



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
Facultad de Medicina División de Estudios de Posgrado
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD
PETROLEOS MEXICANOS
PROGRAMA DE ESPECIALIZACION EN PEDIATRIA

Cuantificación del porcentaje de apoptosis en células mononucleares de niños con leucemia, neutropenia y fiebre, del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos: Estudio descriptivo y comparativo

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN PEDIATRIA**

PRESENTA:

Paola Guadalupe Castro Oteo

Director de Tesis:

Dr. Jesús Reyna Figueroa

Asesores:

Dra. Patricia Galindo Delgado

Dra. Ana Elena Limón Rojas

Ciudad de México; julio del 2016



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.



Dra. Ana Elena Limón Rojas

Director del Hospital Central Sur de Alta Especialidad

PEMEX

Dra. Judith López Zepeda

Jefa del Departamento de Enseñanza e

Investigación

Dr. Guillermo Hideo Wakida Kuzunoki

Profesor Titular del Curso

Dra Xochitl Ramírez Machuca

Profesor adjunto del curso

Dr. Jesús Reyna Figueroa

Director de Tesis

Dra. Patricia Galindo Delgado

Asesor de Tesis



Dedicatoria

A mi familia, por permitirme volar, por las decisiones correctas y por las que nos hacen mejores personas día con día.



Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que de uno u otro modo colaboraron en la realizacion de este trabajo, especialmente a mi tutor, maestro y adscrito el Dr.

Reyna Figueroa, que a su muy manera de ser, da lecciones de vida.

Al Hospital Central Sur de Alta Especialidad a mi servicio pediatria y la familia que creamos, y a cada uno de los que forman parte del mismo, por aportar un grano de arena, a mi dia a dia.

A esos maestros que se vuelven amigos, y a esos amigos que se vuelven maestros con el caminar, por su tiempo compartido, por su gran apoyo y motivacion.

A los niños que en salud o enfermedad me recuerdan la razon por lo que elegi pediatria.

Mi mas sincera gratitud.



Índice

1. <i>Introducción</i>	7
2. <i>Pregunta de investigación</i>	10
3. <i>Marco teórico.</i>	11
3.1 <i>Epidemiología de la sepsis en pacientes con cáncer</i>	12
3.2 <i>Aspectos microbiológicos</i>	13
3.3 <i>Inmunología</i>	14
3.4 <i>Problemática en la identificación del individuo séptico</i>	15
3.5 <i>Apoptosis, sepsis y cáncer</i>	21
4. <i>Justificación</i>	24
5. <i>Hipótesis</i>	25
6. <i>Objetivos</i>	25
7. <i>Material y métodos</i>	25
7.1 <i>Diseño</i>	25
7.2 <i>Definición del universo.</i>	25
7.3 <i>Criterios de Inclusión</i>	25
7.4 <i>Criterios de Exclusión</i>	26
7.5 <i>Selección de casos y controles participantes.</i>	26
7.6 <i>Definiciones operativas</i>	26
7.7 <i>Grupos de pacientes</i>	27
7.8 <i>Obtención de muestras sanguíneas</i>	27
7.9 <i>Hemocultivos.</i>	27
7.10 <i>Aislamiento de células polimorfonucleares de sangre periférica de pacientes con sospecha de sepsis</i>	28



7.11 <i>Septifast</i>	28
7.12 <i>Detección de apoptosis</i>	29
7.13 <i>Tipo y diseño general del estudio</i>	29
7.14 <i>Tamaño de la muestra.</i>	30
7.15 <i>Análisis estadístico</i>	30
7.16 <i>Consideraciones éticas y de bioseguridad</i>	30
8. <i>Resultados</i>	31
8.1 <i>Características Generales</i>	31
8.2 <i>Porcentaje de apoptosis</i>	32
8.3 <i>Características clínicas de los sujetos</i>	32
8.4 <i>Características microbiológicas</i>	33
9. <i>Discusión.</i>	33
10. <i>Bibliografía.</i>	35
11. <i>Cuadros y Figuras</i>	46



1. Introducción

En los últimos años, algunos biomarcadores se han utilizado como una opción para diagnosticar sepsis; cada uno de ellos con diferentes ventajas y limitaciones **(1)**. En los niños con cáncer, neutropenia y fiebre (NF), se requiere de estrategias que puedan diferenciar al niño séptico del que no lo está, de una manera rápida, precisa, barata y que sea factible de aplicar **(2)**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más frecuente en la edad pediátrica, en quienes la sepsis se considera una de las principales complicaciones que se presentan en el medio hospitalario favorecida por la neutropenia que produce la quimioterapia **(3)** En ellos la demora en el inicio de los antimicrobianos puede ser mortal, especialmente en la sepsis producida por las bacterias Gram negativas; motivo por el cual la fiebre en el niño con neutropenia se trata primariamente como si fuera producida por una infección **(4)** .

En el niño con NF, la actividad tumoral, las alteraciones hidroelectrolíticas, la reacción a transfusiones y la enfermedad injerto contra huésped, entre otras, pueden causar sintomatología similar a la ocasionada por sepsis **(5)**. Lo que explica por qué diferentes biomarcadores han sido estudiados como discriminadores de infección con resultados variables; ninguno de ellos subsana la problemática de establecer si la fiebre es consecuencia de un proceso infeccioso o están producidos por la quimioterapia o por la actividad tumoral **(6)** En estos casos la decisión de iniciar el tratamiento antimicrobiano se basa en el criterio y la experiencia del clínico **(7)** La sospecha de sepsis en el niño con cáncer hospitalizado tiene como consecuencia el incremento en el



costo de la atención médica por el uso de los antibióticos y de los recursos diagnósticos, así como por la estancia hospitalaria prolongada **(8)**

La apoptosis es un proceso dependiente de energía que es controlado genéticamente, mediante el cual las células son eliminadas, evitando el daño del microambiente que la rodea **(9)** en individuos sanos, juega un papel importante en la homeostasis y desarrollo tisular **(10)**; mientras que en enfermedades como el cáncer, su bloqueo, se considera un proceso clave que permite la proliferación celular patológica **(11)**, y por consecuencia, la inducción de apoptosis por medio de drogas, es un mecanismo mediante el cual se disminuye la carga tumoral **(12)**

En la sepsis, la apoptosis, es parte de la fase tardía (o hipodinámica), que en modelos animales se presenta 12 horas después del inoculo bacteriano; en esta fase de hiporrespuesta, contribuye a la disfunción inmune y a la disfunción orgánica múltiple (DOM) **(13)** La apoptosis en la sepsis, es inducida por receptores pertenecientes a la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF); conocida como la vía de muerte del receptor, en donde se incluyen Fas, DR3, TNF-R1 y TRAIL **(14)** La apoptosis en sepsis, juega un papel primordial en el detrimento de las condiciones clínicas de los pacientes, y es un mecanismo que favorece los cambios hemodinámicos característicos, como la caída de la tensión arterial, la taquicardia y las alteraciones en la frecuencia respiratoria **(15)**, pero también se asocia a la sobrevivencia y recuperación de pacientes con sepsis y DOM **(16, 17)** Aunque se ha demostrado que la apoptosis presentan un patrón diferencial al comparar sepsis vs choque séptico **(18)**, se considera que los sujetos con sepsis y cáncer son un modelo



difícil para el estudio de apoptosis **(19)**, debido a que junto con la hipoxia, el daño tisular y la inflamación, es parte de los mecanismos fisiopatológicos comunes entre cáncer y sepsis **(20)**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son células sanguíneas caracterizadas por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos. Son consideradas un componente crítico en la respuesta a procesos infecciosos como parte de la respuesta inmune. **(21)**.

En sepsis, el sistema monocito-macrófago y el endotelio vascular, sintetizan mediadores endógenos (particularmente TNF- α) que inicialmente buscan limitar la acción microbiana en los tejidos, pero su activación pueden por consecuencia conducir a la aparición de sepsis grave, disfunción orgánica múltiple (DOM) y choque séptico. **(22)**. En la actualidad se conoce que el curso clínico de la sepsis no obedece a un estado descontrolado de hiperactivación inmunológica, como antes se consideraba, sino por la producción de mediadores anti-inflamatorios que tienen como objetivo mantener un equilibrio entre el estado pro inflamatorio y el antiinflamatorio; donde la apoptosis de las células inmunes, particularmente de células mononucleares favorece el control de la respuesta proinflamatoria, pero también a la inmunosupresión que antecede la sobreinfección **(23)**

La apoptosis, considerada un mecanismo de regulación negativa de la respuesta inmune que contribuyen al estado de inmunosupresión se caracteriza por muerte de linfocitos T, células dendríticas y neutrófilos; la alteración funcional de monocitos y una evidente baja en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II,



particularmente HLA-DR, y la baja capacidad de secretar citocinas pro-inflamatorias como IL-1p, IL-6 y TNF- α ; y la producción de moléculas con propiedades anti-inflamatorias como IL-4, IL-10, TGF- β , el receptor soluble de FNT, el receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) y el receptor sustituto de IL-1 tipo II (24) (Figura 1)

El estudio de apoptosis en sujetos con cáncer, debido a que puede estar influenciada por sepsis, pero también por la actividad tumoral o el efecto de la quimioterapia, debe presentar dentro de su modelo de estudio el comportamiento diferencial del biomarcador por la actividad tumoral, por el tratamiento quimioterapéutico y por la sepsis (25)

El presente estudio tiene como objetivo describir el porcentaje de apoptosis en células mononucleares en niños sépticos con LLA y neutropenia; así como evaluar su eficacia como un biomarcador diagnóstico de sepsis en este grupo de pacientes.

2. Pregunta de investigación

¿Existe diferencia en el porcentaje de apoptosis en células mononucleares en niños con leucemia y sepsis, en comparación con los niños leucémicos sin sepsis?

¿Cuál es la eficacia diagnóstica de la cuantificación de apoptosis de células mononucleares de sepsis en niños con LLA, neutropenia y fiebre?



3. Marco teórico.

La sepsis es considerada un problema de salud mundial, al ser una de las principales causas de muerte en sujetos críticamente enfermos **(26)**, como ejemplo en Estados Unidos en el año 2005, se notificaron más de 500 mil casos de sepsis con aproximadamente 250 mil muertes **(27)** La principal problemática, es la dificultad para discriminar en el paciente con cáncer, cuando la sintomatología del sujeto grave es consecuencia de la sepsis, de la actividad tumoral o es secundaria a la quimioterapia **(28)** , aun así se reconoce como la principal comorbilidad en individuos con cáncer **(29)**

En el comparativo histórico; en Estados Unidos, el cáncer en 110 años pasó de ser la octava a la segunda causa de muerte, notificándose que la incidencia en 1900 fue de 64.0 muertes/ 100,000 habitantes, mientras que en el 2010 fue de 185.9. En la edad pediátrica, el comportamiento ha sido similar, como ejemplo en el año 2008 las cifras acumuladas de cáncer en la población de 0 a 19 años se establecieron en 20.3 / 100,000 niños. Ubicándose en el segundo o en el tercer lugar como causa de muerte en este grupo de edad. En México, de 2002 a 2008 en los 7000 nuevos casos de cáncer diagnosticados en edad pediátrica, se destaca a la leucemia linfoblástica aguda como la principal neoplasia, seguida por los tumores sólidos del sistema nervioso central, linfomas y retinoblastoma. La tasa de muerte por leucemia en niños de 0 a 14 años ha establecido entre 5.6/100 000 habitantes en el año 2000, y en 5.1/100 000 habitantes en el año 2008 **(30)**



Los padecimientos crónicos o neoplásicos se han asociado al 55% de las admisiones hospitalarias por sepsis **(31)** ocasionando la muerte en el 8.5% de los casos (riesgo > 5) debido al daño inmunológico con el que cursa con costos notificados hasta 3.4 billones de dólares por año, es por eso que el costo económico y el de pérdidas humanas son elevados.

3.1 Epidemiología de la sepsis en pacientes con cáncer

La sepsis es un problema de salud pública significativo al ser una de las principales complicaciones en pacientes con cáncer en los que puede ocasionar falla orgánica múltiple y eventualmente la muerte (riesgo > 5) debido al daño inmunológico provocado por el uso de agentes quimioterapéuticos e inmunosupresor. Se considera que la sepsis grave se asocia con el 8.5% de las muertes por cáncer con costos notificados hasta 3.4 billones de dólares por año, es por eso que el costo en pérdidas de vidas humanas y en recursos económicos es elevado. Así mismo, el tipo de cáncer favorece una evolución clínica inadecuada ya que se considera que los pacientes con padecimientos hemato-oncológicos presentan mayor grado de inmunosupresión que los pacientes con tumores sólidos.

La tasa de muertes de pacientes de 0 a 14 años a causa de leucemia en México, se ha establecido entre 5.6/100 000 habitantes en el año 2000, hasta 5.1/100 000 habitantes en el años 2008; según la información obtenida de la Secretaria de Salud/ Dirección General de Información en salud a partir de la base de datos de defunciones 2000-2008 INEGI/SS. Estas cifras no superan



como causa de muerte a enfermedades infecciosas como las intestinales o meníngeas.

3.2 Aspectos microbiológicos

Una vez que para el tratamiento del cáncer se utilizan procedimientos invasivos, quimioterapia y trasplantes que favorecen inmunosupresión **(32)**, el uso de antimicrobianos busca disminuir la mortalidad; aunque algunos autores han demostrado que su uso indiscriminado es un factor de riesgo reconocido para la muerte **(33,34)** al considerarlo responsable en el desarrollo de resistencias bacterianas que se han documentado en los centros hospitalarios **(35)** Es de sobra conocido que la disposición de antibióticos de amplio espectro junto con el uso de nueva tecnología en las unidades de cuidados intensivos es suficiente para incrementar tanto la sobrevivencia de pacientes gravemente enfermos como las cifras de infecciones intrahospitalarias **(27)** a tal grado que el principio de racionalidad, acuñado en la década de los 70 , que establecía que el manejo estandarizado para todos los episodios de neutropenia y fiebre **(36)** que consistía en hospitalización y terapia antimicrobiana intravenosa de amplio espectro, ha cambiado en los últimos 15 años al considerarse poco beneficiosa, por el alto riesgo de complicar la evolución **(37)** , y siendo a su vez un factor que favorece el cambio epidemiológico de los microorganismos causantes de la sepsis en el individuo con cáncer. Los estudios han demostrado en los últimos doce años, que la frecuencia de aislamiento de los microorganismos Gram negativos ha disminuido, dejando en el primer lugar a los microorganismos Gram positivos.



Parte de la explicación se basa en el incremento del uso de catéteres y otros métodos invasivos que lesionan piel o rompen con barreras de defensa primaria como las sondas o cánulas endotraqueales **(38)**

A pesar del cambio microbiológico, las bacterias Gram negativas juegan un papel importante en la sobrevivencia del niño con enfermedad oncológica, una vez que un mayor número de bacterias multiresistentes se han notificado alrededor del mundo siendo causantes de las cifras más altas de mortalidad. Otros agentes como los hongos, particularmente las especies de *Cándida* y hongos no levaduriformes como *aspergillus* han ganado terreno en los últimos años como responsables de infecciones profundas en el niño con cáncer **(39)**

3.3 Inmunología

Fisiopatológicamente el factor que favorece el desarrollo de sepsis grave es la presencia de disfunción orgánica múltiple (DOM); debido al daño celular y orgánico asociado, a la hipoxia micro circulatoria y a la presencia de mediadores inflamatorios **(40)** La respuesta pro-inflamatoria incrementada en la sepsis, es rápidamente seguida por un estado anti-inflamatorio o inmunosupresor, que ha sido denominado “disarmonia inmunológica”, caracterizado por un fenómeno de inmunoparálisis temporal de la propia respuesta del hospedero, y es en esta etapa donde el fenómeno apoptótico juega un papel clave en esta disfunción característica de los pacientes sépticos **(9)** Considerando este concepto; se ha propuesto que la mortalidad observada en pacientes con sepsis, pudiera deberse a una diferencia en sus niveles **(41,42)**



3.4 Problemática en la identificación del individuo séptico

La baja sensibilidad del estándar de oro (hemocultivo), del criterio clínico y de la experiencia favorece el sobre diagnóstico y el abuso de antibióticos **(43)** Muchos intentos de evaluación por medio de pruebas diagnósticas han tratado de resolver el problema, pero el éxito ha sido limitado; bajo estos argumentos publicaciones previas han cuestionado la validez del estudio del fenómeno séptico en pacientes con cáncer **(32)**. El problema está en que el diagnóstico temprano de sepsis en el niño con cáncer sigue siendo tarea difícil; la decisión de retrasar el tratamiento hasta que los síntomas y signos de sepsis sean obvios conlleva un riesgo de muerte que puede prevenirse, desafortunadamente el uso indiscriminado de antimicrobianos, favorece la diseminación de agentes multiresistentes y por consecuencia una mayor mortalidad **(2)** El criterio clínico y la experiencia en el diagnóstico, predominan en la práctica clínica diaria, por encima de consensos y de la evidencia científica que establece existen herramientas con mayor eficacia en la detección de sepsis **(44)** Independientemente de las limitaciones clínicas y técnicas que los trabajadores de la salud encuentran para diagnosticar sepsis; en un individuo con cáncer la dificultad incrementa por el comportamiento biológico de la neoplasia durante la proliferación celular y por el efecto de la quimioterapia **(45)** El problema principal radica en asegurar una identificación certera del paciente inmerso en un proceso dinámico de características clínicas variables, que puede en cuestión de minutos, horas o días evolucionar fácilmente de una sepsis grave a un choque séptico, y en ocasiones a disfunción orgánica múltiple y con características clínicas que plantea diversos



diagnósticos diferenciales **(29)**. En la base de datos Medline, un total de 1085 artículos en idioma inglés o español, son encontrados al utilizar las palabras clave: sepsis, diagnosis, children y cáncer. Pero solo 80 pertenecen a estudios clínicos comparativos que utilizan biomarcadores como discriminadores de sepsis en niños con cáncer. De estos, Las proteínas de fase aguda como la Proteína C reactiva (CRP) y la procalcitonina (PCT) y a las citocinas son los biomarcadores más estudiados en este grupo de pacientes **(2)**. La mayor sensibilidad para un biomarcador se encuentra para IL-6, mientras que mayor especificidad se encontró para IL-5. Para la búsqueda se excluyeron los artículos que utilizaban biomarcadores en enfermedades como malaria, HIV/SIDA, hepatitis, sepsis en niños sin cáncer, estudios in vitro, tampoco se consideraron las cartas al editor, los comentarios o editoriales y otros tipos de publicaciones no originales.

En la actualidad existen opciones que han demostrado su utilidad como herramienta auxiliar en la identificación de un paciente con proceso infeccioso, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); la cual, desde su “redescubrimiento oficial” en 1985, se ha consolidado como la técnica clave de la biología molecular actual **(46)**; Para sepsis, PCR multiplex tienen la capacidad de detectar bacterias en el torrente sanguíneo, las regiones conservadas de los genomas microbianos sirven como blancos para la amplificación (genes de rRNA y la región 16S-23S) Las principales limitaciones de la PCR son de carácter técnico, ya que se requiere que el material genético sea de buena calidad, y que no existan enzimas (endonucleasas y DNAsas) que degraden el material genético. Las muestras de sangre contienen



diferentes componentes estructurales como anillos de porfirinas que interfieren con la actividad de la Taq DNA polimerasa, lo que reduce la eficiencia de la amplificación y puede dar falsos negativos. Y que los iniciadores por amplificar deben ser específicos para cada bacteria, sin contar las posibilidades de contaminación. En pacientes con enfermedades neoplásicas, la experiencia en el uso de métodos moleculares se basa en la detección de bacterias y hongos (particularmente aspergilosis) aunque no hay datos que permitan establecer cuál es la influencia de la técnica en el pronóstico del paciente **(47)**. Algunas opciones comerciales como la prueba SeptiFast®, (técnica “multiplex” por PCR en tiempo real) son capaces de detectar los 25 microorganismos más frecuentemente encontrados en las infecciones sanguíneas, identifica los 20 grupos principales que el clínico valora para tomar una decisión terapéutica y cubre aproximadamente el 90% de las infecciones sanguíneas nosocomiales **(48)** El diseño de esta herramienta supera algunos condicionantes técnicos como las posibles contaminaciones derivadas del uso de reactivos con DNA de origen bacteriano y fúngico similar al que se necesitaba detectar, denominado “contaminación intrínseca” se resolvieron utilizando reactivos “ultrapuros” denominados de grado de pureza M que aseguran la robustez de los datos finales. Además el volumen de la muestra a estudiar es una importante limitación técnica, que ha tratado de resolverse en grupos de alto riesgo como el de los recién nacidos en los cuales se ha utilizado hasta 1 ml de sangre **(49)**

Por otra parte, se han publicado un número creciente de estudios clínicos que investigan algún tópico acerca de la sepsis en niños con cáncer. Estos



estudios, al igual que la práctica médica diaria, están inmersos en la variabilidad de criterios que han permitido el uso indiscriminado del término sepsis, síndrome séptico, shock séptico o síndrome de respuesta inflamatoria sistémico en individuos con afectación grave del estado general, con o sin hipotensión, permitiendo el sobre diagnóstico, el uso indiscriminado de antimicrobianos y el incremento de la permanencia hospitalaria **(50)**. El conjunto de criterios clínicos y de laboratorio característicos del SIRS, tienen en contra su inespecificidad; y que son validados con un estándar de oro que en el mejor de los casos tienen una sensibilidad de 50 a 60% como es el hemocultivo **(43)** Es en 1992 cuando el concepto de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) fue introducido al lenguaje científico, durante el consenso de la Society of Critical Care Medicine (SCCM) y el American College of Chest Physicians (ACCP); en el que se consensaron los datos clínicos y de laboratorio que se presentan como consecuencia de la activación general del sistema inmune y de la cascada inflamatoria y que históricamente se han utilizado para su identificación. Las modificaciones conceptuales que con el tiempo ha sufrido el consenso no han resuelto la problemática que se presenta en grupos particulares, como el de los recién nacidos, o los niños inmunocomprometidos en los que se incluyen los pacientes con cáncer **(51)** A partir de 2001, se aceptó definir como sepsis al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) secundaria a una infección documentada o sospechada más la presencia de algunas variables generales de tipo inflamatorio y otras de tipo hemodinámico **(52)**. El consenso publicado en el año 2005, define con valores, las variables que se deben tomar en cuenta a las



diferentes edades de la vida para el diagnóstico de sepsis, incluye aquí el criterio de utilizar una evidencia sólida infecciosa, sin necesidad de cultivo positivo **(5)**

Las variables comunes utilizadas en los consensos presentan algunas limitaciones para el niño con cáncer **(7)** por ejemplo, cuando el niño presenta al menos dos de los siguientes criterios: a) Temperatura central $> 38.5^{\circ} C$ o $< 36^{\circ} C$, b) taquicardia persistente de 30 minutos a 4 horas c) Taquipnea (> 2 desviaciones estándar sobre los valores normales para la edad o la necesidad de ventilación mecánica y d) Leucocitosis / leucopenia o más de 10% de bandas, estamos por definición ante un SRIS; pero en el niño con cáncer existen factores que pueden justificar y explicar su presencia sin necesariamente ser parte del síndrome, como por ejemplo el uso de drogas con efecto cronotrópico positivo, el uso de anestésicos, la administración de quimioterapia o factores estimulantes de granulocitos. Particularmente la fiebre, considerado uno de los datos pilares en la identificación de un proceso infeccioso, es uno de los síntomas que permiten la sobre estimación de la enfermedad en un tercio de los casos presentados en la edad pediátrica **(53)**, en el niño con cáncer esta cifra incrementa a dos tercios **(54)**, lo que ocasiona un amplio manejo de antipiréticos y antibióticos, por el solo hecho de existir inmunocompromiso y de la frecuente necesidad “humana” de mantener una temperatura “normal” en el niño enfermo **(55)**. El cáncer por si solo puede causar fiebre, debido al suministro de energía del cuerpo utilizado por las células cancerosas o a que secretan sustancias que afectan el metabolismo corporal; adicionado a que el cáncer puede ocasionar la respuesta inflamatoria



del sistema inmune **(56)** Clínicamente la aparición y el grado de la fiebre podrían ser indicadores del crecimiento, actividad o extensión de un tumor. Entre los tipos de cáncer que normalmente producen fiebre se encuentran la enfermedad de Hodgkin, las leucemias, los linfomas, el cáncer de riñón, el cáncer de los huesos, el cáncer adrenal y los tumores hipotalámicos).

La taquicardia y la taquipnea persistente en el niño con cáncer hospitalizado por su parte puede estar causada por factores diversos, la anemia, la deshidratación, las alteraciones hidroelectrolíticas, y el uso de drogas con efecto cronotrópico positivo, derrames pleurales o la ascitis son padecimientos agregados que deben descartarse paralelamente al proceso infeccioso.

Es evidente que existe una reducción sustancial en la mortalidad pediátrica como consecuencia de las intervenciones adoptadas globalmente en materia de salud pública **(57)** corroborando la idea de que los programas adecuadamente estructurados son capaces de eliminar o disminuir enfermedades con cifras altas de mortalidad **(58)** , un ejemplo de ello es la prevención de enfermedades infecto-contagiosas por medio de la vacunación, que ha favorecido que algunos países estén encaminados a cumplir las metas de reducción de la mortalidad infantil para el año 2015 **(59)** Los programas de salud de un país deben considerar cubrir con sus políticas sanitarias la interacción entre infecciones y enfermedades no infecciosas visualizándolas de manera bidireccional. Un ejemplo claro de esa interacción se observa cuando las infecciones graves como la sepsis complican al cáncer o cuando el cáncer favorece la mortalidad por sepsis **(60)**



3.5 Apoptosis, sepsis y cáncer

El concepto básico de apoptosis ha sido manejado históricamente como una forma de muerte celular programada que fue acuñado por Kerr al referirse al patrón de muerte celular opuesto a necrosis; concepto que en la actualidad es cuestionado, una vez que ambos procesos pueden ser inhibidos, estableciendo la existencia de elementos regulables y codificados genéticamente. Por esa terminología la muerte celular programada se ha vuelto imprecisa y genérica **(61)**

Inicialmente, basados en el análisis morfológico de modelos de desarrollo, se identificaron tres tipos de muerte celular:

- La tipo I (apoptosis) caracterizada por condensación nuclear y picnosis, con reducción del volumen citoplasmático, con fragmentación celular tardía y fagocitosis.
- La tipo II (autofagia), caracterizada por la vacuolización autofágica del citoplasma y
- La tipo III o muerte citoplasmática (necrosis), que presenta una desintegración general con pérdida de los organelos.

En el año 2009, se establecieron las recomendaciones basadas en la apariencia morfológica, criterios enzimáticos o características inmunológicas y se establecieron las definiciones tentativas de algunas modalidades de muerte celular atípica como son: la catástrofe mitótica, anoikis, excitotoxicidad, la degeneración Walleriana, la paraptosis, piroptosis, pironecrosis y entosis. Algunos términos que causan confusión como la necroapoptosis y la aponecrosis,



no fueron incluidas en la clasificación; pero si han sido consideradas en estudios posteriores. **(62) (Cuadro 1)**

Observaciones clínicas y experimentales han sugerido que la muerte celular por apoptosis puede jugar un papel importante en la patogénesis y el desarrollo de Disfunción orgánica múltiple (DOM) en pacientes con sepsis y que la mayor mortalidad observada en pacientes con sepsis grave pudiera deberse a diferencia en los niveles de apoptosis

Algunos modelos de sepsis han distinguido dos fases; la temprana o fase hiperdinamica caracterizada biológicamente por un estado pro inflamatorio que es mediado primariamente por neutrófilos, macrófagos y monocitos los cuales han sido estimulados por los microorganismos o sus toxinas, caracterizada clínicamente por incremento en el gasto cardiaco, la perfusión de tejidos y la disminucion en las resistencias vasculares. Y la fase tardía o hipodinámica (aproximadamente 12 horas posteriores al estímulo iniciador que incluye defectos en la presentación de antígenos, disminucion en el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MCH II) , perdida de la respuesta de hipersensibilidad tardía , perdida de la función fagocitica y disminucion en la liberación de citosinas por linfocitos T auxiliares (Th1). Disminuyendo el flujo sanguíneo a tejidos y a la microvasculatura, disminuyendo la función cardiaca e incrementando los índices de daño orgánico y disfunción. En esta fase la muerte celular por disregulación apoptótica (incremento o disminucion) se ha propuesto como el fenómeno que contribuye a incrementar la morbilidad o la mortalidad observada tanto en humanos como en modelos animales **(63,64)**



En sepsis y de manera importante, el grado de apoptosis linfocitaria correlaciona con la severidad de la sepsis. Para ello dos mecanismos se han establecido para explicar cómo la apoptosis participa en la evolución de un sujeto séptico: 1) la delección de células efectoras críticas, como las células T y B. Induce la disminución en el número de DCs, el más potente células presentadora de antígenos (APCs). 2) Inducción de anergia y de respuesta de Th2 en las células inmunes sobrevivientes. En apariencia la tolerancia inmunológica se puede inducir con la liberación de citocinas anti inflamatorias, incluyendo IL-10 y TGF β , y la supresión de la liberación de citocinas proinflamatorias²

Otro aspecto que debe ser tomado en cuenta en el paciente con cáncer son los efectos sobre las vías de la apoptosis que la quimioterapia puede tener. Por definición la quimioterapia permite la destrucción de la masa tumoral e impiden la reproducción celular, paralizando su crecimiento lesionando los ácidos nucleicos, o interfiriendo en funciones biológicas vitales para el crecimiento y desarrollo celular. Por ello reciben los nombres de fármacos citolíticos, citotóxicos o citostáticos. De una u otra manera, las implicaciones finales conducen a modificaciones irreversibles de los sistemas de reparación con descodificación de oncogenes implicados en la apoptosis²⁰

Durante el tratamiento, va disminuyendo la masa tumoral en base a la muerte celular de una parte más o menos importante de la fracción activa del tumor, lo que ocurre de manera progresiva con cada una de las aplicaciones hasta conseguir la regresión de la masa tumoral. El tratamiento exitoso del cáncer



requiere que la terapia interrumpa señales claves en las vías de cáncer, algunas de ellas comunes con la sepsis **(65)**

La eficacia quimioterapéutica se interrumpe por resistencia a las drogas, algunas de ellas a causa de la reducida capacidad de células resistentes a caer en apoptosis posterior al tratamiento con agentes que dañan el DNA. La muerte del receptor del ligando del factor de necrosis tumoral (TNF), FasL y del ligando que induce apoptosis relacionado a TNF (TRAIL), pueden ser candidatos interesantes como productores de apoptosis por unión a los receptores de membrana celular **(44,66)**

4. Justificación

La sepsis en el paciente con cáncer; es reconocido como un problema de salud pública, con cifras de mortalidad superiores a las encontradas en pacientes sin cáncer hasta en un 20%. La principal problemática en la detección de un paciente séptico se encuentra en el hecho de que se basa en el criterio y experiencia del médico o médicos inmiscuidos en su atención, lo cual ha favorecido el sobre diagnóstico y el abuso de antibióticos dada la necesidad de iniciarlos de manera temprana y oportuna.

La participación de las moléculas y vías de la respuesta inflamatoria, particularmente la de la apoptosis no ha sido adecuadamente estudiada en niños con sepsis y cáncer, se espera que los niveles séricos de moléculas asociadas a apoptosis sean diferentes a los niveles del grupo control. El establecer el comportamiento en este grupo de pacientes, puede permitir, estudiar la capacidad de discriminación de pacientes con sepsis de los



pacientes que presentan cambios clínicos por la evolución inadecuada del cáncer o por los efectos secundarios de la quimioterapia.

Con el fin de homogenizar la población, y evitar sesgos en cuanto al comportamiento y potencial apoptótico que puedan tener los diferentes tipos de cáncer, el tratamiento quimioterapéutico, y los criterios de diagnóstico; se tomará en cuenta la población de niños con diagnóstico de leucemia; al ser este el proceso hemato-oncológico más frecuente.

5. Hipótesis: Por ser un estudio descriptivo, no se plantea hipótesis

6. Objetivos

1. Describir el porcentaje de apoptosis en las células mononucleares de niños con leucemia y sepsis.
2. Comparar los porcentajes de apoptosis en células mononucleares de niños con leucemia sépticos y los no sépticos.
3. Establecer la eficacia diagnóstica de la cuantificación del porcentaje de apoptosis en células mononucleares en sepsis.

7. Material y métodos

7.1 Diseño: Estudio transversal y comparativo.

7.2 Definición del universo.

7.3 Criterios de Inclusión

Pacientes hospitalizados < 17 años.

Con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda

- Con neutropenia y fiebre



7.4 Criterios de Exclusión

No contar con vía central para la toma de muestras

No aceptación de participar en el estudio.

7.5 Selección de casos y controles participantes.

Grupo 1 serán considerados los niños con diagnóstico de leucemia y sepsis confirmada por el aislamiento de un microorganismo en sangre y/o septifast positivo. Con fiebre de 38 grados o en su defecto 37.6 a 37.9 grados en al menos dos ocasiones en 24 horas, y neutrófilos $< 1000 \text{ ceL/mm}^3$

Grupo 2 serán considerados a los niños con diagnóstico de leucemia y sospecha de sepsis que no sea corroborada mediante evidencia microbiológica en cultivos de sangre, y/o septifast negativo. Con fiebre de 38 grados o en su defecto 37.6 a 37.9 grados en al menos dos ocasiones en 24 horas. y neutrófilos $< 1000 \text{ ceL/mm}^3$

7.6 Definiciones operativas

Paciente con leucemia: Niño con la presencia de blastos en médula ósea mayor o igual al 20 % de la totalidad celular, con clasificación por morfología e inmunotipificación a través de la positividad de anticuerpos monoclonales característicos de estirpe por Citometría de flujo y por citogenética.

Sospecha de sepsis

Obligadamente:

- a) Temperatura mayor o igual a 38 grados en una ocasión, o de 37.6 a 37.9 en al menos dos ocasiones en 24 horas



Sepsis confirmada. Niño con:

- a) Hemocultivo y/o prueba de septifast positiva

7.7 Grupos de pacientes

- 1) Casos:

Niños con leucemia y sepsis corroborada

- 2) Controles:

Niños con leucemia sin corroboración de sepsis

7.8 Obtención de muestras sanguíneas

Se obtuvieron muestras sanguíneas de catéter para realizar los hemocultivos y extracción de material genético de sangre colectada en tubos vacutainer con EDTA (dos mililitros) para realizar la prueba de Septifast.

7.9 Hemocultivos.

Se utilizò el Sistema automatizado Bact-alert® (Organon Teknika Corp, Dirham, N:C) hasta obtener resultados positivos o negativos a crecimiento microbiano por espacio de 72 horas. A los cultivos positivos se les realizò tinción de Gram y se cultivarán en medios agar sangre de carnero al 5%, MacConkey, Sal y manitol, agar chocolate y agar papa dextrosa y posteriormente se identificò en el sistema automatizado microscan® (Organon Teknika Corp, Dirham, N:C).



7.10 Aislamiento de células polimorfonucleares de sangre periférica de pacientes con sospecha de sepsis

Se realizó a partir de muestra de sangre total anticoagulada, la cual se diluyó 1:1 en PBS previamente estéril. Por cada 4 ml de sangre diluida en PBS se adicionó 3 ml de ficoll. La sangre diluida con PBS se vertió cuidadosamente al tubo que contiene ficoll para formar el gradiente. Se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la capa de linfocitos. Se realizó un lavado de los linfocitos con PBS estéril, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y la pastilla de linfocitos resultante se dividió en dos alícuotas (tubos 1.5ml): una se resuspendió en PBS (300ul) y la otra en Tri-pure (1000ul). Ambas alícuotas se almacenaron a -20°C. Por cada mililitro de sangre se obtuvo aproximadamente 800 mil a 1 millón de linfocitos.

Posteriormente se analizaron por citometría de flujo para evidenciar el porcentaje de apoptosis.

7.11 Septifast

Esta prueba permite la detección de material genético de 25 microorganismos (bacterias gram positivas y negativas así como de hongos), que son causantes de aproximadamente el 95% de las sepsis en pacientes con leucemia. Se basa en la amplificación de regiones hipervariables del ADN ribosomal, para bacterias (16S) y para hongos (18S) por tecnología de PCR en tiempo real. Esta prueba tiene la ventaja de que arroja resultados en seis horas, lo cual



permite tomar decisiones terapéuticas oportunas en pacientes con sepsis.

(Cuadro 2)

7.12 Detección de apoptosis

La identificación de células que se encuentran en apoptosis a través del método de Anexina V se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Becton Dickinson). Brevemente, de la sangre periférica extraída de los niños con leucemia se tomaron 500 μ l y se colocaron en un tubo Falcón, se adicionaron 1.0 ml de FACS™ Lising Solution (No de catalogo 349202. Becton Dickinson) por 10 min y se centrifugaron para remover sobrenadante. Las células (1×10^5) se incubaron con 5 μ l de Anexina V-FITC (No. de catalogo 556547) y 5 μ l de ioduro de propidio en 400 μ l de buffer de unión 1 X. Homogenizamos las células con vórtex cuidadosamente y se incubaron 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se analizaron en el citómetro de flujo.

7.13 Tipo y diseño general del estudio

- a) Objeto de estudio: **clínico**.
- b) Fuente de datos: **datos secundarios, obtenidos de una base de datos**
- c) Tiempo en el que se estudia el evento: **transversal**
- d) Control de las variables: **observacional**.
- e) Fin o propósito: exploratorio, **descriptivo**.



7.14 Tamaño de la muestra.

La base de datos está compuesta por 52 sujetos con neutropenia y fiebre; 18 considerados sépticos.

7.5 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como medias con desviación estándar. La comparación entre grupos se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney. La relación entre variables se analizó usando Correlación de Spearman .

7.16 Consideraciones éticas y de bioseguridad

La información se obtuvo de la base de datos realizada para el estudio titulado “Evaluación de los niveles séricos de moléculas asociada a apoptosis en pacientes pediátricos con leucemia y sepsis nosocomial” autorizado para su realización en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos por el comité de investigación y por el Comité de Ética, institucional. Y por los comités de Investigación y de ética del Instituto Nacional de Salud Pública, donde se realizó entre otras, la Citometría de flujo. (Se anexan documentos).

Ética: El estudio fue aprobado por el comité de investigación y de ética institucional



8. Resultados

8.1 Características Generales

Incluimos para el análisis un total de 72 pacientes con LLA y NF; de acuerdo a la siguiente distribución: Grupo 1 (sujetos con sepsis) =18 (25%); Grupo 2 (sujetos sin sepsis)= 54 (75%).

Treinta y cuatro pacientes correspondieron al sexo masculino y 38 al sexo femenino. El promedio de edad fue de 9,8 años (rango entre 2 – 17 años); no hubo diferencia entre las medias de la edades entre los grupos (9.5 vs 10.2 años respectivamente; $p > 0.05$).

La evaluación de los órganos afectados estableció que 18 (25%) individuos tuvieron 2 órganos afectados; 22 (30.5%) tuvieron tres órganos afectados y 32 (44.4%) tuvieron más de tres órganos afectados. De acuerdo al órgano dañado, se encontró que el hígado presentó disfunción en 69.4% de los pacientes, el riñón en 36.1%; el hígado en 22.2%; el sistema nervioso central en 13.8%, el aparato digestivo (intestino) en 66.6%; el sistema hematológico en 100%, y el aparato cardiovascular en 16.6%.

Seis sujetos (7.1%) murieron, uno debido a perforación gástrica secundaria a aspergillosis y cinco debido a leucemia refractaria; 92.9% sobrevivieron.

Los 54 sujetos con NF sin sepsis corroborada se dividieron de acuerdo a sus características y tiempo de evolución en: -niños con LLA de reciente diagnóstico o en recaída (18 pacientes), - Niños con LLA en ventana esteroidea (10 pacientes), y niños con LLA en el nadir de la quimioterapia (26 niños). (Tabla 1)



8.2 Porcentaje de apoptosis

El porcentaje de apoptosis fue significativamente más alto en el grupo que recibió esteroides (mediana: 94.2 %), en comparación con el grupo de diagnóstico reciente (mediana: 58.9%) y de los sujetos en el nadir de la quimioterapia (mediana 65.3%), $p < 0.05$. **(Figura 1)**, Se observa que el mayor porcentaje de apoptosis se encuentra en sujetos quienes han recibido quimioterapia (94,2%), los sujetos con NF sépticos, presentan cifras de apoptosis similares a la de los controles sépticos sin cáncer (33.9% vs 27.7% respectivamente, $p > 0.05$ **(Gráfica 1)**. Al hacer el análisis , tomando en cuenta fiebre ocasionada por sepsis vs la fiebre por probable actividad tumoral, se encontró que el grado de apoptosis es mayor en sujetos con actividad tumoral (76,5% vs 33.9%) respectivamente. Al comparar los sujetos con NF con sepsis y los sujetos con sepsis sin cáncer, se observa que no hay diferencia significativa entre ambos grupos (33.9% vs 27.7%) $p > 0,05$ **(Gráfica 2)**

8.3 Características clínicas de los sujetos

El estudio de la posible relación entre el porcentaje de apoptosis de células mononucleares y la gravedad de la sintomatología, demostró que la hipotensión fue más frecuente en el grupo número 1; mientras que el grupo número 2 y sus subgrupos mantuvieron la tensión arterial dentro de un rango normal ($p < 0.05$).

Las distermias no presentaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$), con respecto a la frecuencia cardiaca, la tendencia a la taquicardia fue encontrada en ambos grupos ($p > 0.05$). La misma tendencia fue observada



cuando se evaluó la frecuencia respiratoria, la cual se mantuvo elevada en ambos grupos ($p > 0.05$). **(Gráfica 3)**

En términos de sobrevivencia un sujeto murió, en el grupo de sépticos, mientras que 17 sobrevivieron. En el grupo de sujetos sin sepsis, cinco murieron y 49 sobrevivieron.

8.4 Características microbiológicas

De los 18 sujetos en quienes se identificó un microorganismo, seis casos se identificaron mediante hemocultivo (*Klebsiella oxytoca*=2, *Escherichia coli*=3, *Salmonella tify*=1) y 12 mediante la prueba de septifast (*Staphylococcus aureus*=6, *Enterococcus sp*=2, *Aspergillus sp*=1, y tres casos con *Candida krusei*) (Figura 3).

9. Discusión.

Los resultados obtenidos en este estudio fortalece el concepto, que las infecciones como causante de las alteraciones en los signos vitales, que se presentan con mayor frecuencia en el niño con NF; como la hipotension, la taquipnea y la taquicardia; no es susceptible de ser identificada mediante el examen médico **(2)**, lo que favorece el sobrediagnóstico de sepsis, el abuso de antimicrobianos y la aparición de microorganismos multi-resistentes **(27)**

La hipótesis de nuestro estudio se basa en el argumento de que cualquier biomarcador que busca discriminar sepsis en el sujeto con leucemia, NF; presenta la problemática de que sus valores pueden estar influenciados por la



quimioterapia **(67)**, por la enfermedad neoplásica y por sus complicaciones **(68)**, Incrementando nuestra característica inhabilidad para diferenciar, los estados inflamatorios no infecciosos, de la sepsis **(69)**. Hasta ahora, ningun biomarcador ha logrado posicionarse como una herramienta de uso generalizado para la identificación de sepsis, debido a la variabilidad de sus resultados, y a la influencia que tienen en sus valores, las enfermedades no infecciosas de tipo inflamatorio **(70)**

La apoptosis desempeña un papel determinante en la sepsis contribuyendo significativamente al riesgo de adquirir infecciones oportunistas secundarias y a la DOM **(70)**. La apoptosis se presenta aproximadamente 12 horas después del inóculo bacteriano en modelos animales, lo que produce perdida en la función linfocitaria **(9)**

El presente estudio representa un estudio exploratorio, no causal, que considera la evaluación de las moléculas estudiadas en una fase temprana (inicio de la fiebre) para evaluar si existen diferencias entre los niños con sepsis y los no sépticos, cuyas principal limitación es el tamaño de la muestra. Los resultados reflejan que las cifras bajas de Fas-L, correlacionan con el mayor número de órganos con disfunción, con un estado hemodinámico inestable, y con alteración de los signos vitales; desafortunadamente el uso de pruebas como el SOFA o APACHE no son aplicables en niños con cáncer.



10. Bibliografía.

1. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J antimicrobial Chemother* 2011;66 (Suppl 2):S33-S40
2. Reyna FJ, Lagunas MA, Martínez MP, Madrid MV. Procalcitonina como un biomarcador diagnóstico de sepsis en niños con cáncer, neutropenia y fiebre: revisión de la literatura. *Archivos Argentinos de Pediatría* (EN PRENSA)
3. Ducasse K, Fernandez JP, Salgado C, Alvarez AM, Avilés CL, Becker A. Characterization of episodes of febrile neutropenia in children with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Rev Chilena Infectol.* 2014 Jun;31(3):333-8
4. Freifeld A, Bow E, Sepkowitz K, Boeckh M, Ito J, Mullen C, Raad S. Clinical Practice Guideline for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011; 52(4):e56–e93
5. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, and members of the International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatric Critical Care Medicine* 2005; 6(1): 2-8
6. Lehrnbecher T, Phillips R, Alexander S, Alvaro F, Carlesse F, Fisher B, et al. Guideline for the Management of Fever and Neutropenia in Children With Cancer and/or Undergoing



- Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 2012; 30:4427-4438
7. Paganini H, Santolaya ME. Diagnóstico y tratamiento de la neutropenia febril en niños con cáncer Consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. *Rev Chil Infect* 2011; 28 (Supl 1): 10-38
 8. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A.. Inpatient care for septicemia or sepsis: A challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*. 2011; 62:1-8
 9. Wesche D, Lomas NJ, Perl M, Shiang C, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis shock. *J Leukoc Biol* 2005;78:325-337)
 10. Kam P, Ferch N, Apoptosis: mechanism and Clinical implications. *Anaesthesia* 2000;55:1081-1098
 11. Lowe S, Lin A. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):485-495
 12. Wong R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Research* 2011;30:87
 13. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Sc, Moldawer L. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration *FASEB J*. 2001 15:879-892
 14. Peter M, Budd R, Desbarats J, Hedrick S, Hueber A, Karen M, et al. The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. *Cell* 2007;129:447-450



15. Vick J. First Demonstration of the Role of TNF in the Pathogenesis of Disease. *J Immunol* 2008; 181:5-6
16. Chun SC, Song G, Lomas J, Simms H, Chaudry I, Ayala A. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *J Leukoc Biol* 2003;74:344-351
17. Doughty L, Clark R, Carcillo J. Soluble Fas Receptor and Fas Ligand in sepsis- Induced Multiple Organ Failure. *Pediatric Research* 1998; 43:35
18. De Freitas I, Fernandez SM, Essinfeld SA, Cardier J. Serum Levels of the Apoptosis-Associated Molecules, Tumor Necrosis Factor α /Tumor Necrosis Factor Type-1 Receptor and Fas/FasL, in Sepsis. *Chest* 2004; 125:2238-2246
19. Konstadoulakis M, Messaris E. Are cancer patients adequate candidates for studying apoptosis in septic and ARDS models? *American J Resp Crit Care Med* 2001; 163: 1501
20. Regueira T., Andresen M., Djafarzadeh S.. Disfunción mitocondrial en sepsis, impacto y posible papel regulador del factor inducible por hipoxia (HIF-1alfa). *Med. Intensiva* [revista en la Internet]. 2009 Nov [citado 2015 Mayo 13] 33(8): 385-392.
21. Chatzinkolau I, Abi Said D, BOdey G.Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer. *Arc Inter Med* 2000;16:501-509



22. Marshall JC SIRS and MODS: Whats is the relevance to the science and Practice of Intensive Care. Shock 2000;14(6):586-589
23. Diossa-Toro Mayra A, Jaimes B Fabián A, Rugeles L María T, Velilla H Paula A. Células con propiedades inmunoreguladoras y su impacto en la patogénesis de la sepsis. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2011 Dic [citado 2016 Jun 04] ; 28(6): 572-578
24. Wang T S, Deng J C. Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression. J Mol Med 2008; 86 (5): 495-506
25. Faix JD Biomarkers of sepsis Crit Rev Clin Lab Sci. 2013 ; 50(1):23-36).
26. Rosenblum J, Lin J, Kim M, Levy AS. Repeating blood cultures in neutropenic children with persistent fevers when the initial blood culture is negative. Pediatr Blood Cancer. 2013; 60(6):923-7
27. Dhainaut JF, Claessens YE, Janes J, Nelson D. Underlying Disorders and Their Impact on the Host Response to Infection. CID 2005;41(Suppl 7):S 481-9
28. Williams M, Braun L, Cooper L, Johnston J, Weiss R. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. Critical Care 2004, 8 (5) :R291-R298
29. Opal S. The Evolution of the Understanding of Sepsis, Infection, and the Host Response: A Brief History Critical Care Clinics. 2009; 25:637-663
30. Reyna FJ, PerezPeña RD, Galindo DP, Limon RAE, Madrid MV. Association between an Incomplete Vaccination Schedule and



Nosocomial Sepsis among Children with Cancer. World Journal of Vaccines, 2013, 3, 10-15

31. Gannon PJ, Surgalla MJ, Fitzpatrick JE, Neter E. Immunoglobulin G and Immunoglobulin M antibody Response of Patients with Malignancies to the O antigens of bacteria Causing bacteremia. J Clin Microbiol. 1980; 12:60-62
32. Trof RJ, Beishuizen A, Wondergem M, Strack van Schijndel R. Spontaneous remission of acute myeloid leukaemia after recovery from sepsis. The Journal of Medicine 2007;65:259-262
33. Maschmeyer G, Hartmut L, Hiddemann W, Helmerking M. Pulmonary Infiltrations in Febrile Patients with Neutropenia: Risk Factors and Outcome under Empirical Antimicrobial Therapy in a Randomized Multicenter Study Cancer. 1994,73
34. Miranda NMG, Belmont ML, Villasis KMA, Penagos PM, Bernaldez RR, Solorzano SF. Empirical antimicrobial therapy in pediatric patients with neutropenia and fever. Risk factors for treatment failure. Arch Med Res. 1998; 29:331-5
35. Safdar A, Rolston K. Vancomycin tolerance, a potential mechanism for refractory Gram positive bacteremia observational study in patients with cancer. Cancer 2006; 106:1815-1820
36. Schimpff SC, Satterlee W, Young VM, Serpick A. Empiric therapy with carbenicillin and gentamicin for febrile patients with cancer and granulocytopenia. N Engl J Med 1971; 284: 1061-5



37. Santolaya ME, Rabagliat R, Bidart T, Payá P, Guzmán A, Morales R, et al. A. Consensus: Rational approach towards the patient with cancer, fever and neutropenia. *Rev Chil Infect* 2005; 22 (Supl 2): S79
38. Roongpoovapatr P, Suankratay C. Causative pathogens of fever in neutropenic patients at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J Med Assoc Thai.* 2010 Jul;93(7):776-83
39. Stringer MA, Gibson JR, Bowen J, Keefe D. Chemotherapy-Induced Modifications to Gastrointestinal Microflora: Evidence and Implications of Change. *Current Drug Metabolism*, 2009,10:79-83
40. Pavlovic S. Rebuilding immunity in cancer patients. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40(1):94-100
41. Wheeler D, Zingarelli B, Wheeler W, Wong H. Novel Pharmacologic Approaches to the Management of sepsis: Targeting the Host Inflammatory Response. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009;3:96-112.25
42. Fox A, Robertson Ch, Belt B, Clark A, Chang C, Leathersich A, Dominguez J, Perrone E. Cancer causes increased mortality and is associated with altered apoptosis in murine sepsis. *Crit Care Med.* 2010; 38: 886–893)
43. Balk RA. Severe sepsis and septic shock definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin* 2000;16(1):179-92



44. Reyna FJ, Vidal P, Richardson V. De las definiciones, las vacunas y la identificación del paciente séptico en pediatría Rev Panam Salud Publica 2010; 27: 469-470
45. Lopez-Lazaro M. The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?". Anticancer Agents Med. Chem. 2008; 8:305–312)
46. Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, Vesin A, Maurin M, Pavese P, Ravanel N, Bulabois CE, Brion JP, Pelloux H, Timsit JF. Therapeutic impact and diagnostic performance of multiplex PCR in patients with malignancies and suspected sepsis. J Infect. 2010 Oct;61(4):335-42
47. Chen SC, Kontoyiannis DP. New molecular and surrogate biomarker-based tests in the diagnosis of bacterial and fungal infection in febrile neutropenic patients. Curr Opin Infect Dis. 2010 Dec;23(6):567-77
48. Reyna J, Ortiz J, Morales I. Use of the LigthCycler SeptiFast Test for Rapid Etiologic Diagnosis of Nosocomial Infection in Gynecological Sepsis. Gynecologic and Obstetric Investigation. 2010;70:215-216
49. Paolucci M, Grazia M, Dal Monte P, Corvaglia L, Landini M, Varani S, Pession A, Faldella G. Laboratory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multiplex real-time PCR,, JCM, 2013;62:533-534)



50. Baue AE, A debate on the subject "Are SIRS and MODS important entities in the clinical evaluation of patients?" The con position. Shock 2000;14:590-593
51. Bone, ACCP, SCCM. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992;20:864-74)
52. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003;31:1250-6
53. Raya PC, Reyna FJ, Padilla RM, Medina DP, Maldonado RC, Limón RAE. Abuse of antibiotics in children as a result of maternal failure in the identifying fever. Enf Inf Microbiol 2012; 32: 94-99
54. Yin HS, Mendelsohn AL, Wolf MS, Parker RM, Fierman A, van Schaick L, Bazan IS, Kline MD, Dreyer BP. "Parents' medication administration errors: role of dosing instruments and health literacy". Arch Pediatr Adolesc Med. 2010;164:181-6
55. Hobohm U. Fever and cancer in perspective. Cancer immunol Immunother. 2001;50: 391-396
56. Houghton A, Cancer Antigens: Immune Recognition of Self and Altered Self J. Exp. Med. 1994;180:1-4
57. Wilkinson R. The Impact of Inequality: How to Make Sick Societies Healthier Prev Chronic Dis. 2006; 3: A26
58. Sepúlveda J, Bustreo F, Tapia R, Rivera J, Lozano R, Olaiz G, Partida V, García-García ML, Valdespino JL Improvement of child



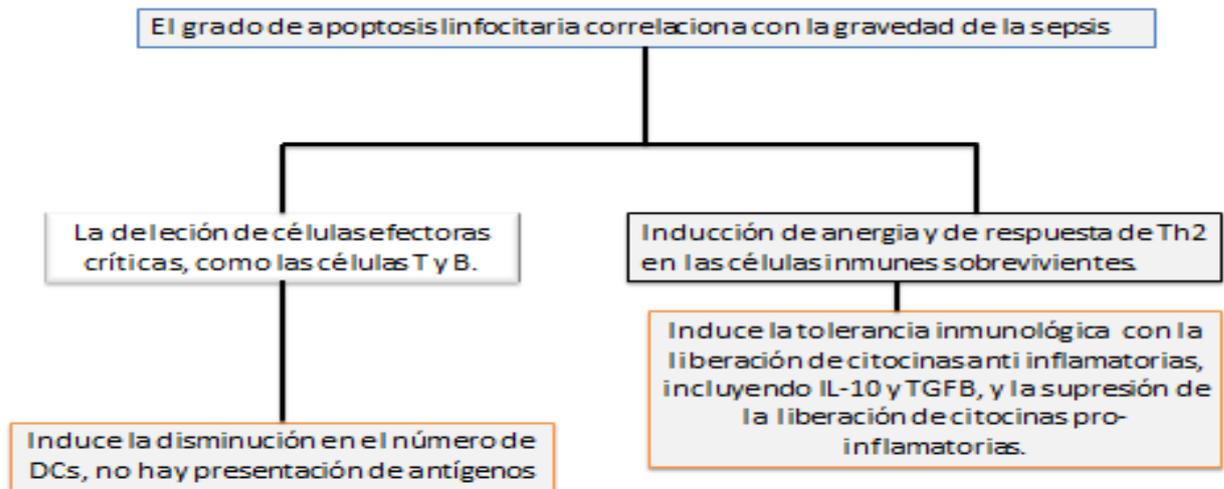
- survival in Mexico: the diagonal approach. *Salud Pública Mex* 2007;49 suppl 1:S110-S125
59. González-Pier E, Gutiérrez-Delgado C, Stevens G, Barraza-Lloréns M, Porrás-Condey R, Carvalho N, Loncich K, Dias RH, Kulkarni S, Casey A, Murakami Y, Ezzati M, Salomon JA. Priority setting for health interventions in Mexico's System of Social Protection in Health. *Salud Publica Mex* 2007;49 suppl 1:S37-S52
60. Chiappini E, Marino M. *Infections and Autoimmunity PIDJ* 2012; 12:1295-1297
61. Danial N, Korsmeyer S. Cell Death: Clinical Control Points. *Cell* 2004; 116: 205-219
62. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke B, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 *Cell Death Differ.* 2009 January ; 16(1): 3–11
63. Mamousos K, Evangelos M. Are Cancer Patients adequate candidates for Studying apoptosis in septic and ARDS models? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2001;163: 1500
64. Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Nakajima H. Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:237–243



65. Los M, Burek C, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. DDT 2003; 6: 67-77
66. De Vries EG, Timmer T, Mulder NH, van Geelen CM, van der Graaf WT Modulation of death receptor pathways in oncology. Drugs Today (barce) . 2003; 39 suppl C:95-109
67. Schuler D, Szende B. Apoptosis and acute lymphocytic leukemia in children. Ann N Y Acad Sci 1997; 824; 28-37
68. Wu Q, Chen H, Xie W, Hong M, Xia L. Elevated Fas/FasL system and endothelial cell microparticles are involved in endothelial damage in acute graft-versus-host Diseases: a Clinical analysis. Leuk Res 2012; 36(3):275-280
69. dos Santos C. Shedding metabolites on the search for sepsis biomarkers. Critical Care 2015;19(277): 2-3
70. Reyna FJ, Lagunas MA, Fernández BMF, Ortiz IFJ, Madrid MV. Sepsis en el niño con cáncer: problemas en su identificación y retos para su disminución. Rev Chilena Infectol 2015; 37(1):97-104)

11. Cuadros y Figuras

Figura 1. Efecto del fenómeno apoptótico de linfocitos en pacientes con sepsis



Doreen E. Curr Drug Targets. 2007 April ; 8(4): 493-500



Cuadro 1. Definiciones y características de las diferentes formas de muerte celular

Concepto	Apariencia morfológica y criterios enzimáticos
Apoptosis	Presenta picnosis, cariorexix, con poca o nula modificación estructural de organelos citoplasmáticos, es engullida por fagocitosis. Sin daño aparente en el DNA. Presencia de caspasas proteolíticamente activas o de productos de escisión.
Autofagia	Ocurre en ausencia de condensación de cromatina pero acompañada de una masiva vacuolización autofágica del citoplasma. No tiene asociación con fagocitosis. Sobre expresión de Atg1 cinasa. E induce muerte por sobre expresión de p53.
Necrosis	Se caracteriza morfológicamente por una ganancia en el volumen celular (oncosis), hinchazón de los organelos, ruptura de la membrana plasmática y la subsiguiente pérdida de contenido intracelular . Es regulada por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos como: TNFR1, Fas/CD95 y TRAIL-R y TLR3 y TLR4, particularmente en presencia de inhibidores de caspasas. (TNFR1, Fas/CD95-, TRAILR y TLR3).
Catástrofe mitótica	Ocurre durante corto tiempo durante la falla de mitosis. Puede estar acompañada por alteraciones morfológicas incluyendo micro nucleación y multinucleación. Puede presente morfología tanto de necrosis como de apoptosis.
Anoikis	Es La apoptosis inducida por la pérdida de la fijación al sustrato o para otras células. Los mecanismos coinciden con los que se activan durante la clásica apoptosis.
Excitotoxicidad	Muerte celular que ocurre en las neuronas desafiadas con los aminoácidos de vías excitatorias. Tiene características tanto de apoptosis, como de necrosis. El glutamato conduce a la apertura de la N-metil-D-aspartato permeable al canal de Ca ²⁺ , seguido por la sobrecarga de Ca ²⁺ citosólico y activación de la señalización de muerte celular.
Degeneración Walleriana	Llevada a cabo en el sistema nervioso, en el que parte de una neurona o axón degenera sin afectar el cuerpo celular. Este término no describe un tipo de muerte celular en sentido estricto, porque las neuronas afectadas por la degeneración walleriana continúan vivas.
Paraptosis	Forma de PCD morfológica y bioquímicamente distinto de apoptosis. Asociada con una amplia vacuolización citoplasmática e hinchazón mitocondrial, pero sin ningún



	<p>otro sello morfológico de apoptosis.</p> <p>En la actualidad, todavía no está claro si paraptosis representa una ruta de la muerte celular que es realmente distinto de todos los demás.</p> <p>En múltiples tipos de células, paraptosis se produce por la expresión del receptor de crecimiento tipo insulina-como factor I, NO se inhibe con los inhibidores de caspasas. Ni por la sobre expresión de moléculas anti-apoptóticas como las proteínas Bcl-2</p> <p>Es resultado de una cascada de señalización que involucra a miembros específicos de la familia de las proteína cinasa-activada por mitógenos</p>
Piroptosis	<p>Descrito primero en macrófagos infectados con <i>Salmonella typhimurium</i> y por otros patógenos tales como <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Shigella flexneri</i>.</p> <p>Se trata de la activación de la caspasa apical-1 (pero no de la caspasa-3), una proteasa que es en su mayoría conocida como la interleucina-1β (IL-1β)-enzima de conversión. Caspasa-1. Se produce a través del IPAF</p>
Pironecrosis	<p>Pironecrosis se distinguen de piroptosis en el hecho de que no requiere Caspasa. NALP3 y ASC están involucrados en la muerte celular necrótica de los macrófagos infectados por <i>S. flexneri</i> y se asocia con la liberación de HMGB-1, caspasa-1 e IL-1β.</p>
Entosis	<p>Una forma de "canibalismo celular" en linfoblastos de pacientes con enfermedad de Huntington, en el que una célula envuelve a uno de sus vecinos en vivo, que luego muere en el fagosoma.</p> <p>Son similares a la apoptosis y a la autofagia.</p> <p>Entosis no es inhibida por Bcl-2 o Z-VAD-FMK, y aparecen células internalizadas prácticamente normal.</p>
Necroptosis	<p>Se refiere a la forma regulada de necrosis, la cual es bioquímicamente definida como una forma de muerte celular que es dependiente de RIP1</p> <p>La fisiopatología de la necroptosis ha sido subestimada por largo tiempo debido a la ausencia de un marcador bioquímico definido como necrostatinas.</p>

Obtenido de la Referencia: 62



Cuadro 2. Microorganismos detectados por la prueba Ligth Cyclor

Septifast

Gram (-)
Escherichia coli
Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)
Serratia marcescensEnterobacter (cloacae/aerogenes)
Proteus mirabilis
Pseudomonas aeruginosa
Acinetobacter baumanniiStenotrophomonas maltophilia
Gram (+)
Staphylococcus aureus
CoNS (Coagulase negative Staphylococci)
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus spp.
Enterococcus faecium
Enterococcus faecalis
Fungi
Candida albicans
Candida tropicalis
Candida parapsilosis
Candida krusei
Candida glabrata
Aspergillus fumigatus



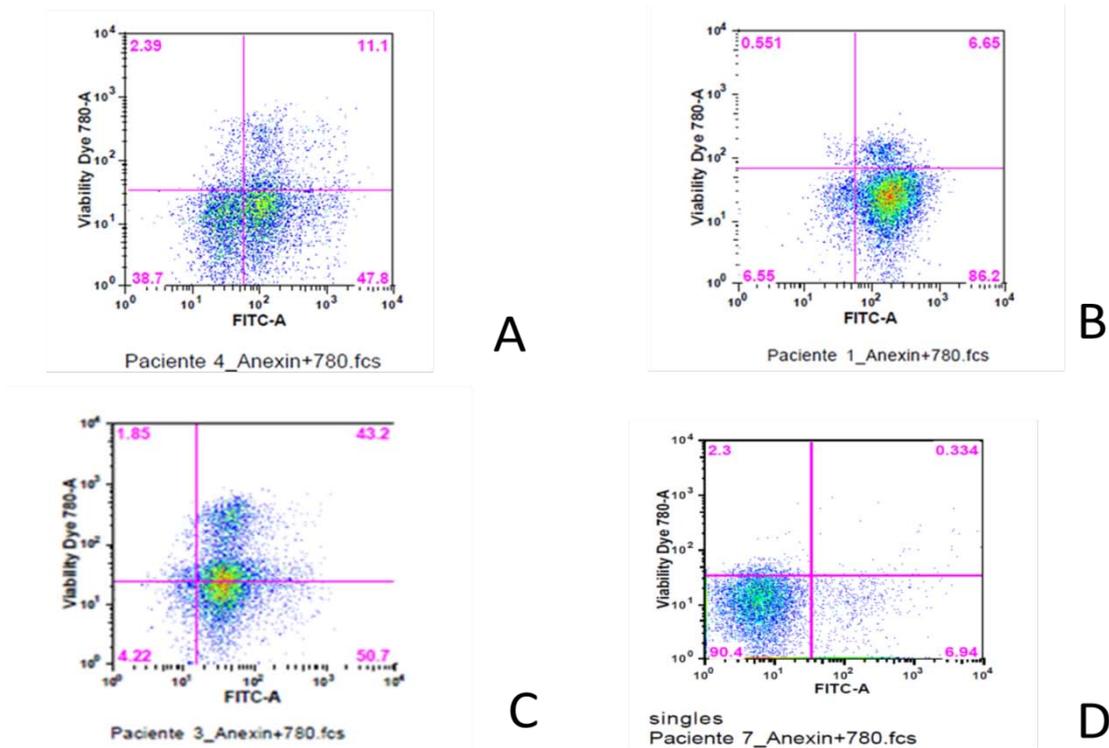
Tabla 1. Características generales de los sujetos incluidos por grupo de estudio

Variable	No sepsis (n=54)	Sepsis (n=18)	P
Edad (media+ DE)	9.5±3.7	10.2± 3.5	>0.05
Sexo			
Masculino (n=17)	24(44.4%)	10(55.5%)	>0.05
Femenino (n=19)	30(55.5%)	8(44.4%)	
Peso	41.1±3.7	45.6 ± 2.5	>0.05
Talla	136±10.2	127 ±12.4	>0.05
IMC	19.7± 7.3	22.7±5.1	>0.05
<u>Estado de los pacientes</u>			
Reciente diagnóstico de LLA (n=9)	18(33.3%)	0(0%)	<0.05
En ventana esteroidea (n=7)	10(18.5%)	4(22.2%)	>0.05
Nadir de la quimioterapia (n=20)	26(48.1%)	14(77.7%)	<0.05
<u>Número de órganos afectados</u>			
<3 (n=9)	18(33.3)	0(0%)	<0.05
3 (n=11)	14(25.9)	8(44.4%)	<0.05
>3(n=16)	22(40.7)	10(55.5%)	<0.05
<u>Órgano afectado</u>			
<Hígado (25)	32(59.2)	18(100%)	<0.05
Riñón (13)	14(25.9)	12(66.6%)	<0.05
Pulmón (8)	8(14.8)	8(44.4%)	<0.05
SNC (5)	10(18.5)	0(0%)	<0.05
Digestivo (24)	30(55.5)	18(100%)	<0.05
Hematológico(36)	54(100)	18(100%)	>0.05
Cardiovascular(6)	2(3.7)	10(55.5%)	<0.05
<u>Signos vitales</u>			
Fiebre	54(100%)	18(100%)	>0.05
Hipotensión	6(11.1%)	8(44.4%)	<0.05
Taquipnea	32(59.2%)	14(77.7%)	<0.05
Taquicardia	36(66.6%)	16(88.8%)	<0.05
Uso de antibióticos (días promedio, rango)	25 (5-30)	14 (10-21)	>0.05
Número de antibióticos utilizados (promedio,rango)	3 (1-4)	2 (1-3)	>0.05
Días de estancia (promedio, rango)	40 (23-57)	24 (12-36)	>0.05
Muertes (n=3)	5(7.4%)	1(11.1%)	>0.05

DE= Desviación estándar, IMC= Índice de masa corporal, SNC=Sistema nervioso

central, SCN= Staphylococcus Coagulasa Negativa,

Figura 2. Porcentaje de muerte celular temprana en células mononucleares de niños con leucemia, neutropenia y fiebre de acuerdo a los grupos de estudio

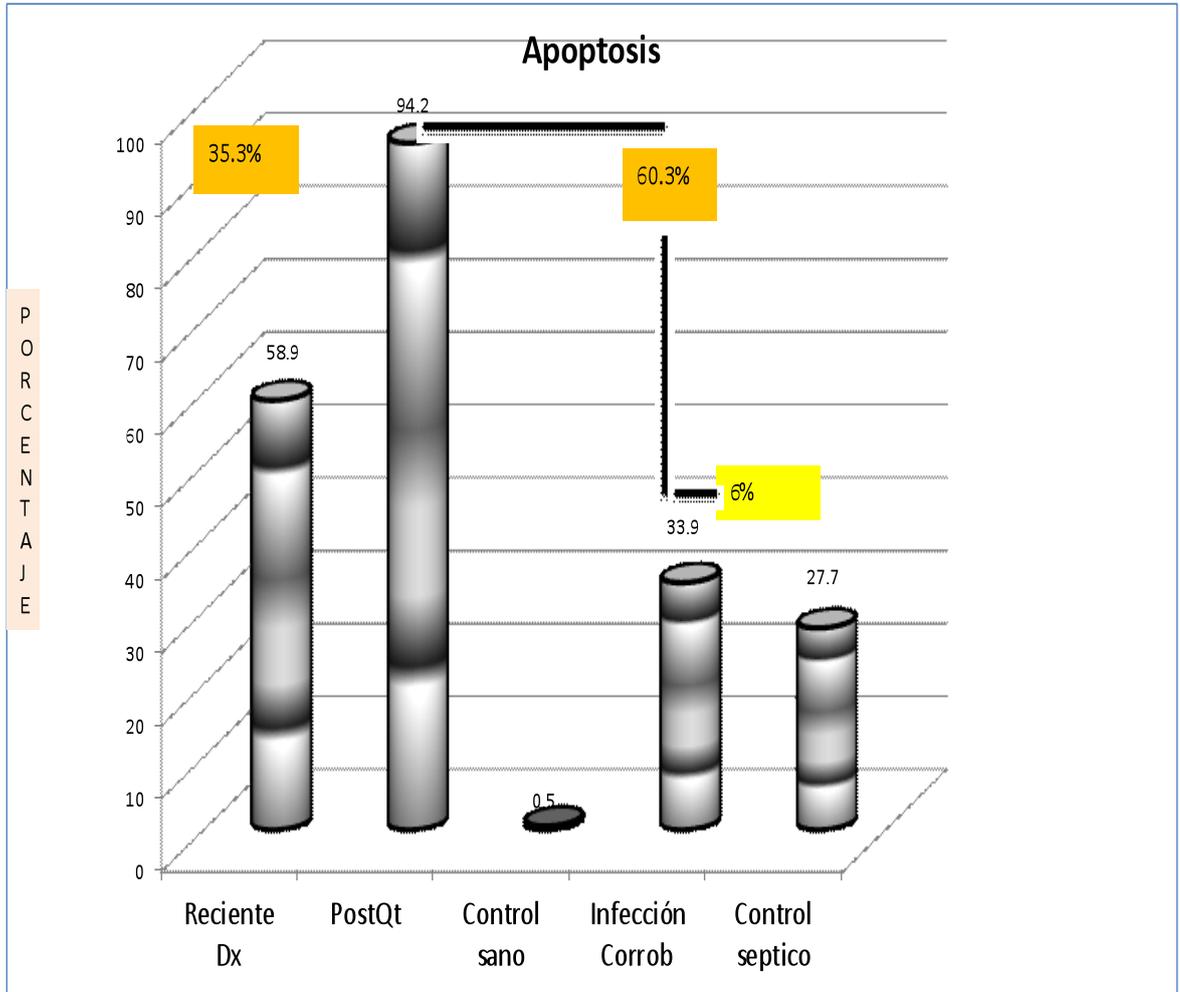


Se determinó el porcentaje de células apoptóticas si:

A = nuevo diagnóstico de la leucemia. B = pacientes en tratamiento con esteroides, C = pacientes sépticos, D = pacientes no sépticos.

*Se observa que el grupo 2, presenta los porcentajes de apoptosis mayores (estudiada con anexina V); Las cifras de apoptosis son similares entre los grupos de sepsis (leucémicos y no leucémicos). **A=** Diagnóstico reciente de leucemia, **B=** Cinco días después del inicio de esteroide (quimioterapia), **C=** Neutropenia y fiebre sin corroboración de infección, **D=** Neutropenia y fiebre con sepsis corroborada.*

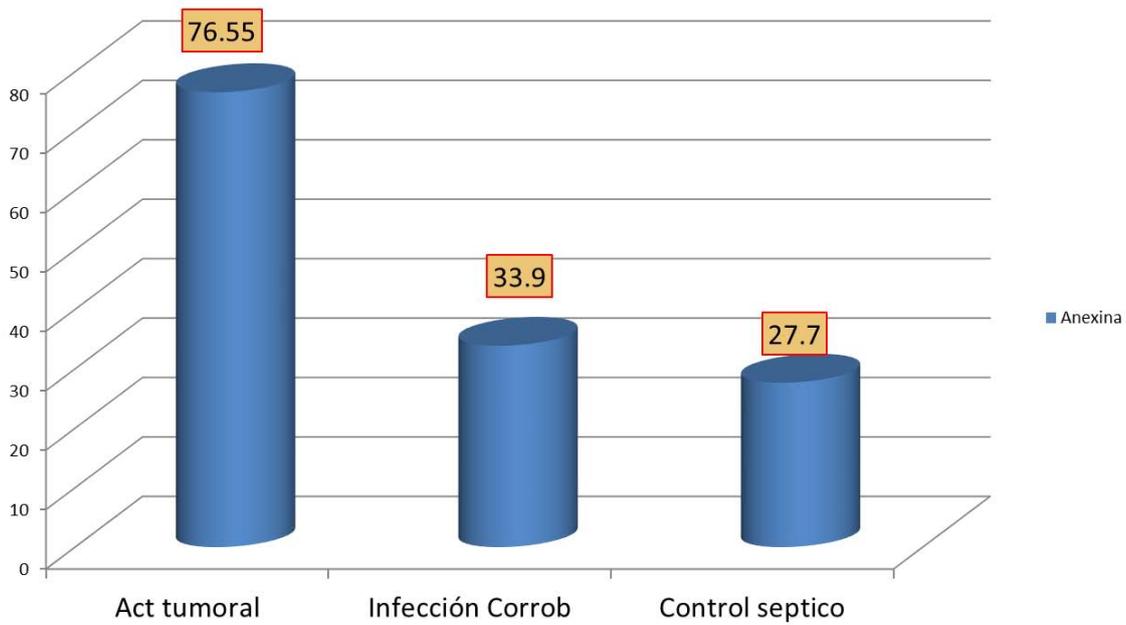
Gráfica 1 Porcentaje de Apoptosis en los diferentes grupos de estudio





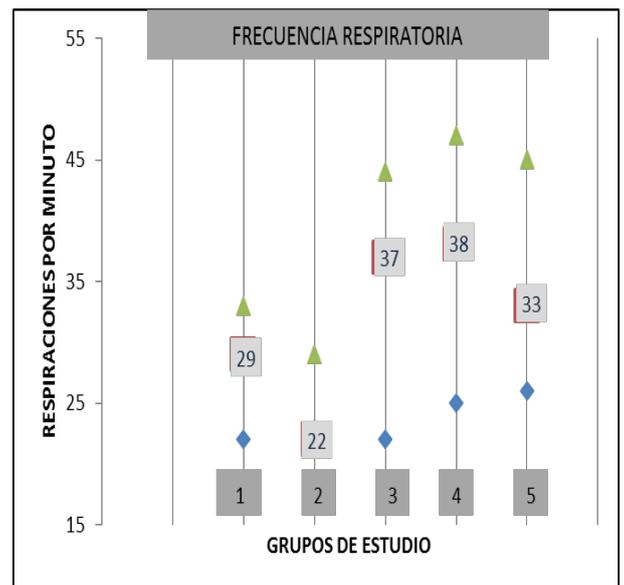
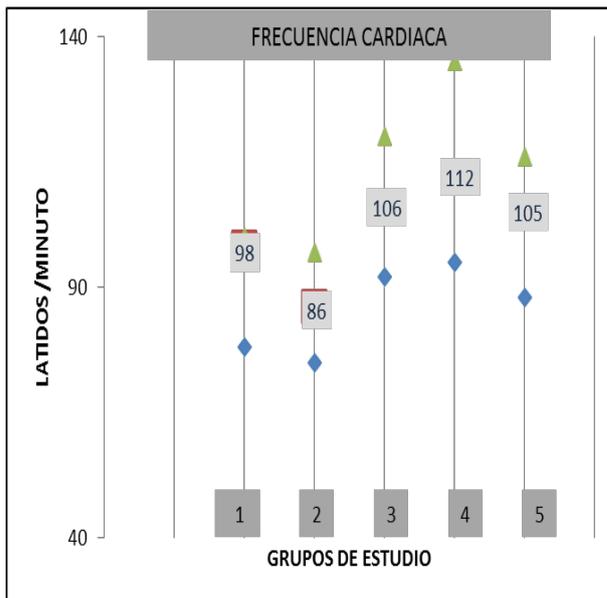
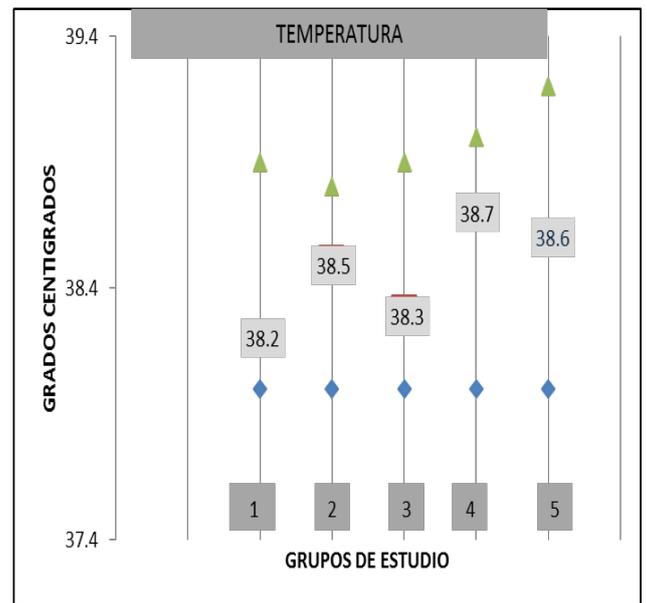
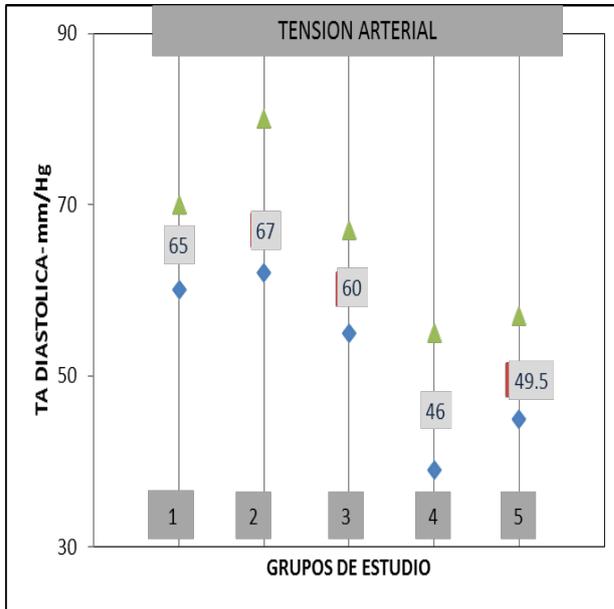
Gráfica 2

Porcentaje de muerte celular temprana de acuerdo a los grupos de estudio



***Valores representados en porcentaje**

Gráfica 3. Comparativo de los signos vitales entre grupos de estudio.



Se observa que las cifras de tensión arterial diastólica son más bajas en el grupo 4 ($p < 0.05$) y similares en el grupo 5 ($p > 0.05$). No hubo diferencia en las cifras de fiebre ($p > 0.05$).

La frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca son mayores en el grupo 4, pero solo hay diferencia en la frecuencia cardíaca ($p < 0.05$).