



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

**Programa de Doctorado en Ciencias en Salud Pública
con Área de Concentración en Enfermedades Infecciosas**

Ciclo escolar 2011-2015

Modalidad de Graduación Tesis

**Evaluación de los niveles séricos de moléculas asociadas a apoptosis en
pacientes pediátricos con leucemia y sepsis nosocomial**

Tesis de Posgrado

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Doctor en Ciencias de la Salud Pública

NOMBRE DEL ESTUDIANTE

Jesús Reyna Figueroa

Director de Tesis:

Dr. Vicente Madrid Marina.

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional
de Salud Pública

Asesores:

Dr. José Moreno Rodríguez.

Dirección de Investigación, Hospital Juárez de México. Secretaría de
Salud

Dr. Federico Javier Ortiz Ibarra.

Infectología Pediátrica. Hospital Ángeles Metropolitano

Cuernavaca Morelos, 11 de agosto de 2015



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Colaboradores:

Instituto Nacional de Salud Pública

Dr. Alfredo Lagunas Martínez

Hospital Central Sur de Alta Especialidad

Dra. Patricia Galindo Delgado

Dra. María Fernanda Fernández Bautista

Dra. Pilar Martínez Matsumoto

Dra. Ana Elena Limón Rojas

Instituto de Biotecnología, UNAM

Biól. Erika Isabel Melchy Pérez

Dra. Yvonne Jane Rosenstein

“TRES PASIONES, SIMPLES PERO IRRESISTIBLEMENTE FUERTES, HAN GOBERNADO MI VIDA: EL ANHELANTE DESEO POR EL AMOR, LA BUSQUEDA DEL CONOCIMIENTO Y LA INTOLERANTE PIEDAD POR EL SUFRIMIENTO HUMANO”.

BERTRAND RUSSELL.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Agradecimientos.

Mi más sincero agradecimiento al Instituto Nacional de Salud Pública por la oportunidad de realizar mi doctorado; al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (Conacyt) y al Hospital Central Sur de Petróleos Mexicanos por su invaluable apoyo para que pudiera concretar mis objetivos personales y profesionales.

Por ser excelentes académicos a los (as) doctores (as): Vicente Madrid Marina, Celia Alpuche, Jesús Martínez Barneche, Verónica Valverde, Lourdes García García, Carlos Jesús Conde, Miguel Cruz, José Ramos Castañeda, José Moreno Rodríguez, Ana Burguete y a quienes de una u otra manera intervinieron en mi formación en los últimos cuatro años; mi eterno agradecimiento.

Mi especial agradecimiento y reconocimiento al Dr. Alfredo Lagunas Martínez parte vital para la realización del presente trabajo no solo por sus enseñanzas, también por su paciencia, y amistad. A la Dra. Ana Burguete por ser una experta que comparte su conocimiento e ingenio al 100% y por las oportunidades otorgadas a mi persona cuando más las necesitaba y al Dr. José Ramos Castañeda por ser además de maestro, un tutor siempre pendiente, proactivo y consejero.

Al equipo del Hospital Central Sur de Petróleos Mexicanos encabezado por la Dra. Ana Elena Limón Rojas maestra y amiga, a la Dra. Patricia Galindo Delgado siempre entusiasta, y a las Dras. María Fernanda Fernández y Pilar Martínez Matsumoto, ambas de enorme futuro.

Al Dr. José Moreno Rodríguez por su asesoría, a la Dra. Carla Contreras y a la Maestra en Ciencias Margarita Bahena siempre aclarando mis dudas, como lo que son, excelentes profesionales y seres humanos.

A la Dra. Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl, por estar siempre pendiente de nosotros, de los tiempos y de las formas; con la paciencia y seguridad que transmite.

Al jurado de tesis, por ver cosas en su revisión, que en cuatro años yo no pude ver, mejorando el sentido de mis resultados.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Mi eterno agradecimiento y reconocimiento al Dr. Javier Ortiz Ibarra por estar pendiente de mis proyectos como lo que es, mi maestro y amigo, siempre con una solución rápida para los problemas que se van presentando; y al Dr. Vicente Madrid Marina a quien agradezco que dentro de toda su sabiduría como científico y de su calidad como persona, permitió la expresión de mis ideas, soy afortunado de haberlo tenido como director.

Finalmente, pero no por eso menos importantes, a los pequeños petroleros con cáncer, que a pesar de su dolor y problemas, siempre están sonrientes, siempre tienen el mejor comentario y la ocurrencia menos esperada; por estar más preocupados por su compañero de al lado y por su familia que por sí mismos, admiro su madurez y tranquilidad.

A Marifer, Naomi, Yola, Carlitos, Akbar e Isaac... en donde quiera que estén.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Dedicatoria.

Para las dos personas que comprendieron que a veces hay que caminar separados para seguir creciendo juntos, las que han tenido la paciencia y la sabiduría de entender que el tiempo perdido no va a volver, pero que era algo necesario.

Por los fines de semana, visitas a nuestras familias y fiestas que se perdieron; por escuchar mis grandes frustraciones y mis pequeños éxitos siempre con el comentario o el silencio perfecto; porque has sacrificado mucho; porque no entendería mi vida sin ti, porque has venido a dar sentido a todo, te amo Elsa.

Por los días de juego y abrazos que te quité; por los días que estuviste sentada a mi lado jugando a que escribías un artículo, aunque solo rayaras mis cuadernos porque no sabías leer ni escribir, por los días del padre que me perdí, por las noches que no he podido contarte un cuento ni cobijarte. Porque de la noche a la mañana creciste mucho y no me di cuenta, porque cada día me sorprendes más, porque has venido a dar calma a mi vida; te amo Tammy.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



INDICE

1. Resumen	08
2. Abstract	09
3. Introducción	10
4. Pregunta de Investigación	12
5. Marco teórico	13
5.1 Epidemiología del cáncer y la sepsis en pediatría	14
5.2 Microbiología de la sepsis y antimicrobianos	16
5.3 Diagnóstico de sepsis en el niño con neutropenia y fiebre por cáncer	18
5.4 Estrategias para el uso de biomarcadores	23
5.5 Diagnostico situacional de Sepsis	24
5.6 Redefinición de Prioridades	25
5.7 Papel de la apoptosis en sepsis	26
6. Objetivos	29
7. Planteamiento de la Hipótesis	30
8. Material y métodos	31
8.1 Obtención de muestras	31
8.2 Grupos de estudio	31
8.3 Definiciones operativas	32
8.3.1 Sepsis no corroborada	
8.3.2 Sepsis confirmada	
8.4 Análisis de sensibilidad	
8.5 Procedimientos	33
8.5.1 Hemocultivos	
8.5.2 Light Cyclor septifast	33
8.5.3 Determinación de moléculas de apoptosis	34
8.5.4 Determinación de muerte celular temprana	34



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



8.6 Análisis estadístico	34
8.7 Ética	35
9. Resultados	36
9.1 Características generales	36
9.2 Concentraciones de TNF- α y TNFRI	37
9.3 Concentraciones de Fas y FaS-L	38
9.4 Relación entre las concentraciones séricas y las características clínicas	38
9.5 Muerte celular temprana	39
10. Discusión	40
11. Bibliografía	47
12. Cuadros y Figuras	61
13. Anexos	69
13.1 Consentimiento informado.	
13.2 Artículos Publicados relacionados	
13.3 Autorizaciones por comités	



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



1. Resumen

Antecedentes: Se ha demostrado que el Receptor Fas (Fas), el ligando de Fas (Fas-L), el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) y el Receptor del Factor de Necrosis Tumoral tipo I (TNFR1) incrementan su concentración en sujetos con sepsis; y se han sugerido como potenciales marcadores de gravedad. El objetivo del estudio es evaluar si existen diferencias en las concentraciones séricas de estas moléculas en el suero de niños con leucemia y sepsis, que puedan considerarse un perfil diferencial de sepsis, antes de proponerlos como biomarcadores diagnósticos.

Material y métodos. Mediante un estudio transversal, estudiamos a niños <17 años con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y neutropenia y fiebre (NF) los cuales se distribuyeron en 5 grupos: 1) diagnóstico reciente de LLA, 2) LLA en ventana esteroidea, 3) LLA con sepsis no corroborada, 4) LLA con sepsis corroborada y 5) sepsis sin leucemia. Para cada uno realizamos la determinación sérica de TNF- α , TNFR-1, Fas y Fas-L mediante técnica de ELISA, además estudiamos el porcentaje de apoptosis en células mononucleares mediante Citometría de flujo.

Resultados. Incluimos 36 niños con LLA y NF en los diferentes grupos. En el grupo 4 encontramos las cifras séricas más altas de TNF- α (35.2 ± 7.6 pg/ml) y TNFR-1 (4102 ± 2440) y las más bajas de Fas-L (19.4 ± 7.3 pg/ml), mientras que las concentraciones séricas de Fas no presentaron diferencia significativa entre grupos. El porcentaje de apoptosis de células mononucleares fue menor en el grupo 4.

Conclusiones

Las concentraciones séricas bajas de Fas-L y el porcentaje bajo de células mononucleares en apoptosis, así como las concentraciones altas de TNF- α , pueden considerarse como un patrón diferencial de sepsis en el niño con NF por leucemia. Lo cual debe corroborarse en un estudio con intención diagnóstica.

Palabras clave: Leucemia, neutropenia y fiebre, sepsis, apoptosis, TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L.



2. Abstract

Purpose: *Previously, Fas/Fas-L and TNF- α /TNFR1 display differently in subjects with sepsis, suggesting their role as potential markers of severity. The need to establish the profile of these molecules in children with cancer has been defined.*

Methods. *Children under 17 years of age diagnosed with leukemia, neutropenia and fever were included. They were distributed in 4 groups: 1) recently diagnosed leukemia, 2) leukemia in steroid window, 3) leukemia and NF without sepsis, 4) leukemia and NF with sepsis. The serum determination of TNF- α , TNFR-1, Fas and Fas-L was carried out by ELISA tests.*

Results. *Thirty-six subjects with leukemia and NF were included in groups: Group 1 (nine subjects), Group 2 (seven subjects), Group 3 (eleven subjects), and Group 4 (nine subjects). The highest levels of TNF- α (35.2 ± 7.6 pg/ml) and TNFR-1 (4102 ± 2440 pg/ml, as well as the lowest levels of Fas-L (19.4 ± 7.3 pg/ml) and low percentages of mononuclear cell apoptosis, were found in Group 4.*

Conclusions. *The results showed a correlate with the larger number of failing organs and an alteration of the vital signs in septic patients. Therefore, it constitutes a pattern that can differentiate sepsis in the child with NF among children with leukemia.*

Key words: *Leukemia, neutropenic fever, sepsis, apoptosis, TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L*



3. Introducción.

La sepsis en el niño con cáncer neutropénico, presenta datos clínicos similares a los ocasionados por la actividad tumoral y por los efectos secundarios de la quimioterapia¹. Esto es importante al comprender que los criterios del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) no son evaluables en el niño con neutropenia y fiebre (NF), debido a que pueden modificarse por anemia, mucositis, deshidratación o falla cardíaca, al usar ventilación mecánica, aminas vasopresoras o factor estimulante de granulocitos, entre otros ^{2,3}. Por lo anterior en el sujeto con cáncer y NF, se han estudiado biomarcadores, que son el producto del daño orgánico o celular, con el objetivo de diagnosticar sepsis; aunque la actividad neoplásica comparte con las infecciones sistémicas, mecanismos fisiopatológicos comunes, como la hipoxia, el daño tisular, la inflamación y la apoptosis⁴. Así, cualquier biomarcador que busque discriminar sepsis en este grupo de pacientes debe presentar dentro de su modelo de estudio, el comportamiento diferencial del biomarcador por la actividad tumoral, por efecto de la quimioterapia, y por la presencia de sepsis⁵.

La apoptosis se incluye en la fase tardía (o hipodinámica) de la sepsis, que en modelos animales se presenta 12 horas después del inóculo bacteriano; en esta fase de hiporrespuesta contribuye a la disfunción inmune y a la disfunción orgánica múltiple (DOM)⁶. Estudios previos realizados en sujetos no oncológicos



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



con sepsis han demostrado que el sistema ligando/receptor de Fas/FasL y de TNFR1/TNF- α , presentan un patrón diferencial en sus concentraciones séricas al comparar sepsis vs choque séptico, esto sugiere que pueden ser evaluados como potenciales marcadores de gravedad ⁷. Sin embargo, los estudios que incluyen a sujetos con cáncer han sido cuestionados por el sesgo de inclusión que implica estudiar apoptosis en una población heterogénea en la que no se definen grupos de comparación⁸. Antes de considerar a las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR1, Fas y Fas-L y al porcentaje de apoptosis como biomarcadores para diagnosticar sepsis en el niño neutropénico con leucemia; es necesario establecer si estas presentan un perfil que pueda diferenciar cuando la fiebre es el resultado de la actividad tumoral o de sepsis; además buscamos establecer si existe correlación con las variaciones presentadas en los signos vitales y con la falla orgánica que presentan.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



4. Pregunta de investigación

¿ Las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR1, Fas y Fas-L y el porcentaje de apoptosis de células mononucleares pueden diferenciar cuando la fiebre es el resultado de la actividad tumoral o de sepsis?



5. Marco teórico.

Desde 1992, la disponibilidad del concepto que identifica al SIRS ha estandarizado la manera como se diagnostica sepsis, enfermedad considerada una de las principales causas de muerte en pacientes hospitalizados de todo el mundo. La sepsis afecta a todos los grupos de edad, lo que incrementa tanto el uso de antimicrobianos como de los recursos diagnósticos y favorece que la estancia hospitalaria sea prolongada⁹. Con el consenso donde se acuñó el término de SIRS la Society of Critical Care Medicine (SCCM) y el American College of Chest Physicians (ACCP) establecieron cuáles son los datos clínicos y de laboratorio que se presentan como consecuencia de la activación general del sistema inmune y de las diferentes vías que convergen en torno a la inflamación¹⁰. A partir de entonces, los datos utilizados para identificar al paciente séptico se han ido modificando, buscando discriminar un mayor número de verdaderos sépticos³.

En pacientes con NF por cáncer, las alteraciones hidroelectrolíticas, la reacción a transfusiones y la enfermedad injerto contra hospedero, entre otros, pueden causar sintomatología similar al síndrome séptico¹¹, problema que adquiere importancia cuando se comprende que los criterios de SIRS no son valorables en el individuo con NF¹².

La identificación temprana de sepsis en el sujeto con cáncer y NF se traduce en el uso adecuado de antimicrobianos, en la mejoría del pronóstico y en la disminución de la mortalidad. Desafortunadamente, el sobrediagnóstico es un problema



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



frecuente, por la inexistencia de un método altamente sensible y específico, favoreciendo que en este grupo de riesgo, el abuso de antimicrobianos incremente la aparición de microorganismos multi-resistentes ¹³.

Se han hecho esfuerzos locales e internacionales con el objetivo de estandarizar los métodos con los que se identifique oportunamente al sujeto con NF y sepsis buscando que la toma de decisiones ^{14,15} impacte positivamente en el manejo racional de las infecciones en estos pacientes ¹⁶, con algunos éxitos particulares sobre todo en países industrializados, éxitos que, sin embargo, no han podido ser globalizados.

5.1 Epidemiología del cáncer y la sepsis en pediatría

En el transcurso de 100 años el cáncer pasó del octavo al segundo lugar como causa de muerte; la incidencia notificada en el año 1900 fue de 64,0 muertes/100.000 habitantes, mientras que en 2010 fue de 185 muertes/100.000 habitantes. En la edad pediátrica se considera la segunda causa de muerte con cifras notificadas de 20,3/100.000 niños ^{17,18}.

En la región latinoamericana, según el consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (2011), existen pocos reportes de la epidemiología del cáncer pediátrico. Argentina notificó entre los años 2000 y 2005 un total de 7.621 casos de cáncer, mientras que Chile estimó 12 a 14 casos/100.000 niños <15 años de edad¹⁴. En México, país no participante en este consenso, la leucemia es el cáncer más común en niños, con cifras que van de 60 a 100 nuevos casos/1



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



millón de habitantes/ año, correspondiendo a leucemia linfoblástica aguda el 81,5%, además de ser la segunda causa de muerte en niños de edad entre 1 y 14 años ¹⁹. Es de tal importancia la interacción entre cáncer y sepsis que autores como Danai P y cols. (2006), refieren que la incidencia de sepsis en sujetos con cáncer es mayor que la asociada con infección por VIH/SIDA (1.051,9), diabetes mellitus (700,8), enfermedad coronaria (550,2) e hipertensión arterial (203,5) ²⁰. Agregado a ello, se considera que los pacientes con cáncer tienen 9,8 veces más riesgo de desarrollar sepsis, que la población general ²¹. En Estados Unidos de América (año 1995) se estableció que las sepsis grave representa 0,56 casos/1.000 habitantes por año, con una mortalidad nacional de 6,2/100.000 habitantes; 49% de ellos en sujetos con enfermedades inmunosupresoras ²².

La complicación con sepsis en el niño con cáncer y NF de alto riesgo se estima en 15 a 25% y el riesgo de muerte está estrechamente vinculado a factores como la neutropenia ¹⁴ y el uso de procedimientos invasores (catéteres principalmente) ²³ que explican porqué las cifras de sepsis en los hospitales no han disminuido contundentemente en comparación con otras enfermedades infecciosas con programas de prevención exitosos²⁴. Junto a estos factores favorecedores de la complicación infecciosa, se han identificado predictores de sepsis como: los niveles de Proteína C reactiva (PCR) ≥ 90 mg/L, hipotensión arterial, recaída de leucemia, recuento plaquetario $< 50,000/\text{mm}^3$ y quimioterapia < 7 días de iniciada la NF ²⁵. Particularmente el estado de vacunación incompleto ²⁶ y el uso



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



de antimicrobianos previo al inicio de la quimioterapia ²⁷ son factores descritos por nuestro grupo que se han encontrado asociados al desarrollo de sepsis y de colitis neutropénica [(OR 10,1; IC95%: 3-36; $p < 0,05$) y (OR 12,4; IC 95%: 3-51; $p: 0,00001$), respectivamente].

5.2 Microbiología de la sepsis y antimicrobianos

El cambio en el patrón epidemiológico de los microorganismos reportados en la sepsis del paciente oncológico ha sido constante; los cocos grampositivos fueron los principales agentes en la era pre-sulfonamida y *Staphylococcus aureus* fue el principal microorganismo aislado de 1950 a 1963; *Escherichia coli* y otras enterobacterias lo fueron posteriormente. En los últimos doce años, las especies gramnegativas han disminuido la frecuencia con la que son aisladas volviendo al primer lugar los microorganismos grampositivos ^{28,29}. Parte de esta última evolución se ha explicado por un incremento en el uso de procedimientos invasores que interrumpen la continuidad de piel y mucosas, por ejemplo catéteres o cánulas endotraqueales. A pesar del cambio microbiológico, las bacterias gramnegativas aún juegan un papel importante en la mortalidad del niño con enfermedad oncológica, toda vez que un mayor número de especies multi-resistentes se han notificado alrededor del mundo siendo causantes de alta mortalidad. También los hongos, particularmente las especies de *Candida* y *Aspergillus* han ganado terreno en los últimos años como responsables de infecciones profundas en el



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



niño con cáncer ³⁰. Una distribución porcentual de los aislados en sangre de sujetos con cáncer se muestra en la Figura 1.

Es claro que en los niños con NF y sepsis, los microorganismos aislados en sangre provienen principalmente de dos ambientes: el hospitalario, asociado a la mencionada pérdida de barreras anatómicas y el intestinal, ricamente colonizado por microbiota entérica ³¹. Se han publicado diferentes recomendaciones para el manejo antimicrobiano del paciente con cáncer y NF, en las que se pretende cubrir, en un inicio, a especies bacterianas productoras de β -lactamasas, *Pseudomonas spp*, bacterias anaerobias y especies de grampositivos de origen intestinal como *Enterococcus spp* ³².

Paradójicamente, la indicación de antimicrobianos, ya sea adecuada o inadecuada, puede favorecer una disbacteriosis enteral, y tornar al sujeto altamente susceptible infecciones con patógenos como *Clostridium difficile* o *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* ³³. A modo de ejemplo, en una revisión realizada, se estableció que el uso de piperacilina/tazobactam (41,9%), imipenem (25,7%), cefepime (17,5%), ciprofloxacina (2,7%) y otros (12,2%) favorecieron la infección por *C. difficile* ³⁴. El estudio poblacional de la secuenciación masiva de ADN y la creación de plataformas han revelado la existencia fisiológica en el tracto intestinal, de cientos de diferentes filotipos bacterianos, predominando *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, así como pequeñas poblaciones de *Proteobacterias*, *Actinobacterias*, *Verrucomicrobias* y *Fusobacterias* ³⁵.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Como consecuencia del uso de ampicilina, vancomicina, combinaciones de amoxicilina, metronidazol y bismuto o cefoperazona sola, ciprofloxacina y vancomicina, se ha encontrado un incremento en la carga intestinal de 16s ARNr de bacterias de las familias *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, y *Clostridiaceae* y la disminución de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* ³⁶. Los cambios en la composición de la microbiota, sobre todo por disminución de *Bifidobacterium* spp y *Lactobacillus* spp, pudiera, en principio, favorecer el incremento de colonizadores resistentes en el intestino ³⁷.

5.3 Diagnóstico de sepsis en el niño con neutropenia y fiebre por cáncer

La presentación clínica de la sepsis comparte características con otras enfermedades no infecciosas que despiertan respuesta inflamatoria (ejs.: pancreatitis, quemaduras extensas y hemorragia masiva) ¹⁰.

De acuerdo al consenso de SIRS, modificado en 2005, las alteraciones en la temperatura corporal y en el conteo de leucocitos en sangre son considerados criterios mayores para el diagnóstico; aunado a ello, alteraciones en la frecuencia cardiaca, en la presión arterial sistólica, en la frecuencia respiratoria, la presencia de leucocitos inmaduros en la biometría hemática, y la disminución en la PCO₂, son los datos menores a considerar. Se evita así que la percepción basada en datos subjetivos, como la coloración de la piel o la respuesta a estímulos, considere un estado séptico de origen infeccioso inexistente ³. No obstante, en los sujetos con NF post quimioterapia, pueden presentarse en su mayoría los criterios



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



de SIRS por anemia, deshidratación, hiperhidratación, falla cardíaca, uso de ventilador, uso de aminos vasopresoras, de factor estimulante de granulocitos, mucositis y por los efectos secundarios propios de la quimio o radioterapia.

Por ello, las posibilidades de identificar bacteremia o fungemia se basan principalmente en los hemocultivos, siendo su principal ventaja conocer al microorganismo causal y la susceptibilidad antimicrobiana. La positividad del hemocultivo depende de la oportunidad de su obtención, del método utilizado (manual vs automatizado) y del uso previo de antibióticos a la toma del mismo. Para este grupo de pacientes, se ha estipulado que existe una mayor eficacia del cultivo al tomar la muestra de sangre del catéter central que la obtenida por punción periférica ³⁸. Desafortunadamente, en pacientes con NF, el hemocultivo presenta un número importante de falsos o genuinos negativos; realizar un segundo hemocultivo incrementa la identificación de microorganismos en 10% de los casos. También, la positividad, puede estar dada por contaminación.

Estas características, favorecen las confusiones y en algunos grupos particulares, al acuñamiento de terminología que busca justificar el tratamiento anti infeccioso; como ejemplo el concepto de “sepsis sin microorganismo aislado” utilizado en el individuo con un alta sospecha de infección sin aislamiento de microorganismos; donde la decisión de interpretar el resultado, de iniciar, continuar o suspender el tratamiento antimicrobiano se basa en el criterio y la experiencia del médico clínico



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Actualmente, la identificación de ADN bacteriano o micótico por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR multiplex) se ha investigado como una opción diagnóstica en este grupo de pacientes. Su resultado se obtiene dentro de las 24 h de solicitada, y es capaz de detectar ADN de bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos, incluyendo *Aspergillus*, microorganismo importante en las infecciones del niño inmunosuprimido con cáncer. En su contra pesa la baja disponibilidad de la prueba, el costo y que no permite conocer la susceptibilidad antimicrobiana in vitro del microorganismo detectado ³⁹

Alternativamente, se han estudiado biomarcadores (ver gráfica 2) para identificar sepsis o predecir bacteremia, con la ventaja de presentar mejores resultados que el criterio clínico. Como ejemplo la Interleucina- 5 (IL-5) en concentraciones séricas > 8 pg / dL presenta sensibilidad (Sn) de 67% y especificidad (Sp) de 96%, mientras que para la Proteína quimiotáctica de monocitos (en inglés *monocyte chemotactic protein*- MCP-1) > 1650pg/dl se encontró Sn de 80% y Sp de 82% ⁴⁰. Se ha establecido también que las citocinas que tienen una vida media prolongada como interleucina -6 (IL-6) pueden predecir DOM de manera oportuna; en NF, IL-6 tiene un valor predictor negativo (VPN) alto (89%) durante el primer día de fiebre lo que serviría para excluir a la bacteriemia/ sepsis como causante de las manifestaciones clínicas. Este resultado, según la recomendación de los autores, es altamente significativo desde las 24 h del inicio de la fiebre y en episodios de más de tres días de evolución ($p < 0,05$) ⁴¹. Otros autores, definen a



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



IL-6 como el mejor predictor de bacteremia con punto de corte > 42 pg/ml ⁴². Sin embargo, IL-6, se eleva en una gran variedad de estados inflamatorios. IL-8 se comporta en forma similar a IL-6, con un VPN de 82%, para excluir sepsis asociada a NF ⁴³ y en la discriminación de episodios de bacteriemia de episodios sin bacteriemia cuando el punto de corte es > 130 pg y en la discriminación de episodios de bacteriemia de episodios sin bacteriemia cuando el punto de corte es > 130 pg/mL (S 72%, E 84%). Las concentraciones plasmáticas bajas de IL-8 en suero, por su parte, se han considerado como un predictor altamente sensible para pacientes con bajo riesgo de bacteriemia (S 72%, E 84%). Las concentraciones plasmáticas bajas de IL-8 en suero, por su parte, se han considerado como un predictor altamente sensible para pacientes con bajo riesgo de bacteriemia ⁴⁴. Por otra parte, IL-10 tiene concentraciones plasmáticas altas dentro de las primeras 24 h de iniciada la fiebre, en bacteriemia por bacilos gramnegativos ($p < 0,001$) y por cocáceas grampositivas ($p < 0,05$) en comparación de niños no bacteremicos ⁴⁵

El péptido natriurético cerebral (en inglés brain natriuretic peptide-BNP) puede ser utilizado como marcador pronóstico en niños con NF que cursan con sepsis, si se encuentran niveles de $330,8 \pm 765,3$ pg/mL. El principal problema es que, de acuerdo a sus resultados, BNP se eleva también en sujetos con anemia, neumonía y tiempo prolongado de estancia hospitalaria con tiempos prolongados de neutropenia ⁴⁶.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Otras moléculas que han mostrado aumento significativo de sus concentraciones séricas son CD25 (+), CD127 (-), CD8 (-), CD3 (+), y células T reguladoras. Otras, como las citocinas intracelulares Th1 (IFN γ , IL-2 y FNT α) han mostrado una disminución significativa en sangre de pacientes con aislamiento microbiológico ⁴⁷. Los niños con NF que presentan H-ficolina (activador de la vía de la lectina del complemento) a concentraciones séricas bajas <14 mg/L presentan un riesgo de desarrollar bacteriemia de 2,24 [(IC 95% 1,38-3,65) p: 0,004] ⁴⁸.

Otra opción se encuentra en los reactantes de fase aguda.. La procalcitonina (PCT), precursor de la hormona calcitonina sintetizada por las células C tiroideas, presenta la ventaja de no modificarse con el uso de corticosteroides ⁴⁹ ampliamente utilizados como parte de la quimioterapia de pacientes con cáncer. Junto con la proteína C reactiva (PCR), son los principales reactantes de fase aguda utilizados en niños con NF para detectar sepsis bacteriana. Existen revisiones sistemáticas que equiparan su utilidad en el diagnóstico de sepsis bacteriana. PCT es mejor biomarcador para predecir bacteriemia, mientras que PCR puede ser una mejor prueba en casos de emergencia ⁵⁰ incluso predice la sepsis que aún no es aparente clínicamente dentro de las primeras 24 h de hospitalización. Ambas, sin embargo, tienen limitantes diagnósticas, toda vez que pueden elevarse en pacientes que reciben tratamiento inmunomodulador dirigido a células T, con soporte de granulocitos o con enfermedad injerto contra hospedero. Particularmente, procalcitonina presenta baja S y E para diagnosticar enfermedad



micótica invasora (aspergilosis) ⁵¹. Finalmente, la velocidad de sedimentación globular (VSG) es considerado un mejor predictor que el conteo leucocitario, sin embargo su positividad en NF no se considera un marcador específico para el diagnóstico de sepsis, ya que puede modificarse en niños con anemia, híper o deshidratación o acción del factor estimulante de neutrófilos.

5.4 Estrategias para el uso de biomarcadores

En el año 2011; Kibe et al publicaron una revisión que enaltece las propiedades de PCT en pacientes en estado crítico con sepsis; sin embargo dentro de sus aclaraciones establecen que la revisión y sus conclusiones no pueden ser aplicadas a niños, a inmunosuprimidos, ni a sujetos con cáncer en estadio terminal

52

El reconocer que los biomarcadores son producto de los mecanismos que explican el daño orgánico y celular en el sujeto séptico y que estos en su mayoría pueden también estar alterados en individuos con cáncer, al tener participación en mecanismos fisiopatológicos de las neoplasias (hipoxia, daño tisular, inflamación y apoptosis) nos obligan a establecer patrones diferenciales entre el sujeto con cáncer séptico del que no lo está ^{53,54}. Pocos son los autores que han ideado diseños metodológicos que hagan esa diferencia. Shomali et al (2012) estableció como una estrategia para distinguir la fiebre causada por un proceso infeccioso sistémico de la fiebre causada por actividad tumoral, el realizar dos mediciones de PCT, una basal y otra siete días después, encontrando que en el primer caso, la



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



PCT disminuía significativamente, mientras que en los sujetos con fiebre por actividad tumoral, la PCT se mantuvo e incluso incrementó con respecto a las concentraciones basales ⁵⁵ las desventajas de esta propuesta son: 1) que la evaluación fue realizada en sujetos no-neutropénicos, lo que obligaría a realizar un estudio similar pero en sujetos con neutropenia y 2) que siete días después, cuando puede concluirse el origen de la fiebre; el costo por el uso de antimicrobianos y de recursos diagnósticos habrá sido devengado.

5.5 Diagnostico situacional de Sepsis

Los datos epidemiológicos publicados sobre sepsis en pacientes hemato-oncológicos son escasos; existiendo diferencias importantes en la etiología y la resistencia antimicrobiana entre los centros estudiados. Motivo por el cual los análisis actualizados locales (hospitalarios, regionales y nacionales) deberían ser obligatorios para apoyar el tratamiento empírico adecuado ¹². Los pacientes con cáncer representan una población altamente heterogénea para los que se utilizan múltiples opciones terapéuticas, por lo que la creación de un sistema de identificación de sepsis útil, presenta desafíos significativos derivados de la complejidad de ambas enfermedades; donde la falta de un fenotipo claro, la influencia de los efectos de la quimioterapia y la capacidad de los tomadores de decisiones así como la poca disponibilidad de marcadores de uso rutinario complican su diagnóstico ⁵⁶



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Considerando que en el niño con NF el porcentaje de sospecha de sepsis es alto; los sistemas de vigilancia de infecciones hospitalarias deben establecer y determinar la concordancia entre los casos notificados y los detectados; revalorando los esquemas de antimicrobianos y estableciendo la retroalimentación del sistema de vigilancia a los tomadores de decisiones. Para tal efecto la validación de los casos notificados y de los esquemas antimicrobianos basados en la microbiología; son tópicos pendientes en muchos de los centros que atienden pacientes gravemente enfermos complicados con sepsis.

5.6 Redefinición de Prioridades.

Queda claro que cada centro hospitalario debe tomar decisiones a partir de datos propios. Mientras que la investigación en la literatura de la epidemiología de otros centros e incluso países, pueden servir como un comparativo en el que se evidencien diferencias y similitudes. Para tal efecto la capacitación de los tomadores de decisiones, debe ir encaminada inicialmente a estandarizar la estrategia de identificación que el centro hospitalario utilizará para decidir qué paciente debe recibir antimicrobianos, estableciendo el árbol de decisión para el cambio o modificación del esquema. La evaluación periódica de la estrategia permitirá disminuir la variabilidad que conlleva tomar decisiones basados en la experiencia del médico ⁵⁷. Los biomarcadores particularmente han demostrado utilidad en diferentes estudios realizados en niños con cáncer, con el inconveniente que no detecta el microorganismos ni su susceptibilidad; teniendo la



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



ventaja que las cifras del biomarcador elegido (por sensibilidad e incluso disponibilidad hospitalaria) puede ser monitoreado y utilizado como un marcador de mejoría o fracaso al tratamiento.

Esto implica, que necesariamente deba haber una mejoría en la infraestructura hospitalaria ⁵⁸. Muchos países con pocos recursos, en la actualidad adolecen de centros hospitalarios, suficientes para una alta densidad poblacional por cada médico disponible; aunado a ello la pobre disponibilidad de pruebas diagnósticas, llevan a que no sea factible el reconocimiento y tratamiento temprano de sepsis. En regiones africanas un ejemplo de la adaptación del manejo de la enfermedad al medio, es en sepsis neonatal donde el inicio de antibióticos pre-hospitalarios, con seguimiento del paciente en puestos de salud de avanzada ha sido propuesto para disminuir la mortalidad ⁵⁹ (Figura 3)

5.7 Papel de la Apoptosis en sepsis

La apoptosis juega un papel importante en la patogénesis de la sepsis y en la DOM resultante ⁶⁰, esta puede ser activada y regulada por la vía extrínseca (muerte del receptor), particularmente por la señalización de Fas/FasL jugando un papel crucial en la resolución de la respuesta inflamatoria ³⁶, incluyendo la producida en sepsis ³.

El receptor de superficie celular denominado Fas (Apo-1 o CD95) es un miembro de la familia de receptores de tipo TNF, que se expresa en una variedad de células inmunes y no inmunes. Su activación induce la muerte celular para limitar



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



la expansión de células T posterior a la eliminación del antígeno e inactiva las células T auto reactivas periféricas que pudieron haber evadido la selección del timo ⁶².

Mientras que el ligando de Fas (FasL o CD95L) es una citocina que se une al receptor de Fas. Se expresa en linfocitos T activados, células NK, neuronas y astrocitos, limita la respuesta inmune en la inflamación estimulada por antígeno ⁶³.

Por su parte TNF- α es una citocina derivada de los monocitos/macrófagos que se ha observado en presencia de endotoxinas (predominantemente lipopolisacárido) ³⁹ y es reconocido como el principal mediador de la respuesta inflamatoria en el paciente con sepsis o con choque séptico ⁶⁴. TNF- α es considerada la primera citocina proinflamatoria que aparece en circulación en la inflamación sistémica aguda, el exceso en su producción y la interacción con sus receptores TNFR1 (CD120 α) y TNFR2 (CD120 β) tiene efectos biológicos que deterioran las condiciones clínicas sistémicas de los pacientes, en las que se incluyen choque y muerte ^{65,66}. En enfermos críticos se ha demostrado apoptosis del túbulo renal ⁶⁷, del epitelio intestinal, del bazo y de células mononucleares asociada a sepsis, mediante la activación de la vía extrínseca de apoptosis.

Sin embargo la apoptosis regulada por la muerte del receptor (Fas/FasL); también puede encontrarse alterada en sujetos con leucemia de reciente diagnóstico, como consecuencia del comportamiento biológico tumoral ⁶⁸, inclusive se ha utilizado como un marcador pronóstico para definir sobrevida y a los niños que tienen



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



pocas probabilidades de recaer cuando se demuestra una elevación significativa de Fas/FasL al momento del diagnóstico ⁶⁹.

Durante el tratamiento quimioterapéutico, la apoptosis de células leucémicas inducida por drogas es uno de los mecanismos por medio del cual se disminuye la carga tumoral y se cura la enfermedad, esto depende del medicamento utilizado por ejemplo la apoptosis inducida por daunorubicina o arabinosido de citocina son independientes del sistema Fas /FasL ^{70,71} mientras que los glucocorticoides estimulan la apoptosis induciendo la muerte de timocitos inmaduros⁷².

Gran parte del mecanismo de acción de los medicamentos de quimioterapia está regulado por el papel de sus receptores, que muestran una localización intracelular, estos activan diversos factores de transcripción que modifican la expresión de proteínas asociadas con la apoptosis como lo son la molécula Bim, la granzima A, moléculas proapoptóticas como GPR65/TDAG8 y otras proteínas implicadas en la vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis ⁷³. Por otra parte las concentraciones de TNF- α , se encuentran disminuidas en el grupo de sujetos con quimioterapia en comparación de los que no la reciben ¹².



6. Objetivos

Objetivo General:

Establecer si existe un patrón diferencial en las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L y en el porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis, entre los pacientes neutropénicos con leucemia y sepsis corroborada; y los pacientes neutropénicos con leucemia sin corroboración de sepsis.

Objetivos particulares

-Correlacionar las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L, y el porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis, con la evolución clínica de niños con leucemia con o sin sepsis.

-Determinar si las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L, y el porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis son eficaces en discriminar bacteremia de no bacteremia en niños con leucemia y sospecha de sepsis.

-Establecer la variación de las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L y en el porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis, durante la evolución del individuo leucemia, de acuerdo a 3 etapas: 1) diagnóstico, 2) quimioterapia, 3) sospecha de sepsis.



7. Planteamiento de Hipótesis.

Hipótesis Metodológica: La apoptosis es una vía fisiopatológica común en la respuesta al tratamiento contra la leucemia y en la respuesta inflamatoria a un proceso infeccioso; las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L y el porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis serán diferentes en el niño considerado séptico comparado con el niño sin sepsis.

Hipótesis nula (H₀):

Las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L y el porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis, de pacientes con leucemia y sepsis tendrán concentraciones iguales a los de pacientes con leucemia, sin sepsis.

Hipótesis alterna (H_a):

Las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas, Fas-L y el porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis, en pacientes con leucemia y sepsis tendrán concentraciones diferentes a los de pacientes con leucemia sin sepsis.



8. Material y métodos

8.1 Obtención de las muestras

Se estudiaron niños <17 años con diagnóstico de LLA y NF, atendidos en el servicio de pediatría del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos. A través de un catéter central se obtuvo sangre para la realización de un hemocultivo; de una prueba de Light Cycler Septifast® Roche (LCSF), de las pruebas de ELISA para la detección de las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR-1, Fas/FasL, una biometría hemática y extracción de mononucleares para buscar muerte celular temprana mediante la tinción con Anexina V por Citometría de Flujo.

8.2 Grupos de estudio

De acuerdo a los resultados de laboratorio y a las características clínicas, los sujetos se dividieron en 5 grupos:

- 1) Pacientes con NF y leucemia de reciente diagnóstico previo al inicio de la quimioterapia.
- 2) Pacientes con NF y leucemia entre los 5 y 7 días de iniciada la ventana esteroidea.
- 3) Pacientes con leucemia, que presentan NF después de dos semanas de iniciada la quimioterapia, sin corroboración microbiológica de sepsis



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



- 4) Pacientes con leucemia, que presentan NF después de dos semanas de iniciada la quimioterapia, con corroboración microbiológica.
- 5) Pacientes sépticos sin leucemia considerados controles sépticos.

8.3 Definiciones operativas

8.3.1 Sepsis no corroborada.

Obligadamente:

- a) Temperatura mayor o igual a 38 grados en una ocasión, o de 37.5 a 37.9 en al menos dos ocasiones en 24 horas ó
- b) Sin aislamiento microbiano por hemocultivo o LCSF.

8.3.2 Sepsis confirmada. Igual que lo anterior pero con hemocultivo y/o prueba de LCSF positiva.

8.4 Análisis de sensibilidad.

Considerando algunas posibilidades de sesgo, debido a que no se tiene la capacidad de diferenciar el 100% de pacientes con sepsis, una vez que el estándar de oro tiene una sensibilidad del 60%, buscamos incrementar la capacidad de identificar el agente bacteriano o micótico involucrado con la realización de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex en tiempo real (LCSF) que ha demostrado una capacidad de identificación hasta del



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



90%. Para cada sujeto se llenó un formato de reporte de caso con información concordante con la establecida por su médico tratante (hematólogo y/o pediatra) en los expedientes clínicos electrónicos individuales, considerando particularmente los datos demográficos, los datos clínicos y de laboratorio, así como los resultados de cultivos de sangre. El incluir niños ≤ 17 años de edad los hace elegibles para recibir el mismo tratamiento quimioterapéutico usado institucionalmente.

8.5 Procedimientos

8.5.1 Hemocultivos.

Se utilizó 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 realizará 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 identificarán en el sistema automatizado microscan® (Organon Teknika Corp, Dirham, N: C).

8.5.2 LightCycler® SeptiFast Test

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



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



amplificación de regiones hipervariables del ADN ribosomal, para bacterias (16S) y para hongos (18S) por tecnología de PCR en tiempo real.

8.5.3 Determinación de moléculas de apoptosis. La estimación de las concentraciones séricas de TNF- α , TNFR1, Fas y FasL fueron realizadas mediante prueba de ELISA por duplicado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Quantikine® ELISA, R&D Systems).

8.5.4 Determinación de muerte celular temprana.

Mediante técnica de gradiente se separaron las células mononucleares, y teñidas con Anexina V y con e-flour 780 mediante la siguiente modificación previamente estandarizada: 1) Se agregó a las células resuspendidas en 100 μ l de PBS 1 μ l de anexina V incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente; 2) se agregó 300 μ l de buffer de unión a anexina, 3) se agregó 5 μ l de e-flour 780 y se incubó 30 minutos a 2-8 °C, 4), centrifugamos a 2000 rpm x 5 minutos y se agregaron 300 μ l de buffer de unión a Anexina y se recentrifugó, 5) finalmente se agregaron 400 μ l de paraformaldehído al 2% para preservar hasta su lectura en el citómetro de flujo (una semana).

8.6 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron mediante medias y desviación estándar de la media. La comparación entre grupos se realizó mediante la U de Mann Whitney. La



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



relación entre dos variables fue analizada usando correlación de Spearman. Se utilizó EPI Info versión 3.5.3; y SPSS ver 10, para el análisis estadístico.

8.7 Ética

El estudio fue aprobado por el comité de investigación y de ética del Hospital Central Sur de Petróleos Mexicanos y los del Instituto Nacional de Salud Pública, México. Se obtuvo consentimiento informado.



9. Resultados.

9.1 Características generales

Un total de 36 sujetos con leucemia y NF, además de 6 sujetos con sepsis sin leucemia como controles fueron incluidos en el análisis; de acuerdo a la siguiente distribución entre los grupos: Grupo 1= nueve, Grupo 2= siete, Grupo 3= once, Grupo 4= nueve y Grupo 5= seis sujetos.

Veinte sujetos correspondieron al sexo masculino y 22 al sexo femenino. El promedio de edad fue de 12.3 años con un rango entre los 2 y los 17 años. Todos presentaron fiebre para ser considerados en la inclusión del estudio.

La evaluación de órganos afectados estableció que 11 (26.1%) individuos tuvieron dos órganos afectados, quince (34.7%) tuvieron 3 órganos afectados, y 16 (38.0%) más de tres órganos afectados. De acuerdo al órgano dañado se encontró que el hígado presentó disfunción en el 73.8 % de los sujetos; el riñón en el 33.3%, el pulmón en el 28.5%, sistema nervioso central en el 11.9%, el aparato digestivo (intestino) en el 71.4%, hematológico en el 100%, cardiovascular en el 21.4%. La sobrevivencia de sujetos se presentó en el 92.9%; debido a que tres (7.1%) sujetos fallecieron; uno de ellos por perforación gástrica secundaria a aspergillosis, y dos más por leucemia refractaria al manejo **(Ver cuadro 1)**.



9.2 Concentración de TNF- α y TNFRI

Concentraciones detectables de TNF- α fueron encontrados en 7 de 9 sujetos del grupo 1 (77.7%); y en todos los sujetos de los grupos 2, 3, 4 y 5. Mientras que concentraciones detectables para TNFRI fueron encontrados en 8 de 9 sujetos del grupo 1, y en 10 de 11 sujetos del grupo 3; en el resto de los grupos (2, 4 y 5) se detectaron concentraciones en todos los sujetos.

La media en las concentraciones séricas de TNF- α (pg/mL) encontradas por grupo establecen que en el grupo 4 se encontraron las concentraciones mayores (35.2), mientras que en el grupo 3 se encontraron las concentraciones séricas más bajas (21.5). Comparativamente; el grupo 4 presenta diferencia significativa con los grupos 1, 2 y 3; pero no presenta diferencia con el grupo 5; ambos grupos considerados sépticos. (Gráfica 3A)

Para TNFRI, las concentraciones séricas más altas fueron los encontrados en el grupo 4 (4102), y las cifras menores se encontraron en el grupo 1 (1,987). Sin embargo comparativamente, no se observa diferencia significativa entre los grupos. (Gráfica 3b)

9.3 Concentraciones de Fas y Fas-L

Concentraciones detectables de Fas fueron encontrados en 8 de 9 sujetos del grupo 1 (77.7%); y en todos los sujetos de los grupos 2, 3, 4 y 5. Mientras que concentraciones detectables para Fas-L fueron encontrados en 6 de 9 sujetos del



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



grupo 1, y en 9 de 11 sujetos del grupo 3; en el resto de los grupos (2,4 y 5) se detectaron concentraciones en todos los sujetos. (Gráfica 3c)

La media en las concentraciones séricas de Fas encontradas por grupo establecen que en el grupo 1 se encontraron los mayores concentraciones (1082.8 pg/ul), mientras que en el grupo 4 se encontraron las concentraciones séricas más bajas (1065.6 pg/uL). Al comparar las concentraciones entre grupos, no hubo diferencia significativa ($p>0.05$). Para FaS-L, las concentraciones séricas más altas fueron las encontradas en el grupo 3 (160), y las cifras menores se encontraron en el grupo 4 (19.14). Encontrando diferencia significativa ($p<0.05$) (Gráfica 3D).

9.4 Relación entre los niveles séricos y las características clínicas.

La evaluación de la posible relación entre los niveles séricos de las moléculas y la gravedad del cuadro clínico fueron estudiadas tomando en cuenta los datos clínicos que frecuentemente se describen en el paciente pediátrico grave; para tal efecto la hipotensión se encontró en los sujetos del grupo 4 y del grupo 5, con cifras de tensión arterial diastólica de 46 a 49.5 mm/Hg. Los grupos no considerados sépticos mantuvieron la tensión arterial en cifras normales ($p<0.05$). En cuanto a las distermias, no hubo diferencia significativa entre los grupos ($p>0.05$). La frecuencia cardíaca por su parte se encontró con tendencia a la taquicardia en los grupos 3,4 y 5 ($p>0.05$), Esa misma tendencia se presentó al evaluar la frecuencia respiratoria, la cual se mantuvo elevada en los grupos 3,4 y 5



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



($p > 0.05$) (ver gráfica 4). La tensión arterial disminuye y la frecuencia cardiaca incrementa con las concentraciones bajas de FasL , y con las concentraciones elevadas de TNF-alfa y TNFR1 ($p < 0.05$).

9.5 Muerte celular temprana

Una de las maneras de detectar la apoptosis en una fase temprana es comprobar la localización de la Fosfatidilserina en la membrana plasmática. La fosfatidilserina es un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. Cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de dicha membrana. Esta localización puede ser detectada fácilmente ya que la Anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. Las moléculas de Anexina V se marcan con diferentes fluoróforos para detectar apoptosis mediante diversas técnicas como, por ejemplo, citometría de flujo. Nuestros resultados presentan que en el grupo 1 el porcentaje promedio de células teñidas con Anexina V fue de 58.9 ± 12 , en el grupo 2 de $94.2 \pm 5\%$, en el grupo 3 de $43 \pm 8\%$, en el grupo 4 de $10 \pm 7\%$, y en el grupo 5 de $15 \pm 9\%$ (**ver figura 2**). Lo que indica que en los sujetos sépticos el porcentaje de muerte celular es bajo en las primeras horas de iniciada la fiebre; a comparación de resto de grupos que traduce actividad tumoral o acción de la quimioterapia.



10. Discusión.

La sepsis es una de las principales causas de muerte en niños con cáncer, quienes presentan un riesgo > 5 veces de desarrollarla al compararse con sujetos sin cáncer ⁷⁵. El estado de inmunodeficiencia del huésped, debido a la neutropenia es un factor que favorece el desarrollo de infecciones graves; como aporte de las observaciones en el grupo de niños que nosotros estudiamos, encontramos que las infecciones nosocomiales, están fuertemente asociadas además, a un esquema de vacunación incompleto, debido a que en el 44% de los casos, las inmunizaciones son suspendidas para iniciar la quimioterapia (OR 10.1; IC 95%, 3-36; $p < 0.05$, lo que implica que, también el estado inmunológico humoral contribuye al riesgo de adquirir infecciones nosocomiales²⁶.

La demora en el inicio de los antimicrobianos puede ser mortal, especialmente en un proceso infeccioso sistémico; motivo por el cual la fiebre en el niño con neutropenia, se trata como una infección ⁷⁶. Sin embargo, el sobre diagnóstico, el abuso de antimicrobianos y la aparición de microorganismos multi-resistentes son temas comunes en estos niños ⁷⁷.

Desde el punto de vista biológico, se sabe que, el uso de antimicrobianos es un determinante que favorece la disbiosis y las alteraciones de las vías metabólicas intestinales, desafortunadamente no está claramente definido el criterio para el uso de agentes antimicrobianos en enfermedades donde la participación bacteriana, como en la NF, es una suposición³¹. Esto se ve claramente definido en



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



los resultados obtenidos por nuestro grupo, con los que evidenciamos en la corte de pacientes estudiados, que el uso de antimicrobianos durante más de 10 días, previo a la administración de quimioterapia, es un factor de riesgo para desarrollar colitis neutropénica (OR 12.4; IC 95%, 3-51; $p=0.00001$) lo cual se suma a factores de riesgo previamente evaluados como el uso de doxirrubicina y la neutropenia grave, lo que establece la importancia de un adecuado uso de los antimicrobianos en el sujeto con leucemia ²⁶ y fortalece la necesidad de contar con un biomarcador que sea útil en discriminar al niño leucémico con sepsis, del que no la padece. En este grupo de pacientes, los valores de los biomarcadores que buscan discriminar sepsis, pueden estar influenciados por la quimioterapia ⁷⁸ por la actividad tumoral y por complicaciones ⁵⁵.

Buscamos por lo tanto, el patrón diferencial de las concentraciones séricas de las moléculas asociadas a apoptosis, TNF- α /TNFR1, y Fas/FasL; y del porcentaje de células mononucleares periféricas en apoptosis, para considerarlos como potenciales biomarcadores. Una vez que el daño orgánico y de la DOM secundaria a la sepsis, la apoptosis juega un papel importante ^{11, 79}

La apoptosis en sepsis de niños con cáncer, no se ha estudiado por completo, pero existen las bases para sugerir que desempeña un papel determinante. Particularmente la apoptosis que se presenta en células T, células B y células NK puede contribuir significativamente al riesgo de adquirir infecciones oportunistas secundarias y a la DOM ⁸⁰.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



La vía extrínseca de la apoptosis consiste en receptores de muerte transmembrana que son miembros de la superfamilia de genes de TNF y se considera una de las más importantes en sepsis, tanto así que están siendo evaluados como potenciales blancos terapéuticos en el SIRS ⁸¹. La sepsis se caracteriza por dos fases, la fase hiperdinámica en la que incrementa el gasto cardíaco, la hipoperfusión del tejido y la disminución de las resistencias vasculares que es mediada por citocinas proinflamatorias. Y la fase tardía que se presenta aproximadamente 12 horas después del inóculo bacteriano, que incluye la disminución en la función cardíaca y de los índices de daño orgánico múltiple, en esta fase entre otras cosas el sistema inmunológico exhibe una presentación antigénica defectuosa y una disregulación apoptótica, lo que produce pérdida en la función linfocitaria ⁸².

Nuestro estudio mostró concentraciones séricas bajas de FasL y concentraciones séricas altas de TNF- α /TNFR1 en niños sépticos con leucemia y NF; así como porcentajes bajos de apoptosis de células mononucleares. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios reportados con anterioridad donde se observaron concentraciones aumentadas de Fas y concentraciones bajas de Fas-L séricos en niños sin cáncer con DOM, este patrón aparentemente favorece la perpetuación de la inflamación debido a que producen la inhibición de la activación de las células inmunes ⁸³. Aparentemente Fas no se eleva en sujetos con leucemias de tipo mieloides, pero se ha encontrado que puede estar elevado



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



cuando se complican con un proceso inflamatorio ⁸⁴ esto incluye a la inflamación que se presenta por la acción citotóxica de la quimioterapia o por la actividad tumoral ^{63,64} y parece estar más relacionado a la evolución de la enfermedad leucémica que a la sepsis ⁸⁵. Este patrón correlaciona con un mayor número de órganos disfuncionales y con un cuadro clínico más grave, datos que apoyan los hallazgos que establecen que la disminución de Fas-L tiene efectos protectores en el daño hepático, lo cual puede presentarse como parte de los mecanismos del hospedero para protegerse del evento séptico ⁸⁶ Por su parte, La producción de TNF- α se ha referido como un elemento central de la patogénesis de numerosas enfermedades agudas y crónicas, como la sepsis y el cáncer⁸⁷ la activación de TNF/TNFR-1 juega un papel primordial en el detrimento de las condiciones clínicas de los pacientes, y es una vía cuya traducción supone cambios hemodinámicos importantes, como la caída de la tensión arterial, la taquicardia y las alteraciones en la frecuencia respiratoria⁸⁸ sin embargo estos cambios también se han demostrado durante el tratamiento quimioterapéutico debido a que el daño citotóxico de algunos medicamentos induce la señalización de TNF- α , produce inflamación tisular y apoptosis en mucosas, particularmente a nivel intestinal, lo que promueve la translocación bacteriana y sepsis ^{89,90}. TNF- α es considerada la primer citocina proinflamatoria que aparece en circulación en la inflamación sistémica aguda, describiéndose claramente que el exceso en su producción y la interacción con sus receptores TNFR1 y TNFR2 tiene efectos biológicos que



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



deterioran las condiciones clínicas sistémicas de los pacientes, en las que se incluyen choque y muerte ⁹¹⁻⁹³.

En un alto porcentaje de niños con neutropenia secundaria al manejo de la quimioterapia o a la actividad tumoral que presentan fiebre, se inicia un tratamiento indiscriminado con antibióticos basado en la presencia de la fiebre, antes de confirmar la presencia de un microorganismo.

El uso de marcadores biológicos además de la evaluación clínica busca aumentar las posibilidades de un diagnóstico preciso y las concentraciones séricas de FasL y el porcentaje de células apoptóticas parecen ser dos marcadores que puede discriminar si la causa de la fiebre en el niño leucémico con neutropenia es causada por una infección o como consecuencia de la actividad y/o tratamiento de la neoplasia. Nuestros resultados sugieren que existe un comportamiento diferente en el grupo de niños sépticos si es comparado con el grupo de niños en los que no se corrobora el proceso infeccioso. Particularmente encontramos una diferencia significativa en las cifras de Fas-L y en el porcentaje de muerte celular temprana en el grupo de sépticos donde se encuentran las cifras más bajas, así como cifras elevadas de TNF- α y TNFR1.

El presente estudio representa un estudio meramente 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, cuya principal limitación es el tamaño de la muestra para cada grupo.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



Los resultados reflejan que las cifras bajas de Fas-L, los porcentajes bajos de muerte celular temprana y las cifras altas de TNF/TNFR1 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; los cultivos pueden ser poco útiles y la evolución es desfavorable a pesar de una cobertura antimicrobiana amplia; y la disyuntiva entre decidir si la gravedad del paciente se debe a actividad tumoral o a un proceso infeccioso difícil de evidenciar puede llevar a evoluciones clínicas fatales; ello se ve reflejado en el caso de una paciente del sexo femenino con aplasia medular secundaria al tratamiento con quimioterapia por leucemia, que falleció por perforación gástrica secundaria a aspergillosis; su evolución no fue adecuada y que publicacos por lo poco común de la complicación en este tipo de pacientes⁹⁴, como agregado (aún no teníamos el análisis de las moléculas estudiadas al momento de la publicación) presentó las concentraciones séricas más altas de los 36 sujetos estudiados de Fas-L (131.88 pg/ml), Fas (1049.52 pg/ml) y TNFR-1 (7102.11 pg/ml), así como muerte celular temprana de 93.9%. Así, la paciente cursaba con un alto porcentaje de apoptosis y concentraciones elevadas de los receptores estudiados, lo cual concuerda con la literatura donde se ha reportado que en sujetos con alto riesgo de muerte el grado de apoptosis es elevado. En su momento, el estudio de estos biomarcadores



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



desde el punto de vista pronóstico puede ser una de las líneas que pueden proponerse.

Nuestros resultados favorecen la realización de nuevos estudios, en los que se defina la eficacia diagnóstica del patrón diferencial encontrado, el potencial pronóstico y su impacto en variables como el costo-beneficio, el uso adecuado de antimicrobianos, así como la comparación de las moléculas que se asocian a apoptosis vs marcadores diagnósticos habituales, son estudios que ayudarían a la comprensión del fenómeno séptico en el niño con leucemia y su adecuado manejo.



11. Bibliografía

1. 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
2. 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
3. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, et al. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. Pediatr Crit Care Med. 2005;6(1): 2-8
4. 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. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912009000800004&lng=es
5. Faix JD Biomarkers of sepsis Crit Rev Clin Lab Sci. 2013 ; 50(1):23-36
6. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Sc, Moldawer L. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration FASEB J. 2001 15:879-892
7. De Freitas I, Fernandez SM, Essinfeld SA, Cardier J. Serum Levels of the Apoptosis-Associated Molecules, Tumor Necrosis Factor α /Tumor Necrosis



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



- Factor Type-1 Receptor and Fas/FasL, in Sepsis. *Chest* 2004; 125:2238-2246
8. 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
 9. Opal S. The Evolution of the Understanding of Sepsis, Infection, and the Host Response: A Brief History. *Critical Care Clinics* 2009; 25:63-66
 10. Bone RC, Balk R, Cerra F, Dellinger RP. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992; 101:1644-1655
 11. Williams M, Braun L, Cooper L, Johnston J, Weiss R, Qualy R, Linde W. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. *Crit Care* 2004, 8 (5): R291-8.
 12. Marshall JC, The piro (predisposition, insult, response organ dysfunction model: toward a staging system for acute illness. *Virulence* 2014;5(1):27-35
 13. 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



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



14. Paganini H, Santolaya M E. Diagnóstico y tratamiento de la neutropenia febril en niños con cáncer. Consenso de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. Rev Chilena Infectol 2011; 28 (Supl 1): 10-38.
15. 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 (35): 4427-38.
16. Santolaya M E, Rabagliati R, Bidart T, Payá E, Guzmán A, Morales R, et al. Consenso Manejo racional del paciente con cáncer, neutropenia y fiebre. Rev Chilena 2005; 22 (Supl 2): S79-S113.
17. Heron M. Deaths: Leading causes for 2008. National vital statistics reports; vol 60 no 6. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2012. Available from:
http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr60/nvsr60_04.pdf. (accedido el 29 de julio de 2014).
18. Jones D, Podolsky S, Greene J. The burden of disease and the changing task of medicine. N Engl J Med 2012; 366(25) :2333-8.
19. Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud, Base de Datos de Defunciones 2000-2008. Disponible en:
<http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/> /accedido el 29 de julio de 2014.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



20. Danai P, Moss M, Mannino D, Martin G. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* 2006; 129 (6): 1432-40.
21. Hodgins K, Moss M. The epidemiology of sepsis. *Curr Pharm Des* 2008, 14(19): 1833-9
22. Watson R S, Carcillo J A, Linde-Zwirble W T, Clermont G, Lidicker J, Angus DC. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (5): 695-701.
23. Balk R A. Severe sepsis and septic shock definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin* 2000; 16 (2): 179-92.
24. Yen C, Reyna F J, Sánchez U E, Hernández H L C, Tate J, Parashar U, et al. Monovalent rotavirus vaccine provides protection against an emerging fully heterotypic G9P(4) rotavirus strain in Mexico. *J Infect Dis* 2011; 204 (5): 783-6
25. Santolaya M, Alvarez A, Becker A, Cofré J, Enriquez N, O' Ryan M, et al. Prospective, multicenter evaluation of risk factors associated with invasive bacterial infection in children with cancer, neutropenia, and fever *J Clin Oncol* 2001; 19 (14): 3415-21.
26. Reyna-Figueroa J, Pérez Peña R D, Galindo-Delgado P, Limón-Rojas A E, Madrid-Marina V. Association between an incomplete vaccination schedule and nosocomial sepsis among children with cancer. *World J Vaccines* 2013, 3(1): 10-15



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



27. Reyna-Figueroa J, García-Beristain J C, Galindo-Delgado P, Limón-Rojas A E, Madrid-Marina V. Antibiotics use before chemotherapy: A risk factor for developing neutropenic colitis in children with leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014; August 5 (Epub ahead of print).
28. Rangel F S. Epidemiología de la sepsis bacteriana. *Enf Infec Microbiol* 1999; 19 (4): 173-80.
29. Velasco E, Byington R, Martins C, Schirmer M, Dias L, Gonçalves V. Bloodstream infection surveillance in cancer centre: a prospective look at clinical microbiology aspects. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (6): 542-9.
30. Yazıcı N, Akyüz C, Yalçın B, Varan A, Kutluk T, Büyükpamukçu M. Infectious complications and conservative treatment of totally implantable venous access devices in children with cancer. *Turk J Pediatr* 2013; 55 (2): 164-71.
31. Reyna F J, Madrid M V. Intestinal microbiota, antibiotics and neutropenic colitis. *Indian J Appl Res* 2014; 4 (2): 1-3
32. Verna E. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap Adv Gastroenterol* 2010; 3 (5): 307-19.
33. Micahil S, Sylvester F, Fuchs G, Isseman R. Clinical efficacy of probiotics: Review of the evidence with focus on children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43 (4): 550-7.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



34. Stecher B. Finding a sugary foothold: how antibiotics pave the way for enteric pathogens. *Cell Host Microbe* 2013; 14 (3): 225-7
35. Tunccan OG, Ulutan F, Karakus R. The frequency of *Clostridium difficile* toxin in neutropenic and non neutropenic patients with antibiotic associated diarrhea and analysis of the risk factors. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42 (4): 573-83.
36. Ubeda C, Palmer E. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol* 2012; 33 (9): 459-66.
37. Murphy E, Cotter P, Hogan A, O'Sullivan O, Joyce A, Fouhy F, et al. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut* 2013; 62 (2): 220-6.
38. Santolaya ME, Farfán MJ, De La Maza V, Cociña M, Santelices F, Alvarez AM, Avilés CL, et al. Diagnosis of bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with cancer: microbiologic and molecular approach *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(11):957-961
39. Guido M, Quattrocchi M, Zizza A, Pasanisi G, Pavone V, Lobreglio G, Gabutti G, De Donno A, Molecular approaches in the diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignances *J Prev Med Hyg* 2012 Jun;53(2):104-108
40. Spasova MI, Terzieva DD, Tzvetkova TZ, Stoyanova AA, Mumdzhev IN, Yanev IB, Genev ED. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, and C-



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



reactive protein in febrile neutropenia in children with malignant diseases.

Folia Med (Plovdiv) 2005;47:46-52

41. Aquino VM, Cost C, Gomez A, Bowers DC, Ramilo O, Ahmad N, Winick N, Leavey PJ. Predictive value of interleukin-5 and monocyte chemotactic protein-1 for bacteremia in children with febrile neutropenia. J Pediatr Hematol Oncol 2012 Aug;34(6):e241-e245
42. Urbonas V, Eidukaitė A, Tamulienė I. The diagnostic value of interleukin-6 and interleukin-8 for early prediction of bacteremia and sepsis in children with febrile neutropenia and cancer Pediatr Hematol Oncol 2012;34(2):122-127
43. Diepold M, Noellke P, Duffner U, Kontrny U, Berner R. Performance of Interleukin-6 and Interleukin-8 serum levels in pediatric oncology patients with neutropenia and fever for the assessment of low-risk. BMC Infect Dis 2008;6:8:28
44. Abrahamsson J, Pahlman M, Mellander L. Interleukin 6, but not tumour necrosis factor- α , is a good predictor of severe infection in febrile neutropenic and non-neutropenic children with malignancy. Acta Paediatrica 1997; 86: 1059–1064
45. Cost CR, Stegner MM, Leonard D, Leavey P IL-8 predicts pediatric oncology patients with febrile neutropenia at low risk for bacteremia. J Pediatr Hematol Oncol 2013 ;35(3):206-211



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



46. Bayram I, Erbey F, Erdem S, Tanyeli A, Brain natriuretic peptide levels in pediatric cancer patients with febrile neutropenia. *Pediatr Hematol Oncol* 2011;28(4):294-827
47. Tang Y, Liao C, Xu X, Song H, Shi S, Yang S. Th1/Th2 cytokine profiles in G+/G- bacteremia in pediatric hematology/oncology patients. *Pediatr Blood Cancer* 2012. 58(1):50-54
48. Schlapbach LJ, Aebi C, Hansen AG, Hirt A, Jensenius JC, Ammann RA. H-ficolin serum concentration and susceptibility to fever and neutropenia in paediatric cancer patients *Clin Exp Immunol* 2009;157(1):83-89
49. Chawes BL, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Tvede M Procalcitonin for early diagnosis of bacteraemia in children with cancer. *Ugeskr Laeger* 2007;169(2):138-142
50. Lin SG, Hou TY, Huang DH, He SY, Lin YD, Zhang LY, Hsieh PS. Role of procalcitonin in the diagnosis of severe infection in pediatric patients with fever and Neutropenia—a systemic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2012 ;31(10):e182-e188).
51. Kibe S, Adams K, Barlow G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J antimicrobial Chemother* 2011;66 (Suppl 2):S33-S40).
52. Martinez AM, Perez MJJ, Gallegos CS, Sanchez ZF, Del Toro AS, Troyo SR, Gonzalez RO. Procalcitonin and C-reactive protein serum levels as



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



- markers of infection in a pediatric population with febrile neutropenia and cancer. *Pediatr Hematol Oncol* 2009;26(6):414-425)
53. Bansal N, Houle A. Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *FASEB* 1991;5:211-216
54. Shomali W, Hachem R, Chaftari A, Jiang Y, Bahu R, Jabbour J, Raad S. et al Can Procalcitonin Distinguish Infectious Fever From Tumor-Related Fever in Non-Neutropenic Cancer Patients? *Cancer* 2012; 118:5823-5829.
55. Mikulska M, Viscoli C, Orasch C, Livermore DM, Averbuch D, Cordonnier C et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J infect* 2014;68(4):321-331
56. Retamar P, Lopez PMD, Natera C, de Cueto M, Nuño E, Herrero M, Fernandez SF, Muñoz A, et al. Reappraisal of the Outcome of healthcare-associated and community acquired bacteremia a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2013;13:344.
57. Rinke ML, Milstone AM, Chen AR, Mirski K, Bundy DG, Colantouni E, Pehar M, Herpst C, Miller MR. Ambulatory Pediatric oncology CLABSis: epidemiology and risk factors. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(11):1882-1889
58. Seale A, Mwaniki M, Newton C, Berkley J. Maternal and early onset neonatal bacterial sepsis: burden and strategies for prevention in Sub-Saharan Africa. *The Lancet Infectious Diseases* 2009;9(7):428-438



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



59. Paunel GA, Kirichevska T, Logters TWindolf J, Flohe S. Molecular Mechanisms Underlying Delayed Apoptosis in Neutrophils from Multiple Trauma Patients with and without Sepsis. *Mol Me* 2012; 18:325-335
60. Paunel GA, Flohe S, Scholz M, Windolf J, Logters T. Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis. *Critical Care* 2011;15(R20): Available in <http://ccforum.com/content/15/1/R20>
61. Waring P, Mullbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in Pathology. *Immunology and Cell Biology*. 1999; 77:312-317
62. Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcripcional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death and Differentiation*. 2003; 10:36-44
63. Vick J. First Demonstration of the Role of TNF in the Pathogenesis of Disease. *J Immunol* 2008; 181:5-6
64. Spooner CE, Markowitz NP, Saravolatz LD. The role of tumor necrosis factor in sepsis *Clin Immunol Immunopathol*. 1992; 62: S11-S17
65. Secher T, Vasseur V, Poisson DM, Mitchell J, Cunha F, Alves FJC, Ryffel B. Crucial Role of TNF Receptors 1 and 2 in the control of Polymicrobial Sepsis. *J Immunol* 2009; 182:7855-7864.
66. Lin E, Calvano E, Lowry SF. Tumor Necrosis Factor Receptors in Systemic Inflammation En: *Immune Response in the Critically ILL*. Marshall JC, Cohen J Edit. Firsdt Edition 2002; pp- 365-380



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



67. Miñambres E, López M. Apoptosis: implicaciones en Medicina Intensiva
Med Intensiva 2004; 28(6):319-28
68. Volm M, Sauerbery A, Koomagi R. Expression of Fas ligand in newly
diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. Anticancer Res 1999;
19:3399-3402
69. Nosair N, Abd El Bar E, Taha A, Gaway A. Fas (CD95) expression as a
prognostic marker in acute leukemia and blastic transformation phase in
chronic myeloid leukemia. (Egyptin Journal of Haematology 2014; 39:25-31)
70. Zou P, Liu Z, Xiao J The effect of the Fas/FasL pathway during
chemotherapeutic drug-induced apoptosis of leukaemic cells. J Tongji Med
Univ. 2001;21(3):212-4
71. McGahon AJ1, Costa Pereira AP, Daly L, Cotter TG. Chemotherapeutic
drug-induced apoptosis in human leukaemic cells is independent of the Fas
(APO-1/CD95) receptor/ligand system. Br J Haematol. 1998 Jun;
101(3):539-47
72. Kullmann M, Schneikert J, Moll J, Heck S, Zeiner M, Gehring U, Cato AC.
RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and
hormone-induced apoptosis. J Biol Chem 1998; 273:14620-14625
73. Schmidt S, Rainer J, Riml S, Ploner C, Jesacher S, Archmüller C et al.
Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute
lymphoblastic leukemia. Blood.2006; 107:2061-2069



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



74. Mazur B, Mertas A, Szczepański T, Janik A. Concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in children with acute lymphoblastic leukemia after cessation of chemotherapy . Hematological Oncology 2004; 22 (1) 27–34
75. Reyna FJ, Lagunas MA, Martínez MP, Madrid MV. Procalcitonin as a diagnostic biomarker of sepsis in children with cancer, fever and neutropenia: literature review. Arch Argent Pediatr. 2015;113(1):46-52
76. 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
77. Schuler D, Szende B. Apoptosis and acute lymphocytic leukemia in children. Ann N Y Acad Sci 1997; 824; 28-37
78. 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
79. Doughy L, Clark R, Carcillo J. Soluble Fas Receptor and Fas Ligand in sepsis- Induced Multiple Organ Failure. Pediatric Research 1998; 43:35)
80. Munker R, Midis G, Owen SL, Andreff M. Soluble Fas (CD95) is not elevated in the serum of patients with myeloid leukemias, myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. Leukemia 1996; 10(9):151-153



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



81. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare C, Moldawer I. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration FASEB J April 2001 15:879-892
82. Rastogi RP, Sinha R, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. EXCLI J. 2009;8:155-181
83. Wesche D, Lomas J, Perl M, Chung C, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. J. Leukoc. Biol. 2005;78: 325–337
84. Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Matsubara H, Takabe K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. World J Gastrointest Oncol. 2015 Apr 15;7(4):17-29
85. Coffelt SB, de Visser KE. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. Trends Immunol. 2015;36(4):198-216
86. 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
87. Nosair N, Abd El Bar E, Taha A, Gawaly A. Fas (CD95) expression as a prognostic marker in acute leukemia and blastic transformation phase in chronic myeloid leukemia. Egyptian Journal of Hematology 2014; 39:25-31
88. Vilcek J, First demonstration of the role of TNF in the Pathogenesis of Disease J immunol 2008;181:5-6



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



89. Papathanassoglou ED, Mpouzika MD, Giannakopoulou M, Bozas E, Middleton N, Boti S, Karabinis A. Pilot Investigation of the Association Between Serum Stress Neuropeptide Levels and Lymphocyte Expression of Fas and Fas Ligand in Critical Illness. *Biol Res Nurs*. 2014 [Epub ahead of print]
90. Spooner CE, Markowitz NP, Saravolatz LD. The role of tumor necrosis factor in sepsis *Clin Immunol Immunopathol*. 1992; 62: S11-S17
91. Vick J. First Demonstration of the Role of TNF in the Pathogenesis of Disease. *J Immunol* 2008; 181:5-6
92. Van Vliet MW, Hermie JM, Harmsen H. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*. 2010;6(5): e1000879
93. Lin CW, Lo S, Hsu C, Hsieh CH, Chang YF, Hou BS, Kao YH, Lin CC, Yu ML, Yuan SS, Hsieh YC. T-cell autophagy deficiency increases mortality and suppresses immune responses after sepsis. *PLoS One*. 2014; 16;9(7):e102066
94. Reyna FJ, Luna AFJ, Cardoso YG, Rivera SMI, Limón RAE, Galindo DP. Gastric wall perforation secondary to presumed aspergillosis in a pediatric patient with aplastic anemia: A case report. *J Infect Dev Ctries* 2015;9(4):431-434.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



12. Cuadros y Gráficas.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

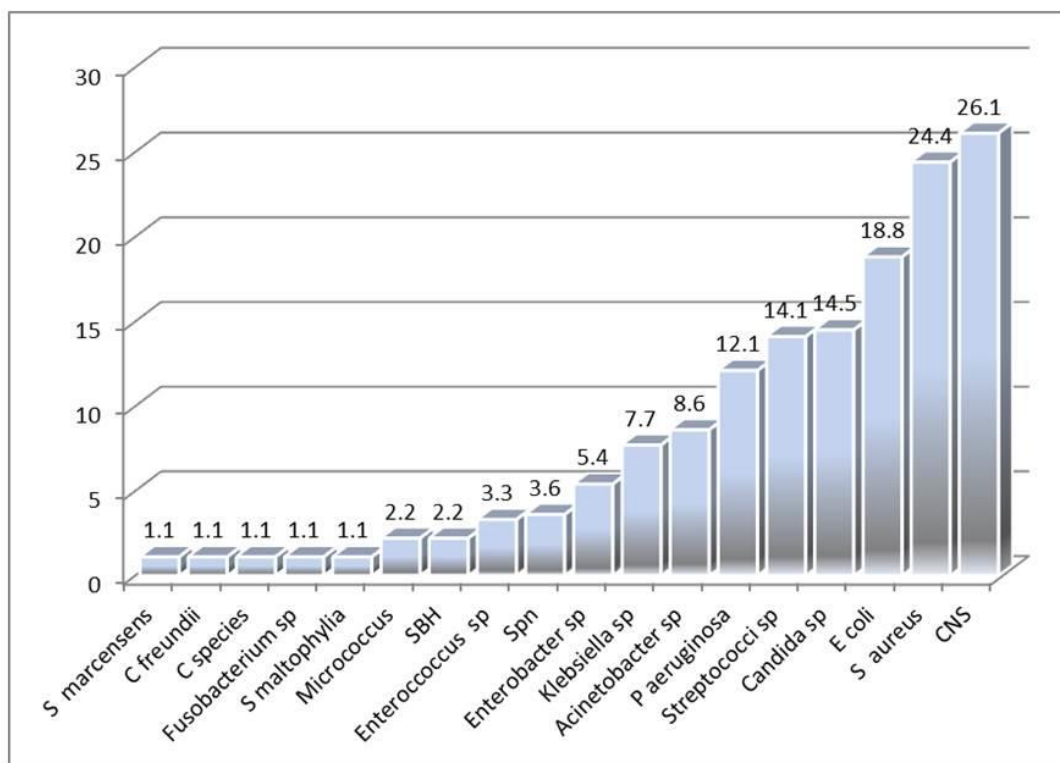


Figura 1. Porcentaje de Microorganismos aislados en sangre de niños con neutropenia y fiebre años 2000 a 2012

S. marcescens = *Serratia marcescens*, **C**= *Citrobacter*, **S. maltophilia**= *Strenotrophomonas maltophilia*, **SBH**= *Streptococcus beta hemolítico*, **Spn**= *Streptococcus pneumoniae*, **P**= *Pseudomonas*, **E. coli**= *Escherichia coli*, **Sp**= Especies, **S. aureus**= *Staphylococcus aureus*, **CNS**= *Staphylococcus coagulasa negativa* (Adaptada de Referencias 13 y14)



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

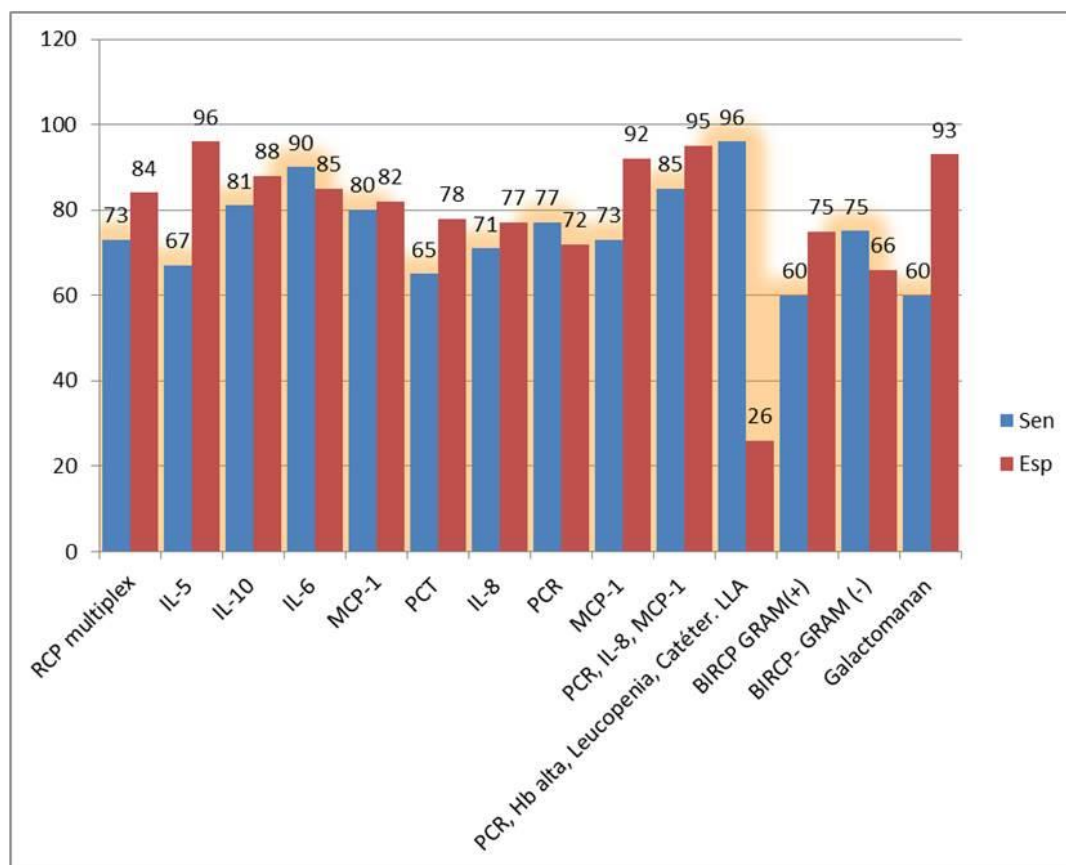


Figura 2. Eficacia de los Biomarcadores reportados en la literatura médica para discriminar sepsis o bacteremia en niños con Neutropenia y fiebre por Cáncer

Sen= Sensibilidad, **Esp**= Especificidad, **RVP**= Razón de verosimilitud positiva, **RVN**= Razón de Verosimilitud negativa, **PCR multiplex** (Reacción en cadena de la polimerasa), **IL** (Interleucina), **MCP-1** (Proteína quimiotáctica de monocitos), **PCT** (procalcitonina), **PCR** (Proteína C Reactiva), **Hb** (Hemoglobina), **LLA** (Leucemia linfoblástica aguda), **BIRCP**=Perfil de citocinas relacionado a infección bacteriana.

Datos obtenidos de la búsqueda de artículos publicados en la base Pubmed, utilizando las palabras clave "biomarker, sepsis, neutropenic fever, children, bacteremia" La sensibilidad y especificidad de marcadores con más de dos referencias se muestran como promedio de los valores encontrados en ellos. La mejor sensibilidad es encontrada con la cuantificación de IL-6, seguida por IL-10. Mientras que la mejor especificad se encuentra al cuantificar IL-5, y con la combinación de PCR, IL-8 y MCP-1.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

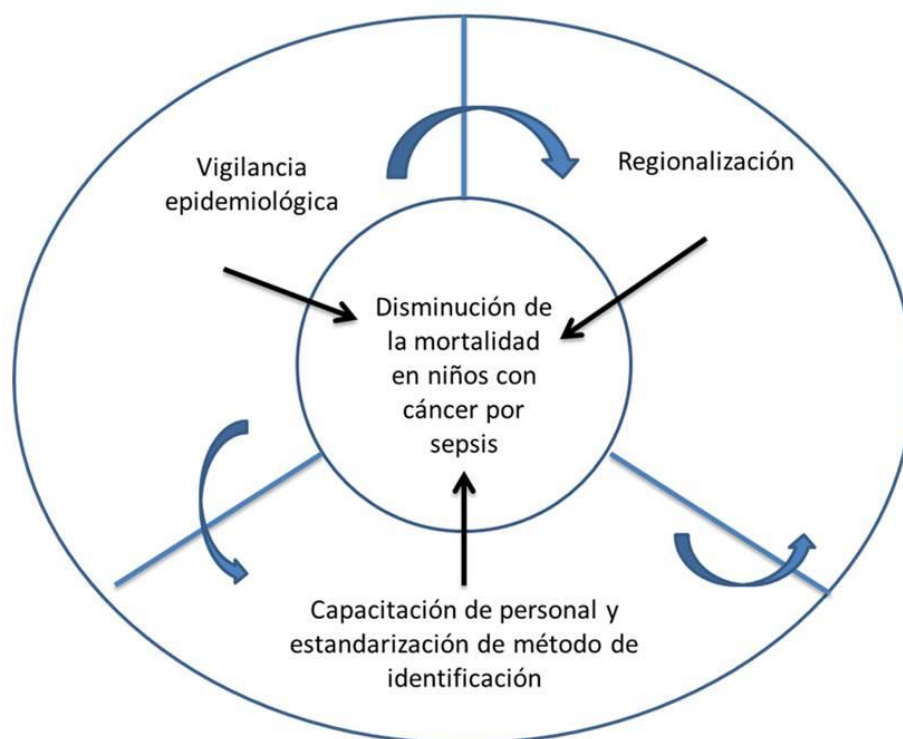


Figura 3. La disminución de la mortalidad en el sujeto con cáncer complicado con sepsis, requiere de una serie de políticas basadas en procesos que busquen aclarar muchas de las dudas que los médicos de las diferentes instituciones y de los diferentes niveles de atención tienen para una mejora en la atención y que puede basarse en los siguientes puntos: **1)** Actualizar la epidemiología institucional. Considerando microorganismos reemergentes. **2)** Validar criterios diagnósticos clinimétricos y de biomarcadores. **3)** Investigar resistencia antimicrobiana y adaptar esquemas de manejo. **4)** Validar modelos de seguimiento con reactantes de fase aguda. **5)** Uso de biología molecular para el diagnóstico de sepsis como apoyo al cultivo. **6)** Formar grupos de investigación que impulsen la calidad de la investigación generada. **7)** Facilitar herramientas metodológicas y técnicas que permitan disminuir desventajas entre instituciones y centros de atención médica, mediante la creación de centros de diagnóstico que atiendan una región y no solo una institución. **8)** Fomentar la integración de grupos de trabajo, con el compromiso de difundir el conocimiento generado. **9)** Evaluar periódicamente el impacto de las estrategias, modificando de acuerdo a resultados.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Cuadro 1 Características generales de los sujetos incluidos por grupo de estudio					
Variable	Grupo1 (n=9)	Grupo 2 (n=7)	Grupo 3 (n=11)	Grupo 4 (n=9)	Grupo 5 (n=6)
Edad (media+ DE)	8.6+2.2	11.1+ 3	9.0+ 6	10.2+ 3.5	5.4+ 4
Sexo					
Masculino	4(44.4%)	4(57.1%)	4 (27.2%)	5(55.5%)	3 (50%)
Femenino	5(55.5%)	3(42.8%)	7 (63.3%)	4(44.4%)	3 (50%)
Peso	41.3	50.7	31.4	45.6	10.2
Talla	140	146	124	127	75
IMC	20.3	21.8	17.2	22.7	15.6
Número de órganos afectados					
2	4(44.4%)	3(42.8%)	2(18.18%)	0(0%)	2(3.3%)
3	2(22.2%)	2(28.5%)	3(27.2%)	4(44.4%)	4(66.6%)
>3	3(33.3%)	2(28.5%)	6(54.5%)	5(55.5%)	0(0%)
Órgano afectado					
Hígado (31)	2(22.9%)	3(42.8%)	11(100%)	9(100%)	6(100%)
Riñón (14)	2(22.9%)	0(0%)	5(45.4%)	6(66.6%)	1(16.6%)
Pulmón (11)	2(22.9%)	1(14.2%)	1(9.09%)	4(44.4%)	3(50%)
SNC (5)	0(0%)	0(0%)	5(45.4%)	0(0%)	0(0%)
Digestivo (30)	2(22.2%)	7(100%)	6 (54.5%)	9(100%)	4(66.6%)
Hematológico(42)	9(100%)	7(100%)	11(100%)	9(100%)	6(100%)
Cardiovascular(9)	0(0%)	0(0%)	1(9.09%)	5(55.5%)	3(50%)
Microrganismos aislados	0	0	0	9	6
Hemocultivo	0	0	0	3	6
Septifast	0	0	0	6	0
<i>P aeruginosa</i>	0	0	0	0	0
<i>K oxytoca</i>	0	0	0	1	0
SCN	0	0	0	0	1
<i>Enterococcus sp</i>	0	0	0	1	1
<i>Aspergillus sp</i>	0	0	0	1	0
<i>E coli</i>	0	0	0	1	1
<i>S aureus</i>	0	0	0	1	1
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	0	1	1
<i>S pneumoniae</i>	0	0	0	0	1
<i>Candida krusei</i>	0	0	0	3	0
TNF-alfa	22.3 (1.72)	23.2(4.0)	21.5 (5.2)	35.2(7.6)	25.0(3.6)
TNFR1	1987 (687.1)	2737(1468.3)	3120(1682)	4102(2440)	3623(1366)
FasL	91.6(71.4)	125(24.3)	160 (126)	19.4(7.3)	236(112)
Fas	1082.8(23.4)	1063(27.5)	1068(15.8)	1059(18.5)	1065(30.9)
Días de estancia	31	32	10	40	18
Muertes	0	0	2	1	0

DE= Desviación estándar, IMC= Índice de masa corporal, SNC=Sistema nervioso central, SCN= Staphylococcus Coagulasa Negativa,



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

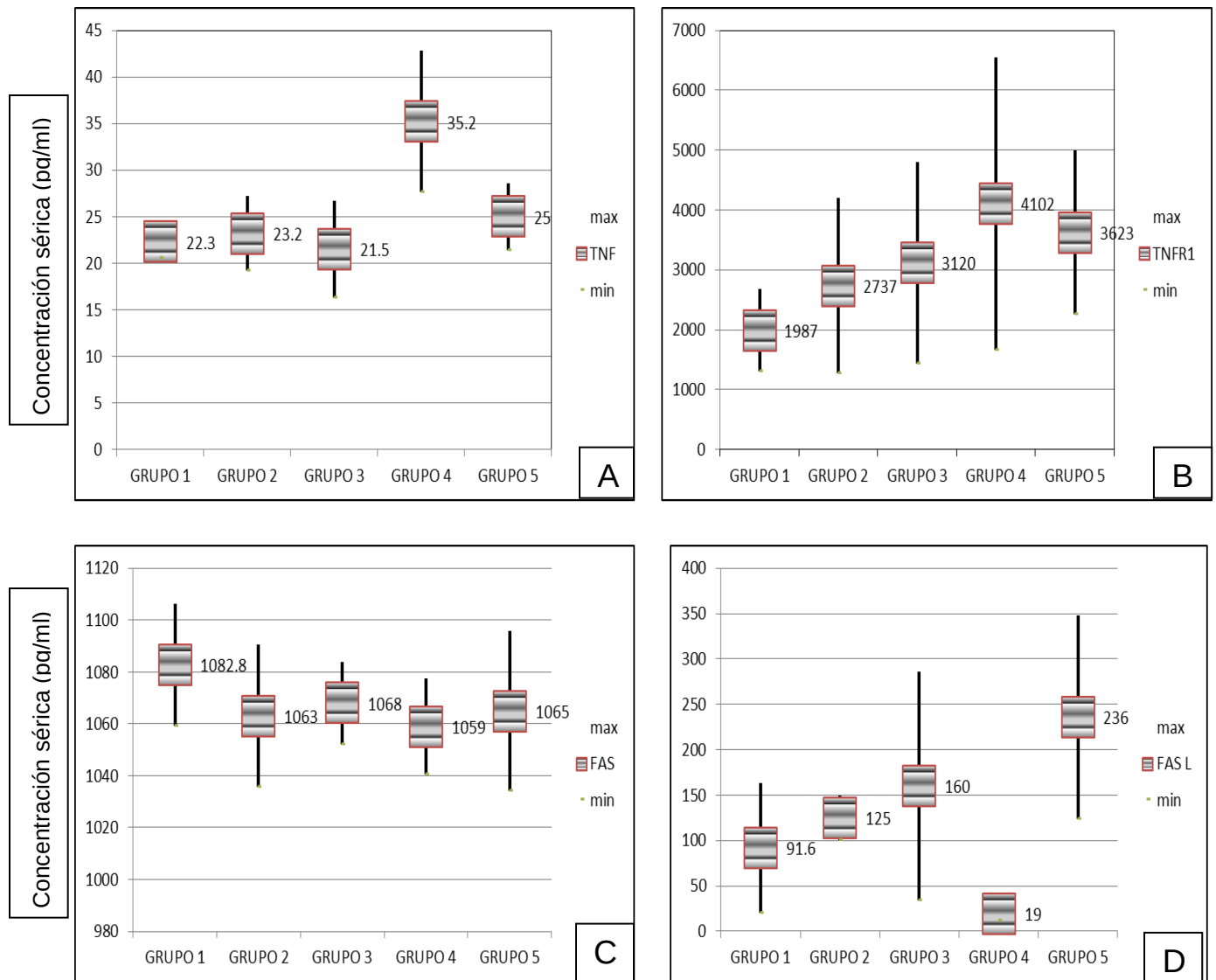


Figura 4. Comparativo en las concentraciones séricas de TNF, TNFR1, Fas y FasL en los diferentes grupos de estudio Grupo 1= Diagnóstico reciente de leucemia, Grupo 2= Cinco días después del inicio de esteroide (quimioterapia), Grupo 3= Neutropenia y fiebre sin corroboración de infección, Grupo 4= Neutropenia y fiebre con sepsis corroborada, Grupo 5= Control séptico. las concentraciones séricas de TNF (A) y TNFR-1 (B) son mayores en el grupo 4, pero solo TNF muestra diferencia significativa ($p < 0.05$). Mientras que las concentraciones séricas de Fas (C) son similares entre grupos ($p > 0.05$), y FasL (D), muestra concentraciones bajas en el grupo 4 ($p < 0.05$).



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

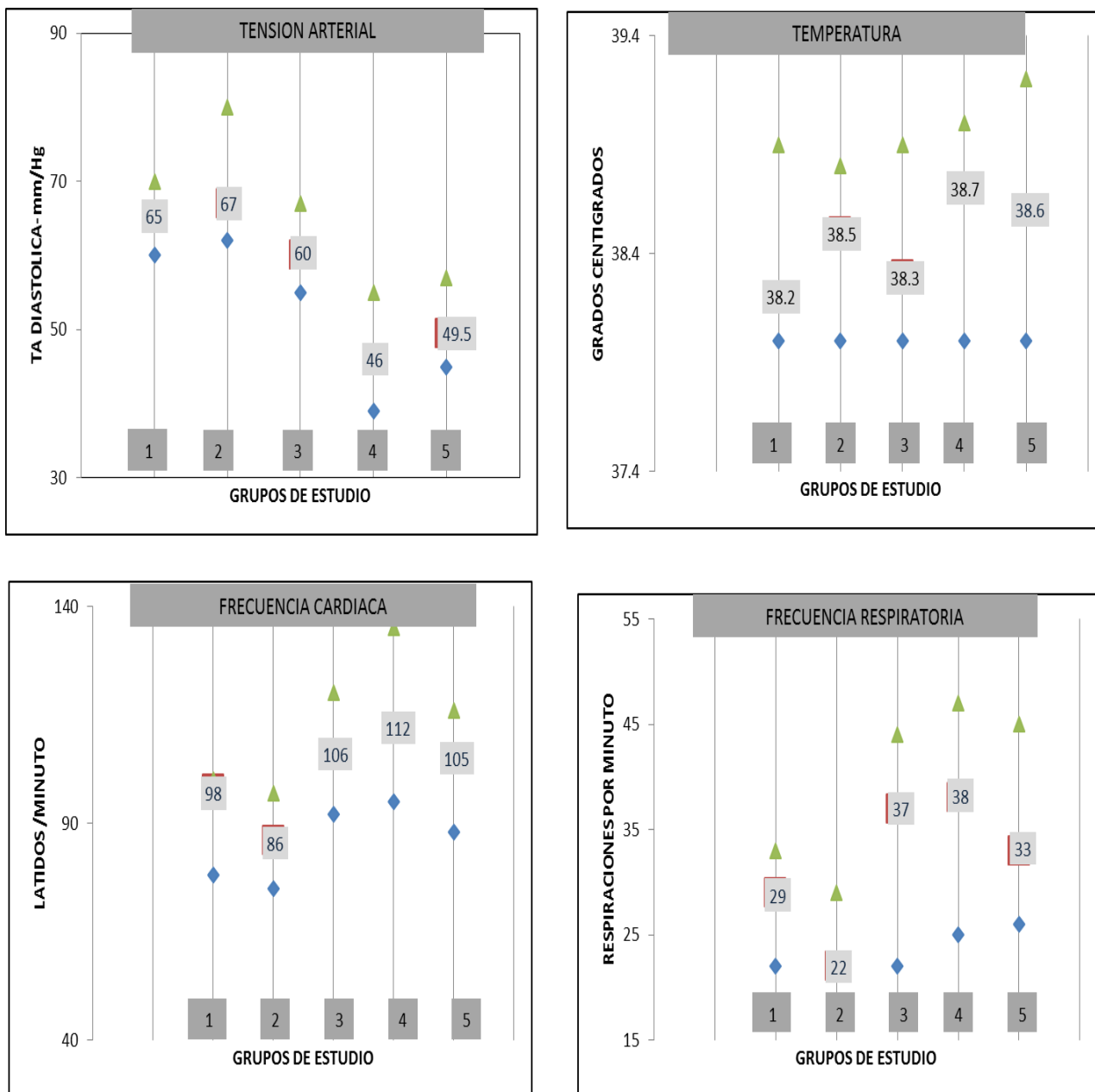


Figura 5. Comparativo de los signos vitales entre grupos de estudio. Se observa que las cifras de tensión arterial diastólica son más bajas en el grupo 4 ($p < 0.05$) y similares en el grupo 5 ($p > 0.05$). No hubo diferencia en las cifras de fiebre ($p > 0.05$). La frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca son mayores en el grupo 4, pero solo hay diferencia en la frecuencia cardíaca ($p < 0.05$).



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

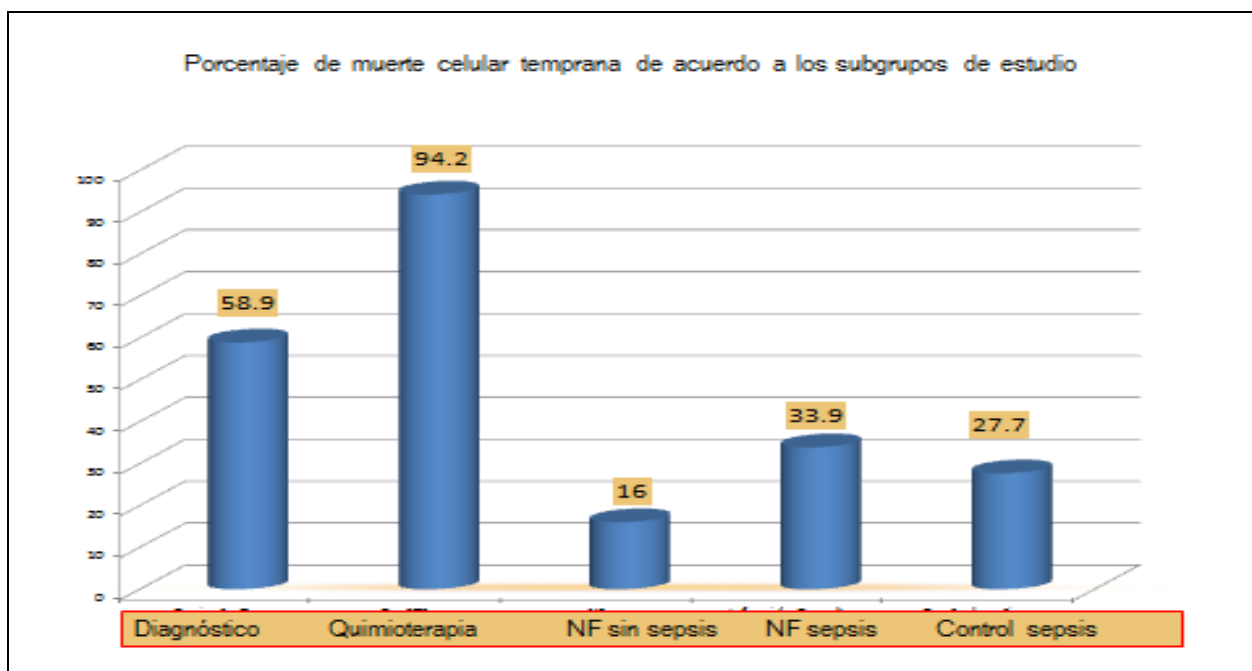
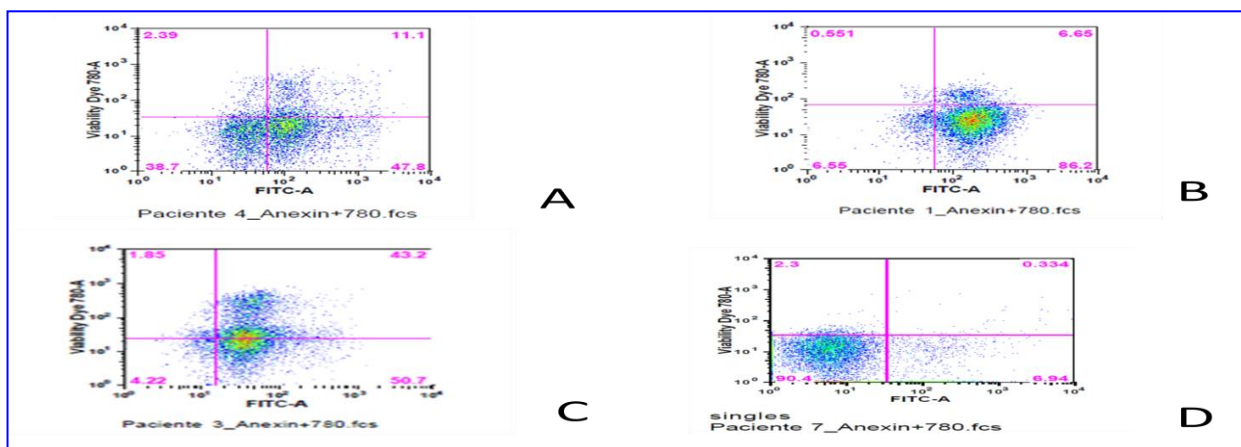


Figura 6. Porcentaje de muerte celular temprana en células mononucleares de niños con leucemia, neutropenia y fiebre de acuerdo a los grupos de estudio. Se observa que el grupo 2, presenta los porcentajes de apoptosis mayores (estudiada con anexina V); Las cifras de apoptosis son similares entre los 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.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA



13. Anexos.