



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

## **TESIS**

**ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE TREC'S PARA LA DETECCIÓN  
OPORTUNA DE INMUNODEFICIENCIA  
COMBINADA SEVERA POR MEDIO DE LA PRUEBA DE TAMIZ NEONATAL  
EN RECIEN NACIDOS SANOS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
CURSO DE POSGRADO DE ALTA ESPECIALIDAD EN MEDICINA  
INMUNODEFICIENCIAS**

**PRESENTA**

**DRA. SELMA CECILIA SCHEFFLER MENDOZA**

**TUTORA**

**DRA. SARA ELVA ESPINOSA PADILLA**

**TUTOR METODOLÓGICO**

**DR. ALEJANDRO GABRIEL GONZÁLEZ GARAY**



México, Distrito Federal, Febrero 2014

ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE  
TREC'S PARA LA DETECCIÓN  
OPORTUNA DE INMUNODEFICIENCIA  
COMBINADA SEVERA POR MEDIO DE LA  
PRUEBA DE TAMIZ NEONATAL EN  
RECIEN NACIDOS SANOS

RESIDENTE

SELMA CECILIA SCHEFFLER MENDOZA

TUTOR

DRA. SARA ELVA ESPINOSA PADILLA

TITULO DE LA TESIS

"ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE TREC'S PARA LA  
DETECCIÓN OPORTUNA DE LA INMUNODEFICIENCIA  
COMBINADA SEVERA POR MEDIO DE LA PRUEBA DE TAMIZ  
NEONATAL EN RECIEN NACIDOS SANOS"

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ROSAURA MARGARITA ROSAS VARGAS

DIRECTORA DE ENSEÑANZA

  
\_\_\_\_\_  
DR. LUIS MARTIN GARRIDO GARCIA

JEFE DE DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO

  
\_\_\_\_\_  
DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA ROSALES

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE  
ALTA ESPECIALIDAD EN INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

  
\_\_\_\_\_  
DRA. SARA ELVA ESPINOSA PADILLA

TUTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
DR. ALEJANDRO GABRIEL GONZALEZ GARAY

ASESOR METODOLOGICO



## AGRADECIMIENTOS

Gracias a cada una de las personas que me ha ayudado a concluir esta etapa de mi vida, ya que sin todos ustedes no lo hubiera logrado, por ser ejemplo de ser cada día mejor.

Gracias por la oportunidad que se me ha brindado, la confianza, tolerancia, e inspiración.

A mi familia por estar conmigo en todo momento con su amor incondicional

A los pacientes que me ponen retos día a día y que son la razón de nuestro esfuerzo.

# ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE TREC'S PARA LA DETECCIÓN OPORTUNA DE INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA POR MEDIO DE LA PRUEBA DE TAMIZ NEONATAL EN RECIEN NACIDOS SANOS

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

Las inmunodeficiencias primarias representan un grupo de enfermedades en las cuales existen defectos en el sistema inmunitario lo que condiciona un espectro de manifestaciones, de estas las inmunodeficiencias combinadas severas (de sus siglas en inglés *Severe Combined Immunodeficiency*, SCID) presentan defecto tanto en la inmunidad humoral como en la celular, ocasionando susceptibilidad a infecciones por toda clase de microorganismos. La demora en el diagnóstico y en el tratamiento adecuado de 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 las 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 disminuida 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 tamiz neonatal para detección de SCID.

### OBJETIVO

Medir la concentración de TREC's en una población de recién nacidos sanos. Medir la concentración de TREC's en pacientes con sospecha clínica de SCID.

### METODOLOGÍA

Se tomaron muestras de 600 recién nacidos sanos y de 2 pacientes con SCID, a los cuales se le realizaron RT-qPCR de TREC's y  $\beta$ -actina, así como la extracción de ADN.

### RESULTADOS

Se recolectaron muestras de 600 recién nacidos sanos, se encontraron valores de TREC's de 36-2670 copias/ $\mu$ L, una media de 431 copias / $\mu$ L y el percentil 25-75 se encuentra entre 237-719 copias/ $\mu$ L. En los 2 pacientes con sospecha clínica de SCID se cuantificaron, un total de 7 y 0 copias/ $\mu$ L.

### CONCLUSIONES

La inmunodeficiencia combinada severa es una emergencia pediátrica que puede ser diagnosticada en el periodo presintomático mediante la realización del tamiz neonatal con la cuantificación de TREC's. Mediante la estandarización y validación del método de cuantificación de TREC's se logró realizar el tamizaje en recién nacidos sanos, de los cuales no se detectó ningún caso de SCID, pero es necesario continuar con el estudio para captar un mayor número de pacientes. Se logró establecer un método confiable y se corroboró que en los pacientes con sospecha clínica de SCID presentan un número disminuido de TREC's. Con estos resultados podemos concluir que es un método que se podrá ofrecer para un diagnóstico oportuno y correcto en esta IDP.

# ÍNDICE

ANTECEDENTES	
Sistema Inmunitario	7
Inmunodeficiencias primarias.	10
Clasificación.	11
Epidemiología de inmunodeficiencias primarias	11
Inmunodeficiencia combinada severa.	12
Clasificación	12
Epidemiología inmunodeficiencia combinada severa	14
Etiología.	15
Fisiopatología.	15
Cuadro clínico.	16
Diagnóstico.	20
Tamiz Neonatal.	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
METODOLOGÍA	28
Clasificación de la Investigación	28
Material y métodos	28
Criterios de Selección de los pacientes	29
Definición operacional de las variables	29
Consideraciones éticas	30
RESULTADOS	31
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

## ANTECEDENTES

### SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario es un sistema complejo y especializado constituido por células, órganos y moléculas que tienen importantes funciones en el organismo, entre las principales son la protección contra microorganismos patógenos y / o toxinas externas, discriminación entre lo propio y lo extraño y el reconocimiento de células neoplásicas.

El organismo tiene varias líneas de defensa contra patógenos que pueden ser anatómicas, mecánicas, físicas y químicas, cuando alguna de estas falla pueden ser atravesadas por microorganismos patógenos, por lo cual el sistema inmunitario iniciara mecanismos de defensa para neutralizar y destruirlos. 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 dos niveles: 1) respuesta inmune innata y 2) respuesta inmune adaptativa.[2] Cuando cualquiera de estos sistemas falla el organismo esta predispuesto a cursar con inmunodeficiencia.

El *sistema inmunitario 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.

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]

Entre los principales elementos de este sistema encontramos dos tipos de respuesta la innata humoral y celular. En la primera encontramos moléculas 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. Ex 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]

El *sistema inmunitario adaptativo* es una respuesta altamente específica que se desencadena secundaria a un patógeno en particular que como consecuencia prepara a la organismo para una protección de larga duración, lo que puede eliminar o destruir a patógenos invasores y a las toxinas que producen. [3]

Las principales características son *especificidad*, debido a que va dirigida directamente a una molécula antigénica. *Memoria*, existe un reconocimiento y un incremento en la intensidad de la respuesta ante los siguientes contactos con el mismo antígeno. *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]

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]

En la médula ósea se encuentra la célula madre linfoide pluripotencial que será la que dará origen a los Linfocitos T. La diferenciación del linfocito T se presenta en varias etapas, primero ocurre en el hígado fetal, luego en médula ósea y finalmente en el timo, donde los precursores de linfocitos T son llamados linfocitos T doble negativos, (CD34+, CD3-, CD4- y CD8-) [3].

En el timo los LT realizan el rearreglo de su receptor de antígeno específico (TCR) y expresan CD3 y TCR en la superficie. [3]. Los linfocitos T circulantes presenta en el 95% cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha\beta$ TCR+) y los linfocitos T doble negativos expresan un TCR alterno compuesto de cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  ( $\gamma\delta$ TCR+) 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]

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

El gen que codifica el TCR esta 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 ocurre al azar y baja estricta regulación.

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. [5]

### **INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS.**

El término de inmunodeficiencias se ha utilizado para describir la ausencia o mala función de algún componente del sistema inmunitario [1].

Las *inmunodeficiencias primarias* (IDP's), son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que afectan uno o más componentes del sistema inmunitario alterando su desarrollo, función o ambos [6]. Las IDP's tienen una mayor incidencia 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, que permite reconocerlas y diagnosticarlas además existe una susceptibilidad incrementada a infecciones y predisposición a enfermedades alérgicas, inflamación crónica y sistémica, enfermedades autoinmunes y neoplasias [1].

Actualmente se han identificado más de 150 genes, involucrados en más de 200 fenotipos de presentación de IDP's [7], lo que conduce a un amplio espectro de manifestaciones. La mayor incidencia se ha reportado en la infancia, pero también existen casos diagnosticados en edades adultas. [1].

La clasificación de estas enfermedad depende del componente del sistema inmunitario que esta afectado, y de acuerdo a esto la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS de sus siglas en inglés) cada dos años realiza una revisión de todos los defectos genéticos identificados como causa de IDP y los clasifica, actualmente estan agrupados en 8 grandes grupos, de acuerdo a la última revisión realizada en 2011 [8]

## 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

### EPIDEMIOLOGÍA DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

Aproximadamente 1 en 10,000 individuos tiene algún tipo de inmunodeficiencia pero varía según el defectos en sistema inmunitario involucrado, siendo la más frecuente la inmunodeficiencia selectiva de IgA, cuya incidencia varía entre diferentes países y grupo racial siendo entre 1:400-800 individuos [9].

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 [9].

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 [9] 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.

En las inmunodeficiencias combinadas graves (SCID de sus siglas en inglés *Severe Combined Immunodeficiency*) existen defectos tanto en la inmunidad humoral como en la celular y existe susceptibilidad 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 [6].

La primera descripción de un niño con SCID fue hecha en 1950 por Glanzmann E. y Riniker [10]. El primer trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en un paciente con SCID se realizó en 1968, logrando reestablecer la función inmune [11].

### CLASIFICACIÓN

Dentro de la clasificación de la IUIS en conjunto con la Organización Mundial de la Salud, en la última revisión, realizada en 2011 [8] 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 $\gamma$ común	Ligada a X	Defecto en receptor de cadena $\gamma$ 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 $\alpha$	AR	Defecto en cadena $\alpha$ de IL-7
d) Deficiencia CD 45	AR	Defecto en CD 45
e) Deficiencia de CD3 $\delta$ /CD3 $\epsilon$ /CD3 $\zeta$	AR	Defecto en las cadenas del complejo de receptor de células T CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ o CD3 $\zeta$
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 adenilato 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 hipomorficas en RAG 1, 2, Artemis, IL7Ra, 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 homologos ( 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 dendriticas
Deficiencia CD-40	AR	Defectos en CD-40 ocasionan cambio de isotipo defectuoso y alteraciones en señalación de células dendriticas
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 $\alpha$ de CD8
Deficiencia de ZAP-70	AR	Defecto en la señalización de ZAP- 70 cinasa
<b>Deficiencia canales de Calcio</b>		
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 N1</i> codificado por FOXN1.
Síndrome de DiGeorge completo	Autosómica Dominante (AD)	Delección 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 cartilago 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 40 000 a 75 000 nacidos vivos a nivel mundial (5),[12-15]. En América Latina se ha reportado una incidencia de 1.28 a 3.79 casos por 100 000 nacidos vivos[9]. 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 [16].

Se estima que en Estados Unidos de Norteamérica se presentan 100 casos nuevos anualmente [17]; mientras que para el caso de México se calcula una incidencia mínima de 0.16 a 0.24 por cada 100 000 nacimientos. [18]

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*

Al menos 18 genes al sufrir mutación causan SCID; siendo estos responsables de la codificación de receptores de la superficie celular y moléculas de señalización del receptor de linfocitos T y B entre los que destacan IL2R $\gamma$ , JAK3, IL7R, CD45, componentes del CD3, FOXP1, 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. [19]

## FISIOPATOLOGÍA

De acuerdo al tipo de mutación de los productos de los genes presentada ya sea por ausencia de función o que esta sea alterada serán las manifestaciones, y estas dependen del rol bioquímico de los productos, genes afectados y las células o los tejidos en los cuales se expresan. Además también es importante la interacción de los productos de los genes, polimorfismos y factores ambientales [1][6]. En el cuadro 2 se muestran los principales mutaciones involucradas en SCID.

El desarrollo y función de linfocitos T esta gravemente comprometido en todas las formas de SCID, 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. [20]

## CUADRO CLÍNICO

Las manifestaciones en todas las formas de presentación de SCID son similares, a pesar de la heterogeneidad de defectos genéticos reportados. La edad de presentación es en etapas tempranas de la vida, entre el tercer y sexto mes.

Las principales y primeras manifestaciones son procesos infecciosos entre los principales tenemos la eventos diarrea crónica, neumonía intersticial y/o candidiasis mucocutánea. Los principales gérmenes etiológicos son los oportunistas como *Pneumocystis jiroveci* o *criptosporidium*, bacterias intracelulares y virus.

La infecciones de tracto respiratorio son comunes, existe una falla para la eliminación de virus lo que conduce a bronquiolitis persistente. Pueden cursar con infecciones virales ocasionadas por adenovirus, citomegalovirus, Epstein-Barr virus, rotavirus, norovirus, virus sincial respiratorio, varicela zoster, herpes simplex, influenza y parainfluenza 3 que pueden ser en ocasiones fatales. [21]

Otras de las manifestaciones frecuentes son falla de medro, al nacimiento puede ser normal pero existen constantes pérdidas por diarrea e infecciones, en los pacientes con SCID se presenta un gasto de energía en reposo incrementado lo que puede contribuir a la falla de medro.[21]

La afección a nivel cutáneo con una gran diversidad de lesiones, la más frecuente es rash cutáneo que puede reflejar enfermedad injerto contra huésped ocasionada por transferencia de células T maternas o daño tisular provocado por infiltración de linfocitos T autólogos activados.

Estos pacientes pueden tener una enfermedad grave o fatal por vacuna de organismos atenuados como vacuna de polio oral, rotavirus, varicela, Bacille Calmette-Guerin.[21]

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	T-B+NK-	IL2RG	Cadena Y común.	Es compartida por los receptores de IL-4, IL-7, IL-9,	



común				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-7Ra	T-B+NK+	IL 7Ra	Cadena u del receptor TSLP (linfopoyetina tímica estromal) e IL-7	IL-7 es un factor de desarrollo del crecimiento de células T.	
<b>Defectos en receptor de células pre-T</b>					
<i>a) Defectos en la recombinación V(D)J</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 homóloga) a nivel de la recombinación V(D)J	Radiosensibilidad, facies dismórfica, microcefalia, retraso en crecimiento, retraso psicomotor.
<i>b) Alteración en la señalización a través de receptor de células pre T</i>					
Defecto 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 ε	T-B+NK+	CD3E	CD3 ε		
Defecto ζ	T-B+NK+	CD3Z	CD3 ζ		
Defecto γ	T-B+NK+	CD3G	CD3 γ		
Defecto	T-B+NK+/-	PTPR	CD45 ( LCA,	Proteína fosfatasa fosfotirosina	

CD45		C	antígeno común leucocitario)	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 las transducción de señal del TCR	
Defecto P56lck	T-B+NK+	LCK	P56lck	Participa en la señalización de CD3-TCR	
<b>Aumento de la apoptosis de linfocitos</b>					
Disgenesia reticular	T-B-NK-	AK2	Cinasa 2 adenilato	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
<b>Defectos en la embriogénesis del Timo</b>					
Síndrome WHN	T-B+NK-	WHN	FOXP1	Factor de transcripción expresado en epitelio tímico y piel.	Alopecia, defectos del tubo neural.
<b>Anomalía DiGeorge completo</b>					
Síndrome DiGeorge (deleción 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 cardíacos congénitos y otras malformaciones, hipocalcemia neonatal, ausencia de glándulas paratiroides
<b>Alteración en el flujo de calcio</b>					
Defecto	T+B+NK+	ORAI	ORAI 1	Proteínas para el flujo y	Miopatía, displasia

<b>ORAI1</b>		1		transducción de señal mediante el calcio.	ectodérmica
<b>Defecto STIM1</b>	T+B+NK+	STIM1	STIM1		Miopatía, displasia ectodérmica, autoinmunidad
<b>Otros mecanismos:</b>					
<b>Defecto coronina-1A</b>	T-B+NK+	CORO1A	Coronina-1A	Proteína reguladora de las estructuras celulares de actina, citoesqueleto y transporte de membranas	
<b>Defecto de MHC clase II</b>	T+B+NK+ CD4- CD8+	CIITA	CIITA	Proteínas codificantes de factores que regulan promotores y transcripción de HLA DR, DP, DQ	
		RFXA	RFXANK		
		RFX5	RFX5		
		RFXA	RFXAP		
<b>Defecto hipoplasia cartilago cabello</b>	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 [6]. Entre otras manifestaciones se encuentran los datos de autoinmunidad, como anemia hemolítica, purpura trombocitopenica autoinmune.

Algunas pueden cursar con fenotipos característicos presentando microcefalia, manifestaciones neurológicas, hipotonía, ataxia, retraso psicomotor, sordera, anormalidades esqueléticas entre otros.

El pronóstico en la mayoría de los pacientes es fatal si no se realiza un diagnóstico y tratamiento oportuno. El desenlace fatal puede ser secundario a complicaciones graves por la respuesta inadecuada del organismo a tratamiento convencionales contra las infecciones graves y recurrentes. [19], [17] [12, 22].

## DIAGNÓSTICO

Los pacientes al nacimiento puede estar asintomáticos, dado que en esta etapa de la vida están protegidos por el sistema inmunitario materno, es hasta los 3 meses de edad aproximadamente que se pueden presentar las manifestaciones clínicas y es cuando se inicia un abordaje diagnóstico. Existen datos en el interrogatorio e historia clínica que pueden dar datos de sospecha, entre ellos los principales son el antecedente de infecciones desde los primeros meses de vida sobretodo por gérmenes oportunistas, las cuales suelen ser de curso grave y prologado con una pobre respuesta a los antibióticos. Hallazgos importantes en la biometría hemática es la presencia de linfopenia y en los estudios paraclínicos y exploración clínica es ausencia de tejido linfoide. Además es importante la realización de una historia clínica detallada para investigar datos de antecedentes familiares de muertes tempranas por procesos infecciosos. Finalmente se puede establecer un diagnóstico específico mediante el estudio molecular con la identificación de mutación en el gen que codifica para la proteína afectada.

Existen criterios diagnósticos para establecer un diagnóstico de SCID, entre los que mas se han utilizados son los de Consorcio de Tratamiento en IDP que ayuda para la clasificación e inicio de tratamiento. estableciendo las siguientes categorías [23, 24].

- a) SCID típico: Ausencia o disminución de linfocitos T autologos ( Linfocitos T CD3+ <300/ $\mu$ L) en sangre periférica y ausencia o baja función de linfocitos T (<10% del límite normal bajo) en respuesta a la estimulación con PHA o Linfocitos T de origen materno presentes.
- b) Leaky SCID: -Número de Linfocitos T disminuidos; en pacientes hasta de 2 años, < 1000 / $\mu$ L; en mayores de 2 años hasta 4 años, <800 / $\mu$ L, en mayores de 4 años, < 600 / $\mu$ L. - Ausencia de injerto materno; - Función de linfocitos T < 30% del limite bajo ( medido con la respuesta a PHA).
- c) Síndrome de Omenn: eritrodermia, adenopatía, linfocitos T oligoclonales, mutaciones hipomorficas de RAG1 y RAG 2. Etc.
- d) Síndrome multisistémico con defectos en linfocitos T con amplio espectro de disgenesia de linfocitos T.

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, con un diagnóstico oportuno se puede ofrecer un tratamiento adecuado tanto de los procesos infecciosos como un tratamiento que restablezca la función del sistema inmunitario, mediante el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas, terapia génica o reemplazo enzimático en el caso de la deficiencia de adenosin deaminasa (23),[25].

Dado el periodo presintomático de estos pacientes se han establecido a lo largo del tiempo diferentes estrategias diagnósticas. En 1997, Buckley y Puck hicieron la primer 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 [26]. Otros de los estudios propuestos son 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. [27]

En el año 2000 Douek y cols. desarrollaron un método que podía ser utilizado para estimar la producción 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 TCRαβ maduras [5]. Esto es posible, gracias a que se emplea a los TREC's denominados dRec-psiJa, que se encuentran en la gran mayoría de los linfocitos circulantes. (Fig. 2)

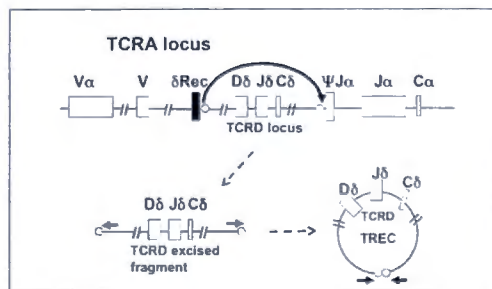


Fig. 2 Generación de TREC's[27]

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 reflejando 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. [27]

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 Trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas o el incremento de TREC's después del inicio de una terapia antiretroviral en pacientes con infección por VIH. [27]

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  $\beta$ -actina. [27]

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 [19, 28], [14], [15], [12]. 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.

## TAMIZ NEONATAL

El tamizaje de recién nacidos inició a principios de 1960 basado en un método propuesto por Robert Guthrie y Ada Susi para la detección de fenilcetonuria, mediante la obtención de gotas de sangre periférica de la punción del talón aplicada en papel filtro a los 2 - 5 días después del nacimiento, estas gotas debían de estar secas y enviadas a laboratorios centrales para el análisis, con lo que se

podieron realizar diagnóstico de manera temprana. La Organización Mundial de la Salud estableció los criterios necesarios para considerar a una enfermedad como candidata para ser parte del tamiz neonatal ( cuadro 3). De estos criterios la SCID, cumple adecuadamente con ellos por lo que ya fue propuesta. [29] La SCID es el primer padecimiento genético del sistema inmunitario que ha sido introducido en el tamiz neonatal y es el primero en utilizar ADN como analito. [23].

CRITERIOS AMPLIADOS DE WILSON-JUNGER	
1. La enfermedad debe de ser un importante problema de salud.	12. La detección del caso debe de poderse reproducir en un método ya existente.
2. Debe de existir un tratamiento aceptado para los pacientes diagnosticados.	13. El proceso de la odisea diagnóstica del paciente y familia debe de ser reducido o eliminado.
3. Deben de estar disponibles facilidades para el diagnóstico y tratamiento.	14. Resultado adversos deben de ser raro ante los casos que sean falsos positivos.
4. Debe de existir un etapa latente o sintomática temprana.	15. El costo del tratamiento debe de ser cubierto por terceras partes ( privada o públicas).
5. Debe de existir un diagnóstico adecuado.	16. El tamizaje puede se rechazado por los padres o tutores.
6. La prueba diagnóstica debe de ser aceptada por la población	17. Debe de estar disponible información y asesoramiento adecuado para los padres o tutores previo a la prueba.
7. La historia natural de la enfermedad debe de estar adecuadamente entendida	18. El tamizado durante el periodo neonatal es critico para un diagnóstico y tratamientos oportunos.
8. Debe de existir una política adecuada para el tratamiento.	19. La infraestructura de Salud Pública debe de poder apoyar todas las fases del tamizaje, diagnóstico e intervenciones.
9. El costo de identificar un caso debe de ser económicamente balanceado en relación al posible gasto en atención médica completa	20. Si se identifican portadores se debe de proveer consejo genético.
10. La detección de un caso debe de ser un proceso continuo.	21. Tratamiento de riesgo y el impacto de pruebas falsas positivas deben de ser explicada a los padres o tutores.
11. Debe de existir una evidencia científica de la efectividad del programa de tamiz y los beneficios deben ser maypres que el daño.	22. Las limitaciones del tamizaje y los riesgos de falsos negativos deben de ser explicados a los padres o tutores.

Cuadro 3 Criterios para inclusión de un enfermedad en el tamiz neonatal

El progreso tecnológico ha permitido la determinación de manera simultánea la detección de varios cientos de metabolitos a partir de muestra de gota de sangre seca a partir de un papel filtro, a además del desarrollo de tecnología para el análisis de ADN y ARN.

En Estados Unidos de América en el 2003 se integraron 29 enfermedades principales y 25 secundarias en el programa de Tamiz Neonatal, afortunadamente se ha integrado a este grupo de enfermedades SCID desde el 2008, a partir de los primeros ensayos en el estado de Wisconsin.

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[26]. En los diversos estudios que se han realizado se ha podido identificar un espectro de diagnósticos, entre los principales se encuentra:

- a. SCID típico
- b. SCID leaky, por mutaciones hipomórficas en genes de SCID típicos.
- c. Variantes de SCID, sin causa genética, con persistencia de 300-1500 células/ $\mu$ L, con una función alterada.
- d. Síndromes con afección de la inmunidad celular variable
  - a. Síndrome de Di George completo
  - b. Síndrome de Di George parcial con linfocitos T bajos.
  - c. Síndrome de CHARGE



- d. Síndrome de Jacobsen
  - e. Trisomía 21
  - f. Mutación dominante interferente de RAC 2
  - g. Síndrome de HiperIgE por deficiencia de DOCK8
  - h. Síndrome Hipoplasia cartilago cabello
- e. Linfopenia de células T secundaria.
- a. Cirugía cardiaca con timectomía
  - b. Leucemia neonatal
  - c. Gastosquisis
  - d. Tercer espacio
  - e. Extremidad extrema
  - f. Infección por VIH.

Todas estas condiciones deben de ser tomadas en consideración ante un resultado de TREC's disminuídos. [23]

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[17, 30].

Además de los beneficios ya mencionados de un diagnóstico oportuno de SCID, la implementación de Tamiz Neonatal ha aumentado los horizontes en búsqueda de pruebas de tamizaje para otras IDP's incluyendo defectos de linfocitos B, mediante la cuantificación de KREC (Círculo de escisión de cadena Kappa de linfocitos B) que es análogo a los TREC's pero en linfocitos B, lo que puede ayudar a la detección de pacientes con agammaglobulinemia congénita y progresivamente se podrán ir buscando otras formas de tamizaje de IDPs. [21]

## 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. En México no existe una prueba de tamiz neonatal para detección de SCID, en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias Primarias, se esta realizando el protocolo para la realización de un Tamiz Neonatal para la detección de esta enfermedad. Esta prueba ya ha sido estandarizada y validada por lo que permite que podamos utilizarla en recién nacidos sanos.

## 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 y que las condiciones clinicas del paciente estan deterioradas. 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.

Al poder identificar paciente con SCID en un periodo pre sintomático se podrán evitar las complicaciones asociadas a un diagnostico tardío, los costos correspondientes a las mismas y se lograra mejorar la sobrevida de estos pacientes, al poder brindarles tratamiento adecuado de forma oportuna. Por lo que el inicio de la implementación del tamiz neonatal mediante la cuantificación de TREC's podrá facilitar la detección de SCID en los primeros niveles de atención sanitaria.

## HIPOTESIS

1.- La incidencia de SCID en recién nacidos del estado de Tabasco durante el periodo comprendido del 01 de enero de 2011 al 31 de diciembre del 2013 mediante la determinación de TRECs será de 1 a 2 casos por cada 60 000 mil nacidos vivos.

2.- El diagnóstico de SCID en pacientes con sospecha clínica podrá ser corroborado mediante la cuantificación de TREC's , la cual deberá ser menor a 25 copias /  $\mu$ L

## OBJETIVOS

### *Objetivo general*

1. Medir la concentración de TREC's en recién nacidos del estado de Tabasco en el periodo comprendido del 01 marzo 2011 al 31 de Diciembre del 2013.
2. Medir la concentración TREC's en paciente referidos con sospecha de SCID al INP, comprendido de marzo- noviembre 2013

### *Objetivos específicos.*

1. Determinar la tasa de incidencia de SCID en recién nacidos del estado de Tabasco en un periodo comprendido del 01 de marzo 2011 al 31 de diciembre del 2013 mediante la determinación de TRECs en GSS sobre tarjeta de Guthrie por PCR en tiempo real.

## **METODOLOGÍA**

### **MATERIAL**

#### **Población estudio**

Recien nacidos sanos del Estado de Tabasco nacidos en el periodo de del 01 de marzo 2011 al 31 de diciembre del 2013 y pacientes del Instituto Nacional de Pediatría con sospecha de SCID..

#### **Análisis de TREC's**

Se analizaron los TREC's con la prueba previamente estandarizada y validada. De las tarjetas de tamiz neonatal se obtuvo un disco de 3.2 mm de una gota de sangre seca. Se extrajo ADN y se realizaron RT-qPCR de TRECs y  $\beta$ -actina.

Los valores de TREC's fueron normalizados a microlitros de sangre basándose que la estimación de cada disco contenía 3  $\mu$ l de sangre.

#### **Clasificación de la Investigación**

Observacional, descriptivo, transversal, prolectivo.

#### **Material y métodos**

#### **POBLACION OBJETIVO:**

Muestras de RN sanos y de pacientes con diagnóstico clínico de SCID

#### **POBLACIÓN ELEGIBLE:**

Recién nacidos mexicanos atendidos en la población de Tabasco en las unidades de primer, segundo y tercer nivel desde el 1 de marzo del 2011 al 30 de diciembre del 2014. Se eligió Tabasco por que es el estado que cuenta con el mejor sistema de detección de casos índice en toda la República Mexicana. Contamos con la autorización del Secretario de Salud para realizar el proyecto. Pacientes con sospecha clínica de SCID del Instituto Nacional de Pediatría.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 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 clínico 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 4

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	Masculin o femenino

<b>Edad</b>	Parte de la vida que transcurre desde el nacimiento hasta un momento dado	Cuantitativa discreta	Días calendario	Días
<b>Edad gestacional (SDG)</b>	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
<b>Peso</b>	Fuerza de gravitación ejercida sobre un cuerpo	Cuantitativa discreta	Báscula	Gramos
<b>TREC's</b>	Círculos de DNA son subproductos del rearrreglo de genes del receptor de linfocitos T en desarrollo	Cuantitativa discreta	PCR en tiempo real	Número de copias
<b>Inmunodeficiencia combinada severa</b>	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
<b>PCR cuantitativa en tiempo real</b>	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

Esté 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.

## RESULTADOS

Durante el periodo de febrero a noviembre 2011, se inició el tamizaje para SCID mediante el análisis de TREC's. Fueron tamizados 600 recién nacidos sanos de los cuales el 100% fueron recién nacidos de término, obteniéndose los siguientes resultados (Fig 2):

Rango de valores de TREC's: 36-2670 copias/ $\mu$ L,

Media de 431 copias / $\mu$ L

Percentil 25-75 se encuentra entre 237-719 copias/ $\mu$ L.

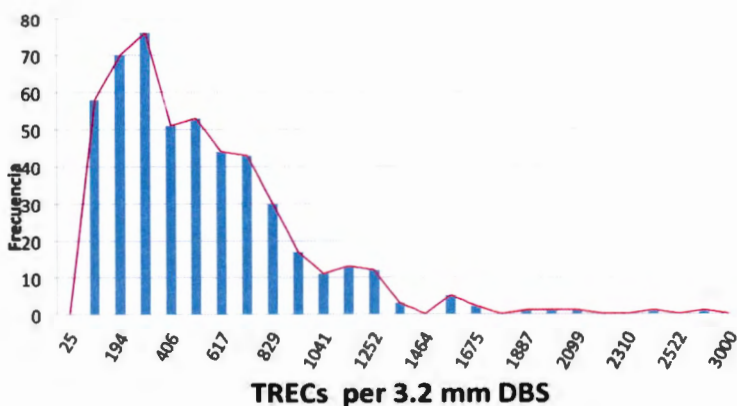


Figura 2. Resultado de valores TREC's

Además durante el periodo de marzo a noviembre del 2013 se analizaron las muestras 2 pacientes con sospecha de SCID, se clasificaron como anormales en la medición inicial, dada la presencia de TREC's disminuidos con un análisis de  $\beta$ -actina normal. Estos 2 pacientes fueron pacientes del Instituto Nacional de Pediatría y fue corroborado el diagnóstico de Inmunodeficiencia combinada grave. ( Cuadro 5)

## Reportes de casos:

**Paciente 1:** Femenina sin antecedente de consanguinidad, originaria de Morelos, nace de embarazo de término a las 38 sdg, referida por infecciones recurrentes desde los 45 días de vida, hospitalizada a los 5 meses de vida por sospecha de bronquilitis, y cuadro de Gastroenteritis y sospecha de alergia a la proteína de la leche de vaca. Enviada a Instituto Nacional a los 6 meses de edad, durante su hospitalización presentó mala evolución con datos de insuficiencia respiratoria requiriendo de ventilación mecánica, lograndose su extubación. Durante el internamiento se inició abordaje diagnóstico, la paciente había cursado con linfopenia persistente, hipogammaglobulinemia con IgG 6.9mg/dL, IgM < 16.9 mg / dL, Ig A < 6.9mg/dL. Por el antecedente de infecciones graves, linfopenia e hipogammaglobulinemia se sospechó en SCID se realizó una citometria de flujo con CD 3: 46% ( 84/ mm<sup>3</sup> ), CD 4: 91.5% (76/ mm<sup>3</sup>), CD 8: 1.81%,( 1/mm<sup>3</sup>) CD19: 0% , 0 , CD 16+56+: 10.1% (19 mm<sup>3</sup>). Se determinaron niveles de TREC's los cuales se encontraron disminuidos en 7 copias/μL. Se sospechó en SCID fenotipo T-B-NK-, con sospecha de Deficiencia de ADA. Fue tratada con profilaxis antibiótica e inmunoglobulina humana sustitutiva. Se inició protocolo de Trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas pero presentó mala evolución y falleció a los 16 meses por sepsis de foco pulmonar.

**Paciente 2:** Paciente masculino originario de Yucatán, sin antecedentes de consanguinidad ni endogamia. Nace de un embarazo normoevolutivo, nace a las 36 sdg, cursó desde el 3er día de vida extrauterina datos de sepsis temprana, con mala evolución requirió de amplio esquema de antibióticos con lo que presentó mejoría y fue egresado a los 7 días. A los 29 días de vida reingresa por cuadro de gastroenteritis y sepsis de foco abdominal, se inició abordaje para descartar SCID, con presencia de hipogammaglobulinemia con niveles de inmunoglobulina con IgA < 26.4 mg/dL, IgM < 17.5 IgG 261 mg/dL e IGE > 4.2 UI/L además de linfopenia persistente e imagen sugestiva por radiografía de tórax de ausencia de sombra tímica. Ante la sospecha de Inmunodeficiencia primaria se inició tratamiento con Inmunoglobulina humana y profilaxis antimicrobiana. Fue referido



a Instituto Nacional de Pediatría a los 2 meses de edad , dentro del protocolo diagnóstico se realizó citometría de flujo con presencia de Linfocitos totales 358 /mm<sup>3</sup>CD 3+:88% ( 315/mm<sup>3</sup>), CD 4+: 36% ( 113/mm<sup>3</sup>), CD 8+ 52% ( 164/mm<sup>3</sup>) CD 19+: no se detecta, CD 16+56+: 3% (11/mm<sup>3</sup>) y determinación de niveles de TREC's resultado en 0 copias. Ante estos hallazgos se corroboró el Diagnóstico de SCID, con el fenotipo de T-B-NK- , se inició protocolo de Trasplante de Células pluripotenciales hematopoyéticas, pero el paciente presentó mala evolución y falleció a los 3 meses de edad.

PACIENTE	SEXO	EDAD DE INICIO DE MANIFESTACIONES	LINFOCITOS TOTALES	CITOMETRIA DE FLUJO					TREC'S (copias/μL)	FENOTIPO	EVOLUCIÓN
				CD3+	CD4+	CD8+	CD19+	CD16+56+			
1	Femenino	45 días de vida	900	46%, 84/mm <sup>3</sup>	91.5% 76/mm <sup>3</sup>	81%, 1/mm <sup>3</sup>	0% , 0	10.1%, 19 mm <sup>3</sup> .	7	T-B-NK-	Falleció.
2	Masculino	3 días de vida	358	88%, 315/mm <sup>3</sup>	36% 113/mm <sup>3</sup>	52% 164/mm <sup>3</sup>	No detectable	3% 11/mm <sup>3</sup>	0	T-B-NK-	Falleció.

Cuadro 5. Características de pacientes con SCID.

## DISCUSION

El programa del tamiz neonatal para detección de SCID se inició en el estado de Wisconsin, EUA en el año 2008 y fue seguido en los estados de Massachusetts, Nueva York, Luisiana y California, en todos los estados realizados se ha podido ofrecer una detección oportuna de casos con SCID, lo cual ha favorecido a un tratamiento oportuno, cambiando a la mejoría el pronóstico y sobrevida de estos pacientes.

En México mediante este estudio se han podido obtener importantes y trascendentes resultados, en primer lugar se logró la estandarización y validación de

la técnica para la cuantificación de TREC's. Se empezó el tamizaje en recién nacidos sanos hasta el momento en este grupo de pacientes no se detectado ningún caso de SCID, ya que la muestra analizada hasta este momento es aún muy pequeña, por lo que es necesario continuar con el estudio para conocer una incidencia real de estos casos. Hasta el momento los pacientes que fueron incluidos en el estudio fueron clínicamente sanos al nacimiento, de término y sin factores de riesgo, por lo que no se encontraron pacientes que pudieran haber dado falsos positivos como los que se han reportado a nivel mundial, como es el caso de pacientes con prematuridad, Síndrome de Down, o malformaciones congénitas en los que se ha detectado linfopenia de células T.

Otro aspecto importante es que mediante la técnica utilizada se pudo corroborar el diagnóstico clínico de SCID en dos paciente referidos al INP con esta sospecha, por lo que lo hace un método confiable, y se puede ofrecer como una herramienta de tamizaje en estos pacientes. Aun es necesario continuar con el trabajo para la detección oportuna de esta patología. Es importante destacar que los 2 pacientes que fueron diagnosticados clínica y para clínicamente con SCID fueron referidos al INP de una manera tardía, lo cual retrasó el diagnóstico, conduciendo a un deterioro clínico, con mayor incidencia de infecciones, falla de medro y complicaciones lo que condujo a un desenlace fatal en ambos pacientes. A lo que nos debe de conducir es que esta herramienta diagnóstica podrá ser útil para un tamizaje de los pacientes en un periodo presintomático con lo que los pacientes podrán llegar en adecuadas condiciones para poder realizar el restablecimiento del sistema inmunitario de manera temprana mediante el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas.

## 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 del tamiz neonatal para su diagnóstico mediante la cuantificación de TREC's, permite mejorar las condiciones para realizar una detección oportuna de los casos.

Mediante este estudio pudimos empezar medición de TREC's en una población de recién nacidos sanos, como parte del tamizaje, con los resultados obtenidos aun no se han diagnosticado pacientes con SCID en esta población, pero se debe de continuar tamizando a más pacientes para poder ofrecer esta herramienta diagnóstica en un futuro a todos los recién nacidos en México como se está realizando ya en otros países con resultados prometedores.

Es importante señalar que dentro de este estudio se incluyeron a pacientes con sospecha de SCID corroborándose con la presencia de un nivel de TREC's disminuidos como lo descrito en la literatura, con lo que podemos concluir que el estudio es confiable y ayudará a la detección de SCID de una manera oportuna y su implementación cambiara radicalmente el pronóstico de estos pacientes.

Un problema al que nos hemos enfrentado es el alto costo que han implicado las primeras fases del estudio para lograr la estandarización y validación de la técnica por lo que esperamos que ya que este objetivo se ha realizado, el procesamiento consecutivo de las siguientes muestras sea aun costo menor, mejorando también los procesos para la obtención y análisis de TREC's.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nima Rezaei, F.A.B., Kathleen E. Sullivan, Esther de Vries, and Jordan S. Orange, *An Introduction to Primary Immunodeficiency Diseases*, in *Primary Immunodeficiency diseases*, A.A. Nima Rezaei, Luigi D. Notarangelo, Editor. 2008, Springer: Berlin. p. 1-37.
2. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.
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, *Clinical Immunology*. 4th ed. 2013: Elsevier.
4. Abbas AK, L.A., Pillai S., *Inmunología celular y molecular*, in *Inmunología Celular y molecular*, L.A. Abbas AK, Pillai S., Editor. 2007, Elsevier. p. 463-88.
5. Douek, D.C., et al., *Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution*. *Lancet*, 2000. **355**(9218): p. 1875-81.
6. Notarangelo, L.D., *Primary immunodeficiencies*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S182-94.
7. Geha, R.S., et al., *Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(4): p. 776-94.
8. Al-Herz, W., 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**: p. 54.
9. Leiva, L.E., et al., *Primary immunodeficiency diseases in Latin America: the second report of the LAGID registry*. *J Clin Immunol*, 2007. **27**(1): p. 101-8.
10. Glanzmann, E. and P. Riniker, [*Essential lymphocytopenia; new clinical aspect of infant pathology*]. *Ann Paediatr*, 1950. **175**(1-2): p. 1-32.
11. Gatti, R.A., et al., *Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency*. *Lancet*, 1968. **2**(7583): p. 1366-9.
12. Chan, K. and J.M. Puck, *Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **115**(2): p. 391-8.
13. Fischer A, N.L., *Combined Immunodeficiencies*, in *Immunologic Disorders in Infants and Children*, O.H. Stiehm ER, Winkelstein JA, Editor. 2004, Elsevier. p. 447-79.
14. Lindegren, M.L., et al., *Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders*. *MMWR Recomm Rep*, 2004. **53**(RR-1): p. 1-29.
15. McGhee, S.A., E.R. Stiehm, and E.R. McCabe, *Potential costs and benefits of newborn screening for severe combined immunodeficiency*. *J Pediatr*, 2005. **147**(5): p. 603-8.
16. Ryser, O., A. Morell, and W.H. Hitzig, *Primary immunodeficiencies in Switzerland: first report of the national registry in adults and children*. *J Clin Immunol*, 1988. **8**(6): p. 479-85.
17. Puck, J.M., *Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps toward implementation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(4): p. 760-8.

18. Coria-Ramírez E, E.-P.S., Espinosa-Rosales F, Vargas-Camaño ME, Blancas-Galicia L, *Panorama epidemiológico de las inmunodeficiencias primarias en México*. Rev Alerg Mex 2010. **57**(5): p. 159-163.
19. Puck, J.M., *Severe combined immunodeficiency: new advances in diagnosis and treatment*. Immunol Res, 2007. **38**(1-3): p. 64-7.
20. Cossu, F., *Genetics of SCID*. Ital J Pediatr, 2010. **36**: p. 76.
21. Kelly, B.T., et al., *Screening for severe combined immunodeficiency in neonates*. Clin Epidemiol, 2013. **5**: p. 363-9.
22. Huang, H. and K.G. Manton, *Newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID): a review*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 1024-39.
23. Puck, J.M., *The case for newborn screening for severe combined immunodeficiency and related disorders*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1246**: p. 108-17.
24. Shearer, W.T., et al., *Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: The Primary Immune Deficiency Treatment Consortium experience*. J Allergy Clin Immunol, 2013.
25. Verbsky, J., M. Thakar, and J. Routes, *The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(3): p. 622-7.
26. Buckley, R.H., *The long quest for neonatal screening for severe combined immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(3): p. 597-604; quiz 605-6.
27. Puck, J.M., *Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: the winner is T-cell receptor excision circles*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(3): p. 607-16.
28. Puck, J.M., *Neonatal screening for severe combined immune deficiency*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007. **7**(6): p. 522-7.
29. Borte, S., U. von Döbeln, and L. Hammarstrom, *Guidelines for newborn screening of primary immunodeficiency diseases*. Curr Opin Hematol, 2013. **20**(1): p. 48-54.
30. Foundation, J.M., *Economic Impact Study. Comparing undiagnosed and diagnosed patients with primary immunodeficiencies*. 2007.