

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE
CUANTIFICACIÓN DE CÍRCULOS DE ESCISIÓN DEL
RECEPTOR DE LINFOCITOS T POR PCR EN TIEMPO REAL.**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA

DRA. SELMA CECILIA SCHEFFLER MENDOZA

TUTORA

DRA. SARA ELVA ESPINOSA PADILLA

COTUTORES

DRA. EDITH GONZALEZ SERRANO

Q.F.B. EDGAR ALEJANDRO MEDINA TORRES



México, Distrito Federal 2013

INP
CENTRO DE INFORMACIÓN
Y DOCUMENTACIÓN

CID
NO CIRCULA

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE
CUANTIFICACIÓN DE CÍRCULOS DE
ESCISIÓN DEL RECEPTOR DE
LINFOCITOS T POR PCR EN TIEMPO
REAL .**

RESIDENTE: SELMA CECILIA SCHEFFLER MENDOZA

TUTORA

DRA. SARA ELVA ESPINOSA PADILLA

COTUTORES

DRA. EDITH GONZÁLEZ SERRANO

Q.F.B. EDGAR ALEJANDRO MEDINA TORRES

TITULO DE LA TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN
DE CÍRCULOS DE ESCISIÓN DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T
POR PCR EN TIEMPO REAL.**

[Signature]
DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA

**DIRECTOR GENERAL INP
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA**

[Signature]
DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS

DIRECTORA DE ENSEÑANZA

[Signature]
DR. LUIS MARTÍN GARRIDO GARCÍA

JEFE DE DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO

[Signature]
DRA. SARA ELVA ESPINOSA PADILLA

TUTOR DE TESIS

[Signature]
DRA. EDITH GONZALEZ SERRANO

CO-TUTOR DE TESIS

[Signature]
DR. EDGAR MEDINA TORRES

CO-TUTOR DE TESIS.



AGRADECIMIENTOS

A mi mamá que con su inmenso amor incondicional, fuerza y ejemplo me han hecho ser cada día mejor.

A mi papá por acompañarme, ayudarme y por su apoyo incondicional.

A mi hermano por su ayuda, enseñanzas y cariño.

A cada uno de mis maestros que me han inspirado. Me han enseñado a lo largo de este tiempo como llegar a ser Pediatra y como ser mejor persona día a día.

A la Dra Sara por su ejemplo, paciencia y confianza.

A la Dra Edith y Edgar por su gran ayuda y paciencia.

Al Instituto Nacional de Pediatría por darme la oportunidad y confianza para formar parte de él.

Gracias a los niños, nuestros pequeños pacientes que cada día me demuestran su magia, energía y que me enseñan el porque he llegado hasta aquí y el porque debo seguir con mis sueños...

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE CÍRCULOS DE ESCISIÓN DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T POR PCR EN TIEMPO REAL .

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias combinadas severas (de sus siglas en inglés *Severe Combined Immunodeficiency*, SCID) son enfermedades en las cuales hay defectos tanto en la inmunidad humoral como en la celular, los pacientes que la padecen son susceptibles a infecciones causadas por toda clase de microorganismos. La demora en el diagnóstico y en el tratamiento adecuado de la SCID puede provocar la muerte a edades tempranas así como generar costos elevados debido a estancias hospitalarias prolongadas e ingresos a la unidad de cuidados intensivos. El contar con un método diagnóstico que detecte a los pacientes con SCID en el periodo pre sintomático, es de gran valor para iniciar un tratamiento oportuno y adecuado.

El tamiz neonatal es el método que se ha empleado para realizar diagnóstico de enfermedades en el periodo neonatal y su implementación como parte del diagnóstico de SCID se ha empezado a utilizar .

La maduración de los linfocitos T en el timo se caracteriza por el rearreglo de los genes del receptor de linfocito T, durante este proceso se generan pequeñas piezas de DNA episomales los cuales son conocidos como "TREC's" (de sus siglas en inglés *T-cell receptor excision circles*, TREC's).

Los pacientes con SCID, presentan una producción disminuída o prácticamente ausente de linfocitos, tienen un número muy bajo (< 30) o indetectable de TREC's; a diferencia de los recién nacidos sanos, por lo que la cuantificación de estos elementos se ha empleado dentro del tamiz neonatal para detección de SCID.

OBJETIVO

Estandarizar el método de cuantificación de círculos de escisión del receptor de linfocito T (TREC's) por PCR en tiempo real para diagnóstico de inmunodeficiencia combinada severa.

METODOLOGÍA

Se realizará la estandarización de un método de cuantificación de TREC's por la técnica de PCR en tiempo real, en muestras de recién nacidos sanos y pacientes con diagnóstico clínico de SCID para realizar curva de TREC's y β -actina.

RESULTADOS

Se definieron las condiciones adecuadas y la composición de la mezcla para amplificar las secuencias de TREC's y β -actina. Posteriormente se purificaron los amplicones de cada gen para clonar cada producto en un plásmido así como la determinación de las condiciones de almacenamiento y estabilidad. Finalmente en la muestra de un recién nacido sano, un paciente con diagnóstico de SCID y un adulto sano se determinaron el número de copias de TREC's en muestras de DNA, encontrando que la muestra del paciente con SCID fue la última en amplificar.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método de cuantificación de TREC's confiable y reproducible, pero es necesario continuar con el estudio del mismo, así como su validación y correlación clínica con los resultados.

ÍNDICE

ANTECEDENTES	
Sistema Inmunológico.	7
Respuesta inmune innata.	7
Respuesta inmune adaptativa.	8
Ontogenia del linfocito T .	9
Inmunodeficiencias primarias.	12
Clasificación.	13
Epidemiología de inmunodeficiencias primarias	13
Inmunodeficiencia combinada severa.	14
Clasificación	14
Epidemiología inmunodeficiencia combinada severa	17
Etiología.	17
Fisiopatología.	17
Cuadro clínico.	18
Diagnóstico.	22
Cuantificación de TREC's por PCR tiempo real.	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
HIPÓTESIS	27
METODOLOGÍA	27
Clasificación de la Investigación	27
Material y métodos	27
Criterios de Selección de los pacientes	28
Definición operacional de las variables	28
Consideraciones éticas	29
Metodología	30
RESULTADOS	37
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	47

ANTECEDENTES

SISTEMA INMUNOLÓGICO

El sistema inmunológico es un sistema complejo y especializado de células y órganos que tiene importantes funciones en el organismo, ayuda a proteger contra microorganismos patógenos y / o toxinas externas, así como amenazas internas como el cáncer, además tiene mecanismos para poder discriminar entre lo propio y lo extraño.

Existen varias líneas de defensa contra las patógenos; pueden ser anatómicas, mecánicas, barreras físicas y químicas. Si los microorganismos patógenos pasan estas barreras, el sistema reticuloendotelial funciona como filtro y neutraliza la invasión por vía hematógena. Los fagocitos, linfocitos y sus productos humorales constituyen una red altamente especializada y coordinada para la selección, reconocimiento y eliminación de estos microorganismos(1)

La respuesta del sistema inmunológico clásicamente se ha dividido para su estudio en tres niveles: 1) barreras anatómicas y fisiológicas, 2) respuesta inmune innata y 3) respuesta inmune adaptativa.(2)

Las barreras anatómicas y fisiológicas representan la primera línea de defensa contra los patógenos, y se incluyen la piel intacta, el mecanismo de aclaramiento mucociliar, pH ácido a nivel gástrico, lisozimas bacteriolíticas a nivel de lágrimas, saliva y otras secreciones. (2)

RESPUESTA INMUNE INNATA

El *sistema inmune innato* se considera como la primera línea de defensa contra infecciones y se conoce como el mecanismo más antiguo de protección contra patógenos, siendo la respuesta inicial a los mismos, lo cual previene, controla o elimina la infección en el huésped, además estimula la respuesta adaptativa para hacerla óptimamente efectiva.

Se puede dividir para su estudio en una respuesta innata humoral y celular. Dentro de la respuesta humoral podemos encontrar moléculas importantes como proteínas del complemento, proteínas de unión a lipopolisacáridos, colectinas, properdinas, citocinas, péptidos antimicrobianos, lisozimas, lectina asociada a manosa, lactoferrina, y reactantes de fase aguda. Tiene mecanismos de reconocimiento de patógenos invasores, que son identificados mediante patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMPs) y su interacción con receptores tipo Toll. Además puede detectar señales de peligro mediante patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Otro mecanismo importante en el sistema inmune innato es la fagocitosis siendo la función principal el reconocimiento y destrucción de patógenos. (2)

En la respuesta innata celular encontramos células hematopoyéticas como los neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, macrófagos, eosinófilos, células natural killer y células T natural killer, además de las células de epiteliales a nivel del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario.(2)

Todos estos mecanismos descritos constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato, tienen una gran interdependencia con mecanismos del sistema inmune adaptativo para así establecer una función óptima y eficaz.

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

La inmunidad adaptativa es una respuesta altamente específica que se desencadena a un patógeno en particular y provee de protección de larga duración, puede eliminar o destruir a patógenos invasores y a las toxinas que producen. Este tipo de respuesta se presenta únicamente en vertebrados y esta especializada para el desarrollo de una respuesta inflamatoria basada en el reconocimiento de macromoléculas extrañas específicas que son predominantemente proteínas, péptidos y carbohidratos. (3)

La respuesta inmune adaptativa tiene varias características: es *específica*, debido a que va dirigida directamente a una molécula antigénica. Tiene *memoria*, ya que existe un reconocimiento y un incremento en la intensidad de la respuesta ante los siguientes contactos con el mismo antígeno. Es *diversa*, ya que hay una heterogeneidad en cuanto a las diferentes especificidades de los linfocitos por la

variedad de sitios de unión de antígenos a los receptores linfocíticos.(4)

Las principales elementos efectores de este tipo de respuesta son los linfocitos B, linfocitos T y los anticuerpos (3). El sistema inmune adaptativo cuenta con una gran cantidad y diversidad de receptores para reconocer virtualmente cualquier antígeno. El cual se basa en un sistema clonal; las célula B y T expresan un propio receptor, el cual es único; dicho receptor se genera como resultado del proceso de maduración de cada clona de B y T. (2)

La respuesta inmune adaptativa se puede desarrollar por dos mecanismos fundamentales las respuesta inmune humoral mediante los anticuerpos producidos por los linfocitos B y la respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T principalmente.

Los Linfocitos representan la principal célula en la respuesta inmune específica y son aproximadamente el 25% de los leucocitos en sangre periférica. Existe tres tipos de linfocitos circulantes; T, B, y células NK y representan el 80, 10 y 10% del total de linfocitos respectivamente. En el timo la mayoría de los linfocitos son células T (90%) en bazo y ganglios linfáticos representan entre el 30 y 40% de células, donde predominan las células B. (3)

ONTOGENIA DEL LINFOCITO T

Los Linfocitos T se originan en médula ósea a partir de una célula madre linfoide pluripotencial que da lugar a células T progenitoras CD7+. En las etapas tempranas de embriogénesis el desarrollo de células T ocurre en el hígado fetal, luego en médula ósea y luego los precursores de células T migran al timo. En el timo hay una diferenciación de las Células CD7+ a una población de precursores de linfocitos T que son CD34+, CD3-, CD4- y CD8- comúnmente llamadas dobles negativas (DN)(3).

Asociada a esta migración, en el timo se seleccionan a los linfocitos T (LT) que van a salir a periferia. En el timo los LT sufren un rearrreglo de su receptor de antígeno específico (TCR) y expresan CD3 y TCR en la superficie. (3)

La forma predominante de TCR en el 95% de las células T circulantes presenta las cadenas α y β ($\alpha\beta$ TCR+). Algunas células CD3+ no expresan CD4 o CD8

y son llamadas doble negativas, se caracterizan por tener un TCR alterno compuesto de cadenas γ y δ ($\gamma\delta$ TCR+). El proceso de diferenciación que ocurre en el timo va desde células CD3+ que expresan CD4+ y CD8+, llamadas doble positivas hasta células que expresan CD4+ o CD8+ pero no ambos, y finalmente pueden circular en sangre periférica con una relación de 2:1 (CD4:CD8) y llegar a ganglios linfáticos, bazo, y tejidos linfoides secundarios. (3)

La diferenciación que ocurre en el timo es un proceso estrictamente regulado, dependiente de citocinas y de la interacción célula a célula entre el estroma de timo y precursor de LT. (3)

Receptor de linfocito T (TCR)

Pertenece a la súper familia de las inmunoglobulinas, reconoce a fragmentos de antígeno superficiales o internos que han sido procesados por células presentadoras de antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I o II. El TCR tiene asociado un complejo de transducción unido no covalentemente, que es el CD3, las mutaciones a este nivel conducen a la muerte celular que condiciona clínicamente un tipo de inmunodeficiencia combinada severa. (3)

El TCR consiste en un heterodímero formado por cadenas $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$, cada componente de la cadena contiene dos o más dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, cada una consiste en 2 estructuras β plegadas con un puente bisulfuro entre las dos con residuos de cisteína. (3)

En los linfocitos T, el gen que codifica el TCR está compuesto de un gran número de segmentos alternantes llamados regiones, cada segmento codifica para la región ; variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) del TCR.

El proceso de recombinación de los distintos segmentos que integran al TCR ocurre al azar y bajo estricta regulación, este proceso es el responsable de que se genere una gran diversidad de receptores de T que pueden reconocer virtualmente cualquier antígeno. (Fig 1)

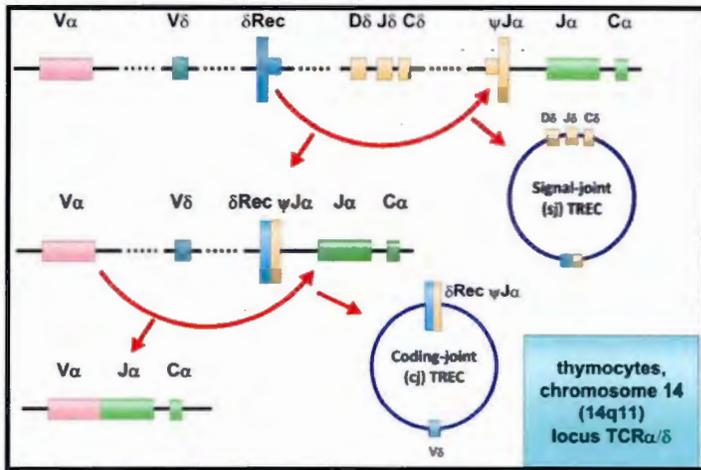


Fig 1. Círculos de escisión del receptor del linfocito T(5)

Por ejemplo en el gen TCR alfa se une un segmento de $V\alpha$, este se une al segmento $J\alpha$ y $C\alpha$ mediante el corte y unión de ADN por una serie de enzimas que producen corte en el ADN de doble cadena en sitios específicos y luego llevar a cabo la transformación y reparación. Los progenitores de células T en los que se produce un locus reordenado se generan estructuras de ADN que son eliminadas de la secuencia que se va a expresar y quedan como elementos génicos tipo episomal, los cuales no son destinados para incorporarse al locus de TCR, no son susceptibles de los mecanismos de replicación y expresión génica de la célula, por lo que se quedan como elementos únicos que evidencian el proceso de maduración de un linfocitos T.

Por la forma en que se generan estos elementos se denominan TREC's, que significa círculos de escisión del receptor del linfocito T; cabe mencionar que estos elementos son estables y se mantienen después de la división celular, no se pueden replicar por lo que se diluyen conforme la célula T prolifera a través de la división mitótica.

La cuantificación estos elementos por reacción de PCR tiempo real puede emplearse como indicador de que nuevas células T emigrantes se han producido.

(6)

INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.

El término de inmunodeficiencias se ha utilizado para describir la ausencia o mala función de algún componente del sistema inmunológico. Las inmunodeficiencias se clasifican en dos tipos: *primarias* las cuales son hereditarias se deben a mutaciones genéticas específicas o *secundarias*, las cuales pueden ser causadas por factores externos, como infecciones, quimioterapia, desnutrición, etc. (1).

Las *inmunodeficiencias primarias* (IDP's), son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que afectan uno o más componentes del sistema inmunológico alterando su desarrollo, función o ambos (7). Las IDP's no son tan raras como antes se creía, existe una incidencia más alta entre poblaciones con alta tasa de consanguinidad o entre poblaciones muy pequeñas. Estas enfermedades tienen un amplio espectro de manifestaciones clínicas y de hallazgos de laboratorio, existe una susceptibilidad aumentada a infecciones y predisposición a enfermedades autoinmunes y a malignidad (1).

Actualmente se han identificado más de 150 genes, involucrados en más de 200 formas diferentes de IDP's (8), las cuales cursan con un incremento en la susceptibilidad a infecciones y se presentan principalmente en la infancia, algunas de ellas son relativamente comunes y otras son raras(1).

Las inmunodeficiencias se clasifican de acuerdo al componente del sistema inmune que se encuentra afectado.

La Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (UIS de sus siglas en inglés) cada dos años hace una revisión de todos los defectos genéticos identificados hasta la fecha que originan una IDP; en la última revisión, realizada en 2011 (9) clasificaron 8 grandes grupos:

CLASIFICACIÓN DE LA UNIÓN INTERNACIONAL DE SOCIEDADES DE INMUNOLOGÍA 2011

1. Inmunodeficiencia combinada de células T y B
2. Deficiencia predominantemente de Anticuerpos
3. Síndromes bien definidos de inmunodeficiencia
4. Enfermedades con disregulación inmune
5. Defectos congénitos de los fagocitos en número, función o ambos
6. Defectos de la inmunidad innata
7. Enfermedades autoinflamatorias
8. Defectos del complemento

Nuestro conocimientos sobre las IDP's es cada vez mayor, lo que ha facilitado el diagnóstico de muchas IDP's y la eficacia en el manejo de las mismas (1).

EPIDEMIOLOGÍA DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Aproximadamente 1 en 10,000 individuos tiene algún tipo de inmunodeficiencia pero varía según la enfermedad, siendo la más frecuente la inmunodeficiencia selectiva de IgA, cuya incidencia varía entre diferentes países y grupo racial siendo entre 1:400-800 individuos (10).

En América Latina, el Grupo Latinoamericano de Inmunodeficiencias Primarias (LAGID) en 2006 reportó que la forma de inmunodeficiencia primaria más común es la Deficiencia de Anticuerpos con el 53.2%, siendo el fenotipo más frecuente la deficiencia selectiva de IgA; en segundo lugar con 22.6% se encuentran las inmunodeficiencias con un síndrome bien definido; en tercer lugar con 9.5% la inmunodeficiencia combinada severa de células T- y B-; en cuarto lugar con 8.6% las alteraciones congénitas de fagocitos en número, función o ambos; en el quinto lugar con 3.3% están las enfermedades con disregulación de la inmunidad y con 2.8% las deficiencias del complemento (10).

De las inmunodeficiencias combinadas de células T y B, la Combinada Severa ligada al cromosoma X ha sido la más reportada, dado la gravedad de su

forma de presentación si no se diagnostica y ofrece un tratamiento adecuado y oportuno, el 100% de los pacientes muere.

En México existe una incidencia reportada de 0.17 casos por cada 100 000 nacimientos (10) sin embargo, estos datos se encuentran subestimados, ya que existe poco registro de los casos y los pacientes mueren sin un diagnóstico.

INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA.

Dentro de las inmunodeficiencias primarias el grupo conocido como inmunodeficiencias combinadas severas (SCID de sus siglas en inglés *Severe Combined Immunodeficiency*) son enfermedades en las cuales hay defectos tanto en la inmunidad humoral como en la celular y son susceptibles a infecciones causadas por toda clase de microorganismos, entre los que destacan los oportunistas (4). En los casos más graves de SCID existe una ausencia de células T periféricas funcionales. Estos pacientes presentan en forma temprana infecciones bacterianas, virales o micóticas (7).

La primera descripción de un niño con SCID fue hecha en 1950 por Glanzmann E. y Riniker (11). La función inmune fue reestablecida con éxito por primera vez con el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en un paciente con SCID en 1968 (12).

CLASIFICACIÓN SCID

Dentro de la clasificación de la IUIS en conjunto con la Organización Mundial de la Salud, en la última revisión, realizada en 2011 (9) el grupo de las SCID se clasifica en los siguientes subgrupos. (Cuadro 1)

ENFERMEDAD	HERENCIA	DEFECTO GENÉTICO
Inmunodeficiencia combinada severa T-B+		
a) Deficiencia de cadena γ común	Ligada a X	Defecto en receptor de cadena γ y para IL-2,4,7,9,15 y 21
b) Deficiencia de JAK3	Autosómica recesiva (AR)	Defectos en cinasa 3 activadora de Janus

c) Deficiencia de IL7R α	AR	Defecto en cadena α de IL-7
d) Deficiencia CD 45	AR	Defecto en CD 45
e) Deficiencia de CD3 δ / CD3 ϵ / CD3 ζ	AR	Defecto en las cadenas del complejo de receptor de células T CD3 δ , CD3 ϵ o CD3 ζ
f) Deficiencia de Coronina 1A	AR	Defecto en la salida del timo de las células T y defecto en el movimiento de células T
Inmunodeficiencia combinada severa T-B-		
a) Deficiencia de RAG 1/2	AR	Defecto en la recombinación VDJ o gene activador de recombinasa (RAG 1 o 2)
b) Deficiencia de DCLRE1C (Artemis)	AR	Defecto en la recombinación VDJ, defecto en la proteína de reparación recombinasa de ADN (Artemis)
c) Deficiencia de DNA-PKcs	AR	Defecto en recombinación VDJ , defecto en proteína de reparación recombinasa (DNA-PKCs)
d) Deficiencia AK2, disgenesia reticular	AR	Defecto en adenilado cinasa 2 mitocondrial con defecto en la maduración de células linfoides y mieloides.
e) Deficiencia de Adenosin deaminasa (ADA)	AR	Ausencia de actividad de ADA, con elevación de metabolitos linfotóxicos.
Síndrome de Omenn	AR	Mutaciones hipomórficas en RAG 1, 2, Artemis, IL7R α , RMRP, ADA, ADN ligasa IV, Yc o asociadas con Síndrome DiGeorge
Deficiencia de DNA ligasa IV	AR	Defecto en ADN ligasa con alteraciones en la unión de los extremos no homólogos (NHEJ)
Deficiencia de Cernunos/ NHJE1	AR	Defectos en cernunos
Deficiencia de CD-40 ligando	Ligada a X	Defectos en CD-40 ligando, causando defecto en cambio de isotipo y alteración de señalización de células dendríticas
Deficiencia CD-40	AR	Defectos en CD-40 ocasionan cambio de isotipo defectuoso y alteraciones en señalización de células dendríticas
Deficiencia de fosforilasa de nucleosido de purina	AR	Ausencia de fosforilasa de nucleosido de purina, ocasiona defectos en células T y neurológicos por metabolitos tóxicos elevados.
Deficiencia de CD3Y	AR	Defecto en CD3Y

Deficiencia CD8	AR	Defecto de cadena α de CD8
Deficiencia de ZAP-70	AR	Defecto en la señalización de ZAP-70 cinasa
Deficiencia canales de Calcio		
a) Deficiencia canales de Calcio Deficiencia de ORAI-1	AR	Defecto en ORAI-1, componente modulador de canal liberador de calcio.
b) Deficiencia de STIM-1	AR	Defecto en STIM-1, molécula estromal de interacción, funciona como sensor de Calcio.
Deficiencia de MHC clase I	AR	Mutaciones en genes TAP1, TAP2 o Tapasina
Deficiencia de MHC II	AR	Mutaciones en factores de transcripción para MHC clase II (genes CIITA, RFX5, RFXAP, RFXNANK)
Deficiencia de WHN (<i>Winged-helix-nude</i>)	AR	Defectos en factor de transcripción <i>forkhead box</i> N1 codificado por FOXN1.
Síndrome de DiGeorge completo	Autosómica Dominante (AD)	Deleción del cromosoma 22q11.2 o en la minoría de los casos en otras regiones de otros cromosomas incluyendo 10p, defectos heterocigotos en factores de transcripción TBX1
Hipoplasia cartílago y cabello	AR	Mutaciones en RMRP, involucrada en el procesamiento de ARN ribosomal, replicación de ADN mitocondrial y control del ciclo celular
Deficiencia de IKAROS	AD o de novo	Mutaciones en IKAROS, proteína hematopoyética específica con dedos de zinc y un regulador central de la diferenciación linfóide.
Deficiencia de STAT 5b	AR	Defectos de STAT5b, involucradas en el desarrollo y función de células T $\gamma\delta$, células T reguladoras, células NK, alteración de proliferación de células T
Deficiencia de ITK	AR	Defectos en ITK asociado con linfoproliferación por Virus de Epstein Barr.
Deficiencia de MAGT1	Ligada a X	Mutación de MAGT 1 causa señalización alterada del TCR por un flujo defectuoso de Magnesio.
Deficiencia DOCK 8	AR	Defecto en DOCK 8

Cuadro 1. Modificado de Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency

EPIDEMIOLOGÍA DE INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA

Se estima que la SCID tiene una incidencia de 1 caso por cada 50 000 a 100 000 nacidos vivos a nivel mundial(13-16). En America Latina se ha reportado una incidencia de 1.28 a 3.79 casos por 100 000 nacidos vivos(10). Cabe señalar que no existen estudios prospectivos adecuados que permitan establecer la incidencia real de la SCID, las estimaciones están basadas en reportes que se han elaborado para los registros de diferentes centros de investigación.

Por lo que los datos reportados puedan variar y el error estimado de estos estudios sugiere que la incidencia podría ser tan alta como de 1 en 35000 nacidos vivos, como en el caso de Suiza, donde se ha encontrado una prevalencia de 2.43 por 100 000 nacidos vivos (17).

Se estima que en Estados Unidos de Norteamérica se presentan 100 casos nuevos anualmente (18); mientras que para el caso de México se calcula una incidencia mínima de 0.16 a 0.24 por cada 100 000 nacimientos. (19)

En el registro del Instituto Nacional de Pediatría, dentro de la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias Primarias hasta el mes de abril 2013 existen registrados un total de 55 pacientes.

ETIOLOGÍA

Defectos Genéticos

Se conocen por lo menos 15 genes que al sufrir mutación causan SCID; estos genes codifican receptores de la superficie celular y moléculas de señalización del receptor de linfocitos T y B entre los que destacan IL2R γ , JAK3, IL7R, CD45, componentes del CD3, FOXP1), o bien son genes activadores de las recombinasas (RAG1, RAG2, Artemis, ADN ligasa 4) o genes de la vía del metabolismo de las purinas (adenosina deaminasa (ADA), purina nucleósido fosforilasa). (20)

FISIOPATOLOGÍA

La susceptibilidad a infección y otras características clínicas de SCID están dadas por la ausencia o función alterada de uno o más productos de genes. Las manifestaciones dependen del rol bioquímico de los productos, genes afectados y

las células o los tejidos en los cuales se expresan. La interacción de los productos de estos genes, su polimorfismo y factores ambientales también juegan un rol importante (1). La patogénesis de la SCID refleja distintos mecanismos que afectan varias etapas en el desarrollo de células T (7).

El desarrollo y función de linfocitos T esta gravemente comprometido en todas las formas de SCID pero también están afectados los linfocitos B y / o células NK. Los diferentes fenotipos de SCID están caracterizados por diferentes combinaciones de células T/B/NK. (5)

El desarrollo normal del sistema inmunológico empieza en etapas muy tempranas, desde las semanas 9 a 10 de gestación se encuentra una linfopoyesis de células T en el timo. El ser humano en el útero ante una exposición a antígenos extraños activa la respuesta inmunológica, no se produce tolerancia, aparte de la existente a aloantígenos maternos. (5)

Las mutaciones genéticas en SCID tienen repercusión en importantes funciones para el desarrollo y función del sistema inmunológico, en el siguiente cuadro se muestran las principales . (Cuadro 2)

CUADRO CLÍNICO

A pesar de la heterogeneidad de los defectos moleculares en los pacientes con SCID, las manifestaciones clínicas de todos son similares, como se ha demostrado en cohortes grandes de estos pacientes en Europa y Estados Unidos. Las manifestaciones inician muy temprano en la vida, casi siempre después del tercer mes y antes de los 6 meses con una historia de diarrea crónica, neumonía intersticial y/o candidiasis mucocutánea resistente al tratamiento. Las infecciones por microorganismos oportunistas como *Pneumocistis jiroveci* o *criptosporidium* son frecuentes, así como bacterias intracelulares y virus. Estos pacientes presentan falla de medro, pueden cursar con rash cutáneo que refleja la enfermedad injerto contra huésped ocasionada por transferencia de células T maternas o daño tisular provocado por infiltración de linfocitos T autólogos activados.

Mecanismo de la enfermedad	Fenotipo T/B/NK	Gen	Proteína	Función	Manifestaciones no inmunológicas
Alteración a nivel de la señalización mediada por citocinas					
Defecto de la cadena Y común	T-B+NK-	IL2RG	Cadena Y común.	Es compartida por los receptores de IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, esenciales para el desarrollo de linfocitos T y células NK	
Defecto JAK3	T-B+NK-	JAK 3	Cinasa 3 Janus	JAK3 une a la cadena Y común, en la señalización de JAK3- STAT 5.	
Defecto de la cadena IL-7R α	T-B+NK+	IL7RA	Cadena α del receptor TSLP (linfopoyetina tímica estromal) e IL-7	IL-7 es un factor de desarrollo del crecimiento de células T.	
Defectos en receptor de células pre-T					
<i>a) Defectos en la recombinación V(D)</i>					
Defectos RAG 1	T-B-NK+	RAG1	RAG1	Enzimas para la recombinación activa de genes específicas para linfocitos T y B	
Defectos RAG 2	T-B-NK+	RAG 2	RAG2		
Defectos de Artemis	T-B-NK+	DCLR E1C	Artemis	Proteína de reparación de ADN cross-link	Radiosensibilidad
Defectos de ADN PKcs	T-B-NK+	PRKD C	ADN- PKcs	Factor para la reparación de ADN	Radiosensibilidad
Defectos de ADN ligasa IV	T-B-NK+	LIG 4	ADN ligasa IV	Esencial para el desarrollo embrional, participa en la reparación del daño a nivel de ADN doble cadena.	Radiosensibilidad, facies dismórfica, microcefalia, retraso en crecimiento, retraso psicomotor.
Defectos en Cernunos/XLF	T-B-NK+	NHEJ 1	Cernunos /XLF	Factor que actúa en la vía de NHEJ (unión final no homologa) a nivel de la recombinación V(D)	Radiosensibilidad, facies dismórfica, microcefalia, retraso en crecimiento, retraso psicomotor.

b) Alteración en la señalización a través de receptor de células pre T					
Defecto CD3 δ	T-B+NK+	CD3D	CD3 δ	Son esenciales para el ensamblaje en la membrana celular y transmisión de señales para la linfopoyesis y activación de linfocito T.	
Defecto CD3 ε	T-B+NK+	CD3E	CD3 ε		
Defecto CD3 ζ	T-B+NK+	CD3Z	CD3 ζ		
Defecto CD3 γ	T-B+NK+	CD3G	CD3 γ		
Defecto CD45	T-B+NK+/-	PTPR C	CD45 (LCA, antígeno común leucocitario)	Proteína fosfatasa fosfotirosina esencial para señalización del pre-TCR y TCR.	
Defecto ZAP-70	T+B+NK+ CD4+CD8-	ZAP70	ZAP-70	Proteína implicada en la vía bioquímica de cinasa de tirosina para la transducción de señal del TCR	
Defecto P56lck	T-B+NK+	LCK	P56lck	Participa en la señalización de CD3-TCR	
Aumento de la apoptosis de linfocitos					
Disgenesia reticular	T-B-NK-	AK2	Cinasa adenilato 2	Adenilato cinasa cataliza la transferencia reversible de un grupo fosforil de adenosina trifosfato a adenosin monofosfato	Aleucocitosis, sordera neurosensorial
Deficiencia de ADA	T-B-NK-	ADA	Deaminasa adenosina	ADA cataliza la desaminación irreversible de adenosina y 2-desoxiadenosina a inosina y desoxinosina.	Alteraciones costocondrales y esqueléticas, hepatitis neonatal, sordera neurosensorial y problemas neurológicos
Deficiencia de PNP	T-B-NK-	PNP	Fosforilasa de nucleosido de purina	Enzima del metabolismo de purinas	Alteraciones neurológicas, autoinmunidad y neoplasias

Defectos en la embriogénesis del Timo					
Síndrome WHN	T-B+NK-	WHN	FOXP1	Factor de transcripción expresado en epitelio tímico y piel.	Alopecia, defectos del tubo neural.
Anomalia DiGeorge completo					
Síndrome DiGeorge (delección 22q11.2)	T-B+NK+	> 35 genes	TBX1 y otras	TBX1 involucrado en desarrollo de corazón, timo, glándulas paratiroides, paladar y región facial.	Facies dismórfica, defectos cardiacos congénitos y otras malformaciones, hipocalcemia neonatal, ausencia de glándulas paratiroides
Alteración en el flujo de calcio					
Defecto ORAI1	T+B+NK+	ORAI 1	ORAI 1	Proteínas para el flujo y transducción de señal mediante el calcio.	Miopatía, displasia ectodérmica
Defecto STIM1	T+B+NK+	STIM 1	STIM1		Miopatía, displasia ectodérmica, autoinmunidad
Otros mecanismos					
Defecto coronina-1A	T-B+NK+	CORO 1A	Coronina-1A	Proteína reguladora de las estructuras celulares de actina, citoesqueleto y transporte de membranas	
Defecto de MHC clase II	T+B+NK+ CD4- CD8+	CIITA	CIITA	Proteínas codificantes de factores que regulan promotores y transcripción de HLA DR, DP, DQ	
		RFXA NK	RFXANK		
		RFX5 RFXA P	RFX5 RFXAP		
Defecto hipoplasia cartilago cabello	T-B+NK+	RMRP	ARN del Complejo RNasa MRP	Procesamiento de ARN ribosomal y replicación celular y mitocondrial	Enanismo con extremidades cortas, hipoplasia de cabello, color claro

Cuadro 2. Mecanismos fisiopatológicos de SCID.

Modificada de Cossu: Genetics of SCID. Italian Journal of Pediatrics 2010 36:76.

Algunas formas de SCID están asociados a características distintivas en otros órganos (7).

La sospecha de SCID siempre debe ser considerada como “emergencia pediátrica” por el riesgo de una evolución fatal si no se diagnostica(21). A la exploración física estos niños tienen hipoplasia del tejido linfoide, en los estudios de laboratorio la linfopenia es un hallazgo común en estos pacientes pero algunos formas de SCID pueden cursar sin ella; en los estudios de gabinete en la radiografía de tórax no hay sombra tímica (1).

Entre otras manifestaciones se encuentran los datos de autoinmunidad, como anemia hemolítica, purpura trombocitopenica autoinmune. Además algunas inmunodeficiencias cursan con fenotipos característicos presentando en algunos casos microcefalia, manifestaciones neurológicas, hipotonía, ataxia, retraso psicomotor, sordera, anormalidades esqueléticas entre otros.

La muerte de estos niños es consecuencia de las complicaciones graves que resultan de la pobre o nula respuesta del organismo a los tratamientos convencionales contra las infecciones graves y recurrentes de vías aéreas superiores, gastrointestinales o sistémicas, las cuales son causadas por patógenos comunes y oportunistas (20), (18) (13, 22).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la SCID es difícil en los recién nacidos debido a que al momento del nacimiento no presentan signos de la enfermedad. Al nacimiento durante la evaluación física de rutina pasan como “sanos” ante el médico evaluador, en gran medida porque en esta etapa están protegidos por el sistema inmune de la madre, luego inician con infecciones de repetición y fallecen en sus primeros meses o años de vida a menos de iniciar un tratamiento adecuado(20).

Una historia clínica con infecciones desde los primeros meses de vida, por oportunistas, pobre respuesta a los antibióticos, linfopenia y ausencia de tejido linfoide orientan al diagnóstico de SCID.

En ocasiones hay antecedentes familiares de muertes tempranas por procesos infecciosos. El diagnóstico específico se realiza al identificar la mutación en el gen que codifica para la proteína afectada.

La importancia de hacer un diagnóstico temprano en estos niños radica en que evitamos complicaciones y secuelas por las infecciones al realizar con éxito la reconstitución inmunológica a través del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, terapia génica o bien ofrecer reemplazo enzimático (en el caso de deficiencia de adenosin deaminasa)(23).

El diagnóstico y tratamiento de SCID en los primeros 3.5 meses de vida antes del desarrollo de infecciones amenazantes para la vida mejora marcadamente el pronóstico (24).

En 1997, Buckley y Puck hicieron la primera propuesta para realizar un tamiz neonatal para el diagnóstico de SCID, quienes sugirieron que la mayoría de los casos podía identificarse por una biometría hemática completa con cuenta diferencial y determinar el número de linfocitos absolutos por microlitro de sangre (25).

CUANTIFICACIÓN DE TREC'S POR PCR TIEMPO REAL.

Se ha planteado en varios estudios la forma ideal de realizar un diagnóstico certero y oportuno de SCID, por ejemplo la cuantificación del número de linfocitos, inmunoensayo para medir IL-7, inmunoensayo para medir CD3 y CD 45, determinación de secuencias de ADN y finalmente la cuantificación del número de TREC's. (26)

En el año 2000 Douek y cols. desarrollaron un método que podía ser utilizado para estimar la producción de linfocitos T del timo, mediante la cuantificación del número de copias de TREC's presentes en células T periféricas, para llevar a cabo esta estimación se utilizan TREC's derivados de un evento único de recombinación que es común en el 70% de los timocitos destinados para convertirse en células T TCR $\alpha\beta$ maduras (6)

Esto es posible, gracias a que se emplea a los TREC's denominados dRec- $\pi\sigma\lambda$, que se encuentran en la gran mayoría de los linfocitos circulantes. (Fig. 2)

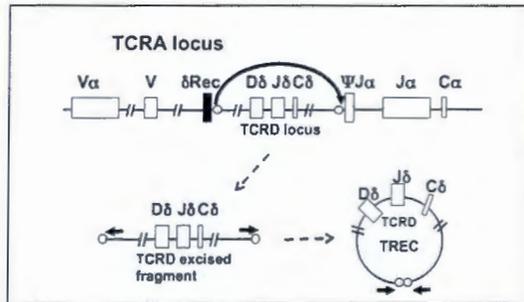


Fig. 2 Generación de TREC's(26)

Douek y cols., encontraron que las muestras de sangre de niños tenían el más alto número de TREC's, aproximadamente 1 TREC por cada 10 células T. Lo que reflejaba la alta tasa de generación de nuevas células T en etapas tempranas de la vida. Los niños mayores y adultos tienen de 10 veces a 100 veces menos TREC's respectivamente, esto refleja el incremento de la expansión de células T periféricas en comparación de la producción de nuevas células T. (26)

El número de copias de TREC's varía entre individuos, se ha visto que las mediciones seriadas en el paciente a través del tiempo puede ayudar a documentar la reconstitución de células T después de Transplante de células pluripotenciales hematopoyéticas o el incremento de TREC's después del inicio de una terapia antiretroviral en pacientes con infección por VIH. (26)

En el 2005 Chan y Puck publicaron el primer método para realizar un tamizaje para diagnosticar SCID mediante gota de sangre seca utilizando la cuantificación de TREC's. Para tal propósito se extrajo DNA de estas muestras y la cuantificación se hizo por PCR cuantitativa, usando como control de integridad del DNA a un gen constitutivo, como la β -actina. (26)

De acuerdo con los resultados de Puck y Chan, los pacientes con SCID, quienes presentan una producción disminuida o prácticamente ausente de linfocitos, tienen un número muy bajo (< 30) o indetectable de TREC's; a diferencia de los recién nacidos sanos, quienes tienen un número alto de TREC's (20, 27), (15), (16), (13). Como resultado de las investigaciones del grupo de la Dra. Puck en el

año 2008 se implementó un programa piloto de tamiz neonatal para detectar SCID en el estado de Wisconsin, siendo este el primer proyecto de su tipo en el mundo.

El programa se ha ampliado a otros estados de la Unión Americana cuyos resultados se enlistan a continuación:

- Wisconsin, se han detectado 4 casos de SCID y 7 casos de linfopenia de células T no relacionada con SCID, de un total de 243, 707 recién nacidos que fueron tamizados.
- Massachusetts, se detectó 1 caso de SCID y 14 casos de linfopenia de células T no relacionada, de un total de 161, 707 recién nacidos que fueron tamizados.
- New York se han detectado 4 casos de SCID y 12 casos de linfopenia de células T no relacionada con SCID, de un total de 136, 635 recién nacidos que fueron tamizados.
- California se han detectado 5 casos de SCID, 6 casos de variantes de SCID y 3 casos de linfopenia de células T no relacionada con SCID, de un total de 358, 000 recién nacidos que fueron tamizados.

Todos los casos que se han detectado con SCID han recibido Transplante de células hematopoyéticas o terapia de remplazo enzimático y han sobrevivido.

Hasta ahora el tamiz neonatal para SCID con TRECS ha sido 100% sensible, pero existen otras condiciones con linfopenia de células T que requieren de atención medica que han sido detectadas(25).

La implementación del tamiz neonatal para SCID brindará a los pacientes la oportunidad de recibir tratamiento definitivo, y a la mayor brevedad posible, aumentando la sobrevivencia de estos pacientes mejorando la calidad de vida de sus familias, además de que generara información para conocer la incidencia real de esta enfermedad en nuestro país(18, 28).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Inmunodeficiencia combinada severa es una enfermedad grave, que si no se diagnóstica de manera temprana puede ocasionar la muerte del paciente, el realizar un diagnóstico oportuno es necesario para dar el tratamiento adecuado. Debido a que el recién nacido cursa con un periodo pre-sintomático se puede detectar mediante el programa de tamiz neonatal a través de la medición de TREC's. Para lograr esto es necesario estandarizar la técnica para poder utilizarla y establecer la condiciones ideales para su realización.

En México no existe una prueba de tamiz neonatal para detección de SCID, por lo que se requiere de la estandarización de la prueba para su implementación.

JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con SCID no tienen manifestaciones al nacimiento de la inmunodeficiencia. Los médicos la sospechan cuando ya han pasado por varias infecciones que ponen en riesgo su vida. Estos pacientes si son diagnosticados oportunamente, tienen tratamiento definitivo (transplante de células progenitoras hematopoyéticas o terapia génica) que corrige el problema y que les permite tener una vida igual que otro niño sin IDP.

Debido al subdiagnóstico, a la falta de datos confiables y a que la sobrevida de este tipo de pacientes es muy baja si no se diagnostican, se requiere implementar una prueba de diagnóstico sensible y confiable para identificar y tratar adecuadamente a los pacientes afectados con SCID. Por tal motivo la estandarización de la prueba servirá como el primer paso de una línea de investigación para establecer el diagnóstico en la población mexicana.

Al poder identificar paciente con SCID en un periodo pre sintomático se podrán evitar las complicaciones asociadas a un diagnóstico tardío, los costos correspondientes a las mismas y se lograra mejorar la sobrevida de estos pacientes, al poder brindarles tratamiento adecuado de forma oportuna.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar el método de cuantificación de círculos de escisión del receptor de linfocitos (TREC's) por PCR en tiempo real para diagnóstico de inmunodeficiencia combinada severa.

Objetivos específicos.

Clonar secuencias de TREC's y β -actina en plasmidos.

Transformación de bacterias con los plasmidos de β - actina y TREC's para obtener los estandares de cuantificación.

Definir la condiciones de trabajo para una reacción de PCR en tiempo real duplex.

HIPÓTESIS

Con el método diseñado en el laboratorio es posible identificar por la cuantificación del numero de copias de TRECs en gotas de sangre periferica a los niños sanos de los afectados con SCID.

METODOLOGÍA

Se realizará la estandarización de un método de cuantificación (TREC's) por la técnica de PCR en tiempo real.

Clasificación de la Investigación

Observacional, descriptivo, transversal, prolectivo.

Material y métodos

POBLACION OBJETIVO:

Se tomarán muestras de RN sanos y de pacientes con diagnóstico clínico de SCID para realizar la curva de TREC's y β -actina que sirva como base para la cuantificación en una población determinada.

POBLACIÓN ELEGIBLE:

Se tomarán muestras de RN sanos y de pacientes con diagnóstico clínico de SCID para realizar la curva de TREC's y β -actina que sirva como base para la cuantificación en una población determinada.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

CRITERIOS DE INCLUSION

- Recién nacidos con peso al nacer de 2500 a 3800 g.
- Recién nacidos con edad gestacional de 37 a 42 SDG.
- Cualquier sexo.
- Recién nacidos clínicamente sanos.
- Firma de consentimiento informado por los padres o tutores.
- Pacientes del Instituto Nacional de Pediatría con el diagnóstico de SCID.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Malformaciones congénitas.
- Sepsis neonatal y/o materna, así como potencialmente infectados
- Asfixia perinatal.
- Error innato del metabolismo en cualquiera de sus variantes.
- Diagnostico de desnutrición (OMS)
- Muestras inadecuadas de acuerdo al lineamiento técnico.
- Administración de inmunosupresores durante el periodo perinatal
- Administración de inductores de la maduración pulmonar en un periodo <72 h del nacimiento.
- Reacción leucemoide (cuenta leucocitaria >percentil 95 para la edad)

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES . Cuadro 3

Variable	Definición	Categoría	Escala	Unidad de Medición
Recién nacido	Entidad biológica de raza humana, cuya edad cronológica es menor a 28 días de vida extrauterina	Nominal	No hay	

Sexo	Cualquiera de las dos formas de individuos que ocurren en la mayoría de las especies y se distinguen como masculino y femenino	Nominal dicotómica	No hay	Masculino o femenino
Edad	Parte de la vida que transcurre desde el nacimiento hasta un momento dado	Cuantitativa discreta	Días calendario	Días
Edad gestacional (SDG)	Tiempo medido en semanas desde el primer día del último ciclo menstrual de la mujer hasta la fecha actual	Cuantitativa discreta	Edad calculada por la fecha de última menstruación	Semanas
Peso	Fuerza de gravitación ejercida sobre un cuerpo	Cuantitativa discreta	Báscula	Gramos
TREC's	Círculos de DNA son subproductos del rearreglo de genes del receptor de linfocitos T en desarrollo	Cuantitativa discreta	PCR en tiempo real	Número de copias
Inmunodeficiencia combinada severa	Grupo heterogéneo de desórdenes caracterizados por defectos en el desarrollo y/o función de células T (linfocitos T), variablemente asociado con desarrollo anormal de otros tipos de linfocitos, como linfocitos B y NK (natural killer)	Nominal, dicotómica	No hay	Presente / ausente
PCR cuantitativa en tiempo real	Método para cuantificar amplificar secuencias de ADN	Cuantitativa discreta	No hay	Número de copias

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título Segundo, Capítulo III De la investigación en **menores de edad o incapaces**, Artículos 34-39

Este ensayo se llevará a cabo de acuerdo con la última versión de la declaración de Helsinki, de Buenas Prácticas Clínicas.

Los padres de los niños firmarán un acuerdo de consentimiento informado y libre, después de haber sido informados de la naturaleza del ensayo, de los riesgos eventuales y de sus obligaciones (Anexo No. 1).

METODOLOGÍA

MATERIAL

Tubos de fondo cónico de 15mL

Tubos para microcentrifuga de 1,5mL

Agitador vortex

Puntas para micropipeta con filtro de 1000muntas par

Micropipetas de 1000micropipet

Incubadora Vortemp

Centrífuga Allegra X-12R

Expectrofotómetro Epoch

Extracción de ADN

Para la realización de la extracción de ADN se tomó material de sangre fresca y de gotas de sangre seca en papel filtro mediante los siguientes pasos :

1.Sangre fresca.

Primero se tomaron 5mL de sangre completa por punción venosa en un tubo con EDTA, la muestra se centrifugó durante 20 minutos a 3500rpm, al terminar de centrifugar con ayuda de la micropipeta de 1000mrimero se tomaron 5mL de sangre completa por puna un tubo de fondo cónico de 15mL. Posteriormente se disgregó el botón de leucocitos y se agregaron 10mL de disolución de lisis de eritrocitos (Qiagen) y se agitó vigorosamente durante 2 min en el agitador vortex. Se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm y se eliminó el sobrenadante, el proceso de lisis de eritrocitos se repitió dos veces más.

Se agregaron 3mL de disolución de lisis de leucocitos (Qiagen) complementada con 20me agregaron 3mL de disolución de lisis de leucocitos (Qiagen) complementada con 2nte 2 horas a 55°C. Al finalizar la incubación, se agregó 1mL de la disolución precipitadora de proteínas (Qiagen) y se incubó en el congelador durante 10min. Se centrifugó durante 10min a 3500rpm, y se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo de 15mL limpio y seco. Para precipitar el DNA se agregan un volumen de isopropanol al 100% por cada volumen de sobrenadante recuperado.

Se agitó gentilmente por inversión hasta observar las fibras de DNA. Se centrifugó a 3500rpm, se eliminó el sobrenadante y dejó secar el DNA a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó al DNA seco, 1.4mL de una

disolución de etanol grado biología molecular al 70% y se agitó gentilmente por inversión durante 10min. (el procedimiento se repitió dos veces más). Se dejó secar a 55°C durante 8min y se resuspendió el DNA en 300m). Se dejó secar a 55°C durante 8min y se resuspendió el DNA en 300ente por inversión durante 10min.

2. Gotas de sangre seca en papel filtro.

Primero se recortó un círculo de papel filtro con sangre de 3mm de diámetro y se colocó en un tubo de fondo cónico para microcentrífuga y se le agregaron

500m500rocentrífuga y se le agregaronpel filtro con sangre de 3mm de diámetro y se colocó en un tubo de fondo cónico parae y dejó secar el DNA a temperatura a mililitro de disolución de lisis. Se incubó 16h en el agitador vortemp a 55°C y 90rpm. Al finalizar la incubación, se agregaron 200mL de la disolución precipitadora de proteínas (Qiagen) y se incubó en el congelador durante 10min. Se centrifugó durante 10min a 3500rpm, y se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de fondo cónico de 1.5mL limpio y seco. Para precipitar el DNA se agregó un volumen de isopropanol 100% por cada volumen de sobrenadante recuperado. Se agitó gentilmente por inversión hasta observar las fibras de DNA. Se centrifugó a 3500rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó al DNA seco, 1.4mL de una disuolución de etanol grado biología molecular al 70% y se agitó gentilmente por inversión durante 10min (el procedimiento se repitió dos veces más). Se dejo secar a 55°C durante 8min y se resuspendió el DNA en 300mel sobrenadante y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó al DNA seco,

Amplificación de TRECs por PCR punto final

Cuadro 4. Componentes de la mezcla

Componente	Cantidad (µl)
Agua	5.8
Master mix	12.5
Iniciador forward	0.6
Iniciador reverse	0.6
DNA	5.5
Volumen final	25

Para realizar la amplificación de TRECs se realizó la siguiente secuencia de pasos.

Se colocó en un tubo de 1.5 ml todos los componentes de la reacción. Se mezclaron perfectamente con la micropipeta y formaron alícuotas de 50 ul en tubos para PCR. Se amplificó en un termociclador con las siguientes condiciones:

- 95 C por 10 minutos
- 95 C por 15 } segundos 40 ciclos
- 60 C por segundos }
- 4 C

Electroforesis

Para comprobar la amplificación de TRECs se preparó un gel de agarosa al 2% con 0.5 ul de GelStar por cada 10 ml de agarosa. Se inyectaron 50 ul del producto en cada pozo y se reservó un pozo para inyectar 5 ul de marcador de peso molecular, se corrió el producto durante 25 minutos a 80 Volts. Se observó bajo una cámara con luz UV y se verificó que el tamaño del producto coincida con la banda de 100 pb incluida en el marcador.

Purificación

Se cortaron las bandas con un bisturí estéril y se pesaron para colocar no más de 400 mg por tubo de 1.5 ml (100 mg- 100 ul). Se agregaron 3 volúmenes de buffer QG y se incubaron a 50 °C por 10 minutos para disolver el gel. Se agregó un volumen equivalente de isopropanol y mezclar por inversión. Se colocó una columna QIAquick en un tubo recolector de 2 ml para verter la solución en la columna y se centrifugó un minuto. Se descartó el sobrenadante y se lavó la columna con 700 ul de buffer PE y se centrifugó por un minuto se descartó el sobrenadante y colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 ml. Se eluyó el DNA con 50 ul de buffer EB y se centrifugó. Se cuantificaron por espectrofotometría

Ligación

Terminado el proceso de purificación de los ampliacones se realizó la reacción de ligación de los amplicones al plásmido pDrive, con las cantidades de cada componente enlistados en el cuadro 5.

Primero se adicionó en un tubo eppendorf cada componente del kit y el volumen equivalente a 13 ng del amplicon purificado se incubó x minutos a 4 C.

Componente	Volumen
pDrive 50 ng/ μ l	1 μ l
Producto de PCR	1-4 μ l
Agua destilada	Variable
Master Mix	5 μ l
Volumen total	10 μ l

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la ligación.

Transformación de células competentes

Una vez clonado el blanco de amplificación de TRECs se usan células competentes *E. coli* TOP 10 de Invitrogen para la transformación.

Se descongelaron en hielo las células competentes y colocaron 50 μ L de estas con 5 μ L de plásmido estandar (plásmido con amplicon ligado), y se incubó en hielo durante 25 minutos. Posteriormente se dio el choque térmico durante 30 segundos a 42 °C, inmediatamente después se colocó en hielo y se agregaron 350 μ l de medio LB complementado con ampicilina 100 μ g/mL. Se incubaron las células transformadas por 2 horas a 37 °C.

Propagación de células

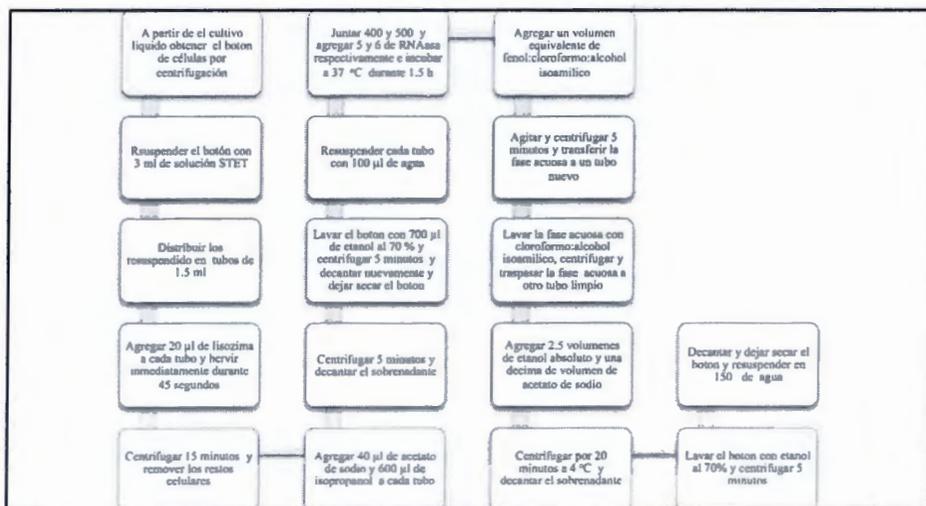
Concluido el periodo de incubación para la recuperación de las células se inoculó en placas con medio LB complementadas con ampicilina 100 μ g/mL. Se seleccionó y se sembraron 10 colonias en una nueva placa con medio LB y ampicilina. Como criterio de selección rápida de colonias con plásmido estandar se inoculó cada clona en viales de 1.5 ml con 1.3 ml de medio LB, y se realizó PCR de colonia.

Extracción del plásmido estandar (mega-prep)

Con el objetivo de obtener una alícuota concentrada de los plásmidos estandar, se inoculó la clona seleccionada en 50 ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/mL y se dejó incubar a 37 °C toda la noche. Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos y se decantó el medio para resuspender el botón de bacterias en 3 ml de solución STET (Sacarosa, Tris, EDTA y Tritón).

Se homogenizó la suspensión y se distribuyeron en tubos eppendorf alícuotas de 350 μ L. Se agregaron a cada uno 20 μ L de lisozima y se calentó a

ebullición durante 45 segundos y centrifugó durante 15 minutos. Con un palillo esteril se removieron los restos celulares. Se añadieron 40 μL de acetato de sodio 1 M y 600 μL de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, luego se centrifugó 5 minutos para eliminar el sobrenadante. Se lavó el botón con etanol al 70% y se agregó a cada tubo un volumen equivalente de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para obtener el DNA en la fracción acuosa. Para eliminar el exceso de fenol se agregó un volumen equivalente de cloroformo:alcohol isoamílico luego y se dejó precipitar el DNA con etanol absoluto durante toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El botón obtenido mediante centrifugación se lavó con etanol al 70% y se dejó secar para finalmente resuspender el DNA plasmídico en buffer TE. En el cuadro 6 se muestra el diagrama de flujo de la técnica. Finalmente se cuantifica.



Cuadro 6. Esquema del proceso de purificación de plásmido estándar.

A partir del stock obtenido de la mega-prep, se calculó el volumen requerido para preparar 1 ml de una disolución a una concentración de 2×10^9 moléculas estándar por μl . Considerando que:

$$\text{Una molécula estándar (plásmido + TREC's)} = 4.19 \times 10^{-12} \text{ ug}$$

Y suponiendo que la concentración del stock es 0.6 $\text{ug}/\mu\text{l}$

$0.6 \text{ ug/ul} / 4.19 \times 10^{-12} = 1.43 \times 10^{11}$ moléculas estándar por ul

$C_i = 1.43 \times 10^{11}$ moléculas std

$V_i = 1$

$C_f = 2 \times 10^9$ moléculas std

$V_f = 1000 \text{ ul}$

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

Se marcó una serie de 7 tubos de 1.5 ml y se colocó en cada uno 900 μ l de buffer TE pH8. A partir de la dilución del paso anterior se homogenizó perfectamente, se tomaron 100 μ l y se colocaron en el tubo ST1, se mezcló con la pipeta el contenido y se realizaron diluciones seriadas 1:10 como se muestra en el esquema. (Fig. 3)

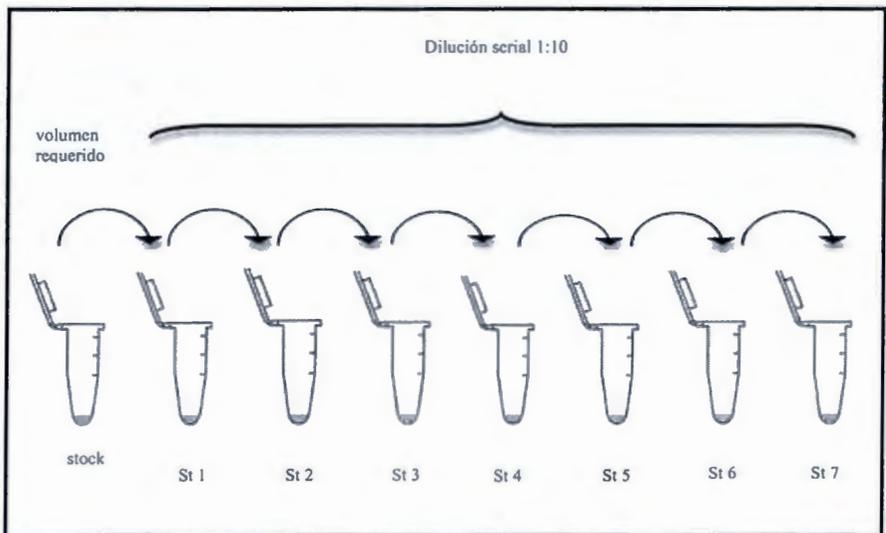


Fig. 3. Esquema de diluciones .

Se hicieron alícuotas de 100 μ l de cada ST y almacenaron a -20 C

Diluciones seriadas del DNAg para la curva estándar

El stock Human DNA Male Applied contiene 10 ng/ μ l y se sabe que 1 copia de RNAsa P = 3 pg 10000 pg / 3 = 3333.33 copias

$$V_i = 3333.33 \text{ copias/ul}$$

$$C_i = 6$$

$$V_f = 1000 \text{ copias/ul}$$

$$C_f = 100 \text{ ul}$$

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

30 ul stock + 70 ul TE

v

Se colocaron 30 μ l del stock Human DNA Male Applied en 70 ul de buffer TE

$$V \times C = V \times C_{III}$$

Se realizaron diluciones seriadas 1:3 a partir de la dilución anterior. Se almacenaron a 4 C

Preparación de la mezcla de reacción para PCR tiempo real

Por cada ensayo con muestras a procesar se realizó una curva estándar; tanto muestras como puntos de la curva se elaboran en dúplex y por duplicado. La curva estándar comprende de 7 puntos para cada secuencia

Se calculó la cantidad de cada reactivo para una curva dúplex por duplicado.

Reactivo	Volumen por reacción dúplex de CS (ul)	Volumen por reacción dúplex de Muestra (ul)
Master Mix	10	10
Iniciador forward	0.53	0.53
Iniciador Reverse	0.53	0.53
Sonda	0.8	0.8
RNAsaP	1	1
Plásmido estándar	5	-
DNA molde para RNAsaP	3	-
Muestra	-	5
Agua	-	3
Volumen total	20 ul	20 ul

Se adicionó cada componente de la reacción en un tubo de 600 μ l excepto los moldes de DNA. Se dispensaron en tubos para PCR 12.86 μ l de la mezcla. Para la curva estándar se adicionaron en cada punto 5 μ l de plásmido std y 3 μ l de DNAg std.

Para las muestras adicionar 5 μ l de DNA del paciente y 3 μ l de agua Se programó en el termociclador AB 7500 las siguientes condiciones

Desnaturalización	PCR		Conservación
95 °C 10 min	95 °C 15 seg	60 °C 60 seg	4 °C
1 ciclo	1 ciclo	40 ciclos	∞

RESULTADOS:

PCR.

Para iniciar el proceso de estandarización, se definió la composición de la mezcla de reacción (ver Cuadro 7) a utilizar para amplificar las secuencias de β -actina y TREC's, para ello se hicieron ensayos en PCR de punto final en reacción individual (singlex) para cada blanco de amplificación.

Cuadro 7. Composición de la mezcla de reacción para PCR de punto final de amplificación individual de β -actina y TREC's.

Reactivo	Cantidad (mL)	Concentración final
Master mix	12.5	1x
Iniciador Fwd	1.0	0.8 pM
Iniciador Rev	1.0	0.8 pM
DNA	5.0	1 ng/mL
H ₂ O	5.5	----
Vol. Final (mL)	25.0	----

Una vez que se definió la composición de la mezcla de reacción se definió la temperatura de alineación de los iniciadores de β -actina y TREC's para ello se realizaron amplificaciones de los genes de interés por separado con temperaturas de alineación de 59, 60 y 61°C; siendo 60 grados la temperatura de trabajo que se eligió. (Fig. 4)

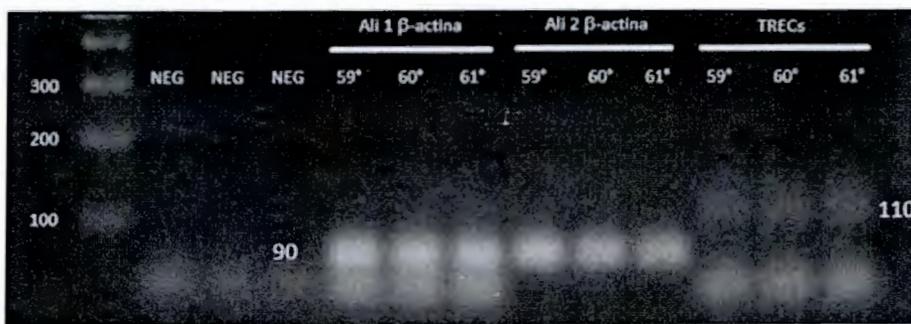


Fig. 4 Productos de amplificación de β -actina y TREC's obtenidos con diferentes temperaturas de alineación (59°, 60° y 61°C) separados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio.

Con los productos amplificados y separados en geles de agarosa por electroforesis, se purificaron los amplicones de cada gen para clonar cada producto

en un plásmido e iniciar la elaboración de las disoluciones estándar de cuantificación de cada gen.

Para los ensayos de clonación se emplearon los plásmidos Cloning Jet de Qiagen, Topo PCR 2.0 de invitrogen y pjet 1.2 de Thermo Scientific.

Cabe mencionar que se utilizaron todos esos plásmidos debido a que durante el proceso de clonación se obtuvo baja eficiencia en el proceso de ligación de las secuencias de β -actina y TREC's; por tal motivo se tuvieron que probar modificaciones al protocolo de ligación y probar con cada plásmido hasta obtener los resultados requeridos, los cuales se alcanzaron con el plásmido pjet1.2.

Con los amplicones ya clonados en el plásmido, se transformaron bacterias *Escherichia coli* TOP10, mismas que fueron cultivados en medios sólidos complementados con ampicilina para seleccionar las colonias transformadas con el plásmido. Para este proceso se seleccionaron 26 colonias de las cuales 14 correspondieron a bacterias transformadas con el plásmido de TREC's y las restantes 12 con el plásmido de β -actina.

Para descartar aquellas bacterias transformadas con el plásmido vacío, se seleccionaron por punción las colonias de *E. coli* transformadas y se cultivaron en 1mL de medio de crecimiento líquido para incrementar el número de bacterias con los plásmidos de β -actina y TREC's respectivamente.

Para tal propósito se realizaron PCR de colonia y los productos de amplificación se sometieron a separación por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 5) identificadas las colonias que tienen el plásmido con el inserto de β -actina y TREC's, se cultivaron dichas colonias en 50mL de medio crecimiento líquido y se purificó el plásmido. El producto purificado fue cuantificado por espectrofotetría y se mando a secuenciar para corroborar la secuencia del inserto (datos no mostrados).

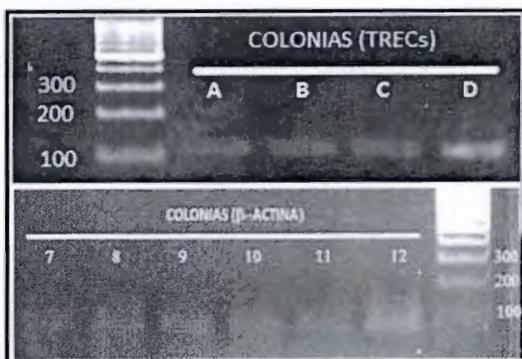


Fig. 5 Productos de amplificación de β -actina y TREC's obtenidos de las colonias transformadas con los plásmidos clonados.

Obtenidos las disoluciones estándar de cada gen se prepararon las diluciones seriadas 1:10, requeridas para realizar las curvas de calibración para β

-actina y TREC's, ajustando en cada caso la primera dilución a una concentración de 2×10^9 copias/mL.

Para elaborar las curvas de calibración de cada gen se emplearon las diluciones que contenían de 2×10^7 - 2×10^1 copias por mililitro. Se montaron reacciones singlex y dobles (dúplex) para β -actina y TREC's. La composición de la mezcla de reacción de cada tipo de reacción así como y las condiciones de reacción para la PCR en tiempo real se describen en los cuadros 8 y 9 respectivamente.

Cuadro 8. Composición de la mezcla de reacción para PCR tiempo real de amplificación individual. singlex de β -actina y TREC's.

Reactivo	Cantidad (mL)	Concentración final
Master mix	12.5	1x
Iniciador Fwd	1.0	0.8 pM
Iniciador Rev	1.0	0.8 pM
Sonda TaqMan	1.5	0,2 pM
DNA	5.0	1 ng/mL
H ₂ O	4.0	----
Vol. Final (mL)	25.0	----

Cuadro 9. Composición de la mezcla de reacción para PCR tiempo real de amplificación individual y dúplex de β -actina y TREC's.

Reactivo	Cantidad (mL)	Concentración final
Master mix	12.5	1x
TREC's Fwd	1.0	0.8 pM
TREC's Rev	1.0	0.8 pM
Sonda TREC's	1.5	0,2 pM
Actina Fwd	1.0	0.8 pM
Actina Rev	1.0	0.8 pM
Sonda Actina	1.5	0,2 pM
DNA	5.0	1 ng/mL
H ₂ O	0.5	----
Vol. Final (mL)	25.0	----

Cuadro 10 Programa de PCR tiempo real para la amplificación de β -actina y TREC's.

Etapa	Núm. Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Holding stage	1	50°C	15 min
Desnaturalización	1	95	10 min
PCR	40	95	15 s
		60	1min

Con las reacciones dúplex, los primeros ensayos mostraron un comportamiento adecuado (Fig. 6), sin embargo el plásmido de β -actina en ensayos posteriores se mostró inestable, lo que tuvo en consecuencias en la reproducibilidad del ensayo; adicionalmente el sistema dúplex en tiempo real, para β -actina y TREC's no fue posible realizarlo, ya que la reacción de β -actina inhibía la reacción de TREC's (datos no mostrados), razones por las que se decidió dejar de usar a la β -actina como gen control y se sustituyó por un sistema comercial de cuantificación basado en la expresión del gen RNaseP de Applied Biosystems.

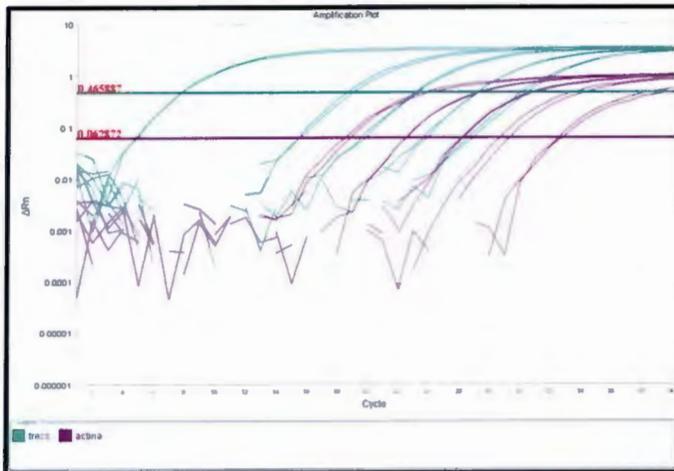


Fig. 6 Curva de calibración de β -actina y TREC's. Amplificación de las diluciones estándar del plásmido con la secuencia de TREC's (verde) y β -actina (morado).

Otro aspecto importante a controlar es el almacenamiento y estabilidad de las diluciones del plásmido estándar. Ya que de su adecuada conservación depende la reproducibilidad y confiabilidad de la prueba.

Las diluciones que se tienen en uso, se mantienen en refrigeración, mientras que las se tienen de reserva y las que constituyen la dilución madre para preparar nuevamente las diluciones seriadas de la curva, se mantienen a -80°C.

Para evaluar la estabilidad de los estándares de cuantificación de PCR se realizaron reacciones para cada alícuota que se encontraban en las diferentes condiciones de almacenamiento ya descritas.

Como puede observarse en el gráfico 6 las alícuotas que se mantuvieron en agua grado biología molecular y refrigeradas durante 24 h tienen mejor reproducibilidad entre replicas de la misma dilución y por ende se observa menor variabilidad entre cada reacción, y ese comportamiento se observa durante los primeros 3 días, después del 4 día se observa en las alícuotas mas concentradas ($2 \times 10^6, 2 \times 10^5, 2 \times 10^4$ y 2×10^3 copias/mL) como la curva cada dilución retrasa en un ciclo de PCR la amplificación del plásmido estándar, hasta que una semana después esas mismas diluciones se retrasaron en promedio 3 ciclos el umbral de detección lo cual representa perder 10 veces la concentración original de cada alícuota. (Fig. 7)

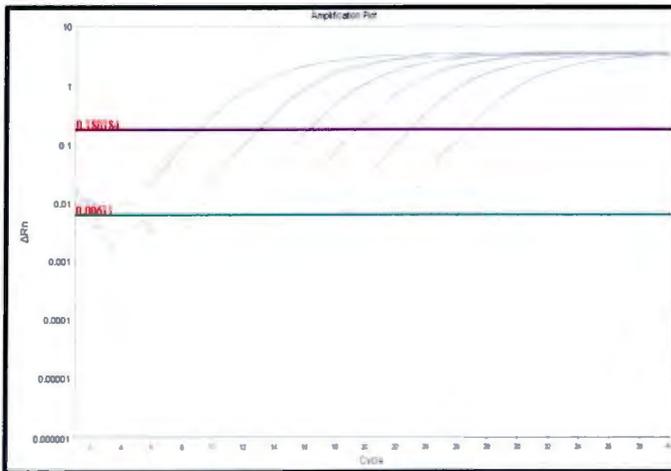


Fig. 7 Curva de calibración de TREC's (2×10^8 - 2×10^3 copias/mL). Las curvas de amplificación corresponden a las diluciones del plásmido estándar de TREC's reconstituido en agua grado biología molecular y que se mantuvieron en refrigeración durante 24h.

Adicionalmente las alícuotas más diluidas (100 y 10 copias/mL) se ven afectadas en el sentido opuesto, con lo que la razón de cambio en lo que se refiere a los ciclos de amplificación entre cada alícuota se reduce, con lo que ya no es posible detectar con confiabilidad, número de copias de TREC's por debajo de 1000 copias que es justo el intervalo dinámico de detección de TREC's de las muestras de recién nacidos. (Fig.8)

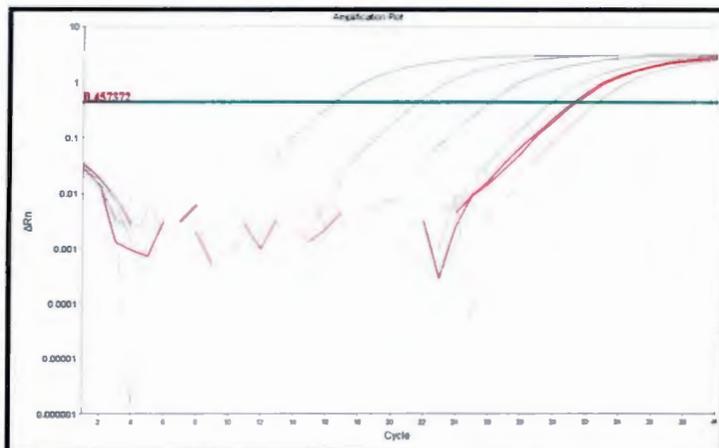
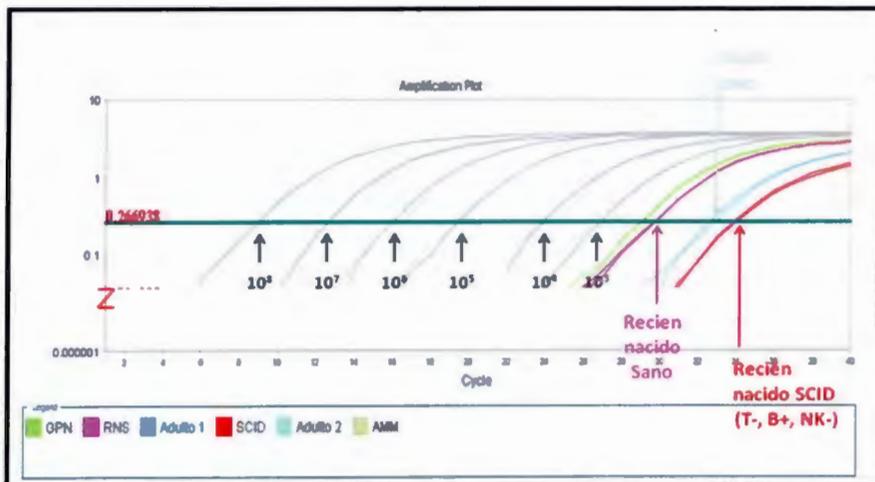


Fig. 8 Curva de calibración de TREC's (2×10^7 - 2×10^2 copias/mL). Las curvas de amplificación corresponden a las diluciones del plásmido estándar de TREC's reconstituido en agua grado biología molecular y que se mantuvieron en refrigeración durante 7d. La línea en rojo corresponde a la curva de amplificación de la dilución 2×10^2 copias/mL.

Por esta razón se vio la conveniencia de utilizar el regulador Tris/EDTA pH=8.0 para reconstituir y almacenar todas las alícuotas de plásmido estándar. Con esta modificación se logra mantener por más de 3 semanas la estabilidad de cada dilución, conservando la reproducibilidad de cada punto de la curva de calibración entre cada ensayo y entre cada replica.

Finalmente para poner a prueba la muestra se realizó un experimento de cuantificación de TREC's en muestras de DNA que se obtuvo de sangre fresca de un recién nacido sano, paciente diagnosticado con SCID y un adulto sano.

Como se puede observar en la siguiente figura las muestras del adulto sano y del recién nacido diagnosticado con SCID amplifican a en los ciclos finales de la reacción, por el menor número de copias que tienen, aun así la muestra del niño con SCID (ciclo 34) es la última en amplificar, este resultado contrasta con las muestras de recién nacidos sanos, en donde observamos que dichas muestras amplifican alrededor de los ciclos 28 y 29 (ver cuadro 11)



GPN: Recién nacido sano
 RNS: Recién nacido sano
 SCID: Paciente con Inmunodeficiencia combinada severa
 AMM: Paciente con academia metimalónica

Fig. 9 Cuantificación de TREC's en muestras de sangre fresca. En esta prueba se incluyen muestras de sangre de un recién nacido diagnosticado con SCID (rojo), una muestra de adulto sano (azul) y recién nacidos sanos (verde y rosa).

Cuadro 11 Resultados de la cuantificación de TREC's en muestras de sangre fresca.

Muestra	Ciclo	Núm. TREC's
SCID	33.95	230.65
Adulto Sano	32.78	544.9
RNS 1	29.75	4775
RNS 2	29.01	7850

CONCLUSIONES

La inmunodeficiencia combinada severa es una inmunodeficiencia primaria grave, que requiere de la realización de un diagnóstico y tratamiento oportuno para evitar la muerte temprana de estos paciente así como los gastos relacionados, la implementación de tamiz neonatal para su diagnóstico mediante la cuantificación de TREC's, permite mejorar las condiciones para realizar una detección oportuna de los casos.

En México no existe el tamiz neonatal para la detección de SCID, por lo que su implementación cambiara radicalmente el pronóstico de estos pacientes. Mediante este estudio se ha desarrollado un método de cuantificación de TREC's confiable y reproducible, y es la primera fase de una línea de investigación sobre el diagnóstico oportuno de pacientes con SCID. Se vuelve indispensable el validar el método y hacer la correlación clínica con los resultados.

Si bien las condiciones de trabajo que aquí se han establecido, nos permiten contar con un método confiable, factores como el tipo de muestra (gotas de sangre seca en papel filtro), el método de extracción que se requiera y el cambio de reactivos para la extracción del material genético, representan un reto importante en el proceso de consolidar una prueba de diagnóstico temprano de SCID, y la única forma de establecer con toda confianza ese método es hacer el seguimiento de los resultados del laboratorio con la clínica de seguimiento del paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nima Rezaei FAB, Kathleen E. Sullivan, Esther de Vries, and Jordan S. Orange. An Introduction to Primary Immunodeficiency Diseases. In: Nima Rezaei AA, Luigi D. Notarangelo, editor. Primary Immunodeficiency diseases. Berlin: Springer; 2008. p. 1-37.
2. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S24-32. Epub 2009/11/26.
3. Robert R. Rich M, Thomas A Fleisher, MD, William T. Shearer, MD, PhD, Harry Schroeder, Anthony J. Frew, MD, FRCP and Cornelia M. Weyand, MD, PhD. *Cinical Immunology*. 4th ed: Elsevier; 2013 2013.
4. Abbas AK LA, Pillai S. Inmunología celular y molecular. In: Abbas AK LA, Pillai S., editor. *Inmunología Celular y molecular*. 6 ed: Elsevier; 2007. p. 463-88.
5. Cossu F. Genetics of SCID. *Italian journal of pediatrics*. 2010;36:76. Epub 2010/11/17.
6. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000;355(9218):1875-81. Epub 2000/06/24.
7. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S182-94. Epub 2010/01/01.
8. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(4):776-94. Epub 2007/10/24.
9. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*. 2011;2:54. Epub 2011/01/01.
10. Leiva LE, Zelazco M, Oleastro M, Carneiro-Sampaio M, Condino-Neto A, Costa-Carvalho BT, et al. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry. *J Clin Immunol*. 2007;27(1):101-8. Epub 2006/12/28.
11. Glanzmann E, Riniker P. [Essential lymphocytophthisis; new clinical aspect of infant pathology]. *Ann Paediatr*. 1950;175(1-2):1-32. Epub 1950/07/01. Essentielle Lymphocytophthise; ein neues Krankheitsbild aus der Sauglingspathologie.
12. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1968;2(7583):1366-9. Epub 1968/12/28.
13. Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(2):391-8. Epub 2005/02/08.
14. Fischer A NL. Combined Immunodeficiencies. In: Stiehm ER OH, Winkelstein JA, editor. *Immunologic Disorders in Infants and Children*. 5 ed: Elsevier; 2004. p. 447-79.

15. Lindegren ML, Kobrynski L, Rasmussen SA, Moore CA, Grosse SD, Vanderford ML, et al. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders. *MMWR Recomm Rep.* 2004;53(RR-1):1-29. Epub 2004/01/16.
16. McGhee SA, Stiehm ER, McCabe ER. Potential costs and benefits of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Pediatr.* 2005;147(5):603-8. Epub 2005/11/18.
17. Ryser O, Morell A, Hitzig WH. Primary immunodeficiencies in Switzerland: first report of the national registry in adults and children. *J Clin Immunol.* 1988;8(6):479-85. Epub 1988/11/01.
18. Puck JM. Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps toward implementation. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2007;120(4):760-8. Epub 2007/10/13.
19. Coria-Ramírez E E-PS, Espinosa-Rosales F, Vargas-Camaño ME, Blancas-Galicia L. Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México. *Rev Alerg Mex* 2010;57(5):159-63.
20. Puck JM. Severe combined immunodeficiency: new advances in diagnosis and treatment. *Immunol Res.* 2007;38(1-3):64-7. Epub 2007/10/06.
21. A. LDFMDHNSNAKPLERCF. Combined T and B cell immunodeficiencies. In: L. RNAAN, editor. *PRIMARY IMMUNODEFICIENCY DISEASES.* 1 ed. Berlin: Springer; 2008. p. 39-95.
22. Huang H, Manton KG. Newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID): a review. *Front Biosci.* 2005;10:1024-39. Epub 2005/03/17.
23. Dvorak CC, Cowan MJ. Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency disease. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(2):119-26. Epub 2007/10/31.
24. Verbsky J, Thakar M, Routes J. The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2012;129(3):622-7. Epub 2012/01/17.
25. Buckley RH. The long quest for neonatal screening for severe combined immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2012;129(3):597-604; quiz 5-6. Epub 2012/01/27.
26. Puck JM. Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: the winner is T-cell receptor excision circles. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2012;129(3):607-16. Epub 2012/01/31.
27. Puck JM. Neonatal screening for severe combined immune deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7(6):522-7. Epub 2007/11/09.
28. Economic Impact Study. Comparing undiagnosed and diagnosed patients with primary immunodeficiencies. [database on the Internet]. 2007.

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“DETECCION OPORTUNA DE LA INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA ATRAVÉS DE UN TAMIZ NEONATAL EN RECIÉN NACIDOS SANOS”

México, D.F a ___ de _____ de 20__.

Estimado señor(a):

Investigadores del Instituto Nacional de Pediatría, realizan un estudio de investigación sobre el diagnóstico temprano de inmunodeficiencia combinada severa (IDCS) (una enfermedad grave y mortal, si no se diagnostica en sus inicios, que afecta el sistema inmune de los niños). El propósito de este estudio es diagnosticar al nacimiento dicha enfermedad a través de la medición de TREC's (fragmentos de DNA que se liberan cuando los linfocitos T, que son células del sistema inmune, se forman) en un tamiz neonatal. El número de TREC's se encuentra disminuido en los niños con IDCS, sin embargo el número de TREC's y su relación con la cuenta de linfocitos T, en cordón umbilical y talón en niños sanos, se desconoce.

Si usted desea colaborar, aceptando que su hijo(a) _____ participe en nuestro estudio, le pediremos lo siguiente:

1. Una muestra de sangre de un mililitro tanto de cordón umbilical, como del talón.
2. Gotas de sangre para llenar 5 círculos de 1.3 cm de diámetro que se colocarán sobre tarjeta de Guthrie (tarjeta para tamiz) tanto de cordón umbilical, como del talón.
3. La sangre se obtendrá mediante punción percutánea con lanceta estéril y desechable (con una lanceta se punciona la piel del talón y se obtiene la muestra de sangre). La cantidad de sangre extraída no representa ningún riesgo para su hijo.

4. La muestra que se obtiene de cordón umbilical se realiza mediante punción del mismo sin que esto represente riesgo para su hijo.
5. Las molestias que su hijo(a) tendrá son mínimas por la extracción de sangre. Estas molestias son pequeño moretón en el sitio de la punción, que no se pueda extraer la sangre en el primer intento, dolor en el sitio de la punción; estos se resolverán con las indicaciones del médico en término de una o 2 semanas.

El beneficio que esperamos tener al llevar a cabo este proyecto, es establecer cuál es el nivel de TREC's y su correlación con la cuenta de linfocitos T en niños sanos. Ni usted ni su hijo(a) recibirán pago alguno por participar en este estudio, pero tampoco representará ningún costo para usted. Sin embargo usted conocerá los resultados de su hijo en cuanto a cuenta de linfocitos totales, linfocitos T y TREC's de cordón umbilical y talón.

En caso de colaborar con nosotros, las muestras se tomarán al nacimiento y los resultados de su hijo (a) se le notificarán en cuanto estén listo.

Usted no está obligado a participar en este estudio y puede retirarse en cualquier momento. Si Usted decide no participar, su relación con los doctores o el INP no cambiará de ninguna manera y seguirá recibiendo los mismos tratamientos y cuidado médico disponible en la clínica u hospital.

Esta forma, es un consentimiento que explica el estudio de investigación a realizar. Por lo que solicitamos, lo lea con detenimiento. Pregunte cualquier cosa que Usted no comprenda. Si no tiene preguntas en este momento, puede hacerlas posteriormente.

Si Usted tiene alguna pregunta puede comunicarse con el investigador principal, la **Dra. Sara Elva Espinosa Padilla**, al 10 84 09 00 EXT 1701 del INP. En el Hospital Gea González podrá comunicarse con el **Dr. Rafael Figueroa Moreno** al 54 24 48 47 ó con el **Dr. Simón Kawa Karasik** 55 28 42 28.

Nosotros mantendremos la información de este estudio confidencial y privada dentro de los límites de la ley. Bajo ciertas condiciones, las personas responsables de asegurar que

las investigaciones se hacen apropiadamente podrían revisar los registros del estudio. Estas personas están también obligadas a mantener su identidad

confidencial. De otra manera, cualquier información que lo identifique no será dada a personas ajenas al trabajo del estudio sin su permiso, o a menos que Usted autorice.

Su firma o huella abajo significa que Usted comprende la información que le hemos dado acerca del estudio y de esta autorización. Si Usted firma esta autorización significa que Usted está de acuerdo con participar en el estudio.

Atentamente

Padre o tutor

Testigo 1

Nombre: _____

Domicilio: _____

Parentesco: _____

Testigo 2

Nombre: _____

Domicilio: _____

Parentesco: _____

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador.

I N P
CENTRO DE INFORMACION
Y DOCUMENTACIÓN