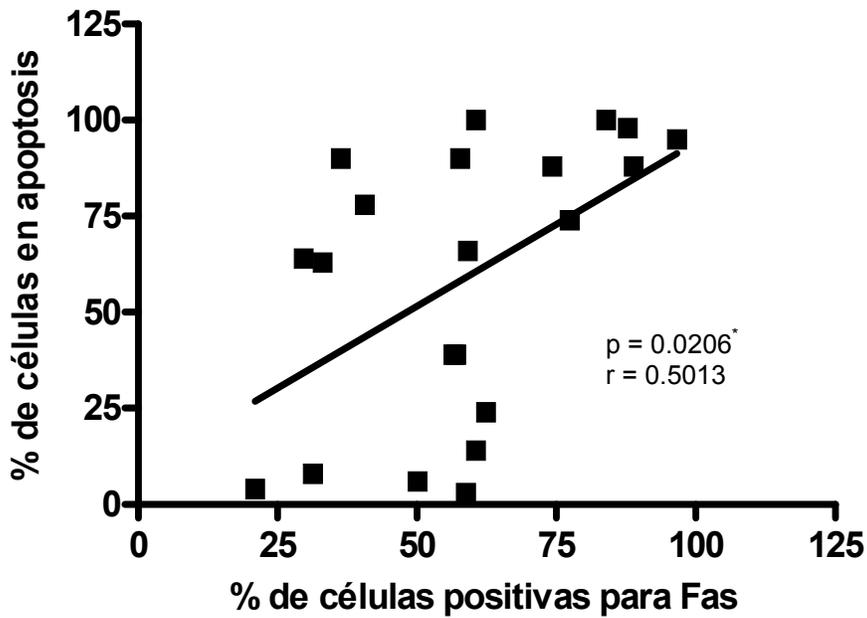


FIGURA 10. Correlación entre la apoptosis y la expresión del factor de transcripción YY1 y la proteína anti-apoptótica Bcl-2, respectivamente, en CMN SP de niños con sepsis. Analizado con una prueba de Pearson ( $n=16/YY1$  y  $n=20/Bcl-2$ ); \*  $p < 0.05$

### A. Correlación entre Fas y la apoptosis



### B. Correlación entre Fas-L y la apoptosis

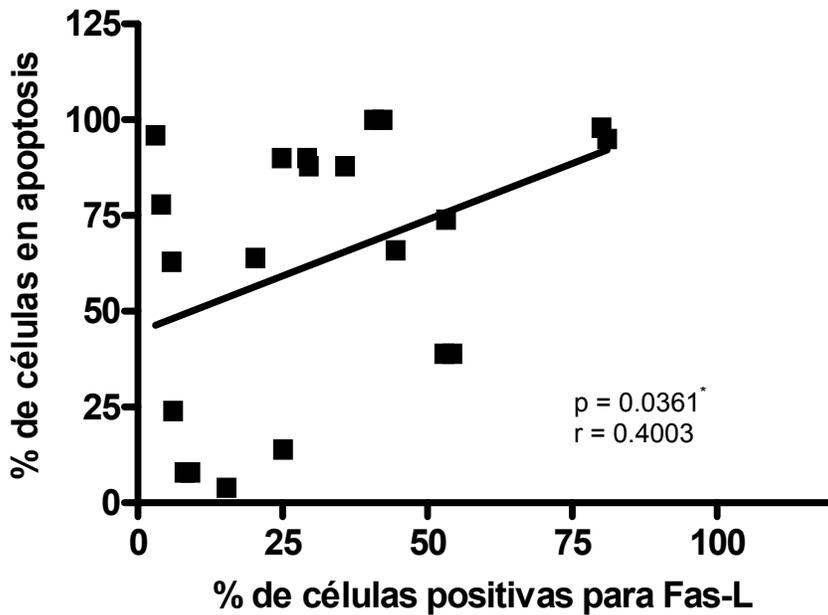


FIGURA 11. Correlación entre la apoptosis y la expresión del receptor de muerte Fas y Fas-L, respectivamente, en CMN SP de niños con sepsis. Analizado con una prueba de Pearson ( $n=20/\text{Fas}$  y  $n=20/\text{FasL}$ );  $p < 0.05$

## Correlación entre Fas y YY-1

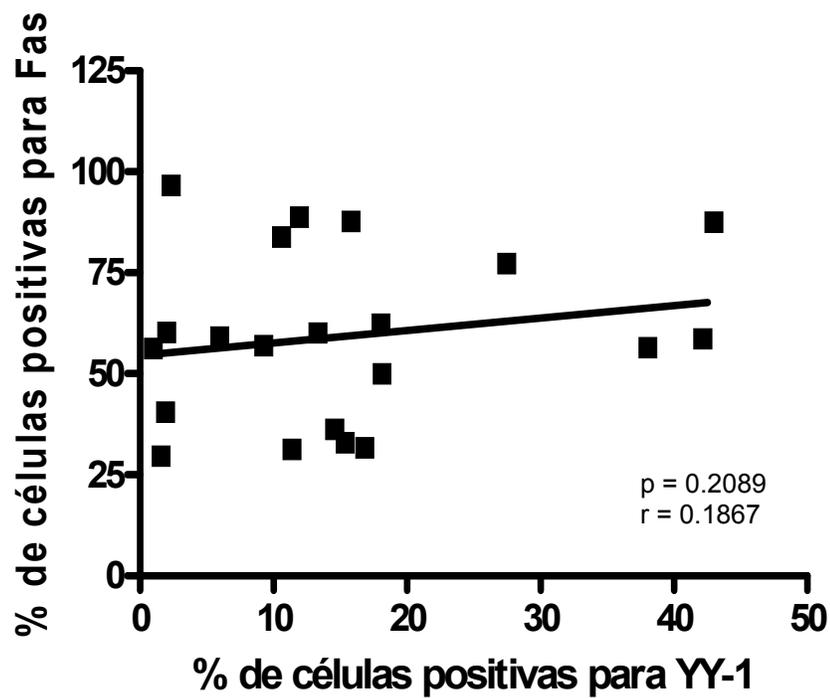


FIGURA 12. Correlación entre la expresión del receptor de muerte Fas y el factor de transcripción YY1 en CMN SP de niños con sepsis. Analizado con una prueba de Pearson (n=21);  $p > 0.05$

## 11. CONCLUSIONES

Los pacientes con sepsis están inmuno comprometidos de acuerdo a las evidencias de su incapacidad para eliminar los procesos infecciosos primarios y desarrollar infecciones secundarias. Un potencial mecanismo para esta inmuno supresión en sepsis es la apoptosis de linfocitos, la cual puede ocurrir por ambas vías de apoptosis (intrínseca y extrínseca)<sup>15</sup>. Diferentes estudios han demostrado que la apoptosis de los linfocitos en sepsis esta correlacionado con la patogenia y con la progresión, teniendo una directa relación con el desarrollo de sepsis severa y DOM<sup>67</sup>. Los mecanismos implicados en la apoptosis de los linfocitos y el desarrollo de DOM en sepsis, han sido estudiados en diferentes modelos y pacientes con sepsis<sup>50</sup>. Se ha definido que la participación del sistema Fas/Fas-L es crucial en este proceso. Sin embargo poco se sabe del mecanismo que pudieran regular la expresión de Fas en la sepsis. Este estudio es el primero en analizar la expresión del factor transcripcional YY-1 y su posible participación en la regulación de Fas y su consecuente participación en la inducción de apoptosis en sepsis. Se observó que existe una tendencia negativa entre la correlación de la expresión de YY-1 y la apoptosis, y una clara correlación positiva entre la apoptosis con la expresión de Fas y su ligando, lo que sugiere que YY-1 puede jugar un papel en la inducción de la apoptosis en sepsis mediante la regulación de la expresión de Fas y otros mecanismos. Por otro lado, también logramos establecer que existe una clara correlación entre la expresión de caspasa-8 activa y apoptosis lo que sugiere que la principal vía de inducción de apoptosis en este estudio pareciera ser la vía extrínseca, mediada por Fas, sin embargo también encontramos resultados que sugieren que la vía intrínseca esta participando, mediante el análisis en la expresión de caspasa-9. Finalmente, no se encontró una correlación entre la expresión de Bcl-2 y la apoptosis, sugiriendo que esta proteína no esta jugando un papel directo en la regulación de apoptosis en los pacientes con sepsis en este estudio y probablemente ser a través de otra proteína anti-apoptotica de la familia de Bcl-2.

## **12. PERSPECTIVAS**

El presente trabajo es el primer reporte de la expresión de YY-1 en células de pacientes con sepsis y abre un nuevo campo en la investigación de la fisiopatología de las complicaciones de la sepsis como lo es DOM. La propuesta es que la determinación de YY-1 y la apoptosis sirvan como marcadores junto con otro grupo de marcadores que en conjunto pudieran predecir el desenlace de los pacientes con sepsis. Para lo cual se pretende hacer más extensivo el estudio y conocer cual es la correlación en la expresión de la proteína YY-1 y su correlación con el desenlace clínico. Así como determinar la secreción de citocinas y su correlación con la expresión del factor de transcripción YY-1. Y poder determinar el índice pronóstico del factor de transcripción YY-1 y la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en los pacientes pediátricos con sepsis. También es necesario determinar la expresión de proteínas pro-apoptóticas, tales como: Bax y Bak, para saber el papel que ejercen en la vía intrínseca y tener una idea de cómo están interactuando con la proteína anti-apoptótica Bcl-2.

### 13. GLOSARIO

**DAB.** 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhidrido. Produce un producto de color café que es altamente insoluble en alcohol y otros compuestos orgánicos. DAB ha sido clasificado como un potencial cancerígeno y por esto tiene que ser manejado con el cuidado apropiado.

**Fosfatidilserina.** Es el principal fosfolípido soluble en grasa que se encuentra endógenamente en el cerebro y ayuda a establecer la integridad y la fluidez de las membranas celulares, es decir el medio ambiente interno de las células, la transducción de las señales, la liberación de las vesículas secretoras, la comunicación de célula a célula y la regulación del crecimiento celular. También es un componente de la membrana mitocondrial donde funciona como un depósito metabólico para otros fosfolípidos.

**Hipotensión inducida por sepsis.** Presión sistólica menor de 90 mmHg o reducción menor o igual de 40 mmHg de la presión basal, sin que haya ninguna otra causa para la hipotensión.

**IFN- $\gamma$ .** Citocina formada por varias proteínas. La principal fuente son las células T. Activa M $\phi$ , activa e influye en la diferenciación de las células T y activa a las células NK.

**IL-1.** Es una citocina producida por múltiples estirpes celulares, principalmente por M $\phi$  activados. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda. La IL-1 es liberada por los M $\phi$ , monocitos y células dendríticas en respuesta al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

**IL-2.** Citocina producida por las células T activadas por el antígeno que actúa de forma autócrina estimulando la proliferación de las células T y que también potencia la muerte celular apoptótica de las células T activadas por el

antígeno. Así, esta IL es necesaria para la inducción como para la autorregulación de las respuestas inmunitarias mediadas por las células T. También estimula la proliferación y las funciones efectoras de las células citotóxicas (NK) y de las células B.

- IL-4.** Citocina producida principalmente por la subpoblación Th2 de células T CD4<sup>+</sup> cuyas funciones son la inducción de la diferenciación de las células Th2 a partir de los precursores CD4<sup>+</sup> no estimulados, la estimulación de la producción de IgE por las células B y la supresión de las funciones de los Mφ dependientes del INF-γ.
- IL-5.** Citocina producida por las células T CD4<sup>+</sup> del tipo Th2 y por los mastocitos que estimula el crecimiento y la diferenciación de los eosinófilos y activa a los eosinófilos maduros.
- IL-6.** Citocina producida por muchos tipos de células, como los Mφ, las células endoteliales y los fibroblastos, que intervienen en la inmunidad tanto innata como adaptativa. La IL-6 estimula la síntesis de proteínas de la fase aguda por los hepatocitos, así como el crecimiento de los linfocitos B productores de anticuerpos.
- IL-10.** Citocina producida por los Mφ activados y por ciertas células T colaboradoras cuya principal función es inhibir a los Mφ activado y, por lo tanto, mantener el control homeostático de las reacciones inmunitarias innatas y mediadas por células.
- IL-12.** Citocina producida por los Mφ y las células dendríticas que actúa como mediador de la respuesta inmunitaria innata a los microorganismos intracelulares y es un inductor clave de las respuestas de inmunidad celular frente a estos microorganismos. La IL-12 activa a las células NK, promueve la inducción de IFN-γ por las células NK y las células T, potencia la actividad lítica de las células NK y promueve el desarrollo de las células Th1.

**InsP3.** Inositol 1,4,5-trifosfato, es un segundo mensajero intracelular que provoca la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en organelos como el ER.

**Linfoma no Hodgkin.** Es un tipo de cáncer que surge en los linfocitos, un tipo de glóbulo blanco de la sangre. Se denomina de este modo para distinguirlo de la enfermedad de Hodgkin, un subtipo particular de linfoma. De hecho, es un término que incluye muchas formas diferentes de linfoma, cada uno con sus características individuales.

**PARP.** Poli(ADP-ribosa) polimerasa, enzima de reparación de DNA. PARP se activa por los fragmentos de DNA y cataliza la unión de polímeros de ADP-ribosa a múltiples factores nucleares, facilitando la reparación del DNA.

**TGF- $\beta$ .** Citocina producida por las células T  $\text{CD4}^+$  y cualquier célula del sistema fagocítico mononuclear e inhibe la proliferación de las células T  $\text{CD4}^+$ .

**TNF- $\alpha$ .** Citocina producida por los M $\phi$ . Aumenta la citotoxicidad de macrófagos y neutrófilos, aumenta la expresión del MHC.

## 14. REFERENCIAS

1. Gerlach H, Keh D. Recent progress in sepsis epidemiology--have we learned enough? *Crit Care* 2003;7:333-334.
2. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:813-822.
3. Encuesta de 21 hospitales de México. *Salud Pública de México* , s18-s23. 1999. México.
4. Martínez Aguilar G. Incidencia de bacteremia y neumonía nosocomial en una unidad de pediatría. *Salud Pública de México* 2001;43:515-523.
5. Ramírez Sandoval ML. Etiología de la sepsis neonatal en una unidad hospitalaria de segundo nivel. *Salud Pública de México* 2007;49:391-392.
6. Rodríguez-Weber MA. Morbilidad y mortalidad en sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención. *Salud Pública de México* 2003;45:90-95.
7. Cabrera Rayo A. Mecanismos patogénicos en sepsis y choque séptico. *Salud Pública de México* 2008;24:38-42.
8. Abbas Abul K. *Inmunología celular y molecular*. España, Madrid: McGraw-Hill; 2003:227-231.
9. Abdeltawab NF, Aziz RK, Kansal R et al. An unbiased systems genetics approach to mapping genetic loci modulating susceptibility to severe streptococcal sepsis. *PLoS.Pathog.* 2008;4:e1000042.
10. Bantel H, Sinha B, Domschke W et al. alpha-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol.* 2001;155:637-648.

11. Blomberg B, Jureen R, Manji KP et al. High rate of fatal cases of pediatric septicemia caused by gram-negative bacteria with extended-spectrum beta-lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. *J Clin.Microbiol* 2005;43:745-749.
12. Sameshima H, Kodama Y, Kaneko M, Ikenoue T. Deaths of early-onset, invasive sepsis in full-term infants in Miyazaki: nine cases from a regional population-based analysis from 1998-2006. *Jpn.J Infect.Dis.* 2008;61:400-401.
13. Mott JL, Bronk SF, Mesa RA, Kaufmann SH, Gores GJ. BH3-only protein mimetic obatoclax sensitizes cholangiocarcinoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:2339-2347.
14. Unsinger J, Herndon JM, Davis CG et al. The role of TCR engagement and activation-induced cell death in sepsis-induced T cell apoptosis. *J Immunol* 2006;177:7968-7973.
15. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC et al. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005;174:5110-5118.
16. Niu J, Azfer A, Kolattukudy PE. Protection against lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction in mice by cardiac-specific expression of soluble Fas. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:160-169.
17. Ren Y, Xie Y, Jiang G et al. Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 2008;180:4978-4985.
18. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F et al. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol* 2008;180:6941-6946.
19. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol.Pathol* 2007;35:495-516.

20. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 2005;4:139-163.
21. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7:532-542.
22. Deng X, Gao F, May WS. Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. *Blood* 2009;113:422-428.
23. Komura H, Miksa M, Wu R, Goyert SM, Wang P. Milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII is down-regulated in sepsis via the lipopolysaccharide-CD14 pathway. *J Immunol* 2009;182:581-587.
24. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:3155-3162.
25. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:589-598.
26. Zhang Y, Zhang B. TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1861-1871.
27. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 2006;25:1125-1142.
28. Shi Y, Lee JS, Galvin KM. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... *Biochim. Biophys. Acta* 1997;1332:F49-F66.
29. Krippner-Heidenreich A, Walsemann G, Beyrouthy MJ et al. Caspase-dependent regulation and subcellular redistribution of the transcriptional modulator YY1 during apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2005;25:3704-3714.

30. Guo J, Lin X, Williams MA, Hamid Q, Georas SN. Yin-Yang 1 regulates effector cytokine gene expression and T(H)2 immune responses. *J Allergy Clin.Immunol* 2008;122:195-201, 201.
31. 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;120:297-309.
32. Holmstrom TH, Eriksson JE. Phosphorylation-Based signaling in Fas receptor-mediated apoptosis. *Crit Rev Immunol* 2000;20:121-152.
33. Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 2002;109 Suppl:S97-107.
34. Roth E, Pircher H. IFN-gamma promotes Fas ligand- and perforin-mediated liver cell destruction by cytotoxic CD8 T cells. *J Immunol* 2004;172:1588-1594.
35. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J Cancer* 1972;26:239-257.
36. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67-77.
37. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu.Rev Physiol* 1998;60:533-573.
38. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-190.
39. Koyama S. Apoptotic depletion of infiltrating mucosal lymphocytes associated with Fas ligand expression by *Helicobacter pylori*-infected gastric

mucosal epithelium: human glandular stomach as a site of immune privilege. *Dig.Dis.Sci.* 2000;45:773-780.

40. Trauth BC, Klas C, Peters AM et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989;245:301-305.
41. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001;44:2115-2133.
42. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
43. Liu X, Li P, Widlak P et al. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:8461-8466.
44. Porter BO, Malek TR. Prostaglandin E2 inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction. *Eur.J Immunol* 1999;29:2360-2365.
45. Newton K, Strasser A. Cell death control in lymphocytes. *Adv.Immunol* 2000;76:179-226.
46. Toledano BJ, Bastien Y, Noya F, Mazer B. Characterization of B lymphocytes rescued from apoptosis by platelet-activating factor. *Cell Immunol* 1999;191:60-68.
47. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166:6952-6963.
48. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000;1:496-501.

49. Vega MI, Jazirehi AR, Huerta-Yeppez S, Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol* 2005;175:2174-2183.
50. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999;27:1230-1251.
51. Austen M, Luscher B, Luscher-Firzlaff JM. Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CPB)-binding protein. *J Biol.Chem.* 1997;272:1709-1717.
52. Guo J, Casolaro V, Seto E et al. Yin-Yang 1 activates interleukin-4 gene expression in T cells. *J Biol.Chem.* 2001;276:48871-48878.
53. Park K, Atchison ML. Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:9804-9808.
54. Denlinger LC, Proctor RA. Potential risk factors for developing apoptosis during septic shock. *Crit Care Med.* 2000;28:2133-2134.
55. Vega MI, Huerta-Yepaz S, Garban H et al. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene* 2004;23:3530-3540.
56. Sakhinia E, Glennie C, Hoyland JA et al. Clinical quantitation of diagnostic and predictive gene expression levels in follicular and diffuse large B-cell

lymphoma by RT-PCR gene expression profiling. *Blood* 2007;109:3922-3928.

57. Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv.Immunol* 1999;71:163-210.
58. Chung CS, Song GY, Moldawer LL, Chaudry IH, Ayala A. Neither Fas ligand nor endotoxin is responsible for inducible peritoneal phagocyte apoptosis during sepsis/peritonitis. *J Surg.Res.* 2000;91:147-153.
59. Bommhardt U, Chang KC, Swanson PE et al. Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 2004;172:7583-7591.
60. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999;162:4148-4156.
61. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
62. Yin XM. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res.* 2000;10:161-167.
63. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis.* 2002;7:313-319.
64. Delogu G, Famularo G, Tellan G et al. Lymphocyte apoptosis, caspase activation and inflammatory response in septic shock. *Infection* 2008;36:485-487.
65. Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A et al. Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med.* 2004;30:408-415.

66. Menges T, Engel J, Welters I et al. Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications. Crit Care Med. 1999;27:733-740.
67. Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. J Immunol 2005;174:3765-3772.