



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Cuantificación de círculos de escisión del receptor de
linfocitos T (TREC) por PCR en tiempo real en muestras
de gota de sangre seca de recién nacidos del estado de
Tabasco.**

TESIS

Que para obtener el título de
Química Farmacéutica Bióloga

P R E S E N T A

Erika Badillo Mora

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Edgar Alejandro Medina Torres



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: Enrique Ortega Soto
VOCAL: Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia
SECRETARIO: Profesor: Edgar Alejandro Medina Torres
1er. SUPLENTE: Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio
2º SUPLENTE: Profesor: Gibrán Pérez Montesinos

Este trabajo se realizó en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de
Pediatría, en la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias.

Asesor del tema:

Dr. Edgar Alejandro Medina Torres _____

Sustentante:

Erika Badillo Mora _____

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las siguientes instituciones por el financiamiento otorgado al presente proyecto:

CONACyT a través de la convocatoria del Fondo Sectorial de Investigación en Salud (FOSIS) con número de proyecto: 87633.

Instituto Nacional de Pediatría por los recursos materiales y económicos otorgados a través de la convocatoria de Fondos Federales para Investigación 2013 y 2014.

Fundación Mexicana para Niñas y Niños con Inmunodeficiencias Primarias A.C:
(FUMENI A.C.).

TamiMaz del estado de Tabasco

Al Dr. Edgar Alejandro Medina Torres por la confianza de depositar en mí la responsabilidad de este proyecto.

ABREVIATURAS

ALC: *Absolute Lymphocytes Count*

DN: *Dobles negativos*

DP: *Dobles positivos*

ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

HSTC: *Hematopoietic Stem Cell Transplatation*

Ig: *Inmunoglobulina*

IL: *Interleucina*

Jack 3: *Jannus-associated kinase 3 gene*

Ln B: *Linfocito B*

Ln NK: *Linfocito Natural Killer*

Ln NKT: *Linfocito Natural Killer- T*

Ln T: *Linfocito T*

Ln Tc: *Linfocito T citotóxico*

Ln Th: *Linfocito T helper*

MHC: *Major Histocompatibitity Complex*

NBS: *Newborn Screening*

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

PID: *Primary Immunodeficiency*

RAG: *Recombination Activating Gene*

RIA: *Respuesta Inmune Adaptativa*

RII: *Respuesta Inmune Innata*

RNAse P: *Ribonuclease P*

RSS: *Recombination Signal Sequence*

RT-q PCR: *Real time quantitative PCR*

SCID: *Severe Combined Immunodeficiency*

SI: *Sistema Inmunológico*

TCR: *T Cell Receptor*

TCRA: *Gen de la cadena α del TCR*

TCRB: *Gen de la cadena β del TCR*

TCRD: *Gen de la cadena δ del TCR*

TCRG: *Gen de la cadena γ del TCR*

TREC: *T Cell Receptor Excision Circle*

γc : *Gen cadena Gamma Común*

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. Introducción	1
1.1 Aspectos generales del Sistema Inmunológico	1
1.2 Definición y clasificación de los linfocitos T.	4
1.3 Ontogenia de los linfocitos T	5
1.3.1 Hematopoyesis	5
1.3.2 Diferenciación de las células T en el timo	6
1.3.3 Procesos de selección	9
1.3.4 Selección positiva	9
1.3.5 Selección negativa	10
1.3.6 Reordenamiento de genes para generar el TCR: formación de TREC10	
1.4 Definición de Inmunodeficiencias	17
1.5 Clasificación de las Inmunodeficiencias	17
1.6 Definición y generalidades de la Inmunodeficiencia combinada grave.	18
1.7 Tamíz neonatal.	20
1.8 Identificación de SCID a partir de diferentes pruebas de laboratorio.	22
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos particulares	28
5. Materiales y métodos	29
6. Resultados	32
7. Discusión de resultados	38
8. Conclusiones	42
9. Perspectivas	43
10. Bibliografía	44

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales del sistema inmunológico.

El sistema inmunológico es un conjunto de células, moléculas, órganos y tejidos, cuya acción conjunta sirve para proporcionar inmunidad o protección al organismo, además del reconocimiento de una gran diversidad de antígenos o epítomos ya sean propios o extraños, y de la eliminación de células infectadas o transformadas.^{1, 3, 4.}

El sistema inmunológico se encuentra dividido para su estudio en respuesta inmune innata (RII) y respuesta inmune adaptativa (RIA) (*figura 1*). La RII (también llamada inmunidad natural) es la primera línea de defensa y se encuentra constituida por mecanismos de defensa humorales y celulares (proteínas sanguíneas y citocinas, células fagocíticas y las células NK).^{1, 2.}

La RII es una respuesta de acción rápida que tiene lugar en las primeras horas de infección; la activación de ésta se lleva a cabo por medio del reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) a través de los receptores tipo Toll (TLR) principalmente.^{1.}

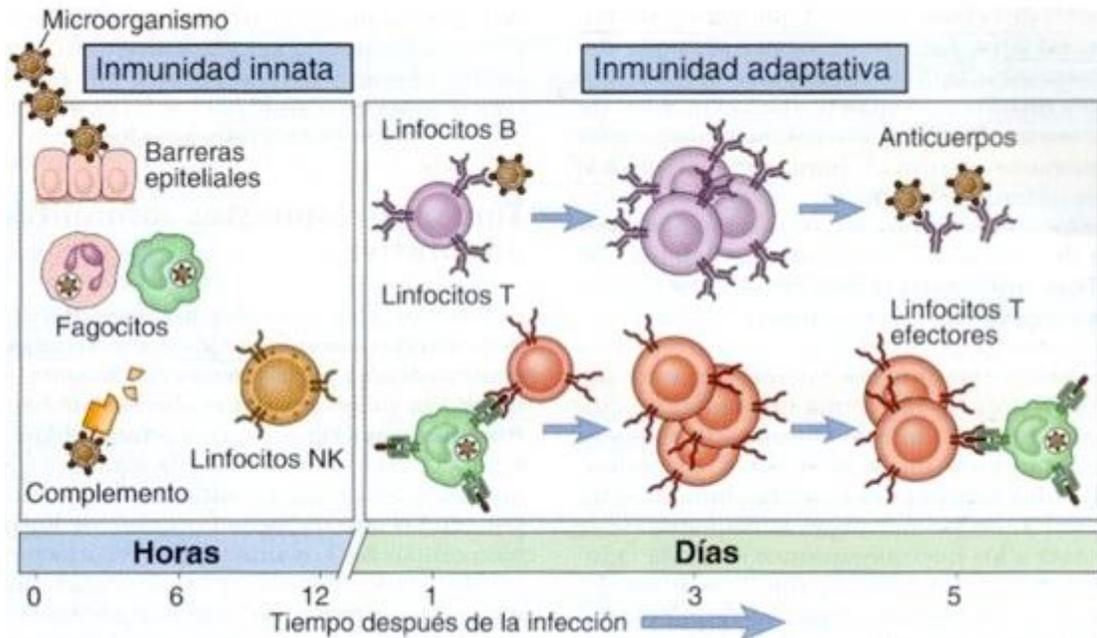


Figura 1. Inmunidad innata e inmunidad adaptativa y sus componentes. (Abbas)

La RIA a su vez se subdivide en dos: respuesta inmune humoral y respuesta inmune celular. La respuesta inmune humoral cuenta con moléculas efectoras presentes en la sangre y en las mucosas llamadas anticuerpos, las cuales son producidas por los linfocitos B (LnB) o células plasmáticas y éste es el principal mecanismo en contra de microorganismos extracelulares y toxinas. Existen 5 clases de anticuerpos: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, las cuales desarrollan diferentes funciones, entre las cuales se encuentran: (figura 2)^{1, 2, 5}.

- ✓ Opsonización de bacterias
- ✓ Anticuerpos neutralizantes
- ✓ Activación de complemento

La respuesta inmune celular queda a cargo de los linfocitos T (LnT), los cuales se pueden dividir de manera general en Ln T CD4⁺ o cooperadores (Th), los cuales presentan varias funciones, entre las cuales se encuentra la cooperación con los Ln B o células plasmáticas para poder llevar a cabo el cambio de isotipo de los anticuerpos, secretan citocinas, activación de macrófagos, Ln NK, Ln T CD8⁺, por otro lado los LnT CD8⁺ o citotóxicos (Tc) tienen como función principal la destrucción de células infectadas por microorganismos intracelulares (virus, algunos hongos y levaduras, bacterias, parásitos) o de células transformadas. (figura 2).^{1, 2, 4, 5.}

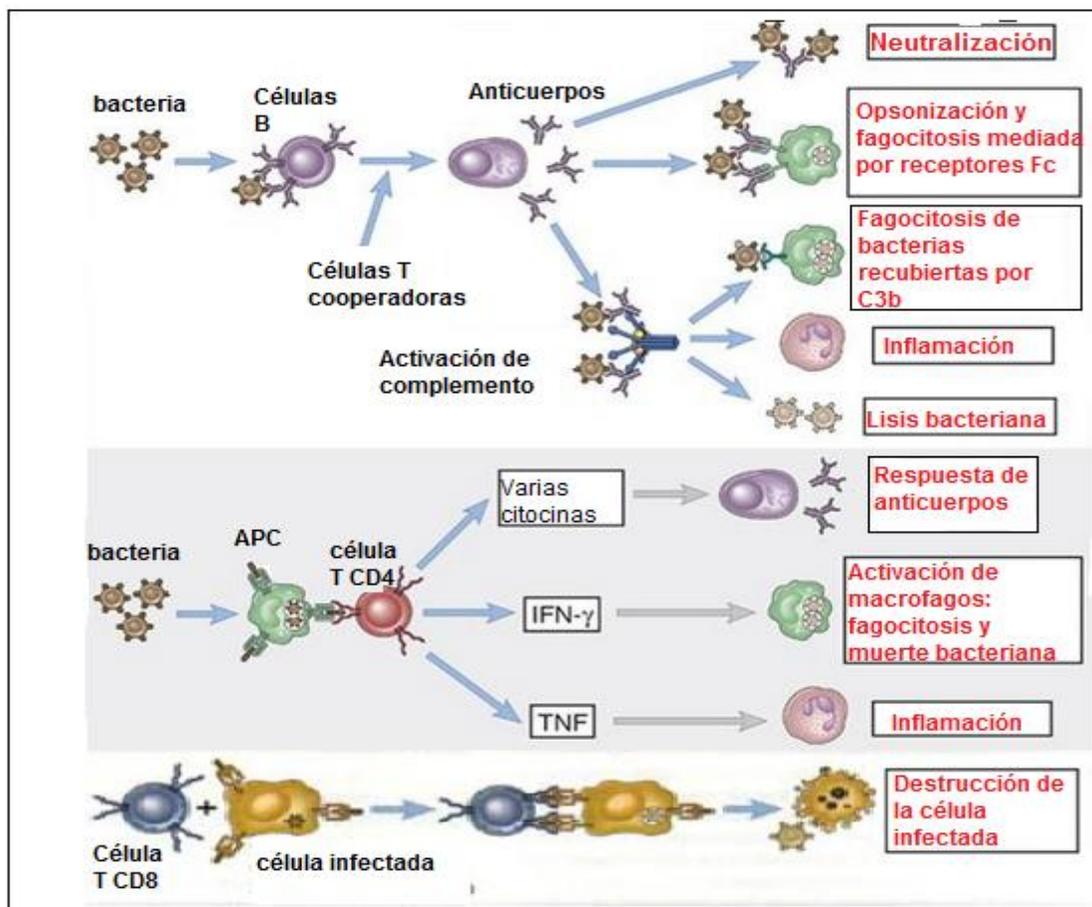


Figura 2. Funciones de la Respuesta Inmune Adaptativa. (Abbas)

Existen otras células que son consideradas como linfocitos debido a que provienen del mismo linaje que los Ln T y B, sin embargo, no se contemplan dentro de la respuesta inmune adaptativa, dichas células son los linfocitos NK, linfocitos NKT y los linfocitos T γ/δ .^{1, 18.}

1.2 Definición y clasificación de los linfocitos T.

Los linfocitos T son células que se caracterizan por presentar un receptor de célula T (TCR), existen diferentes subpoblaciones de Ln T, mismas que presentan características fenotípicas y funcionales distintas, de modo que quedan clasificados de la siguiente manera: los linfocitos Th son CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, y los Ln Tc son CD3⁺, CD4⁻, CD8⁺, los cuales expresan un receptor de antígeno llamado α/β . Otra población de linfocitos es llamada T γ/δ expresan un tipo de receptor parecido al α/β , pero de estructura diferente.^{1, 4, 18.}

Como se comentó con anterioridad, existen otras poblaciones celulares designadas como linfocitos debido a sus características morfológicas y de ciertos criterios funcionales y moleculares, sin embargo, no presentan una clasificación como linfocitos T o B. Los linfocitos citolíticos naturales (NK), poseen unas funciones efectoras similares a los Ln Tc, pero sus receptores no coinciden con los receptores de antígeno de los linfocitos T, ni tampoco están codificados por genes que sufren recombinación somática. Por otro lado, los linfocitos NKT son una población celular que comparte características propias de los Ln NK y T, ya que expresan receptores de antígeno α/β codificados por genes que sufren una recombinación somática, pero al igual que los Ln T γ/δ carecen de diversidad, lo

que indica que no son específicos para los antígenos, es por eso que los Ln NK, NKT y T γ/δ pueden considerarse parte de la RII. ^{1, 5.}

Los Ln T γ/δ también obtienen su TCR por medio de la recombinación somática de sus genes γ y δ ; se ha observado que esta clase de Ln T se encuentran principalmente en los epitelios, donde reciben el nombre de linfocitos intraepiteliales γ/δ . En estudios realizados se ha observado que el TCR γ/δ y el TCR α/β presentan diferencias estructurales en las regiones constantes y variables. En ésta última se ha visto que su longitud es más parecida a las regiones hipervariables de las Igs, esta peculiaridad en su receptor y que se encuentren principalmente en los tejidos epiteliales hace suponer que reconocen a su antígeno directamente los tejidos y no de las APC, tal como ocurre con los LN T α/β , por esta razón es que se les considera como parte de la respuesta innata.

1.3 Ontogenia de los linfocitos T

1.3.1 Hematopoyesis

Al principio del desarrollo fetal, la hematopoyesis se origina en el saco vitelino primitivo, pero a medida que avanza la embriogénesis, esta función la realiza el hígado fetal y por último la médula ósea. Todas las células sanguíneas surgen a partir de una célula madre hematopoyética común, cuya diferenciación queda asignada a una estirpe concreta (eritrocítica, megacariocítica, granulocítica, monocítica y linfocítica), dando origen a la línea linfoide y línea mieloide. (*figura 3*).¹

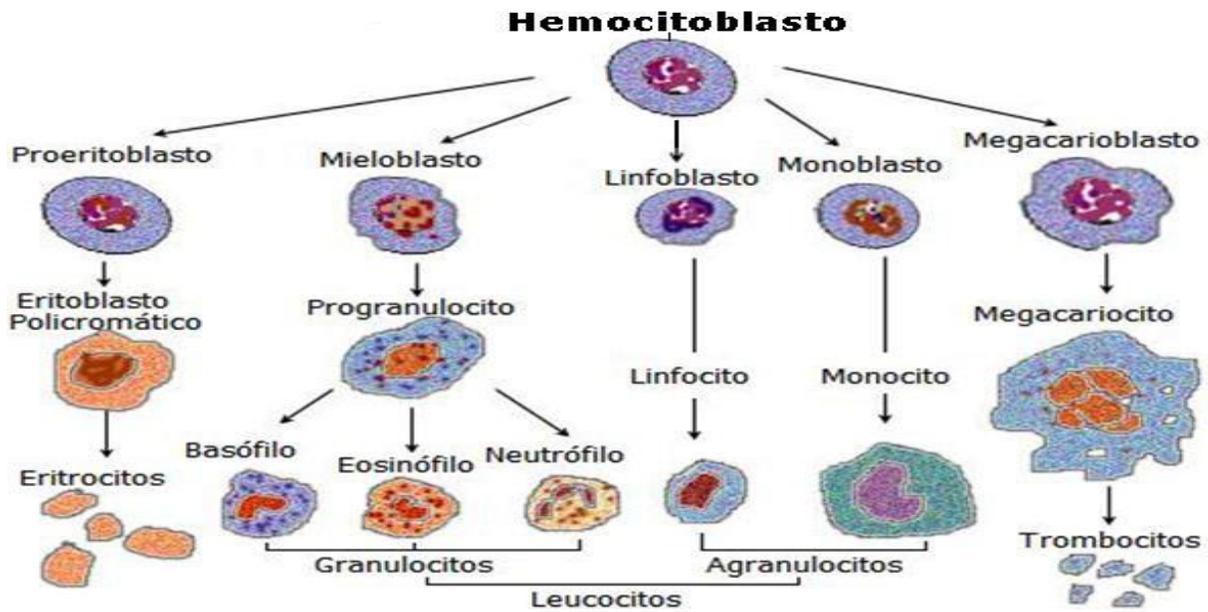


Figura 3. Proceso de hematopoyesis en la médula ósea (Abbas)

Los precursores de los Ln T salen del hígado fetal y de la médula ósea y circulan hacia el timo donde finalizan su maduración. La mayoría de los Ln T γ/δ proceden de las células troncales hematopoyéticas del hígado fetal, y la mayoría de los linfocitos T α/β se desarrollan a partir de las células troncales hematopoyéticas procedentes de la médula ósea.^{1,18}

1.3.2. Diferenciación de las células T en el timo

El timo está organizado en una serie de lóbulos sobre la base de redes de células epiteliales derivadas embriológicamente de evaginaciones del endodermo intestinal, de la tercera bolsa faríngea y que forman zonas corticales y medulares bien definidas. Esta estructura de células epiteliales proporciona el microambiente para la diferenciación de los Ln T, además las células epiteliales se encargan de producir una serie de hormonas peptídicas (timulina, timosina α_1 , factor humoral

timico, timopoyetina, etc) que en su mayor parte parecen ser capaces de ayudar a promover la aparición de marcadores de la diferenciación de los Ln T.¹⁸

Los Ln T que se encuentran en desarrollo en el timo, reciben el nombre de timocitos, éstos cuando se encuentran más inmaduros no expresan TCR, CD3, ni cadenas ζ y son incapaces de reconocer antígenos y ejercer funciones efectoras. A pesar de que carecen de dichos marcadores, se ha hecho un gran esfuerzo por clasificar subpoblaciones de precursores tempranos de los Ln T, basándose en la expresión de otras moléculas como por ejemplo el c-kit, CD44 y CD25, en donde el c-kit es el receptor de un factor de crecimiento de la célula germinal hematopoyética llamado ligando de c-kit, el CD44 es una molécula de adhesión y el CD25 es la cadena α del receptor de la interleucina 2 (IL-2). La mayoría de los precursores tempranos de los Ln T que se encuentran en el timo expresan niveles altos de c-kit y CD44, pero no expresan CD25. La expresión de c-kit y CD44 disminuye y aumenta de manera importante la de CD25 a la vez que el gen de la cadena β comienza su reordenamiento para generar el TCR.^{1, 1819.}

Los precursores que no expresan CD4 ni CD8, reciben el nombre de dobles negativos (DN), sin embargo expresan el receptor de quimiocina CCR7 y por la influencia de quimiocinas como CCL19 y CCL21 migran a través de la corteza del timo hacia la zona subcapsular externa. Las células más tempranas de estas células progenitoras, las células DN1, expresan todavía el marcador de la célula madre CD34 y también expresan niveles elevados de la molécula de adhesión CD44 y el receptor para el factor de la célula madre (SCF). Cuando maduran en células DN2, pierden la expresión de CD34 y comienzan a expresar la cadena α

para el receptor de la IL-2 (CD25). En la diferenciación a células DN3 la expresión transitoria de los genes activadores de la recombinasa RAG-1 y RAG-2, junto con un aumento en la accesibilidad de la cromatina alrededor de un alelo de los genes de la cadena β del TCR, producen el reordenamiento de la anterior y ésta se asocia con una cadena pre- α invariable ($pT\alpha$) para formar un pre-TCR, además de la asignación al linaje de las células T. La expresión de CD3 (el complejo de transducción de la señal del TCR) tiene lugar en esta etapa, mientras se pierde la expresión de CD44 y c-kit. La pérdida de la expresión de CD25 significa el paso a la población DN4, que con posterioridad se diferencian en timocitos doble positivos ($CD4^+ CD8^+$).^{18, 19.}

El reordenamiento del gen de la cadena α del TCR ocurre cuando RAG-1 y RAG-2 se expresan transitoriamente de nuevo en cualquiera de las células DN4 o inmediatamente después la expresión de CD4 y CD8, de modo que los timocitos dobles positivos comienzan a expresar otra vez cantidades elevadas de CCR7 lo que determina que migren a través de la corteza, atraviesen la unión corticomedular y lleguen a la médula, en donde se lleva a cabo el proceso de presentación y reconocimiento de antígenos propios ocasionando que los marcadores CD4 y CD8 se segreguen en forma paralela a la diferenciación en poblaciones inmunocompetentes (células simples positivas), Ln T $CD4^+$ o Ln T $CD8^+$.^{18.}

Además de los factores mencionados, el desarrollo de los timocitos depende estrechamente de la IL-7 necesaria para la transición a la etapa DN3. Los factores que determinan si las células doble positivas se transformarán en $CD4^+$

restringidas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II o CD8⁺ restringidas por el MHC clase I, aun no han sido esclarecidos por completo, sin embargo, existen dos hipótesis principales: la hipótesis estocástica o de selección y la hipótesis instructiva: la primera sugiere que la expresión del correceptor (CD4 o CD8) es inhibida al azar y posteriormente se seleccionan las células que tienen una combinación de TCR-correceptor capaz de reconocer un péptido-MHC adecuado para la supervivencia, por el contrario, la segunda hipótesis establece que la interacción del TCR con el péptido-MHC origina señales que instruyen a las células T para inhibir la expresión del correceptor que no sirve, incapaz de reconocer esa clase particular de MHC. ^{1,18.}

1.3.3 Procesos de selección

El siguiente acontecimiento importante que ocurre en la maduración intratímica de los Ln T, tras la expresión del TCR, CD4 y CD8, es la selección de las células que van a constituir el repertorio de los Ln T maduras en la periferia.

La capacidad de los Ln T para reconocer los péptidos antigénicos asociados con el MHC propio se desarrolla en el timo, por lo tanto los procesos de selección son los responsables de la supervivencia de las células T que expresan sólo TCR que sean capaces de reconocer las moléculas del MHC y los antígenos péptidicos expresados en el timo. ^{1, 2, 18.}

1.3.4 Selección positiva

Durante esta fase se pueden eliminar células potencialmente perjudiciales que reconocen con avidéz estructuras propias, o se les puede inducir a que alteren sus

receptores del antígeno y se pueden conservar células que expresan receptores del antígeno útiles. La conservación de especificidades útiles supone un proceso llamado *selección positiva*, esta selección garantiza la maduración de los Ln T cuyos receptores se unen con baja avidéz a las moléculas del MHC propias.⁵

1.3.5 Selección negativa

La *selección negativa*, por otro lado, es el proceso que elimina o altera los linfocitos en desarrollo cuyos receptores de antígeno se unen fuertemente a antígenos propios presentes en los órganos linfáticos generadores. Los Ln T en desarrollo son susceptibles a la selección negativa durante un periodo corto después de que se expresen por primera vez los receptores de antígeno. Los Ln T en desarrollo con una afinidad elevada por los auto-antígenos son eliminados mediante apoptosis, un fenómeno conocido como eliminación clonal. La selección negativa de los linfocitos en desarrollo es un mecanismo importante para mantener la tolerancia a muchos auto-antígenos, a esto se le llama tolerancia central.^{4, 5, 6.}

1.3.6 Reordenamiento de genes para generar TCR: formación de TREC

Así como las células se van diferenciando de acuerdo con el tipo de molécula que se expresa en su superficie, algo parecido sucede a nivel del reordenamiento de los genes para la formación del TCR.

En la línea germinal y en todas las células no linfoides, el loci de los genes que codifican para las moléculas de anticuerpos y para las cadenas del receptor de antígeno de los Ln T, están compuestas por un gran número de segmentos

alternativos V, D y J que se encuentran río arriba de las regiones constantes, por lo que la recombinación de éstos genes en el timo es un proceso por el cual se genera el repertorio de Ln T. Dicho reordenamiento da como resultado un círculo de DNA llamado círculo de escisión del receptor de la célula T (TREC). Los TRECs son círculos de DNA estables y se mantienen después de la división celular, pero debido a que no se replican, ellos se diluyen a través de la división mitótica de los Ln T, es por esta razón es que en 1998 Douek y colaboradores fueron los primeros en reportar el uso de TRECs para estudiar los cambios en la frecuencia de las salidas de emigrantes del timo con respecto a la edad y en casos con infección de VIH. A causa de este estudio, se llamó la atención de que los niveles de TRECs pueden ser usados para resolver preguntas con respecto a la salida de los Ln T del timo (biomarcador) .^{9, 10}

La reorganización de los genes de los receptores del Ln T supone la adición y eliminación aleatorias de bases entre los segmentos génicos que se unen entre sí a fin de aumentar al máximo su diversidad. Como ya se mencionó, los linfocitos en desarrollo de su TCR, ensamblan un pre-receptor del antígeno conocido como receptor del linfocito pre-TCR. En ausencia de la expresión del pre-receptor del antígeno, los Ln T experimentan muerte celular programada. Después del punto de verificación del pre-TCR, los linfocitos continúan con su maduración y expresan su receptor del antígeno completo mientras todavía están inmaduros. Este TRC completo es muy importante ya que a partir de él los Ln T pueden reconocer específicamente a los antígenos extraños.¹⁰

Existen cuatro genes de TCR que codifican dos tipos de heterodímeros unidos por uniones disulfuro: el TCR clásico que consiste de las cadenas TCR α (cromosoma 14q11) y TCR β (cromosoma 7q34) que se expresan en la mayoría de los linfocitos de la periferia, mientras que el TCR alternativo consiste de las cadenas TCR γ (cromosoma 7q15) y TCR δ (cromosoma 14q11), que se expresan del 2 al 14% de los linfocitos T de la periferia. ¹⁰

Los dominios variables para el reconocimiento de los antígenos de las moléculas del TCR están codificadas por combinaciones de los segmentos génicos variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) para las cadenas TCR δ y TCR β o los segmentos génicos V y J para las cadenas TCR γ y TCR α . El número de los diferentes segmentos génicos determina el potencial en la diversidad de combinación. Todos los segmentos génicos V, D y J están flanqueados por señales de secuencia de recombinación homologas específicas (RSS). Estas RSS consisten en una secuencia palindrómica conservada heptamérica (CACAGTG) adyacente a la secuencia codificante, y una secuencia nonamérica conservada (ACAAAACC) que se encuentran separadas por una región menos conservada de 12 o 23 pares de bases (pb). ^{10, 15}

Las secuencias RSS son reconocidas por las proteínas RAG-1 y RAG-2, que son capaces de escindir el ADN entre el heptámero y el segmento final del gen implicado. El ADN escindido resulta en un extremo la formación de una horquilla y en el otro extremo una señal fosforilada en el extremo como 5'. Un llamado código de unión se obtiene después de la escisión y ligadura de los extremos de la horquilla codificada. Durante este proceso de ligadura adicional (unión) la

diversidad de los códigos de unión se obtienen a través de la inserción y delección de nucleótidos, dicha inserción de nucleótidos es posible por medio de una enzima transferasa llamada desoxinucleotil transferasa terminal (TdT). Los exones V (D-) J son los códigos de unión que junto con los exones constantes se transcriben en ARNm y se traducen en proteína. Los extremos señal también se ligan y de ese modo forman un producto circular de escisión extracromosómico (TREC) que contiene las dos RSS acopladas, es decir, la señal de unión.¹⁰

Los genes *TCRD* (genes que codifican para la cadena δ del TCR) son los primeros en reordenarse, estos reordenamientos ocurren cuando las células se han diferenciado de CD34⁺ CD1a⁻ a CD34⁺ CD1a⁺ (etapa DN). Aproximadamente el 40% de los timocitos CD34⁺ CD1a⁻ más inmaduros tienen reordenamientos incompletos del gen *TCRD*. Estos timocitos inmaduros CD34⁺ únicamente representan del 1-3% del total de la población de timocitos, lo que implica que casi todos los genes *TCRD* se reordenan mucho antes de que los timocitos comiencen a expandirse. Después del reordenamiento de los genes *TCRD*, los genes que se reordenan son los genes *TCRG* (genes que codifican para la cadena γ del TCR), los cuales se llevan a cabo antes de la expansión de los timocitos. (*Figura 4*).¹⁰

El reordenamiento de los genes *TCRB* (genes que codifican para la cadena β del TCR) se inician con la subpoblación CD34⁺ CD1a⁺, sin embargo la mayoría de las células empiezan a reorganizar sus genes *TRCB* cuando ellas comienzan a expresar CD4⁺ antes de estar en la etapa de dobles positivos. Esta transición muestra ser un paso importante en la diferenciación de los Ln T, ya que como se mencionó anteriormente, a partir de este paso comienzan los procesos de

selección y con ello la supervivencia y expansión de los timocitos. No se conoce mucho acerca del reordenamiento de los genes *TCRA* (genes que codifican para la cadena α del TCR) en el timo, sin embargo como ya se vio, son importantes en la selección positiva (*figura 4*).¹⁰

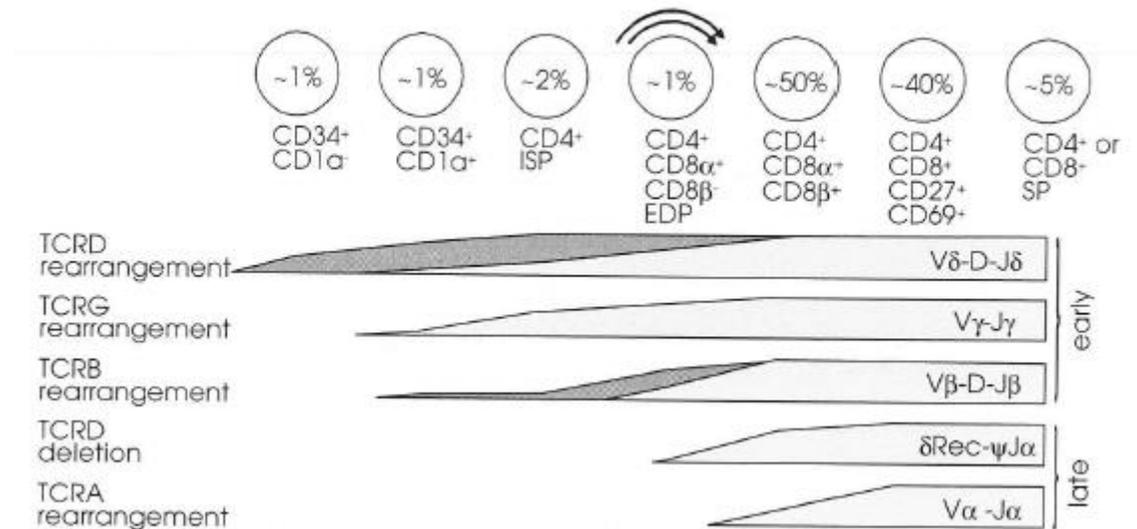


Figura 4. Esquema para la diferenciación de las células T y secuencia de reordenamientos de los genes de TCR. (Hezenberg)

La eliminación del gen *TCRD* es un paso importante en la maduración de los timocitos pertenecientes al linaje TCR α/β . Los segmentos de los genes TCRD se encuentran intercalados con los segmentos de los genes TCRA de modo que al reordenarse los genes TCRA esto podría ocasionar la eliminación de los genes TCRD, de tal manera que todos los Ln T que presentan un TCR de tipo de TCR α/β ⁺ tienen sus genes *TCRD* eliminados por lo menos en un alelo y aproximadamente el 80% de estas células tienen eliminados sus *TCRD* en ambos alelos.¹⁰

En 1988, De Villartay y colaboradores identificaron dos elementos eliminados de los genes *TCRD* llamados δ Rec y ψ J α , que flanquean la mayor parte de los segmentos del gen *TCRD*. Con la identificación de estos elementos, se asume que la eliminación del gen *TCRD* define un paso intermedio en el proceso de diferenciación hacia el linaje de TCR α/β . Experimentos muestran que el reordenamiento del TREC δ Rec- ψ J α ocurre aproximadamente 2000 veces más frecuente en los Ln T que presentan un TCR α/β ⁺ que en los Ln T que tienen un receptor del linaje TCR γ/δ ⁺. Lo anterior indica que varios tipos de reordenamientos pueden ocurrir en el timo en la eliminación de los genes *TCRD*, pero el reordenamiento δ Rec- ψ J α es el más destacado después de realizada la eliminación de los genes *TCRD* (figura 5).¹⁰

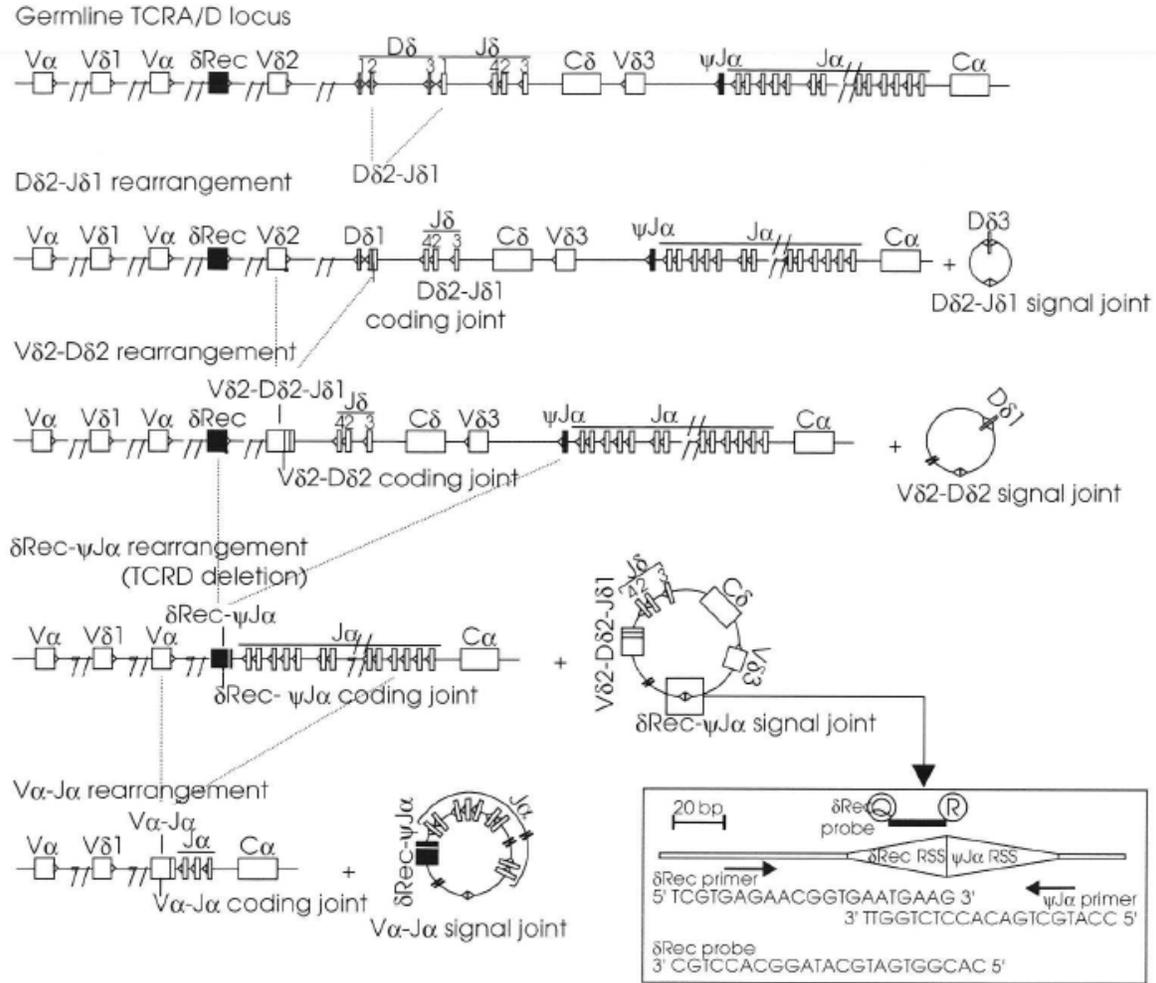


Figura 5. Reordenamientos secuenciales en el locus TCRA/D. Los reordenamientos consecutivos de TCRD, la eliminación de TCRD y el reordenamiento de TCRA son indicados con los correspondientes TRECs. Primero el reordenamiento de D a J de TCRD ocurre, seguido por el reordenamiento de V a D-J. En el linaje TCR α/β , el gen TCRD es entonces preferentemente eliminado por el reordenamiento $\delta\text{Rec}-\psi\text{J}\alpha$, el cual es inmediatamente seguido por el reordenamiento por el gen TCRA ($V\alpha$ - $J\alpha$). Tomando en cuenta que la señal de unión del TREC $V\alpha$ - $J\alpha$ puede también ser llamada $\delta\text{Rec}-\psi\text{J}\alpha$ como señal de codificación de TREC. (Hazenbergs)

1.4 Definición de Inmunodeficiencias

La integridad del sistema inmunitario es esencial para proteger al organismo de microorganismos infecciosos, microorganismos oportunistas y sus productos tóxicos, pero también para eliminar aquellos elementos propios que representan un peligro para la supervivencia del organismo. Los defectos de uno o más componentes del sistema inmune pueden producir trastornos graves y con frecuencia mortales, que en forma conjunta se denominan inmunodeficiencias. Éstas se clasifican en general en dos grupos: congénitas o primarias y adquiridas o secundarias.¹¹

Las inmunodeficiencias primarias (PID) son un grupo de desordenes genéticamente heterogéneos que afectan distintos componentes del sistema inmune innato y adaptativo. Más de 120 genes distintos han sido identificados, cuyas anormalidades se encuentran en más de las 150 diferentes formas de inmunodeficiencias primarias.¹²

Las manifestaciones clínicas de las inmunodeficiencias primarias son muy variables, por lo general incluyen infecciones recurrentes, alergia, proliferación anormal de linfocitos, cáncer y autoinmunidad.¹⁹

1.5 Clasificación de las Inmunodeficiencias

Las PID son clasificadas en términos generales de acuerdo con el componente inmune que se altera principalmente:¹¹

- a) Desórdenes en la inmunidad adaptativa.

b) Desórdenes de la inmunidad innata.

De acuerdo con la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas, clasifican a las inmunodeficiencias en: ¹².

- ✓ Inmunodeficiencias combinadas de células T y células B.
- ✓ Deficiencias de anticuerpos.
- ✓ Otros síndromes bien definidos como inmunodeficiencias.
- ✓ Enfermedades de desregulación inmunológica.
- ✓ Defectos congénitos del número de fagocitos, función o ambos.
- ✓ Defectos en la inmunidad innata.
- ✓ Desórdenes autoinflamatorios.
- ✓ Deficiencias en complemento.

1.6 Definición y generalidades de las Inmunodeficiencia combinada grave.

Dentro del grupo de las inmunodeficiencias combinadas de células T y células B, se encuentra la Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID), la cual representa un espectro de desórdenes genéticos con profundos defectos en ambas inmunidades: celular y humoral. ¹⁶.

La SCID es un grupo de condiciones caracterizada por problemas en el desarrollo de las células T, lo que conduce a deficiencias funcionales en ambos tipos de linfocitos. Un denominador común en todos los niños con SCID es un paro intrínseco de la diferenciación de los Ln T, a menudo relacionado con diferenciación defectuosa de células B y en algunos tipos genéticos deficiencias en las células NK. Esto da como resultado que niños recién nacidos con estas

condiciones inmunológicas carecen de la habilidad para producir una respuesta efectiva en contra de agentes infecciosos. Los recién nacidos afectados son extremadamente propensos a todas las formas de infección (virus, bacterias y hongos), diarreas persistentes, alteraciones en el crecimiento, lo cual provoca prolongadas hospitalizaciones y generalmente mueren durante el primer año de vida. Desafortunadamente, pacientes con SCID no pueden ser identificados inmediatamente con esta enfermedad, debido a que, al momento de nacer, ellos son sanos y otro factor importante que impide su identificación es a causa de la leche materna ya que estos pequeños se benefician de los anticuerpos de la madre que se secretan en ésta, por lo que los niños se encuentran indirectamente protegidos. ^{7, 8, 19.}

Alrededor del 40% de los pacientes con SCID tiene mutaciones en la cadena común γ (γ_c) de los receptores para interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, de ellos el receptor de IL-7 es el más importante para la diferenciación de linfocitos y las mutaciones en la cadena α del receptor de la IL-2 o en JAK 3. Otra mutación importante que puede ocasionar esta enfermedad es la mutación en el complejo enzimático RAG 1 y RAG 2. ^{18.}

Los defectos de SCID son clasificados de acuerdo con el fenotipo inmunológico y son categorizados en:

- a) SCID con ausencia de linfocitos T pero presencia de linfocitos B ($T^- B^+$)
- b) SCID con ausencia de ambos linfocitos T y B ($T^- B^-$).

Ambos grupos importantes de SCID incluyen formas con o sin linfocitos natural killer (NK).¹³

Los niños con SCID mueren como consecuencia de las infecciones que sufren durante el primer año de vida a menos de que reciba el tratamiento adecuado, el cual puede ser, terapia de reemplazo enzimático, que el sistema inmunológico defectuoso sea reemplazado mediante el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TPCH) o en casos más recientes, terapia génica.

Antes de 1968, cuando se realizó el primer trasplante de médula ósea exitoso, la SCID siempre era fatal, pero Buckley y colaboradores, demostraron que un diagnóstico y tratamiento temprano con un trasplante de células madre hematopoyéticas puede reestablecer una función inmune normal. Si los recién nacidos con SCID son tratados antes de los 3.5 meses de edad y de manera muy importante antes de presentar la primera infección, tienen un 95% de probabilidad de supervivencia (>20 años). Si son diagnosticados después de los 3.5 meses de edad la tasa de supervivencia cae por debajo del 70%.^{8, 12, 16.}

La incidencia verdadera de los niños con SCID es desconocida; existen estudios en que sugieren que la incidencia es de 1/100,000 nacimientos, mientras que otros estudios indican que la incidencia es de 1/60,000 nacimientos vivos.^{8, 16.}

1.7 Tamíz neonatal.

El tamiz neonatal es un programa que busca pacientes con trastornos metabólicos y genéticos entre todos los recién nacidos de una población, para darles un tratamiento que evite o aminore la producción de daño que puede ocasionar,

desde graves minusvalías hasta la muerte. Para que un trastorno se incluya en la lista, debe comprobarse: 1) el trastorno sea tratable, 2) exista una buena prueba para identificarlo y 3) la intervención médica temprana sea de beneficio para el bebé.^{14, 17.} Para poder tener la efectividad esperada en el tamiz neonatal, es necesario que la muestra sea tomada dentro de las dos primeras semanas del recién nacido, de preferencia en los primeros 4 a 7 días de vida extrauterina, sin embargo, sí esto no puede realizarse de esta manera se establece que como máximo la prueba se pueda realizar hasta los dos o tres meses de vida.

En 1961 el Dr. Robert Guthrie fue el primero en desarrollar la prueba del tamiz, a partir de la recolección de gotas de sangre en papel filtro para la detección de la enfermedad llamada fenilcetonuria. Durante todos los años de aplicación del programa de tamiz neonatal, se ha comprobado el éxito y la utilidad de la información proporcionada a las instituciones de salud, con ella ha sido posible eficientar gastos de atención que requieren los pacientes identificados con alguna enfermedad incluida en el programa de tamiz neonatal y al mismo tiempo permite diseñar esquemas de prevención mediante el asesoramiento genético a las familias. La SCID ha sido reconocida como un trastorno que cumple con los criterios de inclusión para la evaluación neonatal, esto de acuerdo con los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, a partir de una conferencia realizada en el año 2004 titulada “Aplicación de Estrategias de Salud Pública para Enfermedades de Inmunodeficiencias Primarias.”^{7,8, 9.}

1.8 Identificación de SCID a partir de diferentes pruebas de laboratorio.

Debido a que muchos de los casos con SCID son esporádicos y sin una historia familiar, la mayoría de los recién nacidos con SCID podrían ser claramente beneficiados a través de un programa de evaluación neonatal, el cual permitiría la detección temprana antes del desarrollo de infecciones que pongan en riesgo la vida del niño. Varios métodos para la evaluación neonatal han sido sugeridos, incluyéndose un conteo completo de sangre en todos los recién nacidos, inmunoensayos con IL-7, ensayo luminex multiplex de antígenos marcados para células T y la cuantificación de los círculos de escisión del receptor de la célula T (TRECs) en muestras de sangre seca.⁸

El primer intento para la evaluación de todos los recién nacidos para SCID fue por el equipo de Buckley y Puck en 1997, quienes hacían la sugerencia que la gran mayoría de los casos podría ser identificado por un conteo completo y diferencial de sangre, para determinar el conteo absoluto de linfocitos (ALC) por mililitro de sangre.⁹

El ALC es una prueba informativa en el ámbito clínico ya que los Ln T representan aproximadamente el 70% de los linfocitos en niños sanos. Sin embargo como el ALC incluye todas las subpoblaciones de linfocitos, pacientes con SCID (T⁻ B⁺), quienes tienen un alto número de células B y posiblemente células NK podrían dar resultados normales en esta prueba (falso negativo). Otro caso en el cual se podría generar un resultado falso negativo es cuando las células maternas se

encuentran en la circulación de los infantes provocando un incremento en los valores de ALC.⁹

Los inmunoensayos para Ln T con IL-7 y proteínas específicas han sido evaluadas por McGhee et al y Janik et al. Altos niveles de IL-7 en suero están asociados con estados linfocitopenicos de T, en un número limitado de casos se ha probado que dichos estados de linfocitopenia se relacionan con SCID, sin embargo, esta asociación no se ha convertido en una herramienta robusta de la evaluación neonatal para SCID, debido a la labilidad de la IL-7 y problemas con la técnica. Por otro lado, la detección de proteínas del complejo del receptor de la célula T (TCR)-CD3 en combinación con CD45 ha sido lograda mediante el uso de una tecnología de captura de alto rendimiento. Sin embargo, la cantidad de proteína ha sido tan baja, que necesita de antisuero policlonal de conejo en lugar de utilizar anticuerpos monoclonales más estandarizados, haciendo que este ensayo sea problemático en este momento.⁹

Hazenberg et al y Douek et al, encontraron como ya se mencionó anteriormente, que los TRECs son un biomarcador producido por los nuevos linfocitos T naive que emigran hacia la sangre periférica desde el timo. De acuerdo con Jennifer Puck, en contraste con sus carencias como una prueba clínica (debido a que no es suficiente una sola medición), la determinación de los TRECs, de todos los métodos considerados hasta la fecha, es el único que resultó tener una utilidad en la clínica para la evaluación neonatal de SCID. Los TRECs pueden ser detectados y cuantificados usando varios métodos basados en PCR, como es la PCR competitiva, PCR-ELISA o RT-qPCR. En el estudio de TREC basado en PCR no

es posible distinguir entre las uniones codificantes $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha$ con la señal codificante $V\alpha\text{-J}\alpha$. Sin embargo, la señal codificante $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha$ es el objetivo óptimo para el estudio de TREC. La RT-qPCR es el método preferido, porque es sensible y exacto, basado en la detección específica de una secuencia objetivo amplificada durante cada ciclo de PCR. Consecuentemente, no necesita un proceso post-PCR, lo que la hace una técnica rápida, reduce la carga de trabajo y previene la contaminación cruzada con productos de PCR. La ventaja de los TRECs como analito en la evaluación neonatal incluye la habilidad de usar muestras de sangre seca, bajo costo, alto rendimiento y alta sensibilidad, por esa razón el método de cuantificación de TRECs fue el primero en ser adaptado y usado como estudio piloto dentro del programa de la evaluación del recién nacido en el estado de Wisconsin, Estados Unidos.^{8, 9, 10}

Para poder realizar la evaluación neonatal para SCID, la universidad de Wisconsin y el Instituto Madison revisaron y aprobaron un protocolo para el desarrollo del método de evaluación utilizando las mismas muestras destinadas para el tamiz neonatal (NBS, del inglés *newborn screening*). El método ha sido subsecuentemente evaluado y optimizado para usar muestras de sangre seca (tarjetas de Guthrie).⁸

El análisis comienza con obtener círculos de 3.2 mm de diámetro de la muestra de sangre seca, cada círculo equivale a 3 μ L de sangre líquida, después esta sangre es procesada en placas de 96 pozos y es analizada por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para cuantificar el número de TRECs/ μ L de sangre. (Figura 6).⁸

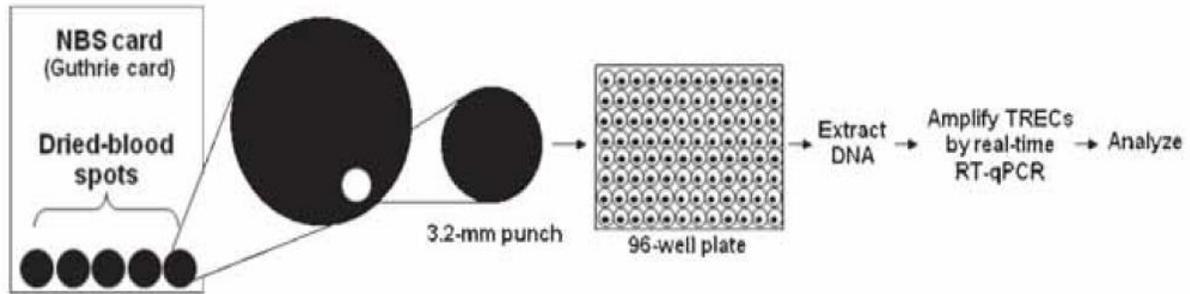


Figura 6. Representación gráfica del método usado para la evaluación de SCID por el programa de evaluación neonatal en Wisconsin. (Baker)

De acuerdo con los resultados obtenidos, el número de TRECs / $3\mu\text{L}$ (TRECs/ 3.2 mm de muestra de sangre seca) se encuentra en un rango de 0 a 3900, con una media de 827 y una mediana de 708.⁸ La forma de la función de distribución se encuentra sesgada hacia la derecha, esto es típico para muchos analitos clínicos; sin embargo, la región de interés para la evaluación de inmunodeficiencias y SCID, presenta una distribución hacia la izquierda (*figura 7A*). En la *figura 7B*, se muestra la distribución de los TRECs desde niños recién nacidos que tuvieron ≤ 150 TRECs en la prueba inicial. Únicamente cerca de 1.06% de los recién nacidos tuvieron <75 TRECs/ $3\mu\text{L}$ o un equivalente de 25 TRECs/ μL . Usando estos datos del estudio piloto, se estableció como valor de corte interno <25 TRECs/ μL . Las muestras con ≥ 25 TRECs/ μL son considerados como normales (negativos para SCID u otras inmunodeficiencias). Las muestras que no se reportan como normales (≥ 25 TRECs/ μL) se clasifican en dos categorías: en no concluyentes o anormales. Estas muestras tienen que repetirse.^{7, 8.}

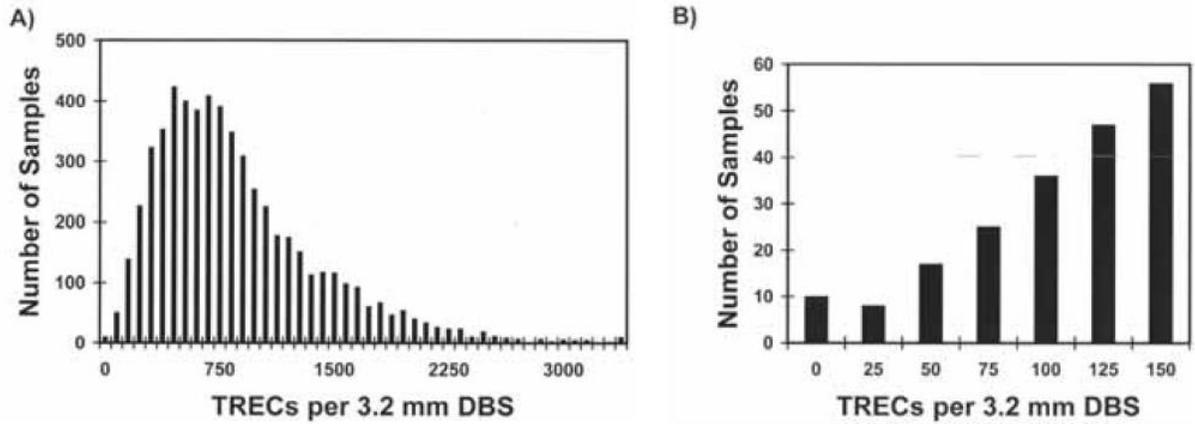


Figura 7. Resultados del ensayo inicial de TREC por RT-qPCR realizado por el programa NBS de Wisconsin a partir de 5,766 tarjetas NBS durante el estudio piloto para la evaluación de SCID en 2007. En la figura A se observa una gráfica de distribución, la cual nos muestra cuales son los valores de TRECs obtenidos de la población estudiada, en donde se observa que el valor máximo se encuentra entre 0 a 750 TRECs/ μ L. La figura B indica el valor de corte establecido (25 TRECs/ μ L) con respecto a la cantidad de muestras que se analizaron.

2. JUSTIFICACIÓN.

La ausencia de un procedimiento para realizar diagnóstico temprano del recién nacido con SCID, no solo imposibilita el establecer la prevalencia de esta inmunodeficiencia en nuestra población, al mismo tiempo retrasa el diagnóstico, lo que reduce el éxito del tratamiento y se reduce la esperanza de vida de estos pacientes. El diagnóstico oportuno y el tratamiento temprano permitirá ofrecer la oportunidad de tratamiento curativo, aumentando la sobrevida y mejorando la calidad de vida de la familia; de igual forma, permitirá que las instituciones de salud puedan ejercer de manera más eficiente los recursos materiales y humanos con los que cuenta para atender al paciente con inmunodeficiencia combinada grave.

3. HIPÓTESIS

Si el TREC δ Rec- ψ J α surge de la recombinación de los genes que codifican para las cadenas del TCR de los Ln T, entonces el realizar la cuantificación de éste nos permitirá conocer de manera indirecta la formación de dichas células en las muestras analizadas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Implementar la técnica de cuantificación de TRECs por PCR en tiempo real como programa piloto para la detección temprana de SCID en recién nacidos del estado de Tabasco.

4.2 Objetivos particulares.

- a) Establecer la distribución de valores de TRECs en recién nacidos del estado de Tabasco.
- b) Evaluar la utilidad del valor de corte reportado internacionalmente para el diagnóstico de SCID en la población mexicana.
- c) Evaluar el impacto que tiene en el resultado de cuantificación de TRECs el uso de un protocolo automatizado para la extracción del DNA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizaron muestras de DNA extraídas a partir de una muestra de sangre seca (tarjeta de Guthrie) de 480 niños recién nacidos del estado de Tabasco.

El DNA se obtuvo a partir de 6 µL de sangre seca (dos círculos de 3 mm obtenidos a partir de la tarjeta de Guthrie) y se usó el kit de extracción PrepFiler Express (Applied Biosystems) y un método manual para obtener DNA.

Para la realización de la PCR en tiempo real, se utilizaron primers y sonda (*Taqman*) del plásmido de TREC. La reacción utilizada fue previamente estandarizada. (*tabla 1*).

Tabla 1. Primers y sonda de TREC para la realización de la reacción de RQ-PCR.

Nombre	Secuencia
TREC forward primer	5'-CAC ATC CCT TTC AAC CAT GCT-3'
TREC reverse primer	5'-GCC AGC TGC AGG GTT TAG G-3'
TREC sonda	6-FAM-ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT-3'-TAMRA

Para la reacción de PCR, se utilizó *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y un *Copy number reference assay* con RNasa P como gen de control interno (Applied Biosystems); esta última también nos permite conocer de cuantas células se obtuvo el DNA. Para la construcción de la curva estándar se utilizaron

diluciones del plásmido estándar de TREC's con un intervalo dinámico de 10^6 a 10^1 copias de TREC's; mientras que para la curva de RNase P se utilizó el estándar de RNasa P (DNA humano, Applied Biosystems), la cual iba de 3000 copias a 4 copias de RNase P.

Procedimiento para preparar las muestras y analizarlas por la técnica de PCR en tiempo real.

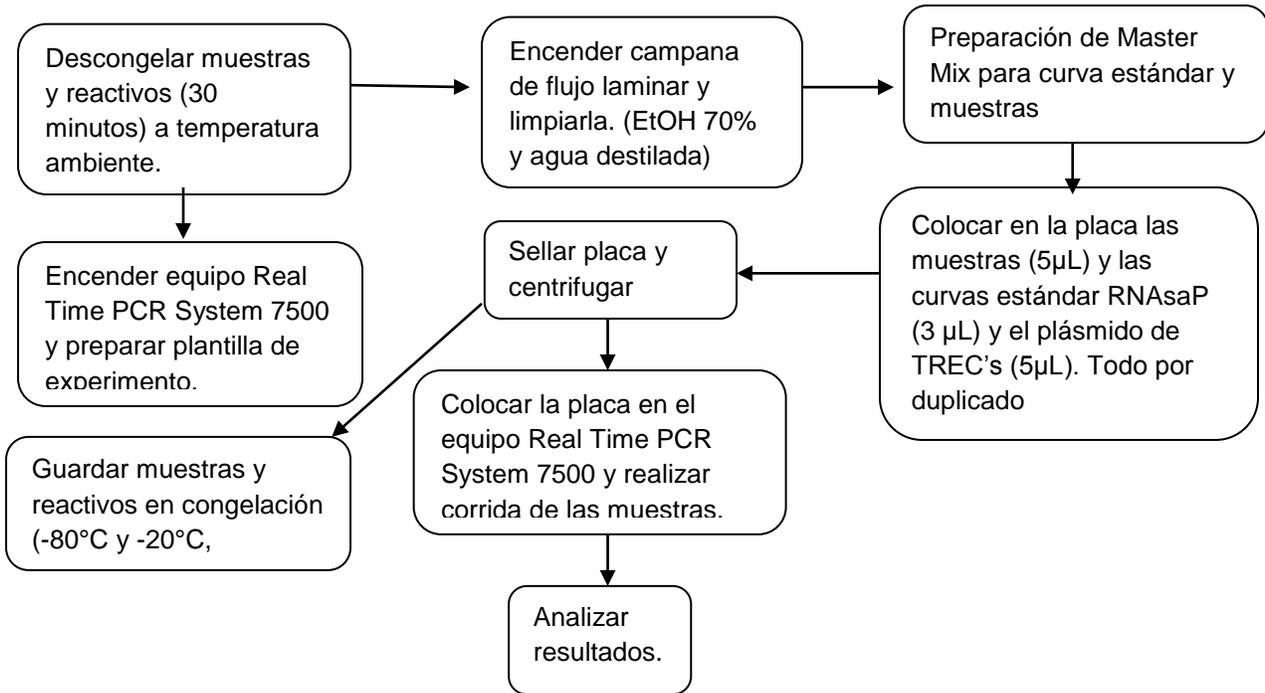
1. Descongelar muestras de Tabasco (40 muestras) y reactivos durante 40 minutos a temperatura ambiente.
2. Agitar muestras en el vortex con velocidad 6 por 20 segundos y realizar centrifugación de las muestras (1minuto a 3000 rpm).
3. Encender y limpiar campana de flujo laminar (EtOH 70%, agua destilada).
4. Encender equipo (7500 Real Time PCR) y preparar plantilla para realizar el experimento.
5. Preparar Master Mix (MM) para las curvas estándar y las muestras.
6. A partir de la columna 3 de la placa, colocar por duplicado 5 μ L de la muestra (DNA problema). En la columna 1 y 2 se colocarán los reactivos y los estándares para la curva estándar (por duplicado): 3 μ L de la RNAsaP (DNA humano) y 5 μ L del plásmido de TREC's.
7. Una vez colocadas las muestras y los estándares, colocar a cada pozo 13 μ L de la MM preparada anteriormente.
8. Sellar placa con película adhesiva.
9. Centrifugar durante 1 min, 3000 rpm.

10. Colocar placa en termociclador (7500 Real Time PCR) y realizar corrida de muestras.

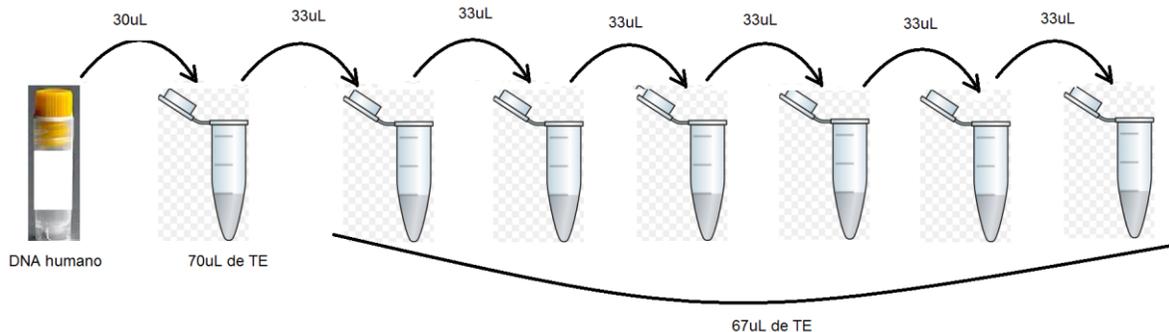
11. Analizar resultados.

Esquema general de trabajo

Preparación de placa para PCR



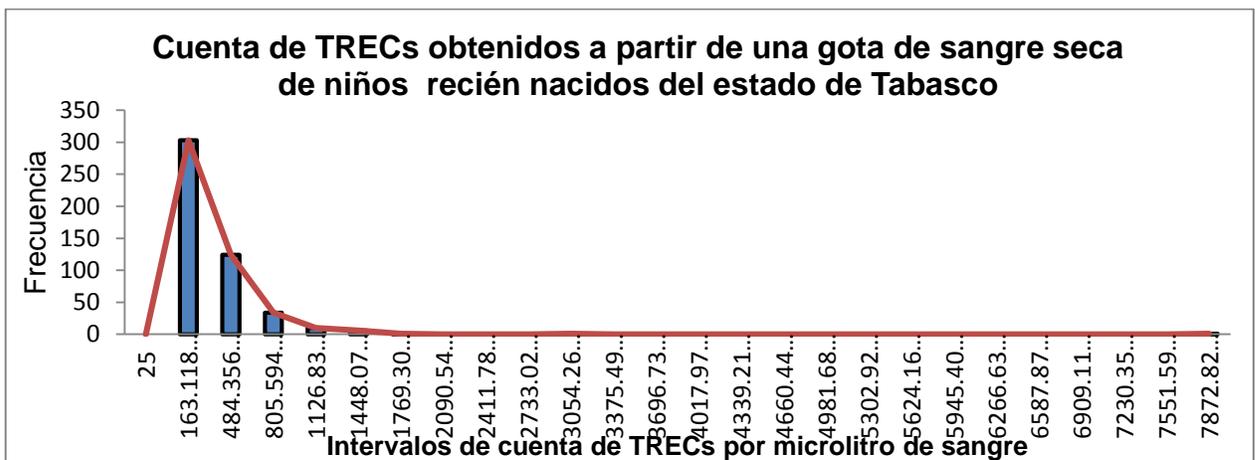
Preparación de estándares de RNasa P



6. RESULTADOS.

A continuación, se muestra una gráfica con los resultados obtenidos a partir de 480 muestras de niños recién nacidos del estado de Tabasco.

Gráfica 1. Frecuencia en la cuenta de TRECs a partir de muestras de pacientes pediátricos del estado de Tabasco.



En la gráfica 1 se observa la distribución del número de TRECs por microlitro de sangre. de las muestras de DNA analizadas.

De acuerdo con los datos obtenidos, se observa que la mayor parte de las muestras (aproximadamente 300), se encuentra en un rango de 163 TRECs/ μL de sangre, un poco más de 100 muestras presentan 484 TRECs/ μL de sangre, menos de 100 muestras tienen 806 TRECs/ μL de sangre, aproximadamente 20 muestras presentan 1127 TRECs/ μL de sangre y de 5 a 10 muestras presentan 7873 TRECs/ μL de sangre.

Adicionalmente se procesaron muestras, de pacientes con diagnóstico presuntivo de SCID y con ellas se pudo establecer la utilidad de la prueba. Es importante

mencionar que las muestras de estos pacientes se corrieron en un ensayo ciego simple. Los resultados obtenidos los muestro a continuación:

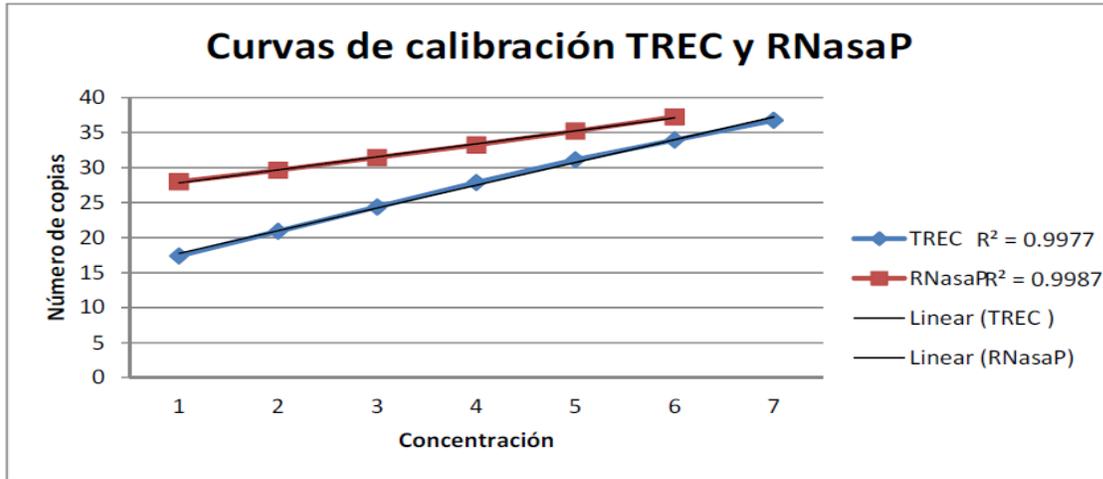
- P1 1.9813 TRECs/ μ L
- P2 16.9900TRECs/ μ L
- P3 5.9154 TRECs/ μ L
- P4 49.4740 TRECs/ μ L
- P5 23.5275 TRECs/ μ L

Para corroborar si el uso de un método automatizado para la extracción de DNA tiene un impacto sobre la cuantificación de TRECs, se realizó la comparación con las muestras de los pacientes con un diagnóstico presuntivo de SCID, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Comparación de la cuantificación de TRECs entre el método automatizado y manual.

Muestra	Método manual	Método automatizado
P1	1.324 TREC/ μ L	0.968 TREC/ μ L
P2	7.844 TREC/ μ L	12.046 TREC/ μ L
P3	5.648 TREC/ μ L	6.184 TREC/ μ L
P4	36.778 TREC/ μ L	44.207 TREC/ μ L
P5	10.767 TREC/ μ L	9.756 TREC/ μ L

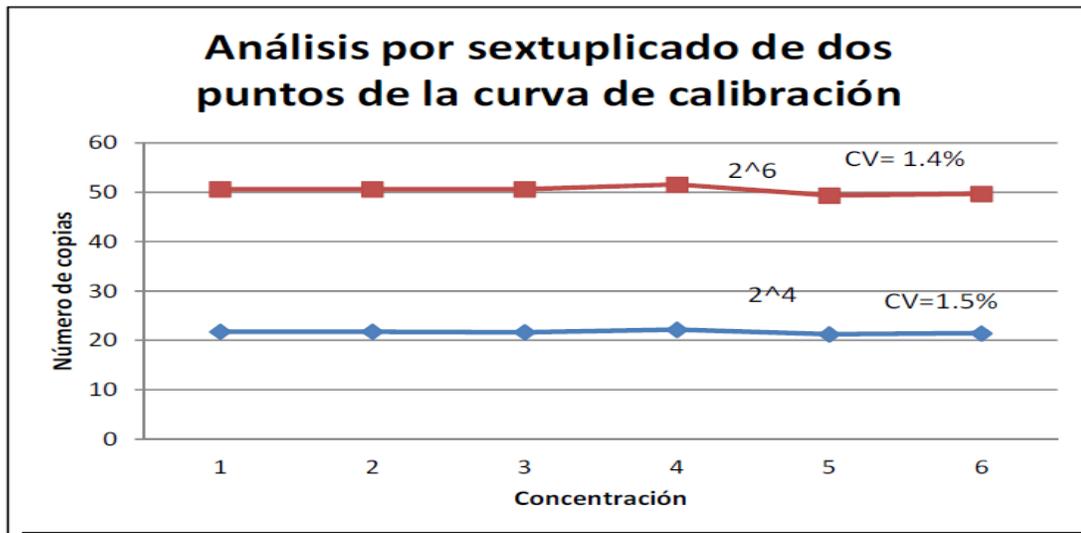
Validación de la técnica (obtenido de la tesis con referencia 20)



Gráfica 2. Número de copias obtenidas a diferentes concentraciones de TREC y RNasa P.

➤ **Precisión del sistema**

Se realizó un análisis por sextuplicado de dos puntos de la curva de calibración, los cuales fueron tomados al azar (2^6 y 2^4), teniendo como coeficiente de variación 1.4 % y 1.5% respectivamente.



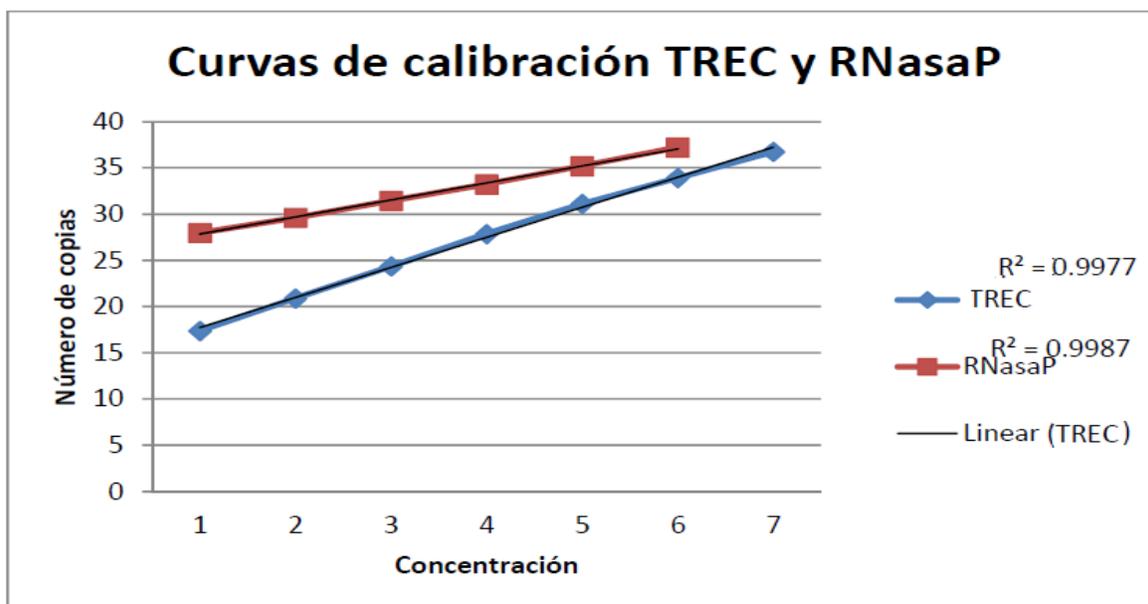
Gráfica 3. Análisis por sextuplicado de dos puntos de la curva de calibración.

- Linealidad del método.

Se realizó una curva estándar de RNAsa P y una de TREC obteniendo los siguientes datos:

Tabla 3. Valores de la curva estándar de TREC y RNAsa P.

	TREC	RNasa P
Pendiente	-3.365	-3.345
r²	0.998	0.997
Intersección con Y	41.39	40.27
Eficiencia	98.24	99.03



Gráfica 4. Curva estándar de RNAsa P y TREC.

- Exactitud del método

Se realizaron análisis en ciego de cuatro muestras otorgadas por la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias para la obtención del número de copias de TREC con un diagnóstico tentativo basado en el resultado.

Tabla 4. Número de copias de TREC de cuatro muestras en ciego.

Muestra	Copias/ μ L	Diagnóstico tentativo
1	310	Niño sano
2	478	Niño sano
3	6.36	SCID
4	458	Niño sano

Las muestras con las que se trabajaron fueron las siguientes:

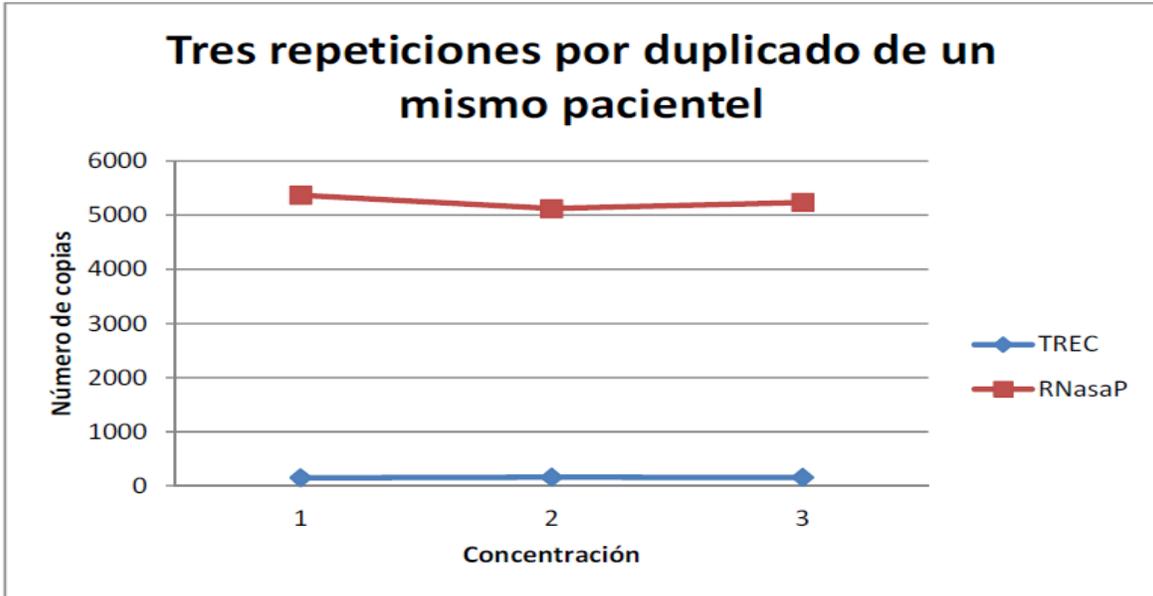
1. Sangre extraída de cordón umbilical de niño recién nacido sano.
2. Sangre extraída de niño sano de 12 días de nacido.
3. Niño confirmado con SCID.
4. Sangre extraída de niño sano de 1 año de edad.

➤ Precisión del método.

Se realizaron tres repeticiones de un mismo paciente por duplicado, posteriormente se obtuvo el promedio y el coeficiente de variación de cada repetición.

Tabla 5. Análisis de tres repeticiones por duplicado de un mismo paciente.

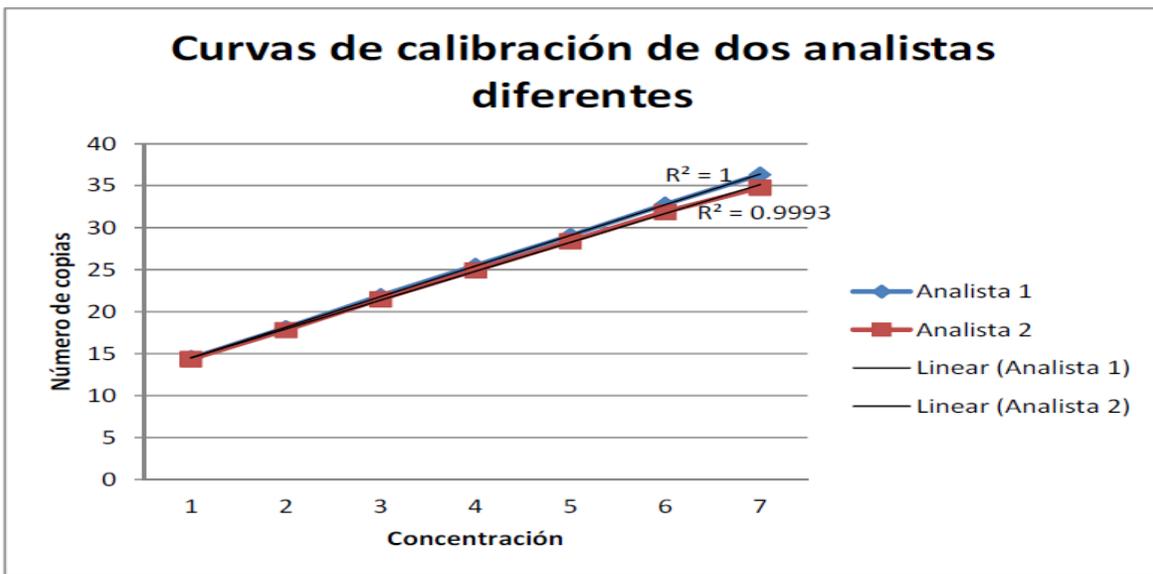
	Promedio de # de copias de TREC	Promedio de # de copias de RNasa P
	157.86	5.24E+03
CV	3.0%	2.83%



Gráfica 5. Promedio de los valores de tres repeticiones por duplicado de un mismo paciente.

➤ Estabilidad de la muestra.

Dos analistas en diferentes días realizaron tres curvas de calibración de TREC para observar el comportamiento de ésta y su constancia.



Gráfica 6. Promedio de las curvas de calibración de los dos analistas en diferentes días.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo a lo reportado en la literatura (estudio piloto realizado en Wisconsin), la distribución en la curva con respecto al número de TRECs por microlitro de sangre, se encuentra sesgada hacia la derecha y al compararse con los datos obtenidos en el presente trabajo, se observa una distribución similar a la que ellos reportan; esto sugiere que la distribución de los valores de cuantificación de TRECs no se ven afectados por el fondo genético de nuestra población, sin embargo se debe realizar el estudio estadístico correspondiente con un número mayor de muestras para sustentarlo. Además, hay que señalar que los datos obtenidos en esta gráfica solo representan a la población del estado de Tabasco por lo que sería conveniente realizar el estudio con una muestra representativa de todo el país para observar si los datos siguen presentando la misma tendencia.

Es importante destacar que el 80% (384) de las muestras tienen cuentas de TRECs por debajo de 500 TRECs/ μ L. Se encontró que la media de las muestras fue 306.83 TRECs/ μ L de sangre seca, mientras que la mediana fue de 201.52 TRECs/ μ L de sangre seca; el que la media sea mayor que la mediana nos explica el por qué la gráfica presenta esa tendencia de encontrarse desplazada hacia la derecha, lo que nos lleva a calcular los límites del ensayo y se obtuvo que como límite inferior tenemos 129 TRECs/ μ L (P_{25}) y como límite superior 471 TRECs/ μ L (P_{75}). Lo anterior nos indica que el 25% de las muestras analizadas presentan un valor menor que 129 TRECs/ μ L de sangre seca, mientras que el 75% de las muestras tiene un valor menor a 471 TRECs/ μ L de sangre seca.

Los valores obtenidos en las muestras que analizamos y de acuerdo al valor de corte (< 25 TRECs/ μL) reportado por Puck y colaboradores, en este grupo de muestras no se ha identificado a ningún recién nacido como probable SCID con este ensayo, sin embargo, es necesario señalar que debemos obtener un valor de corte propio y que se obtenga con muestras de recién nacidos mexicanos, el cual consideramos será de mayor utilidad.

Con respecto a los pacientes con el diagnóstico presuntivo de SCID se encontró que en el caso de los pacientes P1, P2 y P3 se confirma dicho diagnóstico, esto debido a que en los tres casos se encontraron valores de TRECs menores a 25 TRECs/ μL .

El caso del P4 se observa que a pesar de su valor de TRECs es bajo, es superior al valor de corte, por lo que puede decirse que no es SCID. Y en el seguimiento del caso las cuentas de Ln T se encontraron números normales para las poblaciones de linfocitos T, sin embargo, se diagnosticó como una inmunodeficiencia combinada no grave.

En el caso del P5 a pesar de presentar una cantidad de TRECs menor al valor de corte reportado en la literatura, la muestra proviene de un paciente con diagnóstico de SCID, después de 30 días post trasplante, porque lo que suponemos que el paciente se encuentra en franca recuperación, sin embargo, es necesario dar seguimiento al caso y confirmar su recuperación con el consiguiente aumento en el número de TRECs.

Contar con una opción para realizar la identificación de SCID en un breve periodo de tiempo da la oportunidad de proporcionar tratamiento oportuno para aquellos pacientes en los cuales se confirma la inmunodeficiencia.

Otro punto importante por analizar es el tiempo que tarda la muestra en procesarse, esto se menciona debido a que la mayoría de las muestras analizadas en este trabajo se procesaron aproximadamente un año después de que la muestra fuera tomada, y esto generó algunos problemas al momento en que se realizó la cuantificación de TRECs. Uno de los inconvenientes observados de manera repetida fue que los valores obtenidos entre ambas réplicas de una misma muestra, generaban desviaciones estándar muy amplias, y lo anterior provocaba que la cuantificación tuviese que repetirse, por otro lado, con una muestra que se analizó 20 días después de que ésta fuera tomada, se encontró consistencia en el número de TRECs/ μ L de sangre seca obtenidos en las réplicas de la muestra en las diferentes determinaciones a las cuales fue sometida. Este dato es de suma importancia, debido a que, si se quieren tener resultados confiables y consistentes, es necesario analizar la muestra lo más pronto posible a partir de la fecha en que se obtuvo el DNA.

Para comprobar si existe alguna diferencia entre el uso del método automatizado con respecto al método manual para la extracción de DNA, en algunas de las muestras se realizó la extracción con el método automatizado y también con el método manual y al realizarse la cuantificación se encontró que los números de TRECs obtenidos son muy similares, por lo que es posible reemplazar el método

automatizado por el método manual, debido a que en ambos métodos se obtienen resultados consistentes y con ello nos aseguramos de que éstos sean confiables.

Otra situación importante de mencionar es que es vital que la cantidad de DNA sea la suficiente para que los datos de TREC's que se obtengan sean correctos, esto debido a que en muchas de las muestras se encontró que se encontraban valores bajos en la cuenta de TREC's así como en los valores de la RNAsa P. Esto ocasionó que las muestras tuviesen que repetirse e inclusive en algunos casos repetir la extracción de DNA y volver a analizar dicha muestra. Esta peculiaridad también es reportada por Jennifer Puck en una de las comparaciones que realiza en las diferentes técnicas para la identificación de SCID; es por ello que no sólo es necesario la correcta extracción de DNA, sino que desde la toma de muestra del talón del recién nacido tiene que ser adecuada, no siendo tan diluida ni tan concentrada, ya que eso ocasiona que la extracción de DNA sea difícil de realizar.

8. CONCLUSIONES

- El protocolo de PCR que hemos implementado representa una herramienta de utilidad para apoyar el diagnóstico de SCID.
- Los valores de TRECs obtenidos por el método automatizado y manual son similares por lo que se puede realizar su cuantificación por cualquier método.
- El tiempo de procesamiento de la muestra si es importante para poder obtener resultados confiables en la cuantificación de TRECs por PCR en tiempo real.

9. PERSPECTIVAS

Dentro de este proyecto se quiere en un futuro no muy lejano poder establecer un valor de corte propio y con ello poder realizar una cuantificación más adecuada con respecto a la población mexicana. Además, se pretende implementar esta técnica en otras entidades de la Secretaria de Salud en sus programas de tamiz neonatal, esto con el fin de poder lograr la identificación oportuna de esta inmunodeficiencia y con ello establecer el mejor tratamiento para los pacientes pediátricos que sean positivos para SCID.

Así como en Estados Unidos, en donde 27 estados del país han realizado la implementación de la técnica en sus evaluaciones neonatales y con ello el diagnóstico y tratamiento temprano de pacientes con SCID, inclusive en España y Brasil, se comienza a querer la implementación de la técnica para la identificación de esta inmunodeficiencia.

Otra cuestión importante de mencionar es el costo, aproximadamente por niño cuesta de \$12 (por prueba). Incluso el costo por diagnóstico y tratamiento tardío es mayor a que si se realiza el diagnóstico y tratamiento temprano. Esta es una razón más para realizar la implementación de la técnica en nuestro país.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, Abul K., "Inmunología celular y molecular", 6ta edición, Editorial Elsevier Saunders. 2006
2. Male, David K., "Inmunología", Editorial Elsevier, España, 2007
3. Rabinovich, Gabriel A, "Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina, un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica", Editorial Médica Panamericana, 2004.
4. Prieto, Prieto J, de la Rosa, Manuel., "Microbiología en ciencias de la salud: conceptos y aplicaciones", Editorial Elsevier, España, 2011.
5. Parham, Peter., "Inmunología", Editorial Médica Panamericana, 2006
6. Tamayo, García F., "Fundamentos de Inmunobiología", UNAM, 1997
7. Mei W. Baker, MD [et. al], 2009. **Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency.** J Allergy Clin Immunol 124:522-7.
8. Mei W Baker, Ronald H. Laessing; Murray L. Katcher; John M. Routes; William J. Grossman; James Verbsky; Charles D. Brokopp. 2010. **Implementing Routine Testing for Severe Combined Immunodeficiency within Wisconsin's Newborn Screening Program.** Public Health Reports. 125(Suppl 2): 88-95
9. Jennifer M. Puck. 2012. **Laboratory technology for population-based for severe combined immunodeficiency in neonates: The winter is T-cell receptor excision circles.** J Allergy Clin Immunol Mar; 129(3):607-16

10. Mette D. Hazenberg, Martie C.M. Verschuren, DorteHamaan, Frank Miedemaand J.M. van Dongen. 2002. **T cell receptor excision circles (TRECs) as markers for recent thymic emigrants. Basic aspects, technical approach and guidelines interpretation.** Nov;79(11):631-40.
11. McCusker Christine. Richard Warrington. 2011. **Primary immunodeficiency.** Allergy, Asthma & clinical immunology. 7(Suppl 1): S11
12. Raif S. Geha; Luigi D. Notarangelo; Jean- Laurent Casanova; Helen Chapel; Mary Ellen Conley; Alain Fischer; LennartHammasstrom;ShigeakiNonoyama Hans D. Ochs; Jennifer M. Puck; ChaimRoifman; ReinhardSeeger and Josaih Wedgwood. 2007. **Primary immunodeficiency diseases: An update from the international Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee.** Oct;120(4):776-94.
13. Luigi D. Notarangelo 2010. **Primary immunodeficiencies.** Allergy Clin Immunol. Feb;125(Suppl.2): S182-94
14. **Evaluación del recién nacido en Massachusetts: Respuestas para usted y su bebé.** Department of public health. Disponible <https://nensp.umassmed.edu/sites/nensp.umassmed.edu/files/Spanish.pdf>.
15. Serana Federico; Marco Chiarini, Cinzia Zanotti; Alessandra Sottini; Diego Bertoli; Andrea Bosio: Luigi Caimi and Luisa Imberti. 2013. **Use of V(D)J recombination excision circles to identify T-and B- cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies.** Journal of translational medicine. 11:119

16. Kee Chan and Jennifer M. Puck. 2005. **Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency.** American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Feb;115(2):391-8.
17. Antonio Velázquez Arellano. 2001. **Tamiz neonatal: problemas, estrategias y perspectivas.** Bol Med; 58(11):753-754.
18. Roitt, “Inmunología. Fundamentos”, Editorial Médica Panamericana, 2008
19. Murphy Kenneth. “Inmunología de Janeway”, 7 edición, Editorial McGrawHill, 2009.
20. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., “Molecular Biology of the cell”, 4 edición, Editorial Garland Science, 2002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26926/#A4525>
21. Tesis **“Validación de un método de cuantificación de círculos de escisión de células T por PCR en tiempo real a partir de extracción de DNA del tamíz neonatal para diagnóstico oportuno de Inmunodeficiencia Combinada Severa”**, para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biotecnólogo, presentado por: Erika Haydee Acosta Alvarado.
22. Xueling Ou, Hu Zhao, Hongyu Sun, Zhengfei Yang, Bailu Xie, Yanwei Shi, Xinyao Wu, 2010, **Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood.** Springer- Verlag July, Vol.125, Issue 4, pp.603-608.

23. Medhi M. Adeli. and Rebecca H. Buckley., 2010, **Why Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency is essential: A case report.** Official Journal of the American Academy of Pediatrics. August, vol. 126 / Issue 2.

24. Menno C. van Zelm., Mirjam van der Burg., Anton W. Langerak and Jacques J.M. van Dongen. 2011. **PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles of research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders.** Frontiers in Immunology. 2:12.

25. Lang, P.O., Mitchell, W.A., Govind, S., Aspinall, R., 2011. **Real Time-PCR assay estimating the naive T-cell pool in whole blood and dried blood spot samples: Pilot study in Young adults.** Elsevier. Jun 30;369(1-2):133-40.

26. Chase, Nicole M., Verbsky, James W. and Routes John M. 2011. **Newborn screening for SCID: three years of experience.** Annals of the New York Academy of Sciences. 1238:99-105.

27. Trigo Madrid, Max., Díaz Gallardo, Javier., Mar Aldana, Roberto., Ruíz Ochoa, Deyanira., Moreno Graciano, Claudia., Martínez Cruz, Patricia., Herrera Pérez, Luis del Alba., De la Torre García, Oliver. 2014. **Resultados del programa de Tamiz Neonatal Ampliado y epidemiología perinatal en los servicios de sanidad de la Secretaría de Marina Armada de México.** Acta Pediátrica de México. Vol.35, núm. 6, pp.448-458.

28. Norma Oficial Mexicana, NOM -034-SSA2-2013, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento. Diario Oficial de la Federación, 24 de junio de 2014.

29. Barba Evia José Roberto. 2004. **Tamiz neonatal: una estrategia en la medicina preventiva.** Federación Mexicana de Patología Clínica. Vol. 51, núm. 3, pp. 130-144.

30. Thakar, Monica S., Hintermeyer, Mary K., Gries, Miranda G., Routes, John M. and Verbsky, James. 2017. **A practical approach to Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency using the T Cell Receptor Excision Circle Assay.** Front Immunol. 8:1470

31. Kwan, Antonia., Roshini, Abraham S., Currier, Robert., Brower, Amy., Andruszewski, Karen., Abbott, Jordan K., Baker, Mei., Ballow, Mark., Bartoshesky, Louis E., Bonagura, Vincent R., Bonilla, Francisco A., Brokopp, Charles., Brooks, Edward., Caggana, Michele., Celestin, Jocelyn., Church, Joseph A., Comeau, Anne Marie., Connelly, James A., Cowan, Morton J., Cunningham Rundles, Charlotte., Dasu Trivikram., Dave, Nina., De La Morena, Maria T., Duffner, Ulrich., Fong, Chin-To., Forbes, Lisa., Freedenberg, Debra., Gelfand, Erwin W., Hale, Jaime E., Hanson, I. Celine., Hay, Beverly N., Hu, Diana., Infante Anthony., Johnson, Daisy., Kapoor, Neena., Kay, Denisse M., Kohn, Donald B., Lee, Rachel., Lehman, Heather., Lin, Zhili., Lorey, Fred., Abdel Mageed, Aly., Manning, Adrienne., McGhee, Sean., Moore, Theodore B., Naides, Stanley J., Notarangelo, Luigi D., Orange, Jordan S., Pai, Sung-Yun., Porteus, Matthew., Rodríguez, Ray., Romberg, Neil., Routes, John., Ruehle, Mary., Rubenstein Arye., Saavedra Matiz, Carlos A., Scott, Ginger., Scott, Patricia M., Secord, Elizabeth., Seroogy, Christine., Shearer, William T., Siegel, Subhadra., Silvers, Stacy K., Stiehm, Richard E., Sugerman, Robert W., Sullivan, John L., Tanksley, Susan., Tierce,

Millard L., Verbsky, James., Vogel, Beth., Walker, Rosalyn., Walkovich, Kelly., Walter, Jolan E., Wasserman, Richard L., Watson, Michael S., Weinberg, Geoffrey A., Weiner, Leonard B., Wood, Heather., Yates, Anna B., and Puck Jennifer M.

2014. **Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States.** JAMA. Aug 20;312(7): 729-738

32. Vela Amieva, Marcela., Ibarra Gonzalez, Isabel., Fernández Lainez, Cynthia., Belmont Martínez, Leticia. 2012. **Fundamentos teórico-prácticos para la toma correcta de la muestra de sangre de talón para el tamiz neonatal.** Acta Pediátrica Mexicana. 33(6):273-278

33. García Martínez, JM., Santos Díez, L., Dopazo, L., 2013. **Diagnóstico de las inmunodeficiencias primarias.** Asociación Española de Pediatría.1:81-92

34. Villarrubia, N., León, F., Bootello, A. 2002. **Los linfocitos T γ/δ y su papel en procesos de hipersensibilidad en la mucosa digestiva y respiratoria.** Allergol et Immunopathol. 30:273-82

35. Alsina, L., Llobet- Agulló, P., Soler- Palacín, P. 2014. **Extending neonatal screening to the detection of severe combined immunodeficiencies. A moral imperative.** An Pediatr.81: 273-4

36. Contreras- Verduco, Francisco Alberto., Morales-Vázquez, Adriana., Medina-Torres, Edgar Alejandro., Espinosa-Padilla, Sara Elva. 2014. **Diagnóstico oportuno de la Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID) a través del tamiz neonatal.** Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas. Vol. 23, Núm. 2, pp 48-56

37. Puck, Jennifer M. 2007. **Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: Steps toward implementation.** J Allergy Clin Immunol. Oct;120(4):760-8.
38. Morinishi, Yoichi., Imai, Kohsuke., Nakagawa, Noriko., Sato, Hiroki., Horiuchi, Katsuyuki., Ohtsuka, Yoshitoshi., Kaneda, Yumi., Taga, Takashi., Hisakawa, Hiroaki., Miyaji, Ryosuke., Endo, Mikiya., Oh-ishi, Tsutomu., Kamachi, Yoshiro., Akahane, Koshi., Kobayashi, Chie., Tsuchida, Masahiro., Morio, Tomohiro., Sasahara, Yoji., Kumaki, Satoru., Ishigaki, Keiko., Yoshida, Makoto., Urabe, Tomonari., Kobayashi, Norimoto., Okimoto, Yuri., Reichenbanch, Janine., Hashii, Yoshiko., Tsuji, Yoichiro., Kogawa, Kazuhiro., Yamaguchi, Seiji., Kanegane, Hirokazu., Miyawaki, Toshio., Yamada, Masafumi., Ariga, Tadashi and Nonoyama, Shigeaki. 2009. **Identification of Severe Combined Immunodeficiency by T-Cell Receptor Excision Circles Quantification Using Neonatal Guthrie Cards.** The Journal of Pediatrics. Vol.155, Núm 6:829-33.
39. Kwan, Antonia. and Puck Jennifer. 2015. **History and Current Status Of Newborn Screening For Severe Combined Immunodeficiency.** Semin Perinatol. Apr; 39(3): 194-205.
40. Sarzotti- Kelsoe, Marcella., Win, Chan M., Parrott, Roberta E., Conney, Myriah., Moser, Barry K., Roberts, Josehp L., Sempowski., Gregory D. and Buckley, Rebecca H. 2009. **Thymic output, T-cell diversity, and T-cell funtion in long-term human SCID chimeras.** Blood, 13 August, Volume 114, number 7 : 1445-1453.

41. Forman, Michelle M. 2010. **WI Public Health Lab Identifies First SCID Baby Using New TREC Assay.** Association of Public Health Laboratories. June 16.
42. Van der Burg, Mirjam and Gennery, Andy R. 2011. **The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency.** *Fur J Pediatric.* May; 170(5): 561-571.
43. Brown, Lucinda., Xu- Bayford, Jinhua., Allwood, Zoe., Slatter, Mary., Cant, Andrew., Graham Davis, E., Veys, Paul., Gennery, Andrew R. and Gaspar Bobby. 2011. **Neonatal Diagnosis of severe combined immunodeficiency leadsto significantly improved survival outcome: the case for newborn screening.** *Blood* 117:3243-3246.
44. Chan, Alice., Scalchunes, Christopher., Boyle, Marcia. and Puck Jennifer. 2011. **Early vs. Delayed Diagnosis of Severe Combined Immunodeficiency: A family Perspective Survey.** *Clin Immunol.* Jan: 138(1): 3-8.
45. Gerstel-Thompson, JL., Wilkey, JF., Baptiste, JC., Navas, JS., Pai, SY., Pass, KA., Eaton, RB. and Comeau, AM. 2010. **High-throughput multiplexed T-cell-receptor excision circle quantitative PCR assay with internal controls for detection of severe combined immunodeficiency in population-based newborn screening.** *Clin Chem Sep;* 56(9): 1466-74.
46. Marilia Pyles Patto Kanegae, Lucila Akune Barreiros, Juliana Themudo Lessa Mazzucchelli, Sonia Marchezi Hadachi, Laura Maria de Figueiredo Ferreira Guilhoto, Ana Lúcia Acquesta, Isabel Rugue Genov , Silvia Maia Holanda, Regina Sumiko Watanabe Di Gesu, Ana Lucia Goulart, Amélia Miyashiro Nunes dos

Santos, Newton Bellesi, Beatriz Tavares Costa-Carvalho, Antonio Condino-Neto. 2016. **Neonatal screening for severe combined immunodeficiency in Brazil.** J Pediatric (Rio J); 92: 374-80.

47. Olbrich, P., de Felipe, B., Delgado-Pecellin, C., Rodero, R., Rojas, P., Aguayo, P., Marquez, J., Casanovas, J., Sánchez., Lucena, J.M., Ybot-González, P., Borte, S. and Neth, O. 2014. **A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECS and KRECS identify severe T-and B cell lymphopenia.** An Pediatr (Barc); 81:310-7.