



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

CUANTIFICACIÓN DE CÍRCULOS DE  
ESCISIÓN DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T  
(TRECS) POR PCR EN TIEMPO REAL:  
PRUEBA DE APOYO PARA EL DIAGNÓSTICO  
TEMPRANO DE INMUNODEFICIENCIA  
COMBINADA GRAVE (SCID) EN  
POBLACIÓN PEDIÁTRICA MEXICANA.

TRABAJO DE TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

EVELYN GONZÁLEZ REVILLA

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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: GIBRAN PEREZ MONTESINOS

SECRETARIO: Profesor: EDGAR ALEJANDRO MEDINA TORRES

1er. SUPLENTE: Profesor: ENRIQUE DE LEÓN LARA

2° SUPLENTE: Profesor: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ASESOR DEL TEMA:

EDGAR ALEJANDRO MEDINA TORRES

\_\_\_\_\_

SUSTENTANTE:

EVELYN GONZÁLEZ REVILLA

\_\_\_\_\_

ABREVIATURAS.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1 SISTEMA INMUNOLÓGICO .....	2
1.2 HEMATOPOYESIS .....	3
1.3 LINFOCITOS .....	4
1.3.1 <i>Ontogenia de los Linfocitos T</i> .....	4
1.3.2 <i>Maduración de linfocitos T</i> .....	4
1.3a Tipos de linfocitos.....	7
1.4 RECEPTOR DE CÉLULA T.....	8
1.4.1 <i>Recombinación V (D) J</i> .....	8
1.4a TRECs.....	10
1.5 INMUNODEFICIENCIAS .....	11
1.5.1 <i>Inmunodeficiencias Primarias</i> .....	11
1.5.2 <i>Inmunodeficiencia combinada grave</i> .....	11
1.5a Cuadro clínico de SCID.....	12
1.5b Heterogeneidad génica de SCID .....	13
1.5c Tipos de SCID.....	13
1.5d Prevalencia epidemiológica.....	15
1.5.3 <i>Tratamiento y profilaxis</i> .....	16
1.6 DIAGNÓSTICO.....	17
1.6.1 <i>Historia del diagnóstico de SCID</i> .....	18
1.7 TAMIZ NEONATAL.....	18
1.8 PRUEBA DE TRECS .....	20
1.8.1 <i>Fundamento de la prueba</i> .....	20
1.8.2 <i>Impacto clínico de tamizaje para SCID</i> .....	21
1.8a Blancos secundarios .....	21
1.8.3 <i>Pruebas confirmatorias de SCID</i> .....	22
1.9 SITUACIÓN ACTUAL EN EL EXTRANJERO.....	22
1.9.1 <i>Resultados de la implementación en otros países</i> .....	23
1.10 IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA EN MÉXICO.....	24
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	26

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
4. HIPÓTESIS .....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.0 MUESTRAS .....	27
5.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN.....	27
5.2 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL .....	28
a) <i>Reactivos y distribución de muestras</i> .....	28
b) <i>Curvas de Calibración</i> .....	29
c) <i>Cuantificación de TRECs</i> .....	29
d) <i>Resultados y criterios de aceptación</i> .....	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1 GRUPO CONTROL .....	31
a) <i>Comparación talón y cordón</i> .....	31
b) <i>Valor de referencia para población mexicana</i> .....	32
6.1 BASE DE DATOS DE TABASCO .....	33
6.2 CASOS SCID.....	33
6.3 CONTROL DE CALIDAD DEL ENSAYO .....	34
a) <i>Relación TRECs/RNasa P</i> .....	34
b) <i>Reproducibilidad del ensayo</i> .....	35
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	36
7.1 ENSAYO DE TRECS.....	36
a) <i>Reproducibilidad</i> .....	37
b) <i>Valor relativo de TRECs/RNasa P</i> .....	37
7.2 CONTROL DE CALIDAD .....	38
a) <i>Condiciones de las muestras</i> .....	39
7.3 GRUPO CONTROL .....	40
a) <i>Comparación talón vs cordón</i> .....	41
b) <i>Valor de referencia</i> .....	42
7.4 MUESTRAS DEL ESTADO DE TABASCO .....	42
7.5 PACIENTES .....	43
7.6 IMPLEMENTACIÓN .....	46
a) <i>Legalidad</i> .....	46

<i>b) Costo-beneficio.....</i>	<i>46</i>
<i>c) Trabajo pendiente.....</i>	<i>46</i>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>

## ABREVIATURAS

AD: autosómica dominante

ADA: adenosin deaminasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AR: autosómica recesiva

CLP: progenitor linfoide común

CMV: citomegalovirus

CTL: linfocitos citotóxicos

Cq: *quantification cycle*

DP: *double positive thymocytes*

DN: *double negative thymocytes*

ERT: *enzyme replacement therapy*

EBV: *Epstein Barr Virus*

HSC: *hematopoietic stem cell*

IDP: inmunodeficiencia primaria

ILR2G: *interleukin 2 receptor gamma gene*

ITAM: *Immune receptor tyrosine-based activation motif*

IUIS: *International Union of Immunological Societies*

JAK3: *Janus-associated kinase 3 gene*

μL: microlitros

LT: linfocito T

MHC: *Major histocompatibility complex*

MO: médula ósea

NK: célula *Natural Killer*

PCR: *polimerase chain reaction*

RAG: Gen activador de recombinación

RT-q-PCR: *Real Time quantitative PCR*

SCID: *severe combined immunodeficiency*

SP: *single positive thymocytes*

TCL: *T-cell lymphopenia*

TCPH: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

TCR: *T-cell Receptor*

TdT: enzima deoxinucleotidil transferase terminal

TMEC: células epiteliales medulares tímicas

TREC: *T-cell-receptor excision circle*

T reg: Linfocitos T reguladores

XL-SCID: SCID recesivo ligado a X

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Sistema inmunológico

El sistema inmunológico reconoce **moléculas llamadas "antígenos"**, con la finalidad de distinguir aquellos potencialmente dañinos y eliminarlos. Los antígenos dañinos pueden ser parte de agentes externos o tener origen intrínseco debido a desregulaciones de causa diversa (genética, medioambiente, estilo de vida, entre otros)<sup>4, 5</sup>.

Los mecanismos de defensa del sistema inmunológico se clasifican en dos tipos de respuesta: a) la inmunidad innata genera una respuesta al **identificar ciertos "Patrones Moleculares Asociados a Daño"; pero es** necesaria una segunda respuesta, la b) inmunidad adaptativa, que a su vez se divide en: i) inmunidad humoral (anticuerpos y componentes del complemento que viajan en el torrente sanguíneo) y en ii) la inmunidad celular, un conjunto de células inmunológicas especializadas en erradicar elementos dañinos al organismo y algunas células incluso mantienen una **"memoria inmunológica"**<sup>4</sup>.

El tema de estudio de esta tesis compete, principalmente, al sistema adaptativo, por lo que es importante profundizar en el estudio de dichas células inmunológicas. Empezando por su origen, la hematopoyesis (Figura 1.1).



## 1.2 Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso de crecimiento, división y diferenciación de las células sanguíneas<sup>55</sup>. Estas, provienen de un conjunto de células progenitoras hematopoyéticas pluripotenciales o HSC (*Hematopoietic Stem Cells*) de fenotipo CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>. Al inicio de la vida de un individuo, las HSC se originan en el mesodermo del saco vitelino y tras una migración por el hígado fetal, se establecen permanentemente en la médula ósea (MO). Una vez en MO, se exponen a un microambiente específico de citocinas (factores estimuladores de colonias) que favorecen la diferenciación celular<sup>55</sup> (Figura 1.1).

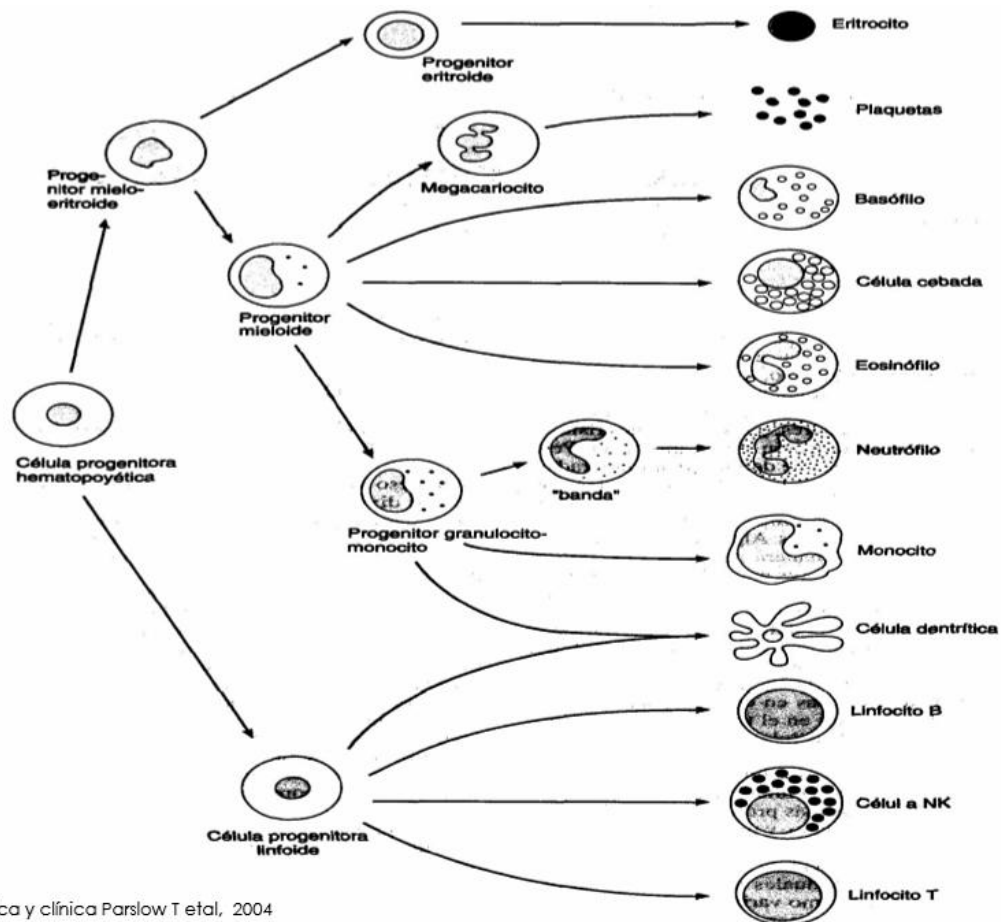


Figura 1.1 Hematopoyesis de células sanguíneas. A partir de una célula progenitora hematopoyética pluripotencial se originan una serie de células sanguíneas, según el microambiente de citocinas del sitio anatómico en que se diferencien<sup>55</sup>.

### 1.3 Linfocitos

De las células que se diferencian en la hematopoyesis, existen varias poblaciones de linfocitos, entre ellas: T, B y NK<sup>82</sup>. Los linfocitos T y B reciben sus nombres según el sitio anatómico en el que concluyen su proceso de maduración (timo y MO respectivamente); mientras que los linfocitos *Natural Killer* (NK), por la acción citolítica que ejercen.

De los linfocitos T precursores que salen de MO un 20 % se diferencia a NKT y el resto llega a madurar al timo. Esto sucede desde la formación de dicho órgano, en las semanas 9 a 10 de gestación. Los linfocitos T formados comienzan a activarse por la exposición a aloantígenos en el útero materno, sin embargo, se genera tolerancia gracias a un tipo de linfocitos T reguladores (T reg) del embrión sano<sup>20, 44</sup>.

#### 1.3.1 Ontogenia de los Linfocitos T

La principal característica de los linfocitos T es la expresión del receptor de célula T (TCR), esencial para el reconocimiento de antígenos cargados a moléculas propias del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

Es necesaria una gran diversidad de TCRs de secuencia única para reconocer a casi todos los patógenos existentes; esta diversidad se genera durante la maduración y solo es posible gracias a un rearreglo genético<sup>37</sup> que se describirá más adelante.

#### 1.3.2 Maduración de linfocitos T

Mediante los vasos sanguíneos que irrigan la región cortical del timo (Figura 1.2), llega a su primer estadio de diferenciación un progenitor linfoide común (CLP) con fenotipo: HLA-DR, IL-7R, CD34<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD2<sup>+</sup>, CD45 débil y TdT nuclear<sup>19</sup>. Las células epiteliales de corteza tímica estimulan a los timocitos mediante el ligando de Notch y un ambiente rico en factor de crecimiento de timocitos (IL-7).

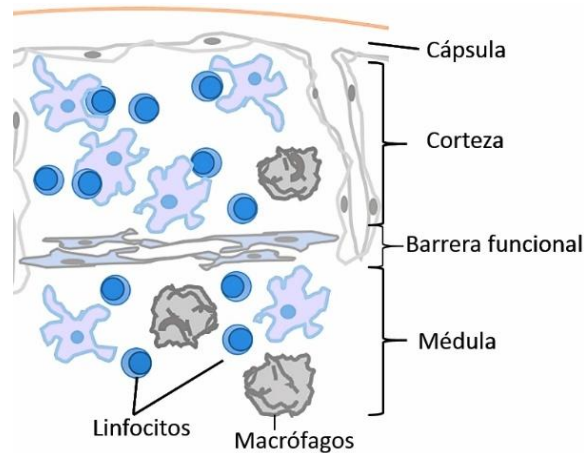


Figura 1.2 Representación de la estructura interna del timo. El timo es un órgano linfóide primario capsulado, en el cual maduran los timocitos. Además de timocitos, podemos encontrar células epiteliales y macrófagos.

La selección de timocitos durante la maduración, asegura la inmunocompetencia, es decir, la capacidad de reconocer antígenos foráneos potencialmente dañinos y no reaccionar ante lo propio. Este proceso de selección, comienza con los timocitos dobles negativos (DN) en la corteza tímica, cuya principal tarea es sintetizar un TCR funcional (Figura 1.3).

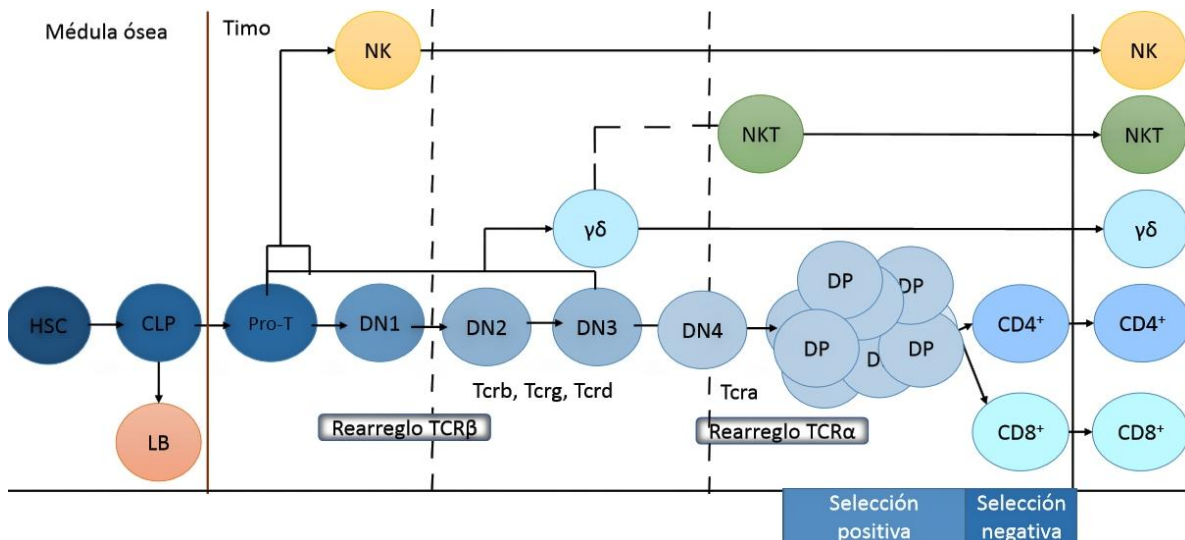
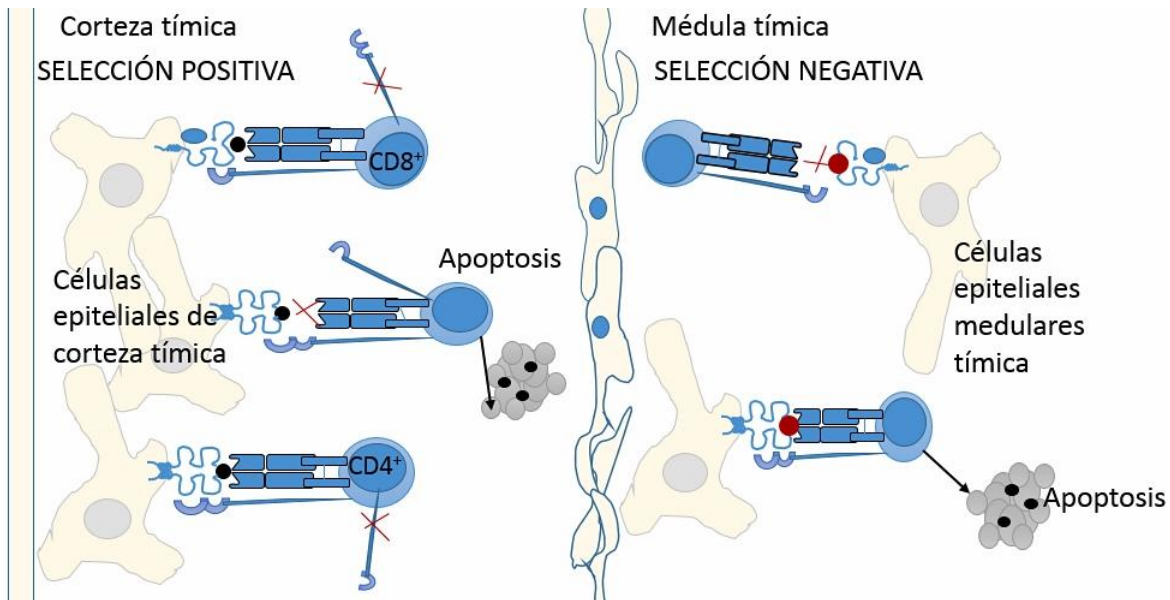


Figura 1.3 Diferenciación de linfocitos. A partir de una célula HSC en médula ósea, se generan todos los tipos de linfocitos. En específico, la diferenciación del linfocito T (linaje azul) muestra sus diferentes estadios, correlacionados con el rearreglo de genes (*Tcrb*, *Tcrγ*, *Tcrδ* y *Tcrα*) para la expresión del TCR y sus posteriores selecciones: positiva y negativa. Abreviaturas: HSC, "hematopoietic stem cell"; CLP, progenitor linfóide común; LB, linfocito B; DN, doble negativo; NK, "natural killer"; DP, doble positivo.

La formación de TCR se detallará en la siguiente sección, sin embargo, una vez que se forma el Receptor de Célula T, los timocitos expresan dos complejos de diferenciación simultáneamente: 4 y 8. Por consiguiente, se les conoce como dobles positivos (DP) (Figura 1.3) y aún en la corteza tímica, se enfrentan a la selección positiva (Figura 1.4).



*Figura 1.4 Selección positiva y negativa. En la corteza tímica se lleva a cabo la selección positiva (izquierda), donde el timocito ( $CD3^+ \alpha:\beta^+ CD4^+ CD8^+$ ) se enfrenta a antígenos cargados a moléculas del MHC que presentan las células epiteliales de corteza tímica; si no existe reconocimiento, el timocito muere por apoptosis, pero sí reconoce la molécula, se diferencia a positivo sencillo. El positivo sencillo migra a la médula tímica y se enfrenta a antígenos propios expresados por las células epiteliales medulares tímicas; esta es la selección negativa (derecha), en la que el timocito no debe reconocer lo propio, de lo contrario muere por apoptosis.*

En la selección positiva, el linfocito reconoce a una única molécula de clase I o de clase II mediante su TCR. Si la interacción se lleva a cabo con una molécula de clase I, se acopla el CD8 y si la interacción es con una molécula de clase II, el CD4 permanece expresado. Si el TCR no reconoce las moléculas, muere por apoptosis y es fagocitado por macrófagos en el

timo (Figura 1.2). Los linfocitos resultantes solo continúan la expresión del clúster que reconoció a la molécula del MHC, quedando como positivos sencillos (SP) (Figura 1.3). **La selección positiva asegura una “restricción génica”, es decir, que los linfocitos T reconozcan antígenos presentados únicamente en moléculas propias.**

Gracias a la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, el SP migra a la médula del timo, donde se lleva a cabo la selección negativa (Figura 1.4); aquí las células epiteliales medulares tímicas (TMEC) presentan antígenos de cualquier parte del organismo (gracias al factor de transcripción “AIRE”), con la finalidad de buscar linfocitos reactivos a antígenos propios. Todas las clonas autorreactivas reciben señales de apoptosis; este evento favorece la tolerancia central y junto a la tolerancia periférica, evitan el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Solo salen del timo los linfocitos T naive o inmunocompetentes y migran a órganos linfoides secundarios, donde son llamados linfocitos maduros. Cuando conocen a su antígeno proliferan y se diferencian, dando origen a los llamados: linfocitos efectores.

### *1.3a Tipos de linfocitos*

Los linfocitos T inmunocompetentes que salen del timo, pueden diferenciarse a: (a) linfocitos T cooperadores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) que al reconocer antígenos de patógenos extracelulares presentados en moléculas de clase II, favorecen la activación de linfocitos B y la acción de macrófagos y linfocitos T citotóxicos (CTL); (b) CTL (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) quienes detectan antígenos de patógenos o daños intracelulares presentados en moléculas de clase I y liberan moléculas citolíticas<sup>5</sup>; (c) linfocitos T reguladores (T reg) (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>CTLA<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) encargados de modular la respuesta inmunológica<sup>94</sup>; (d) linfocitos T  $\gamma\delta$

(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+/-</sup>), quienes vinculan la respuesta inmune innata y adaptativa, además de intervenir en el control de la activación de linfocitos T; estudios recientes sugieren incluso funciones no inmunológicas<sup>27</sup> y (e) linfocitos NKT (CD16<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) quienes participan en eventos de respuesta innata y favorecen la adaptativa<sup>73</sup>.

#### 1.4 Receptor de célula T

Como se ha mencionado, la principal característica de los linfocitos T, es la expresión de un TCR. El TCR es un heterodímero transmembranal de dos cadenas polipeptídicas, compuestas a su vez, de un dominio variable y uno constante. La región variable es altamente polimórfica, con el objeto de reconocer una gran variedad de antígenos presentados en moléculas propias<sup>39, 19, 47</sup>.

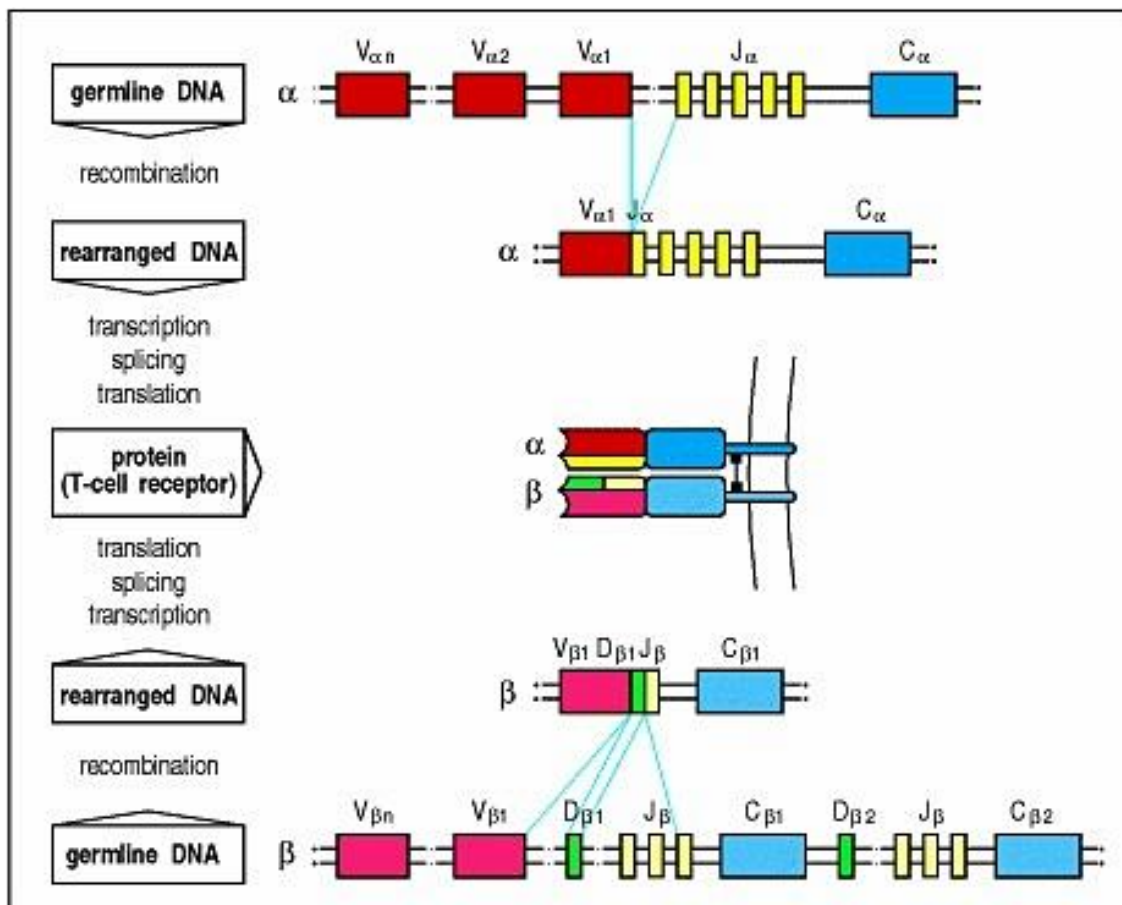
Al reconocer a su antígeno, el TCR se activa y desencadena una cascada de señalización que culmina en la activación de genes para síntesis de citocinas y factores de crecimiento que favorecen la expansión clonal (Figura 1.8).

##### 1.4.1 Recombinación V (D) J

Los genes para las cadenas  $\alpha$  y  $\delta$  (Tcra y Tcrd) se encuentran en el cromosoma 14q11 y los genes para las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  (Tcrb y Tcrg), en el cromosoma 7q34 y 7q15<sup>19</sup>. Para reconocer la mayoría de los antígenos existentes, se necesita un amplio repertorio de TCRs, generado gracias a eventos de recombinación aleatorios entre los segmentos V (*variable*), D (*diversity*) y J (*joining*) (Figura 1.6). Para iniciar la recombinación, son necesarios los genes activadores de recombinación RAG1 y RAG2. Incluso tras la recombinación, la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal

(TdT) añade nucleótidos aleatorios en posición terminal del ADN para generar mayor diversidad de proteínas<sup>47</sup>.

Con el propósito de generar un TCR, el DN sintetiza una cadena  $\beta$  y comprueba su funcionamiento, posteriormente, **recombina los genes de  $\alpha$**  y traduce la cadena correspondiente<sup>57</sup> (Figura 1.5). Si el TCR  $\alpha:\beta$  generado no es funcional, se rearreglan las cadenas  $\delta$  y  $\gamma$ , generando linfocitos  $\delta:\gamma^+CD3^+CD4^-CD8^-$  que migran a la periferia. Tras este evento de variación en la transcriptómica, el TCR que se traduce se asocia a las moléculas de superficie del **CD3 y cadenas  $\zeta$** .



**Figura 1.5 Rearreglo y expresión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR.** Para la cadena  $\alpha$  (parte superior), un segmento  $V_\alpha$  se rearregla a un segmento  $J_\alpha$  para generar una unidad variable funcional; a su vez, se une a  $C_\alpha$  para transcribirse a mRNA que será traducido a la cadena  $\alpha$  del TCR. Para la cadena  $\beta$  (parte inferior), el dominio variable se codifica en tres segmentos:  $V_\beta$ ,  $D_\beta$  y  $J_\beta$ . El rearreglo de estos segmentos genera una región variable funcional que se une a  $C_\beta$  para generar la cadena  $\beta$ . Una vez sintetizados, se unen para formar un heterodímero o TCR  $\alpha:\beta$ . Janeway CA Jr, et al., 2001<sup>31</sup>.

### 1.4a TRECs

Durante la recombinación V (D) J (Figura 1.6), el ADN que sobra es cortado, escindido y ligado por los extremos, formando segmentos extracromosomales llamados: círculos de escisión del receptor de células T (TRECs; *T-cell Receptor Excision Circle*)<sup>38</sup>. Se estima que el 70 % de los linfocitos con TCR  $\alpha\beta$  generan TRECs  $\delta\text{Rec}-\psi\text{J}\alpha$ , también conocidos como sj-TRECs (*signal joint* TRECs)<sup>22</sup>. Estos sj-TRECs (primer TREC formado en la Figura 1.6), resultan de la eliminación del locus TCRD durante el reordenamiento del locus TCRA.

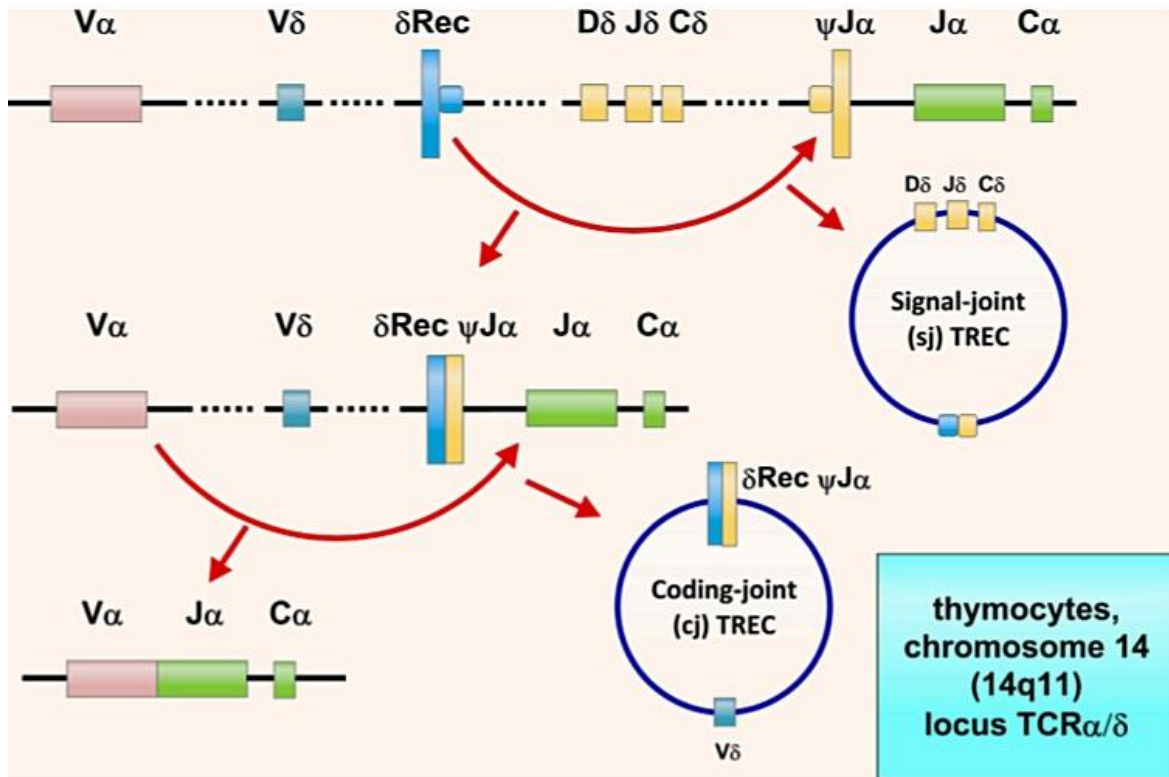


Figura 1.6 Generación de círculos de escisión del receptor de células T (TRECs). Los TRECs son círculos de ADN, escindidos como productos estables del rearrreglo genético para la formación del TCR de los timocitos. No se duplican en mitosis y se diluyen cada división celular, por lo que es común encontrarlos en timocitos y linfocitos T naive (Cossu, 2010)<sup>20</sup>.



## 1.5 Inmunodeficiencias

Defectos en uno o más elementos del sistema inmunológico llevan a desarrollar trastornos graves e incluso mortales llamados “inmunodeficiencias”. Las inmunodeficiencias se clasifican en dos grandes grupos: las primarias o congénitas (con origen genético) y las secundarias o adquiridas (consecuencia de factores como el contagio de VIH, desnutrición, cáncer, autoinmunidad, entre otros)<sup>4</sup>.

### 1.5.1 Inmunodeficiencias Primarias

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un grupo de enfermedades genéticas que afectan uno o más componentes del sistema inmunológico<sup>18</sup>. La principal característica de una IDP es la predisposición a infecciones, además, se asocian a eventos autoinmunitarios y predisposición a cáncer (especialmente linfomas)<sup>50</sup>. Aproximadamente el 80 % de los pacientes con IDP son menores de 20 años y se sabe que el 70 % de los afectados son pacientes masculinos, pues la herencia más frecuente es recesiva ligada a X <sup>15</sup>.

Las IDPs son clasificadas por la IUIS (*International Union of Immunological Societies*) en tablas que relacionan las enfermedades con sus respectivos defectos genéticos, anormalidades inmunológicas y no inmunológicas<sup>1</sup>. Dentro de las IDPs, la más peligrosa es la SCID (*Severe Combined Immunodeficiency* o Inmunodeficiencia Combinada Grave)<sup>9</sup>.

### 1.5.2 Inmunodeficiencia combinada grave

También conocida como “la enfermedad del niño burbuja”, SCID es el término para una gran variedad de defectos inmunológicos heredables<sup>39</sup> y representa un 20 % de todas las IDPs<sup>15</sup>. Se conocen más de una docena de defectos genéticos<sup>10</sup> para la enfermedad y en el documento de la IUIS,

se refieren 14 genotipos, clasificados por su fenotipo (T<sup>-</sup>B<sup>+</sup> y T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>) y sus características (ausencia de linfocitos T y de inmunoglobulinas)<sup>1</sup>; esta deficiencia celular y humoral, le da a SCID la característica de “combinada”<sup>37, 81, 26, 50</sup>.

El desarrollo y función de los linfocitos T se encuentra comprometido en todas las formas de SCID con diferentes combinaciones fenotípicas de T/B/NK debido a progenitores en común (Figura 1.1), vías comunes de señalización en desarrollo y función, vías metabólicas, entre otras<sup>20</sup>.

### 1.5a Cuadro clínico de SCID

La variabilidad clínica es un aspecto primordial de SCID<sup>13</sup>, se observa incluso en hermanos con la misma mutación, debido a la interferencia de factores genéticos, ambientales o de otro tipo<sup>15, 78</sup>. Generalmente los pacientes son recién nacidos aparentemente sanos que comienzan a manifestar defectos inmunológicos<sup>2</sup> y no inmunológicos<sup>1, 20</sup> indicados en la Figura 1.7 y que evaluará el médico tratante del paciente.

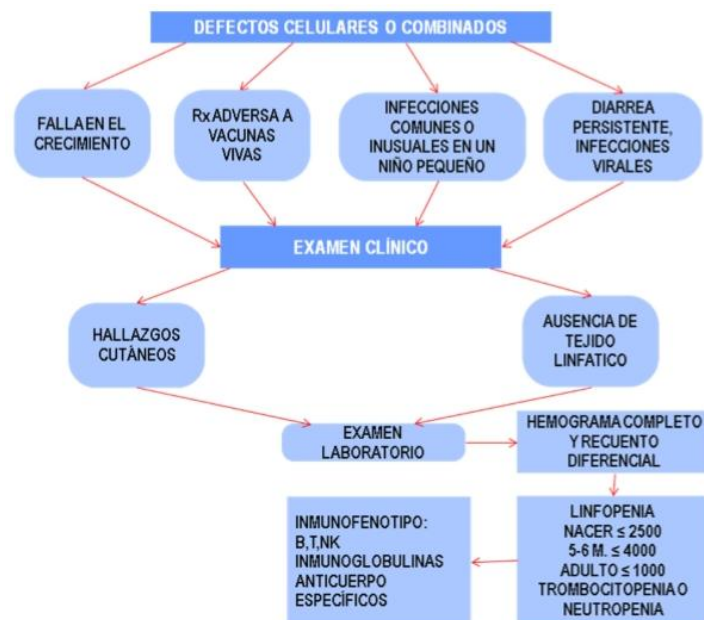


Figura 1.7 Aspectos clínicos para el diagnóstico de SCID (Guía de Práctica Clínica del Niño con Inmunodeficiencia Primaria IDP, 2013)<sup>92</sup>.

Los pacientes con SCID presentan infecciones oportunistas como: neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, infección diseminada por BCG (secundaria a vacunación), diarrea recurrente por vacuna de rotavirus<sup>8</sup>, CMV persistente y severo, adenovirus, EBV, metapneumovirus y otras infecciones virales, fúngicas (candidiasis mucocutánea resistente a tratamiento)<sup>18</sup> o por bacterias intracelulares.

### 1.5b Heterogeneidad génica de SCID

Las mutaciones asociadas a SCID alteran la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo y maduración del linfocito T, sin embargo, aún no se conocen todos los genes involucrados<sup>20</sup>; dichas mutaciones pueden afectar antes o durante la recombinación V (D) J<sup>38, 37</sup>. A excepción del Síndrome de *Di George* y en algunos casos el síndrome *Hoyeraal-Hreidarsson* (enfermedades autosómicas dominantes AD), se sabe que más del 50 % de los casos SCID son causados por mutaciones en ILR2G<sup>38</sup> (ligadas a X recesivas o XL-SCID) y el resto son de herencia autosómica recesiva (AR-SCID)<sup>38, 20</sup>.

### 1.5c Tipos de SCID

Existen más de 32 tipos de SCID, enlistados por la IUIS<sup>1</sup> y descritas a profundidad por Cossu en un artículo del 2010<sup>20</sup>. Más de la mitad de los casos SCID son ligados a X, resultado de una mutación en la cadena gamma común ( $\gamma_c$ ) del receptor de interleucina 2 (ILR2G), que afecta diversos receptores de interleucinas como: IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-12<sup>20, 25</sup>.

Otras mutaciones cuya huella molecular se asocia a SCID afectan la señalización de citocinas (JAK3 e IL-7R $\alpha$ )<sup>28, 62</sup>, el metabolismo de purinas (ADA y PNP), la recombinación V (D) J (RAG1 y RAG2), la reparación de

ADN (ADN ligasa IV, Artemis y Cernunnos), metabolismo mitocondrial (AK2), anomalías tímicas (FOXN1), presentación de antígenos y transducción de señales<sup>51</sup>, mutaciones en: cadenas  $\delta$ ,  $\epsilon$  del CD3, en ZAP-70, CD45 e IL-7 $\alpha$ <sup>69</sup>, o defectos en el flujo de calcio (ORAI1 y STIM1)<sup>25</sup>.

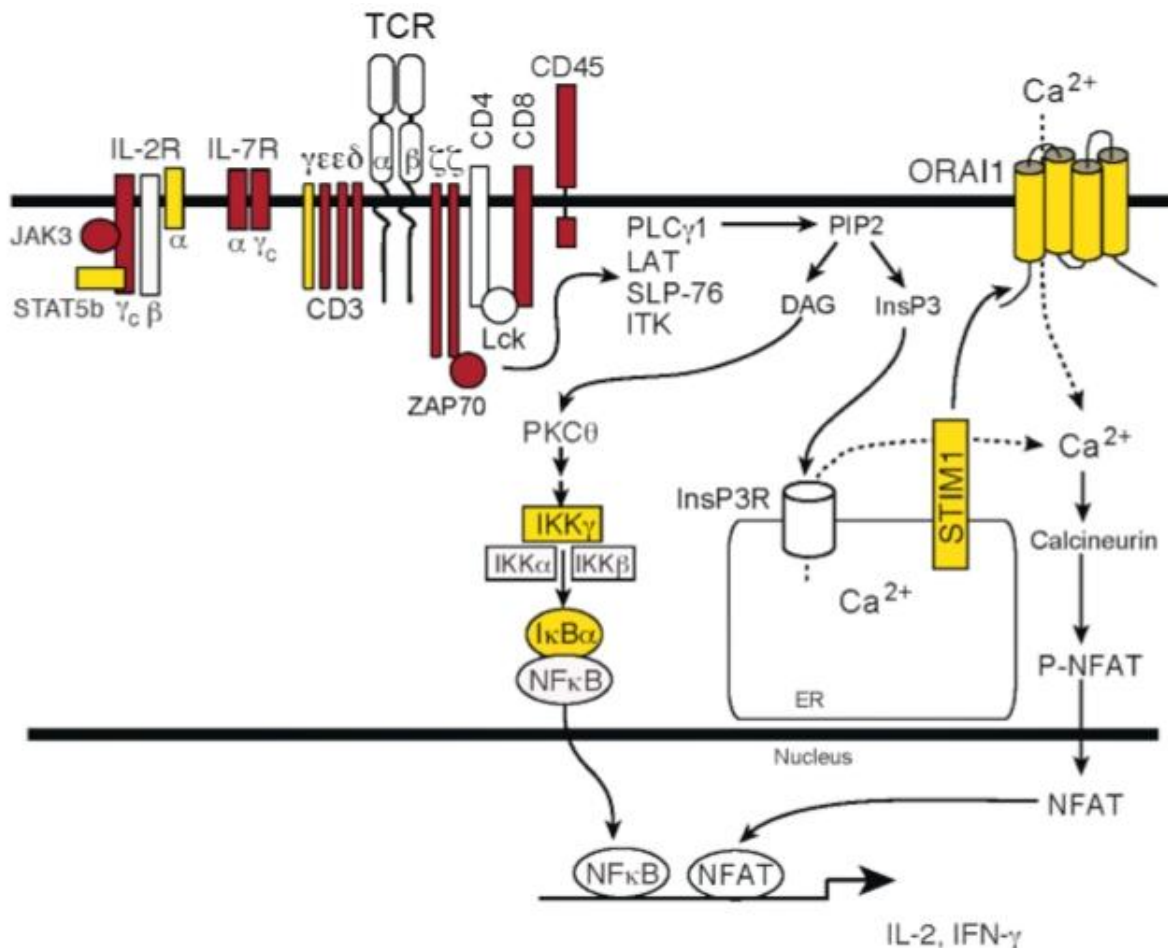


Figura 1.8 Moléculas mutadas en SCID. Aquellos pacientes con mutaciones en las proteínas representadas de color amarillo presentan problemas en la activación de linfocitos T sin presentar linfopenia. Por otro lado, aquellos con las proteínas color rojo mutadas tienen defectos graves en el desarrollo de timocitos y otros tipos celulares. Abreviaciones: DAG, diacilglicerol; InsP3, inositol-1,4,5-trifosfato; LAT, "linker for activation of T cells"; NFAT, factor nuclear de células T activadas; PLC, fosfolipasa C; PtdIns(4,5)P2, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; SLP76, dominio SH2 de proteína leucocítica de 76 kDa; STIM1, molécula de interacción estromal 1; ZAP-70, "ζ-chain-associated protein kinase of 70 kDa". Smith-Garvin, Koretzky and Jordan, 2009<sup>69</sup>.

### *1.5d Prevalencia epidemiológica*

Se estima que la incidencia mundial de SCID es de 1 en 100,000 <sup>38, 34, 15</sup>, gracias a nuevos métodos de detección se puede estimar hasta 1 de cada 40,000 o 75,000 nacidos <sup>39, 20, 77</sup>. Sin embargo, la incidencia tiene factores étnicos importantes, por ejemplo: ADA-SCID se presenta en 1 de cada 5000 somalís y la mutación en el gen Artemis (DCLRE1C) ocurre en 1 de cada 2000 nacidos en Navajo. Las mutaciones RAG1<sup>-</sup>, RAG2<sup>-</sup>, ADA<sup>-</sup>, IL7R<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup> y ZAP70<sup>-</sup> se han identificado en población menonita Amish <sup>32, 46</sup>.

En México, se desconoce su prevalencia e incidencia, así como los costos que genera la atención de esta IDP<sup>18</sup>, sin embargo, mediante datos estadísticos, se puede calcular un estimado. A nivel de la República Mexicana, se registran 2 239 217 nacimientos al año <sup>88, 90, 91, 89</sup> y se calcula una prevalencia mundial de SCID de 1 de cada 70 000 recién nacidos vivos <sup>20, 39, 77</sup>. La correlación de estos datos indica que se presentan aproximadamente 32 casos de SCID al año en México, siendo un valor subestimado, principalmente porque únicamente un 93.4 % de los nacimientos son registrados en nuestro país <sup>90</sup>.

Aunado a esto, al analizar las tasas de mortalidad infantil (TMI), la República Mexicana ocupa el puesto 110 en el ranking mundial, con una TMI = 15 (menores de 5 años) y TMI = 13 (menores de 1 año) <sup>89</sup>. Una porción de estas tasas debe pertenecer a casos no exitosos de SCID, considerando las edades de referencia. En la **Figura 1.9** se observan los estados con TMI mayor al promedio nacional, que, si bien es afectado por muchos aspectos, uno de ellos es el acceso a la atención médica.

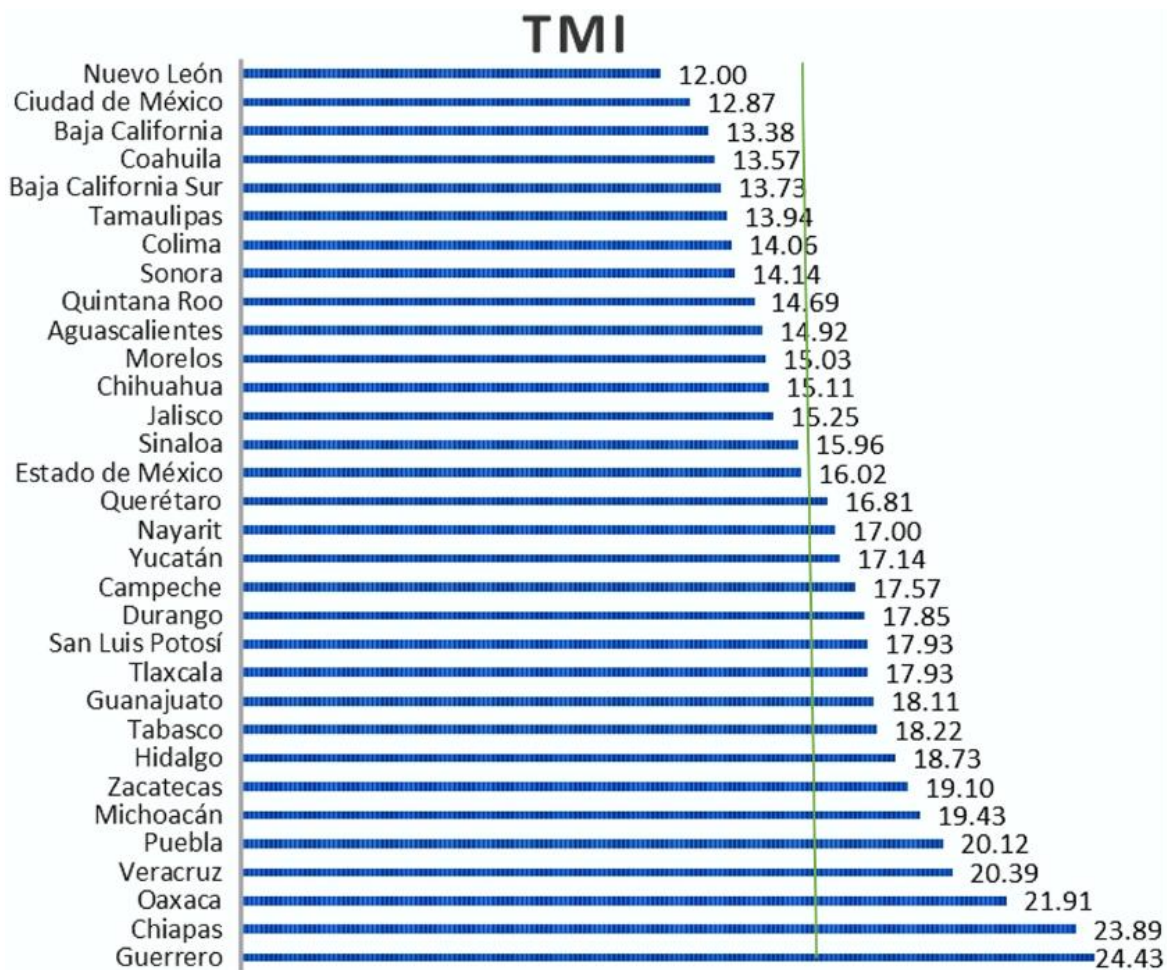


Figura 1.9 Tasa de mortalidad infantil por entidad federativa. Decesos de menores de un año por cada mil nacidos vivos en 2005 <sup>89</sup>.

### 1.5.3 Tratamiento y profilaxis

El diagnóstico temprano de SCID es crucial, debido a que el éxito del tratamiento aumenta considerablemente en aquellos pacientes que no han padecido infecciones oportunistas<sup>15</sup>. El tratamiento de elección es el Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH) de donadores alogénicos, haploidénticos (éxito >90 %). Dependiendo el caso, se puede trasplantar cordón umbilical, realizar terapia de reemplazo enzimático<sup>76</sup> (en pacientes con deficiencia de ADA) o terapia génica<sup>37, 20</sup>.

Adicionalmente, se está desarrollando tecnología de edición genómica que promete terapias de corrección sin el uso de vectores virales y regulación no fisiológica de la expresión de genes<sup>38</sup>.

Debido a la susceptibilidad de estos pacientes a enfermedades, el personal de salud debe advertir a los familiares el riesgo de virus respiratorios y de la transmisión potencial de CMV en leche materna. Además, se debe evitar la aplicación de vacunas con patógenos vivos o rotavirus atenuados y tener precaución al momento de realizar transfusiones. Las medidas profilácticas van desde la aplicación de antibióticos, hasta infusiones de inmunoglobulinas<sup>38, 67, 8</sup>.

## 1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de SCID varía entre países e instituciones<sup>67</sup>, aquellos que realizan un análisis de antecedentes familiares, identifican únicamente el 20 % de los casos<sup>38</sup>. En 2009 se estimó que en EE. UU. fallecía el 50 % de los afectados por no ser diagnosticados a tiempo<sup>10</sup>. La demora en el diagnóstico genera costos económicos importantes, debido a estancias prolongadas en hospitales, cuidados intensivos y muertes. Se estima que el 8 % de las IDPs identificadas en México son SCID y que los pacientes permanecen hospitalizados hasta 27 semanas, aunque se desconocen los costos<sup>18</sup>.

Aunado a esto, un diagnóstico temprano crea oportunidad de investigación de nuevas etiologías moleculares y de desarrollo de nuevas estrategias personalizadas de tratamiento.

### 1.6.1 Historia del diagnóstico de SCID

De manera general, se han realizado las siguientes pruebas en la búsqueda de la detección temprana de SCID:

- 1) Inmunoensayos: análisis colorimétricos de actividad de ADA, marcadores de IL-7, búsqueda de CD3 y CD45 y leucocitos totales.
- 2) Análisis de ADN, inefectiva por la heterogeneidad de la enfermedad y las mutaciones no reportadas.
- 3) Conteo absoluto de linfocitos en sangre total, reportando falsos negativos por presencia de linfocitos maternos y altos costos.
- 4) Cuantificación de poblaciones linfocíticas en sangre de cordón umbilical.
- 5) En la actualidad se busca implementar la prueba de cuantificación de TRECs a lo largo del mundo complementado con el hallazgo de mutaciones en genes asociados a SCID<sup>38, 68</sup>.

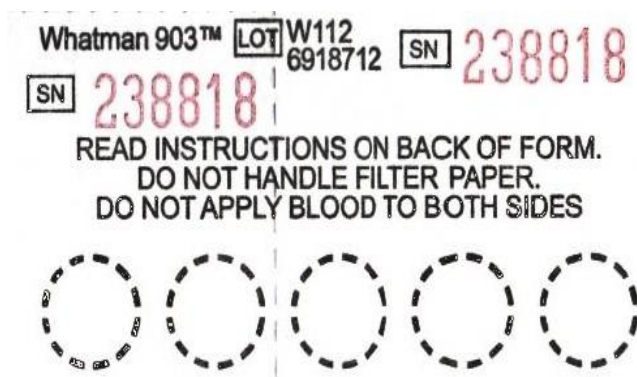
### 1.7 Tamiz neonatal

Para poder explicar la prueba de TRECs, es necesario explicar conceptos básicos y características del tamiz neonatal. El tamiz neonatal consiste en un conjunto de pruebas (microtécnicas) con el potencial de detectar defectos al nacimiento, que son condiciones que alteran el desarrollo anatomofuncional, crecimiento, maduración o metabolismo de los recién nacidos<sup>87</sup>.

Estas enfermedades son prevenibles si se detectan, diagnostican, tratan y/o rehabilitan oportunamente. La detección presintomática permite: evitar o limitar la discapacidad o muerte, ofrecer atención médica y en general tomar medidas de prevención y control que impactan epidemiológicamente en las tasas de morbimortalidad<sup>87</sup>.



El tamiz neonatal surgió hace más de 50 años con el trabajo del Dr. Guthrie<sup>29</sup>. Hoy en día, se detectan más de 50 enfermedades<sup>75</sup> y el tamiz neonatal ampliado incluye exámenes de laboratorio cuantitativos, siendo una gran herramienta en salud pública y pediatría preventiva<sup>87</sup>. Las muestras de sangre se recolectan fácilmente en las llamadas tarjetas Guthrie (*Figura 10.1*), esta matriz de fibra de algodón<sup>41</sup> confiere estabilidad a las muestras, permitiendo que los ensayos de tamiz sean: reproducibles, económicos y precisos.



*Figura 10.1 Tarjeta Guthrie. Papel filtro con un código de identificación único, con espacio suficiente para registrar los datos del paciente. Tiene dibujados 5 círculos de 3.2 mm en los que se depositan 100  $\mu$ L de sangre periférica obtenida de la punción del talón de los recién nacidos<sup>45</sup>.*

Para incluir una prueba en tamiz neonatal, es necesario: educar a la población, capacitar al personal de salud, invertir en investigación, equipos y espacios para el tratamiento; convirtiéndose en un tema económico, político y cultural<sup>38, 80, 75</sup>. Los criterios de inclusión están establecidos desde 1968 por Wilson y Jugner<sup>96</sup>, además, Kwan y Puck manifiestan la necesidad de que las pruebas sean específicas, sensibles, de fácil disposición y bajo costo<sup>38</sup>.

En México, la NOM-034-SSA2-2013, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento, es de observancia obligatoria para todo

establecimiento de atención médica que atienda partos o recién nacidos e indica la toma de muestra entre los días 2 y 7 desde el nacimiento.

## 1.8 Prueba de TRECs

El tamizaje de SCID ha sido tema de trabajos en EE. UU. desde 2001<sup>26, 58</sup>, sin embargo, no se incluyó en tamiz neonatal<sup>26, 96</sup> hasta 2008 en Wisconsin<sup>39</sup>, siendo la primera IDP incluida en tamiz neonatal<sup>38, 26, 16</sup>. Posteriormente, en el 2010 fue clasificada como una prueba clínicamente válida para detección de SCID en recién nacidos<sup>26</sup>.

Con base en el ensayo de Douek (para la cuantificación de linfocitos T en pacientes con VIH bajo tratamiento antiviral<sup>22</sup>), el grupo de Chan y Puck aplicó la prueba de TRECs para identificar SCID, cuya principal característica es la ausencia o bajas concentraciones de linfocitos T funcionales<sup>26</sup>. Posteriormente, evaluaron la factibilidad de la prueba y su implementación en el tamiz neonatal<sup>16</sup>.

La prueba de TRECs cumple con los criterios y características necesarias para implementarse en tamiz neonatal en todo el mundo<sup>15, 96</sup>. Siendo una gran herramienta de apoyo como evidencia médica y científica<sup>75</sup>. Además, es la primera prueba **de tipo "high-throughput" basada** en ADN entre las pruebas de tamiz<sup>38</sup>.

### 1.8.1 Fundamento de la prueba

La prueba se basa en la cuantificación de TRECs por medio de una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-q-PCR/ *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*) con *primers* que amplifican el segmento de unión de dichos círculos (Figura 1.6), a partir de ADN de muestras sanguíneas de tamiz neonatal<sup>9</sup>. Como se mencionó anteriormente, los TRECs son

biomarcadores específicos de la maduración de linfocitos T y sin importar el defecto molecular, todas las formas de SCID se caracterizan por ausencia o bajas cantidades de TRECs<sup>65, 9, 20</sup>.

Los TRECs son estructuras estables que no se multiplican durante la mitosis, por lo que se diluyen a medida que los linfocitos proliferan<sup>38, 19</sup> y dado que la producción tímica disminuye con la edad<sup>38</sup>, son más abundantes en población pediátrica sana. Se considera que el número de TRECs guarda una proporción 1:1 con los TCRs generados y en consecuencia, a la producción tímica de células T naive<sup>16</sup>.

### 1.8.2 Impacto clínico de tamizaje para SCID

El diagnóstico mediante tamiz neonatal tiene una gran importancia clínica, especialmente porque la detección antes de los 3.5 meses de vida aumenta el éxito de los tratamientos. En específico, un TCPH a esta edad tiene un 95 % de éxito y a edades más avanzadas, la tasa disminuye a 70 %<sup>15</sup>. El diagnóstico repercute en la esperanza y calidad de vida de los pacientes diagnosticados y de sus familiares, ya que se les puede informar sobre la heredabilidad de las mutaciones, previniendo futuros casos.

#### 1.8a Blancos secundarios

El ensayo de TRECs puede detectar otras linfopenias no-SCID<sup>38, 57</sup> o relacionadas a SCID. Las TCLs (*T-cell lymphopenia*) pueden desarrollarse por síndromes como: *Di George* (delección 22q11), *Down* (trisomía 21), *CHARGE*, *Jacobsen*, *Nijmegen*, *Fryns* e hipoplasia cartílago-cabello<sup>38, 39</sup>; enfermedades no inmunológicas (leucemias), recién nacidos de bajo peso, nacimiento prematuro, incluso algunas de origen idiopático<sup>38, 39, 40</sup>.

Cualquier TCL, independientemente de su etiología, debe recibir seguimiento de especialistas inmunólogos pediatras hasta restablecer el número de linfocitos, asimismo, se deben aplicar precauciones especiales y profilácticas; si el número de linfocitos no aumenta, es necesario un TCPH<sup>38</sup>.

### 1.8.3 Pruebas confirmatorias de SCID

#### A) Conteo de linfocitos T:

- Biometría hemática, se observa como linfopenia  $<2000/\text{mm}^3$ .
- Subpoblaciones de linfocitos en citometría de flujo (T/B/NK)<sup>39</sup>.
- Subpoblaciones LT (CD3/CD4), (CD3/CD8) en citometría de flujo.

#### B) Evaluación de la función linfocitaria:

- Proliferación de linfocitos T estimulados por mitógenos y antígenos, principalmente mitógeno fitohemaglutinina A (PHA).
- Títulos de inmunoglobulinas tras la aplicación de vacunas.

#### C) Reducción de nitro azul de tetrazolio $<1\%$ , comparado con testigo de $56\%$ (DNFB).

#### D) Título de Isohemaglutininas.

### 1.9 Situación actual en el extranjero

EE. UU., es el país con mayor experiencia en la prueba de TRECs, actualmente, se ha implementado en 32 de sus estados<sup>38, 39</sup> y desde el 2010 se recomienda en la RUSP (*Recommended Uniform Screening*)<sup>75, 39</sup>. Desde 2013 se han tamizado más de la mitad de los nacimientos en EE. UU.<sup>30</sup> y se estima una prevalencia de 1:58,000<sup>38, 39, 40</sup>.

Otras regiones que han implementado la prueba de TRECs en tamiz neonatal, son: Ontario y Taiwán. Países europeos, asiáticos, de medio

oriente y latinoamericanos (Chile, Brasil, México, Argentina, Colombia y Venezuela) realizan esfuerzos para implementarlo<sup>75</sup>.

La consanguinidad aumenta la probabilidad de que se presenten desórdenes genéticos en una población; algunos lugares donde es común la consanguinidad son: medio oriente y el norte de África<sup>66</sup>. Por otro lado, India tiene el mayor número de nacimientos en el mundo y no realiza tamiz neonatal<sup>38</sup>.

### 1.9.1 Resultados de la implementación en otros países

EE. UU., ha reportado los resultados de la implementación en sus diferentes estados, incluyendo hasta 3 millones de recién nacidos tamizados; la mayoría de los casos detectados son causados por: defectos autosomales en genes recesivos, mutaciones ligadas a X en ILR2G<sup>38, 39, 13</sup>, defectos en RAG1 y RAG2<sup>38, 39</sup>.

Además, se detectaron casos *leaky*-RAG que generalmente se detectan hasta la niñez, cuando ya existen complicaciones como autoinmunidad<sup>38</sup>. Los casos *leaky*-SCID presentaron mutaciones hipomórficas en los mismos genes que SCID, por lo que el desarrollo de linfocitos T es parcial y en consecuencia, presentan valores anormales de TRECs<sup>38, 40</sup>.

Gracias a la secuenciación de genes en células de los casos detectados se descubrieron nuevas mutaciones, aunque existen casos de etiología genética desconocida. Además, la recuperación de los pacientes sometidos a tratamientos restauradores del sistema inmunológico, han resultado en su mayoría exitosos.

### 1.10 Implementación de la prueba en México

En México, se ha aumentado la cobertura del tamiz neonatal, a través de actividades de las instituciones de salud; se estima que la Secretaría de Salud y el Instituto Mexicano del Seguro Social tamizan al 70 % de los recién nacidos<sup>75</sup>.

A pesar de que en nuestro país el tamiz neonatal no incluye la prueba de cuantificación de TRECs, se están haciendo importantes esfuerzos para hacerlo posible; en el Instituto Nacional de Pediatría, la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias (UIID), con la ayuda de la fundación Jeffrey Model, busca la implementación de la prueba en el tamiz neonatal ampliado de México, bajo la dirección de la Dra. Sara Elva Espinosa Padilla y el cDr. Edgar Alejandro Medina Torres; siendo un proyecto pionero en el país.

Este proyecto comenzó con un estudio piloto, en el cual, se empleó la técnica de RT-q-PCR para la cuantificación de TRECs en muestras de sangre seca en tarjetas Guthrie.

Se especula que la incidencia de SCID en México se encuentra subestimada, especialmente por falta de atención clínica, consanguinidad **de menonitas, grupos religiosos "ortodoxos" y comunidades pequeñas aisladas.**

## 2. JUSTIFICACIÓN

Mediante los esfuerzos en curso para la optimización de la prueba de TRECs (mediante PCR cuantitativa en tiempo real), se establecerán las bases para una futura implementación en el tamiz neonatal mexicano. Para obtener resultados de calidad, es necesario aplicar las mejores condiciones metodológicas, por lo que mediante el antecedente de los trabajos citados, se busca elegir el mejor origen de la muestra. La obtención de la muestra, es de gran importancia, porque es una condición pre-analítica que impacta en el resultado final.

La prueba de TRECs es un apoyo científico invaluable para el diagnóstico oportuno de SCID, que influye en la decisión médica para la toma de medidas especiales, el inicio de tratamientos y en consecuencia, en la esperanza y calidad de vida de los pacientes (evitando su muerte) y de sus familiares (informando la heredabilidad de las mutaciones para prevenir nuevos casos). Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico clínico de SCID es muy difícil, debido a la ausencia inicial de síntomas y de la heterogeneidad de la enfermedad. Adicionalmente, la prueba identifica otras enfermedades (TCLs) como blancos secundarios.

Este trabajo, abre muchas posibilidades de investigación para trabajos futuros, ya que se desconoce: la incidencia de SCID, sus manifestaciones idiosincráticas, costos, datos estadísticos y mutaciones en población mexicana.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Cuantificar Círculos de Escisión del Receptor de células T por PCR en tiempo real en muestras de sangre de cordón umbilical y talón de recién nacidos, para determinar el mejor origen de la muestra y con la finalidad de diagnosticar Inmunodeficiencia Combinada Grave en población pediátrica mexicana.

#### 3.2 Objetivos particulares

- ✓ Obtener los valores de TRECs a partir de muestras de sangre de cordón umbilical y talón de recién nacidos clínicamente sanos clasificados como grupo control.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos de la cuantificación de TRECs en función del origen de la muestra (cordón o talón).
- ✓ Obtener el valor de referencia de TRECs/ $\mu$ L para población mexicana, a partir de los resultados del grupo control.
- ✓ Comparar el número de TRECs de las muestras de talón con una base de datos existente de usuarios de tamiz neonatal del estado de Tabasco.

### 4. HIPÓTESIS

La cuantificación de TRECs/ $\mu$ L se verá favorecida en muestras de sangre periférica obtenida del talón de los recién nacidos comparadas con las muestras de cordón umbilical.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.0 Muestras

Las muestras utilizadas en este estudio se obtuvieron de las siguientes fuentes: (a) sangre seca de tarjetas Guthrie de 1 482 recién nacidos en el periodo de octubre de 2011 a enero de 2012 del estado de Tabasco (proporcionadas por la empresa privada "TamizMás"); (b) 23 pacientes con diagnóstico previo o perfiles asociados a SCID; (c) controles negativos, obtenidos de sangre periférica de adultos sanos y (d) un grupo control de 100 muestras totales, obtenidas de 50 recién nacidos sanos evaluados clínicamente por expertos en inmunodeficiencias del Hospital General Gea González y obtenidas según la metodología descrita en el Acta Pediátrica de México<sup>83</sup>; de cada recién nacido se analizó una muestra de talón y otra de cordón umbilical. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Todas las muestras cuentan con el previo consentimiento escrito y firmado por los pacientes y donantes o sus representantes legales (menores de edad).

### 5.1 Tratamiento de las muestras y extracción de ADN

De cada tarjeta Guthrie, se perforaban dos círculos de 3.2 mm de diámetro, equivalente a un volumen de 3  $\mu$ L de sangre. Dichas perforaciones se depositaron en tubos *ependorf* de 2.0 mL para la extracción de ADN genómico (gDNA) mediante el empleo del kit comercial *Axyprep Multisource Genomic DNA Miniprep* (Axygen, USA). El proceso fue modificado para el tipo de muestra, pero siempre siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las perforaciones se dejaron en 500  $\mu\text{L}$  de Buffer de lisis durante un día; al día siguiente se incubaron a  $56^{\circ}\text{C}$  y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución precipitante. Entre cada paso se agitaba en Vortex durante 30 s.; una vez agregada la solución precipitante, se realizó una centrifugación de 10 minutos a 12,000 rpm en el equipo Allegra X-12R (Beckman Coulter). El líquido obtenido se transfirió a columnas de extracción de gDNA colocadas en tubos *ependorf* de 2.0 mL. Los lavados se realizaron con dos soluciones generales de lavado: W1 y W2 (700  $\mu\text{L}$  y 800 $\mu\text{L}$  respectivamente); se lavaron con la solución W2 por duplicado. Para finalizar, la columna se transfirió a tubos nuevos de 1.5 mL y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de Buffer TE, seguido de un breve reposo (aproximadamente 2 minutos), para finalmente centrifugar durante 1 minuto a 12,000 rpm para la obtención del ADN.

En algunas muestras, la concentración y pureza del gDNA disuelto se midió por espectrofotometría con el equipo Epoch-BioTek (USA). Calculando las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

## 5.2 PCR cuantitativa en tiempo real

### a) Reactivos y distribución de muestras

Todos los reactivos fueron preparados en un cuarto limpio, mediante el uso de una campana de extracción estéril Labgard (*Class II, Type A2 Biological Safety Cabinet*). Se utilizó TaqMan® *Gene Expression Master Mix* (Life technologies). Las concentraciones de plásmido de TRECs y del gen de referencia (RNasa P) se determinaron por espectrofotometría. Diluciones seriadas de ambos se corrían por duplicado en cada corrida.

Los *primers forward y reverse* **específicos para una secuencia  $\delta\text{Rec-}\psi\text{Ja}$**  de TRECs (Applied Biosystems) se utilizaron para generar amplicones de

110 pb. El *primer forward* (5´-VIC-TGCTGACACCTCTGGTTTTTGTA-3´) y el *reverse* (5´-VIC-GTGCCAGCTGCAGGGTTTAG-3´) y la sonda (5´-FAM-ATGCATAGGCACCTGC-TAMRA) son de la marca comercial TaqMan, con base en las secuencias utilizadas en el ensayo original de Douek<sup>22, 26</sup>. En algunos casos, se utilizó sangre periférica de adultos sanos en tarjetas Guthrie como control positivo a SCID, esto debido a la disminución de copias de TRECs en adultos; estas muestras se agregaban como controles ciegos.

#### b) Curvas de Calibración

Para el estándar de TRECs se determinó la concentración del plásmido por espectrofotometría; se prepararon diluciones seriadas de 10<sup>6</sup> hasta 10<sup>0</sup> copias para las dos curvas de calibración, de 8 puntos cada una.

Adicionalmente, empleamos el gen RNasa P como gen constitutivo, para la normalización del gDNA extraído, con base en el método utilizado en 2009 por Baker<sup>10</sup>. Del ADN humano utilizado, se realizaron 7 diluciones seriadas a partir de una concentración de 10 *ng/μL*.

El stock de todos los reactivos fue dividido en alícuotas de 100 μL, etiquetadas adecuadamente y mantenidas a -20 °C para almacenamiento a largo plazo y empleados en cada reacción de cuantificación.

#### c) Cuantificación de TRECs

Los niveles de TRECs fueron medidos en el gDNA tanto de sangre de cordón umbilical como de sangre periférica; todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Para la cuantificación de TRECs, se empleó la técnica de qRT-PCR multiplex, amplificando: TRECs y RNasa P en la misma reacción. La amplificación se llevó a cabo en el equipo *7 500 Fast DX Real-*

*Time PCR Instrument (Applied Biosystems)*, en placas selladas de 96 pozos (*Applied Biosystems*). El volumen de reacción total (23  $\mu\text{L}$ ), incluía 5  $\mu\text{L}$  de gDNA extraído, 10  $\mu\text{L}$  *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (4374657, *Life technologies*), 1  $\mu\text{L}$  *TaqMan® Copy Number Reference Assays* (4403326, *Life technologies*). Adicionalmente, cada pozo de reacción contenía 0.53  $\mu\text{L}$  de cada *primer*, 0.8  $\mu\text{L}$  de sonda y el resto de agua.

Las muestras se sometieron a un perfil termocíclico para desnaturalizar el ADN en un ciclo de desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de: 30 s a 95°C y 1 min a 60 °C.

#### d) Resultados y criterios de aceptación.

El software 7500, *versión 2.05* se utilizó para el análisis de datos. Cada punto obtenido fue calculado a partir de los datos crudos (en tiempo real) con base en la curva de calibración de los estándares. Para cada corrida, se permitió una pendiente de -4.00 con  $R^2 \geq 0.980$ .

Los resultados se reportaron como número de copias por  $\mu\text{L}$  de sangre total para facilitar la estandarización interlaboratorio; asumiendo que cada perforación de 3.2 mm contiene 3  $\mu\text{L}$  de sangre total (según el método original de Kwann en 2014). Es decir, por cada muestra ensayada, el dato reportado por el software se divide entre 6, bajo el siguiente razonamiento:

$$\left(\frac{\text{dato obtenido}}{1 \text{ reacción}}\right) \left(\frac{1 \text{ reacción}}{5 \mu\text{L ADN eluido}}\right) \left(\frac{100 \mu\text{L ADN eluido}}{1 \text{ perforación}}\right) \left(\frac{1 \text{ perforación}}{3 \mu\text{L de sangre total}}\right)$$

Un total de 1 605 muestras fueron analizadas por RT-q-PCR, cuantificando los TRECs. Los datos fueron procesados desde 2014 a agosto de 2015 y recopilados en una base de datos para su análisis.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Grupo control

Un total de 50 pacientes clínicamente sanos constituyeron un grupo control, de cada uno de ellos se obtuvo una muestra de sangre del cordón umbilical durante el parto (antes de realizar el corte) y otra muestra de sangre periférica del talón del recién nacido.

Ambas muestras de un mismo paciente, se procesaban simultáneamente según la metodología descrita. Una vez que se obtuvieron los valores de TRECs y de RNasa P se agruparon los datos según el origen de la muestra, con la finalidad de calcular un promedio y un Coeficiente de Variación (CV).

#### a) Comparación talón y cordón

Una vez obtenidos los valores, se realizó un histograma de frecuencias para cada tipo de muestra. Se utilizaron las mismas escalas con fines comparativos.

Origen de la muestra	TREC <sub>s</sub> /μL		RNasa P	
	Valor	CV	Valor	CV
Cordón	630	0.66	1018	0.56
Talón	954	0.61	1482	0.47

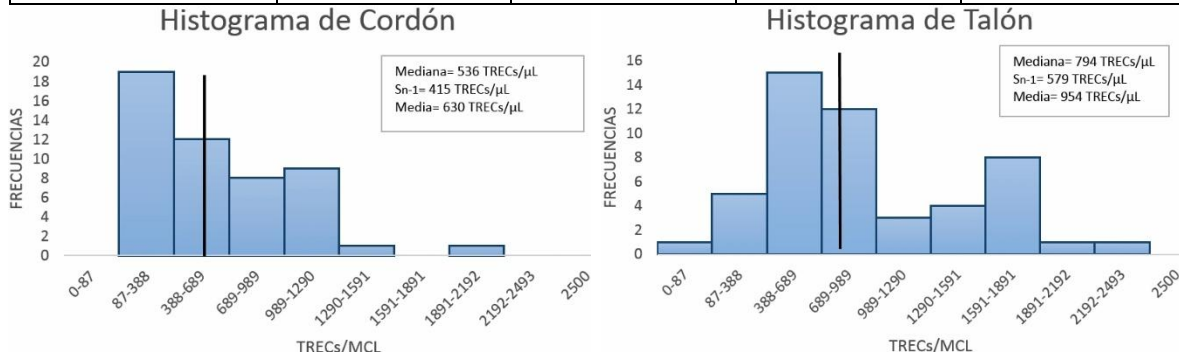


Figura 11.1 Resultados del grupo control. En la tabla se muestran los promedios tanto de TREC<sub>s</sub> como de RNasa P y los Coeficientes de Variación obtenidos. En las figuras inferiores se encuentra la distribución de los resultados para cada tipo de muestra. MCL=μL (microlitro).

#### b) Valor de referencia para población mexicana

Con la finalidad de comparar el comportamiento de los datos del grupo control sin importar el origen de la muestra, se realizó un histograma con los 100 resultados del grupo control. De manera general, se observa que los valores más frecuentes se encuentran entre los 388 y 689 TREC<sub>s</sub>/μL.

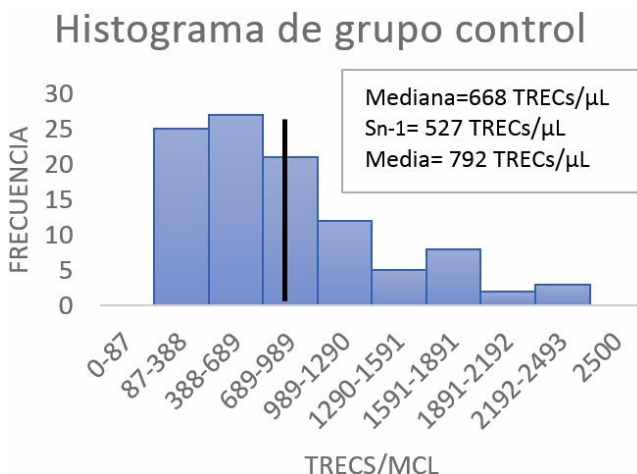


Figura 11.2 Distribución de los resultados del grupo control. En esta figura se observan los valores obtenidos para población mexicana. Obteniendo una media de 792 TREC<sub>s</sub>/μL a partir de los resultados del grupo control. MCL=μL (microlitros)

A pesar de obtenerse una media de 792 TRECs/ $\mu$ L, este valor no representa el valor de referencia para población mexicana. Los valores de referencia se obtienen mediante análisis estadísticos más complejos, responsabilidad de un experto en estadística del Instituto Nacional de Pediatría.

Desafortunadamente, la obtención del valor de referencia no ha sido posible hasta la fecha, debido a la falta de resultados que ayuden a obtener un valor verdadero.

### 6.1 Base de datos de Tabasco

Se generó una base de datos de 1,482 usuarios de tamiz neonatal de Tabasco (TamizMás) incluyendo los datos clínicos indicados en las tarjetas Guthrie y los resultados de la prueba de TRECs. Del total de pacientes analizados se calculó una media para el analito y el control, siendo 792 TRECs/ $\mu$ L y 616 de RNasa P respectivamente. Se considera una población heterogénea con un comportamiento similar al que tendría el tamizaje sobre la población general. Sin embargo, es importante tener en mente que esta población, al ser de un solo estado de la República Mexicana, no representa los valores de todos los estados.

### 6.2 Casos SCID

Durante el periodo en el que se analizaron tanto el grupo control, como las muestras de Tabasco, llegaron al Instituto 23 pacientes cuya sospecha clínica era de Inmunodeficiencia Primaria. Se decidió analizar muestras de sangre periférica de dichos pacientes mediante la prueba de TRECs. Las muestras se introducían arbitrariamente dentro de los ensayos experimentales y se procesaban de la misma manera que todas las

muestras. De los 23 pacientes analizados, solamente 4 obtuvieron un conteo bajo de TRECs, bajo los criterios internacionales.

Además, dado que estos pacientes acudían a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias y de manera rutinaria se les tomaban muestras sanguíneas para diversos estudios, se aprovechaba la flebotomía para monitorear los niveles de TRECs de los pacientes. En la siguiente figura, se muestra el seguimiento temporal de dos pacientes con diagnóstico presuntivo de SCID.

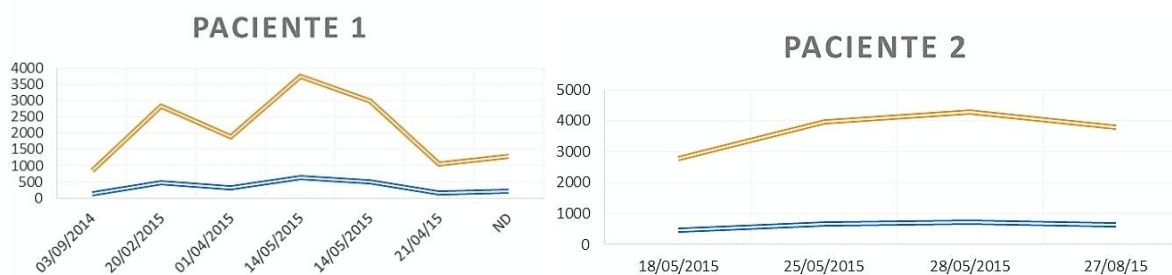


Figura 11.3 Curva temporal de dos pacientes con SCID. En color naranja, se representan los valores de RNasa P, observando variaciones de la calidad de la muestra, principalmente en el paciente 1. De color azul se encuentran representados los valores de TRECs/μL; en ambos casos, todos los valores son menores a 792 TRECs/μL en las diferentes muestras tomadas en diferentes meses. La referencia de 792 TRECs/μL es la media del grupo control del presente trabajo.

### 6.3 Control de calidad del ensayo

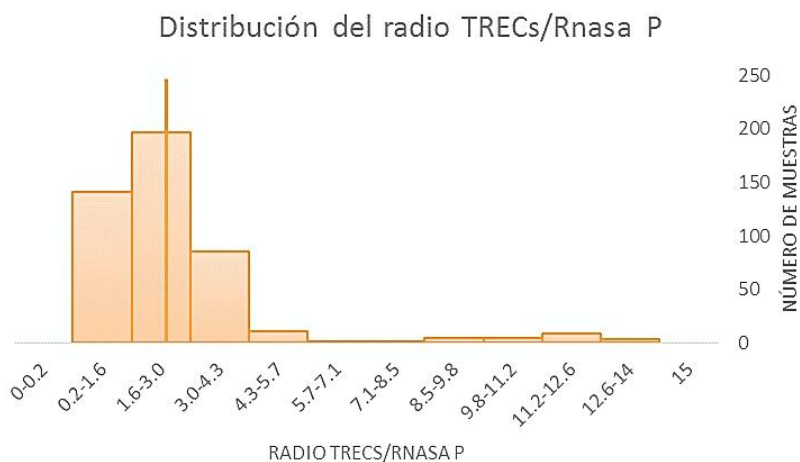
Además de los múltiples controles en los ensayos, se evaluaron los siguientes aspectos:

#### a) Relación TRECs/RNasa P

De todos los ensayos a nivel mundial, los valores absolutos de TRECs varían importantemente según el laboratorio. Independientemente de las condiciones de trabajo, conservación de las muestras, el éxito de la extracción, el uso de equipos automatizado o diferentes analistas; el

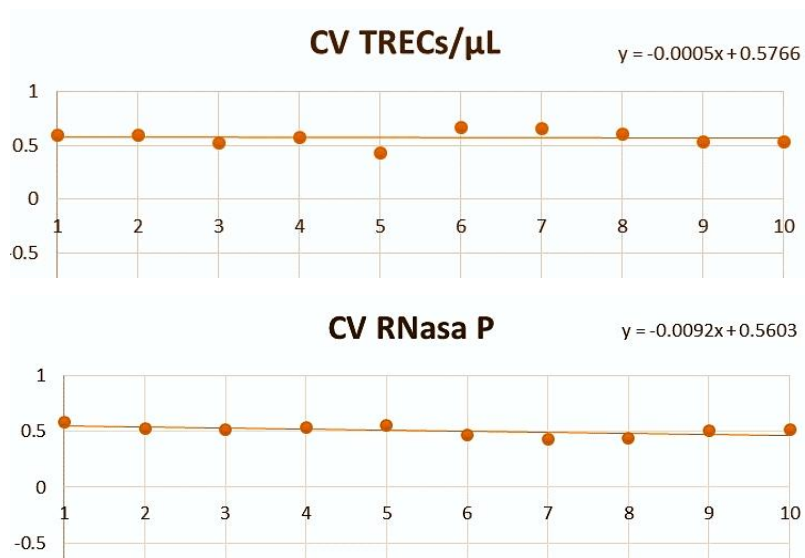


valor relativo de TRECs/RNasa P es comparable a nivel interlaboratorio. Este valor representa la cantidad de TRECs en relación con las copias de RNasa P presentes en la muestra. En la siguiente figura se muestra la distribución de los valores TRECs/RNasa P obtenidos de todas las muestras procesadas a partir de julio del 2014, exceptuando únicamente los pacientes con sospecha clínica de SCID. La media obtenida fue de  $2.63 \pm 2.30$ .



*Figura 11.4*  
Valores relativos de TRECs/RNasa P. Resultados de todas las muestras analizadas a partir de julio de 2014, con excepción de los pacientes con sospecha clínica de SCID.

b) Reproducibilidad del ensayo



*Figura 11.5*  
Reproducibilidad del ensayo. Comportamiento del Coeficiente de Variación de 10 corridas representativas, para TRECs/µL y RNasa P.

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1 Ensayo de TRECs

<b>Nombre de la prueba</b>	<b>Prueba de TRECs</b>
<i>Unidades de medición</i>	TRECs/ $\mu$ L
<i>Valor de Referencia</i>	792
<i>Rango</i>	265-1319
<i>Desviación estándar</i>	527
<i>Controles</i>	RNasa P

La prueba de TRECs, como se describió anteriormente, es un excelente candidato para su implementación en el tamiz neonatal en México. Una notable ventaja de la RT-q-PCR es que podemos medir el producto amplificado en tiempo real, mediante la sonda fluorescente de TaqMan. El ensayo multiplex tiene un perfil multianalítico que permite analizar simultáneamente: TRECs como biomarcador de la linfopoyesis y RNasa P como gen control en una misma reacción.

Para validar los resultados de la prueba, se aplican controles de calidad que aseguran que el gDNA sea adecuado y suficiente. En este ensayo, se utilizó como control interno al gen constitutivo: RNasa P. Este gen codifica para una ribonucleasa no relacionada al proceso de generación de TRECs<sup>38, 57</sup>. Toda muestra con bajas cuantificaciones del control era considerada como error por amplificación o extracción fallida<sup>40</sup>; repitiendo su determinación<sup>58</sup>.

En cambio, si los resultados de TRECs eran bajos y la RNasa P normal, se repetía todo el proceso desde la extracción. Un estudio de 2013 sugiere

realizar una inmunotipificación de estos pacientes<sup>40</sup> y aunque esto resultaría muy costoso, comprobaría una sospecha de TCL.

La variabilidad total de los resultados del presente estudio está conformada por factores biológicos (edad, género, dieta) y analíticos (toma de muestra, mantenimiento de la misma, calibradores, reactivos, controles e interferencias)<sup>74</sup>. La variabilidad biológica también se ve afectada interindividualmente e intraindividualmente.

#### a) Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad del ensayo, se analizó la variación temporal del Coeficiente de Variación (CV) de agosto de 2014 al mismo mes del año 2015. En la Figura 11.5 se observan las gráficas del CV, demostrando que los ensayos realizados son reproducibles. Esta característica se añade a la lista de virtudes de la prueba de TRECs, como la especificidad y suficiente sensibilidad para detectar números anormales de TRECs<sup>10</sup>.

#### b) Valor relativo de TRECs/RNasa P

Durante el tratamiento de los datos, también se calculó el valor relativo de TRECs/RNasa P (Figura 11.4). Este valor representa el error de muestreo en la matriz de papel filtro<sup>26</sup> y el rendimiento de la prueba. En el presente estudio se obtuvieron valores de TRECs/RNasa P mayores en comparación con otros estudios que han calculado la misma relación<sup>32</sup>. Sería conveniente aumentar el tamaño de la muestra en estudios posteriores de manera que al graficar los valores, se obtenga un comportamiento gaussiano en los histogramas. Además, se sospecha que la antigüedad de las muestras afecta el rendimiento de extracción, este aspecto, se discutirá más adelante a profundidad.

## 7.2 Control de calidad

El conjunto de acciones que ayudan a que los resultados de algún procedimiento sean confiables para el usuario, se les llama control de calidad; en las pruebas clínicas se busca disminuir la variabilidad analítica. La ISO 15 189 enfatiza la importancia del laboratorio clínico en los diagnósticos médicos y, en consecuencia, la importancia del control de calidad en los estudios clínicos<sup>74</sup>. Además, los criterios de calidad ayudan a evaluar la prueba según los objetivos, de manera que se puedan validar los resultados.

Para estandarizar el procedimiento y asegurar que los resultados de TREC's son confiables, se tomaron las siguientes medidas según la fase correspondiente: a. Fase pre preanalítica (uso de equipos adecuados, mantenimiento y limpieza de los mismos); b. Fase preanalítica (identificación correcta de los pacientes, conservación de la muestra, criterios de aceptación); c. Fase analítica (limpieza, optimización de métodos de extracción de ADN, uso de controles (ciegos, gen control), curvas estándar y actualización de protocolos); d. Fase postanalítica (manejo de datos, tratamientos estadísticos y de control de calidad e interpretación de resultados) y e. Fase post postanalítica (seguimiento de pacientes por parte de los médicos).

El laboratorio cuenta con todo el equipo necesario y durante la realización de este proyecto, se dio mantenimiento continuo a los equipos y las limpiezas correspondientes. Si bien algunos aspectos como los recién mencionados son muy sencillos, otros merecen su apartado en esta discusión:

### a) Condiciones de las muestras

Una de las fases más difíciles de controlar en este proyecto es la fase preanalítica, debido a que las muestras pueden provenir de diferentes fuentes y a que es muy compleja la toma de muestra para tamiz neonatal. Todo esto en conjunto impacta importantemente en los resultados. En primer lugar, no todo el personal de salud conoce el correcto llenado de las tarjetas Guthrie, la importancia y repercusiones de esta acción. Además, algunas muestras no contienen los datos correctos de los pacientes o son ilegibles.

Las muestras del grupo control no sufrieron de estos defectos, sin embargo, las muestras de Tabasco tenían muchas irregularidades, observando muestras como las de la Figura 12.0.



*Figura 12.0 Ejemplos de muestras deficientes, tomadas en tarjetas Guthrie<sup>83</sup>.*

La flebotomía es un proceso doloroso para cualquier paciente, en este caso, la dificultad se multiplica al tratarse de pacientes pediátricos. Por lo que se debe evitar la necesidad de una segunda toma de muestra; sería

conveniente impartir cursos breves que eduquen al personal de salud en la toma de este tipo de muestras y el correcto llenado del papel filtro.

Por otro lado, si la toma de muestra es correcta, las pruebas de tamiz neonatal resultan prácticamente indoloras a los neonatos. Vinculado al concepto, los ensayos de tamiz requieren una cantidad o volumen mínimo y si la muestra es adecuada, una misma tarjeta Guthrie se puede utilizar para realizar diversas pruebas de tamiz neonatal.

Asimismo, repercute en los resultados la antigüedad de la muestra cómo se mencionó anteriormente y esto, junto a la toma incorrecta de muestra y un mal almacenamiento se refleja en la disminución del rendimiento de extracción de ADN. Los valores del gen control para el grupo control son de 1 250 copias en promedio, mientras que para las muestras de Tabasco se obtuvo una media de 616 copias de RNasa P promedio; esto representa una disminución del 50 % del rendimiento debido a las condiciones reportadas. Sería conveniente realizar estudios posteriores que evalúen el comportamiento de un grupo control con el paso del tiempo.

### 7.3 Grupo control

El grupo control está conformado por población pediátrica sana, verificando que los pacientes que lo conforman cumplan ciertos criterios. En estudios posteriores, sería conveniente aumentar el tamaño del grupo control para estimar con mayor precisión los valores verdaderos de la población y en consecuencia disminuir la desviación estándar. Además de incluir grupos de estudios adicionales, necesarios para la obtención de un valor de corte.

#### a) Comparación talón vs cordón

Después del tercer mes de gestación y una vez formado el timo, se comienzan a producir pequeñas cantidades de TRECs por la maduración de Linfocitos T del producto. Estos TRECs se encuentran en la sangre periférica del feto. Se sabe que al momento del parto, la sangre del cordón umbilical contiene sangre tanto materna como fetal. Es por esto que se pueden cuantificar los TRECs en esta muestra; considerando además, que la contribución de TRECs de la madre es prácticamente nula por ser un adulto.

Siendo la primera muestra que se puede obtener del producto a partir de su nacimiento, el análisis de la misma podría diagnosticar de manera temprana enfermedades como SCID. Por esto, se quiso evaluar la idoneidad de la muestra contra sangre periférica de talón, obtenida según las recomendaciones en los primeros 2 a 7 días desde el nacimiento<sup>96, 87</sup>.

La cuantificación de TRECs fue exitosa en sangre de cordón umbilical, sin embargo, la sangre de talón demostró mejores resultados. Diversos estudios han reportado que la sangre de cordón umbilical es rica en HSC<sup>79, 55</sup> del producto (Figura 1.1). Esto quiere decir que la muestra contiene células fetales no diferenciadas, que no han migrado a órganos linfoides y no han comenzado su diferenciación. Todo esto aunado a que en el momento del parto, el cordón umbilical transporta líquidos, nutrientes, **células maternas y otros componentes que "diluyen" cualquier analito a cuantificar**. Esta dilución no solo aplica al número de TRECs, también se extiende a los valores de RNasa P (Figura 11.1).

Otra inconveniencia importante, es la toma de muestra al momento del parto por que representa un gasto adicional<sup>58</sup> y un problema de logística para su implementación<sup>37</sup>. Bajo este razonamiento y con los resultados mostrados, se puede afirmar que la cuantificación de TRECs/ $\mu$ L se ve

favorecida en muestras de sangre periférica obtenida de talón comparadas con las muestras de cordón umbilical. Además, si consideramos que la ventaja más importante de la muestra de cordón es el diagnóstico oportuno, los 2 a 7 días de diferencia entre la toma de ambas muestras, no representa una diferencia real en el tratamiento de los pacientes diagnosticados.

#### b) Valor de referencia

Los valores de corte de estudios anteriores reportados, generalmente oscilan entre los 25<sup>20, 18</sup> a los 40 TREC<sub>s</sub>/μL<sup>40, 18, 16, 58</sup>, sin embargo, se han mencionado cuantificaciones de hasta 250 TREC<sub>s</sub>/μL según el laboratorio. Debido a la gran diferencia en las cuantificaciones, no es adecuado utilizar los valores de referencia de otros países. Entre las razones principales de esta diferencia, se encuentran: el uso de equipos automatizados, la diferencia de reactivos, la diferencia de condiciones de trabajo, los analistas, entre muchos otros factores que pueden incluir incluso factores genéticos y de salud de la población. Este es el primer trabajo que estudia a la población mexicana en específico y una vez que se establezca el uso de la prueba en México, se facilitarán los esquemas de diagnósticos existentes<sup>20, 39, 40</sup>. Desafortunadamente se ha determinado la falta de un grupo de estudio para poder obtener el valor de referencia para nuestra población.

#### 7.4 Muestras del estado de Tabasco

Los resultados del estado de Tabasco (muestras del 04 de diciembre del 2011 al 12 de enero del 2012) constaban de usuarios de un tamiz neonatal privado sin ningún requisito para la toma de muestra. Dentro de esta perspectiva, la población es heterogénea. Como era de esperarse,



no se encontró ningún paciente con SCID dada la incidencia. Algo notable es que en promedio, se obtuvieron cuantificaciones menores comparadas con el grupo control. De tal forma que se mantiene la observación respecto a la antigüedad de las muestras.

Siendo imprescindible que las muestras sean recientes y que las tarjetas Guthrie se almacenen adecuadamente. El almacén es tan importante como los demás aspectos, para prevenir la contaminación entre muestras; la principal razón es que queremos identificar aquellos pacientes con valores anormales o disminuidos<sup>26</sup>.

## 7.5 Pacientes

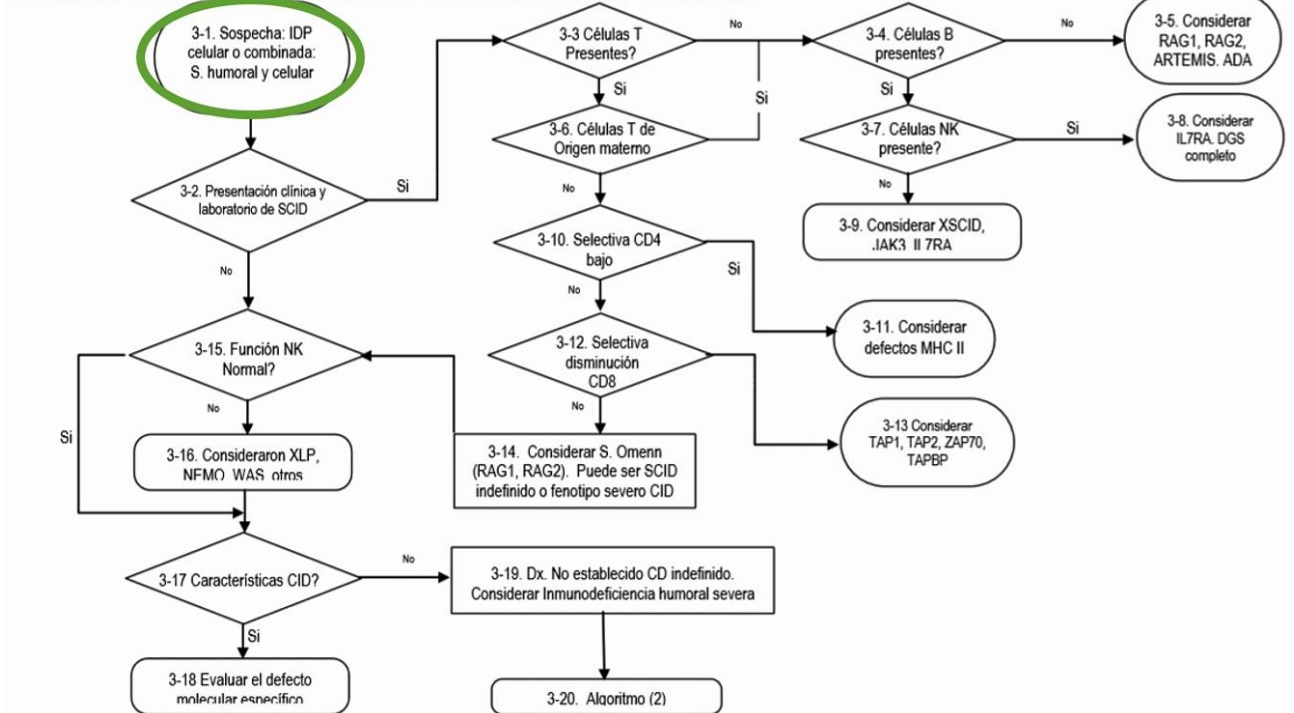
Los médicos se encargan de realizar el diagnóstico correspondiente de los pacientes, pero es necesario y de gran importancia tener un fundamento y evidencia científica para que este diagnóstico sea confiable. Los resultados de la prueba de TRECs apoyan de esta manera el diagnóstico de SCID, incluso en pacientes con injerto materno de células T, debido a que estas clonas no generan una cantidad considerable de TRECs. Como criterio principal, estudios anteriores, han establecido que el 70 % de los linfocitos que expresan TCR  $\alpha\beta$  generan TRECs  $\delta\text{rec-}\psi\text{Ja}$  <sup>38, 22, 26</sup>.

Al analizar las muestras de los 23 pacientes con sospecha clínica de IDP, únicamente 4 presentaron valores de TRECs notablemente disminuidos. El resto padecía otro tipo de IDP o enfermedad que comparte síntomas con SCID. A partir de esta discriminación, se hizo un diagnóstico presuntivo de los 4 pacientes con conteo bajo de TRECs (faltan estudios moleculares). Se sospecha que dos pacientes (hermanos entre sí) y el Paciente 1 (Figura 11.3) padecen SCID ligada a X con deficiencia en la cadena gamma común y para el Paciente 2 de la Figura 11.3 se sospecha una deficiencia de enzima ADA. Adicionalmente, un paciente con todos los

síntomas de un SCID, **obtuvo valores "normales"** en la prueba. Una explicación en este caso, es que el paciente tuviera una mutación después del rearreglo V (D) J, es decir, una inmunodeficiencia combinada (CID); esta IDP comparte síntomas con SCID y aunque fenotípicamente son muy parecidos, los pacientes con CID no tienen valores bajos de TRECs <sup>38, 36</sup>. Otra posible explicación es un caso SCID con niveles normales de TRECs, ya sea por defecto en los canales de calcio <sup>25</sup>, defectos en ZAP70 <sup>77</sup> o cualquier otro tipo de defecto que provoque una falta de funcionalidad celular <sup>20</sup>.

Después de los resultados de la prueba se debe identificar el tipo de TLC, para lo que existen pruebas confirmatorias. En EEUU el *Primary Immune Deficiency Treatment Consortium* (PIDTC) considera SCID a todos aquellos pacientes con <300 células T autólogas/ $\mu$ L de sangre y <10% de proliferación con mitógeno fitohemaglutinina A (PHA) <sup>39</sup>. El diagnóstico de los defectos al nacimiento se debe realizar en establecimientos de atención médica interdisciplinarias por personal médico especializado, con base en los antecedentes, hallazgos clínicos, pruebas diagnósticas disponibles y según la etapa del desarrollo en que se encuentre<sup>87</sup>. Un ejemplo de esquemas a seguir, se muestra en la *Figura 12.1*.

**ALGORITMO 3: DIAGNÓSTICO DE INMUNODEFICIENCIA CELULAR Y COMBINADA**



*Figura 12.1* Algoritmo del diagnóstico de SCID. Este esquema es útil en el diagnóstico de SCID<sup>92</sup> y de color verde, se señala el momento de la aplicación de la prueba de TRECs.

Sin embargo, aún con la aplicación de la prueba, el servicio médico debe mantenerse alerta a desordenes inmunológicos relacionados a SCID. Por ejemplo, en EEUU se reportaron dos pacientes con síndrome del linfocito desnudo no detectados por la prueba <sup>36</sup>. Los casos mencionados en dicha carta al editor, son de pacientes mexicanos, por lo cual se puede pensar que la incidencia en México es mayor, especialmente en zonas donde la consanguineidad es frecuente.

## 7.6 Implementación

Estos primeros esfuerzos nos encaminan en la implementación de la prueba de TREC's en el tamiz neonatal mexicano, sin embargo, hay factores que se deben considerar, se mencionarán brevemente, debido a que su estudio en particular es suficiente para trabajos futuros.

### a) Legalidad

Con el aumento mundial del interés en el tamiz neonatal y el desarrollo de nuevas tecnologías para la extracción facilitada de ADN, es necesario restringir el uso de las muestras para proteger tanto al paciente como sus datos personales. Considerando lo estipulado en la Declaración de Helsinki y algunas recomendaciones generales de Rothwell EW, et al.<sup>75</sup>; respecto al uso de muestras residuales y cuestiones de estabilidad de las muestras.

### b) Costo-beneficio

Los estudios piloto deben incluir un análisis de impacto en la salud pública y del costo-beneficio con proyección a futuro<sup>75</sup>. En 2007 la *Jeffrey Modell Foundation* estimó los gastos que genera un paciente con SCID en EE.UU., los cuales ascienden hasta 1, 000,000 de dólares al año por paciente. En este artículo se analiza a profundidad la relación costo-beneficio de la aplicación rutinaria de la muestra a todo recién nacido. Por otra parte, los costos del tratamiento permanecen sin cuantificarse en nuestro país.

### c) Trabajo pendiente

No debemos olvidar que para que un programa de tamiz neonatal sea exitoso, requiere: (1) priorización gubernamental, (2) financiamiento del gobierno, (3) aceptación y educación pública, (4) cooperación e

involucramiento de expertos de la salud y (5) participación gubernamental en la institucionalización del programa<sup>75</sup>.

Falta mucho trabajo de análisis de muestras, los resultados de este estudio piloto no son representativos de todos los estados del país. Faltaría que cada estado implemente un estudio piloto, para poder dimensionar el problema de SCID en México. Incluso así, el problema podría estar subvalorado, debido a que en zonas rurales no todos los casos llegan a las unidades de salud correspondientes.

Se sabe que el registro de la incidencia de SCID en México está subestimado por los siguientes factores: (1) falta de conocimientos de la etiopatología, (2) falta de registros, (3) pocos centros de referencia y (4) muertes antes del diagnóstico.

## 8. CONCLUSIONES

El ensayo multiplex de TRECs tiene validez clínica para múltiples formas de SCID y algunas TCLs. Los resultados obtenidos mediante la prueba de TRECs son evidencia científica de apoyo para el diagnóstico, aportando evidencia científica de manera confiable y representando una gran herramienta en medicina preventiva.

La aplicación constante de las medidas de control de calidad, aseguran que los resultados sean confiables.

El tamizaje mediante el ensayo de TRECs ayudará a disminuir los costos ocasionados por SCID, que si bien no han sido cuantificados aún, se pueden reducir mediante la aplicación de estudios más específicos y de mayor costo únicamente a los pacientes positivos a la prueba.

La integración de los resultados de la prueba de TRECs con la historia clínica del paciente ayudan a realizar un diagnóstico oportuno y en consecuencia, al recibir tratamiento, se podrá reducir la mortalidad y morbilidad causadas por SCID en México.

Es injustificable que sigan muriendo niños mexicanos por falta del tamizaje de SCID, siendo que existen múltiples opciones terapéuticas para estos pacientes.

Con trabajos posteriores, podremos encontrar la verdadera incidencia por SCID en México, así como el valor de referencia para población mexicana.

## Referencias

1. Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J., Chatila, T., Conley, M., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J., Gaspar, H., Holland, S., Klein, C., Nonoyama, S., Ochs, H., Oksenhendler, E., Picard, C., Puck, J., Sullivan, K. and Tang, M. (2014). Primary Immunodeficiency Diseases: An Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, 5.
2. Adeli, M. and Buckley, R. (2010). Why Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency Is Essential: A Case Report. *PEDIATRICS*, 126(2), pp.e465-e469.
3. Amorosi, S., D'Armiento, M., Calcagno, G., Russo, I., Adriani, M., Christiano, A., Weiner, L., Brissette, J. and Pignata, C. (2008). FOXP1 homozygous mutation associated with anencephaly and severe neural tube defect in human athymic Nude/SCID fetus. *Clinical Genetics*, 73(4), pp.380-384.
4. Abbas, A. (2012). *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders.
5. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Helper T Cells and Lymphocyte Activation. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26827/>**
6. Au-Yeung, B., Deindl, S., Hsu, L., Palacios, E., Levin, S., Kuriyan, J. and Weiss, A. (2009). The structure, regulation, and function of ZAP-70. *Immunological Reviews*, 228(1), pp.41-57.
7. AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit. (2015). 1st ed. [ebook] California: Axygen Biosciences, pp.1-18. [Accessed 20 Aug. 2014].
8. Bakare N, Menschik D, Tiernan R, Hua W, Martin D. Severe combined immunodeficiency (SCID) and rotavirus vaccination: reports to the Vaccine Adverse Events Reporting System (VAERS). *Vaccine*. 2010; 28(49):6609-6612.
9. Baker, M., Laessig, R., Katcher, M., Routes, J., Grossman, W., Verbsky, J., Kurtycz, D. and Brokopp, C. (2010). Implementing Routine Testing for Severe Combined Immunodeficiency within Wisconsin's Newborn Screening Program. *Public Health Reports*, 125, pp.88-95.
10. Baker, M., Grossman, W., Laessig, R., Hoffman, G., Brokopp, C., Kurtycz, D., Cogley, M., Litsheim, T., Katcher, M. and Routes, J. (2009). Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(3), pp.522-527.

11. Berg, L. (2008). The "Bubble Boy" Paradox: An Answer That Led to a Question. *The Journal of Immunology*, 181(9), pp.5815-5816.
12. Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M., Sanal, O., Plebani, A., Stéphan, J., Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J. and Revy, P. (2006). Cernunnos, a Novel Nonhomologous End-Joining Factor, Is Mutated in Human Immunodeficiency with Microcephaly. *Cell*, 124(2), pp.287-299.
13. Buckley, R. (2005). Variable phenotypic expression of mutations in genes of the immune system. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), pp.2974-2976.
14. Cassani, B., Poliani, P., Moratto, D., Sobacchi, C., Marrella, V., Imperatori, L., Vairo, D., Plebani, A., Gilliani, S., Vezzoni, P., Facchetti, F., Porta, F., Notarangelo, L., Villa, A. and Badolato, R. (2010). Defect of regulatory T cells in patients with Omenn syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), pp.209-216.
15. CDC, (2004). *Applying Public Health Strategies to Primart Immunodeficiency Diseases*. MMWR, pp.1-39.
16. Chan, K. and Puck, J. (2005). Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(2), pp.391-398.
17. Chistiakov, D., Voronova, N. and Chistiakov, A. (2009). Ligase IV syndrome. *European Journal of Medical Genetics*, 52(6), pp.373-378.
18. Contreras Verduzco, F., Morales Vázquez, A., Medina Torres, E. and Espinosa Padilla, S. (2014). *Diagnóstico oportuno de la Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID) a través del tamíz neonatal*. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
19. Correa Vanegas, P. (2013). *Estudio de la Reconstitución de Poblaciones de Linfocitos T Mediante Marcadores Epigenéticos*. Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
20. Cossu, F. (2010). Genetics of SCID. *Ital J Pediatr*, 36(1), p.76.
21. Denianke, K., Frieden, I., Cowan, M., Williams, M. and McCalmont, T. (2001). Cutaneous manifestations of maternal engraftment in patients with severe combined immunodeficiency: a clinicopathologic study. *Bone Marrow Transplant*, 28(3), pp.227-233.
22. Douek, D., Koup, R., McFarland, R., Sullivan, J. and Luzuriaga, K. (2000). Effect of HIV on Thymic Function before and after Antiretroviral Therapy in Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(4), pp.1479-1482.



23. Dvorak, C. and Cowan, M. (2010). Radiosensitive Severe Combined Immunodeficiency Disease. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 30(1), pp.125-142.
24. Ege, M. (2005). Omenn syndrome due to ARTEMIS mutations. *Blood*, 105(11), pp.4179-4186.
25. Feske, S., Picard, C. and Fischer, A. (2010). Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clinical Immunology*, 135(2), pp.169-182.
26. Gerstel-Thompson, J., Wilkey, J., Baptiste, J., Navas, J., Pai, S., Pass, K., Eaton, R. and Comeau, A. (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. *Clinical Chemistry*, 56(9), pp.1466-1474.
27. **Gertner, J., Scotet, E., Poupot, M., Bonneville, M. and Fournié, J. (2007). Lymphocytes: Gamma Delta. *Encyclopedia of Life Sciences*.**
28. Ghoreschi, K., Laurence, A. and O'Shea, J. (2009). Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological Reviews*, 228(1), pp.273-287.
29. Gonzalez, J. and Willis, M. (2009). Robert Guthrie, MD, PhD: Clinical Chemistry/Microbiology. *Laboratory Medicine*, 40(12), pp.748-749.
30. Hamilton, B., Martin, J., Osterman, M. and Curtin, S. (2014). *Births: Preliminary Data for 2013*. US: National Vital Statistics Report.
31. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Fifth edition. New York: Garland Science; 2001. T-cell receptor gene rearrangement. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27145>
32. Jilkina, O., Thompson, J., Kwan, L., Van Caesele, P., Rockman-Greenberg, C. and Schroeder, M. (2014). Retrospective TREC testing of newborns with Severe Combined Immunodeficiency and other primary immunodeficiency diseases. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 1, pp.324-333.
33. J.R. Luckasen, et al. (1974) Lymphocytes bearing complement receptors, surface immunoglobulins and sheep erythrocyte receptors in primary immunodeficiency diseases. *Clin.exp.Immunol.* 16, 535-540.
34. Knapp, L. and Perrin, J. (2009). Evidence review: severe combined immunodeficiency (SCID). [online] Available at: <http://ftp://ftp.hrsa.gov/mchb/genetics/reports/SCIDevidencereviewfinal.pdf> [Accessed 1 May 2015].

35. Kobrynski, L. and Sullivan, K. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *The Lancet*, 370(9596), pp.1443-1452.
36. Kuo, C., Chase, J., Garcia Lloret, M., Stiehm, E., Moore, T., Aguilera, M., Lopez Siles, J. and Church, J. (2013). Newborn screening for severe combined immunodeficiency does not identify bare lymphocyte syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(6), pp.1693-1695.
37. Kwann A & Puck JM. Newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Curr Pediatr Rep*. 2015; 3(1): 34-42.
38. Kwan, A. and Puck, J. (2015). History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Seminars in Perinatology*, 39(3), pp.194-205.
39. Kwan, A., Abraham, R., Currier, R., Brower, A., Andruszewski, K., Abbott, J., Baker, M., Ballow, M., Bartoshesky, L., Bonilla, F., Brokopp, C., Brooks, E., Caggana, M., Celestin, J., Church, J., Comeau, A., Connelly, J., Cowan, M., Cunningham-Rundles, C., Dasu, T., Dave, N., De La Morena, M., Duffner, U., Fong, C., Forbes, L., Freedenberg, D., Gelfand, E., Hale, J., Hanson, I., Hay, B., Hu, D., Infante, A., Johnson, D., Kapoor, N., Kay, D., Kohn, D., Lee, R., Lehman, H., Lin, Z., Lorey, F., Abdel-Mageed, A., Manning, A., McGhee, S., Moore, T., Naides, S., Notarangelo, L., Orange, J., Pai, S., Porteus, M., Rodriguez, R., Romberg, N., Routes, J., Ruehle, M., Rubenstein, A., Saavedra-Matiz, C., Scott, G., Scott, P., Secord, E., Seroogy, C., Shearer, W., Siegel, S., Silvers, S., Stiehm, E., Sugerman, R., Sullivan, J., Tanksley, S., Tierce, M., Verbsky, J., Vogel, B., Walker, R., Walkovich, K., Walter, J., Wasserman, R., Watson, M., Weinberg, G., Weiner, L., Wood, H., Yates, A. and Puck, J. (2014). Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States. *JAMA*, 312(7), p.729.
40. Kwan, A., Church, J., Cowan, M., Agarwal, R., Kapoor, N., Kohn, D., Lewis, D., McGhee, S., Moore, T., Stiehm, E., Porteus, M., Aznar, C., Currier, R., Lorey, F. and Puck, J. (2013). Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia in California: Results of the first 2 years. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(1), pp.140-150.e7.
41. Lee, M. and Li, W. (2014). *Dried blood spots: Applications and Techniques*. John Wiley & Sons.
42. Li, L., Moshous, D., Zhou, Y., Wang, J., Xie, G., Salido, E., Hu, D., de Villartay, J. and Cowan, M. (2002). A Founder Mutation in Artemis, an SNM1-Like Protein,

- Causes SCID in Athabascan-Speaking Native Americans. *The Journal of Immunology*, 168(12), pp.6323-6329.
43. Louise Markert, M., Alexieff, M., Li, J., Sarzotti, M., Ozaki, D., Devlin, B., Sempowski, G., Rhein, M., Szabolcs, P., Hale, L., Buckley, R., Coyne, K., Rice, H., Mahaffey, S. and Skinner, M. (2004). Complete DiGeorge syndrome: Development of rash, lymphadenopathy, and oligoclonal T cells in 5 cases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(4), pp.734-741.
44. Mold, J., Michaelsson, J., Burt, T., Muench, M., Beckerman, K., Busch, M., Lee, T., Nixon, D. and McCune, J. (2008). Maternal Alloantigens Promote the Development of Tolerogenic Fetal Regulatory T Cells in Utero. *Science*, 322(5907), pp.1562-1565.
45. Montana, (2015). *Tarjeta Guthrie*. [image] Available at: <http://www.babysfirsttest.org/newborn-screening/states/montana> [Accessed 2 May 2015].
46. Morton DH, Morton CS, Strauss KA, et al. Pediatric medicine and the genetic disorders of the Amish and Mennonite people of Pennsylvania. *Am J Med Genet*, 2003; 121C (1):5-17.
47. Ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *Tcra T cell receptor alpha chain [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI*. [online] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21473> [Accessed 18 Oct. 2015].
48. Niehues, T., Perez-Becker, R. and Schuetz, C. (2010). More than just SCID—the phenotypic range of combined immunodeficiencies associated with mutations in the recombinase activating genes (RAG) 1 and 2. *Clinical Immunology*, 135(2), pp.183-192.
49. Noguchi, M. (1993). Interleukin-2 receptor & chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*, 73(1), pp.147-157.
50. Notarangelo, L. (2010). Primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), pp.S182-S194.
51. Notarangelo, L., Fischer, A., Geha, R., Casanova, J., Chapel, H., Conley, M., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Hammartröm, L., Nonoyama, S., Ochs, H., Puck, J., Roifman, C., Seger, R. and Wedgwood, J. (2009). Primary immunodeficiencies: 2009 update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(6), pp.1161-1178.
52. Ochi, T., Sibanda, B., Wu, Q., Chirgadze, D., Bolanos-Garcia, V. and Blundell, T. (2010). Structural Biology of DNA Repair: Spatial Organisation of the

- Multicomponent Complexes of Nonhomologous End Joining. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, pp.1-19.
53. Palmer, K., Green, T., Roberts, J., Sajaroff, E., Cooney, M., Parrott, R., Chen, D., Reinsmoen, N. and Buckley, R. (2007). Unusual clinical and immunologic manifestations of transplacentally acquired maternal T cells in severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(2), pp.423-428.
54. Pannicke, U., Hönig, M., Hess, I., Friesen, C., Holzmann, K., Rump, E., Barth, T., Rojewski, M., Schulz, A., Boehm, T., Friedrich, W. and Schwarz, K. (2008). Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nature Genetics*, 41(1), pp.101-105.
55. Parslow, T., Stites, D., Terr, A. and Imboden, J. (2001). *Inmunología básica y clínica*. 10th ed. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno.
56. Poliani, P., Vermi, W. and Facchetti, F. (2009). Thymus microenvironment in human primary immunodeficiency diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(6), pp.489-495.
57. Puck, J. (2012). *TRECs generation*. [image] Available at: [http://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(12\)00066-8/pdf](http://www.jacionline.org/article/S0091-6749(12)00066-8/pdf) [Accessed 31 Mar. 2015].\*
58. Puck, J. (2007). Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: Steps toward implementation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(4), pp.760-768.
59. Puel, A. and Leonard, W. (2000). Mutations in the gene for the IL-7 receptor result in T-B+NK+ severe combined immunodeficiency disease. *Current Opinion in Immunology*, 12(4), pp.468-473.
60. Recio, M., Moreno-Pelayo, M., Kilic, S., Guardo, A., Sanal, O., Allende, L., Perez-Flores, V., Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., Seoane, E. and Regueiro, J. (2007). Differential Biological Role of CD3 Chains Revealed by Human Immunodeficiencies. *The Journal of Immunology*, 178(4), pp.2556-2564.
61. Roberts, J., Lauritsen, J., Cooney, M., Parrott, R., Sajaroff, E., Win, C., Keller, M., Carpenter, J., Carabana, J., Krangel, M., Sarzotti, M., Zhong, X., Wiest, D. and Buckley, R. (2007). T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3 subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood*, 109(8), pp.3198-3206.
62. Rochman, Y., Spolski, R. and Leonard, W. (2009). New insights into the regulation of T cells by  $\gamma$ c family cytokines. *Nat Rev Immunol*, 9(7), pp.480-490.

63. Rodewald, H. (2008). Thymus Organogenesis. *Annual Review of Immunology*, 26(1), pp.355-388.
64. Sanchez JJ, Monaghan G, Borsting C, et al. Carrier frequency of a nonsense mutation in the adenosine deaminase (ADA) gene implies a high incidence of ADA-deficient severe combined immunodeficiency (SCID) in Somalia and a single, common ancestry. *Ann Hum Genet*. 2007; 71(3): 336-347.
65. Serana, F., Chiarini, M., Zanotti, C., Sottini, A., Bertoli, D., Bosio, A., Caimi, L. and Imberti, L. (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. *J Transl Med*, 11(1), p.119.
66. Shawky, R., Elsayed, N., Ibrahim, D. and Seifeldin, N. (2012). Profile of genetic disorders prevalent in northeast region of Cairo, Egypt. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 13(1), pp.45-62.
67. Shearer, W., Dunn, E., Notarangelo, L., Dvorak, C., Puck, J., Logan, B., Griffith, L., Kohn, D., O'Reilly, R., Fleisher, T., Pai, S., Martinez, C., Buckley, R. and Cowan, M. (2014). Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: The Primary Immune Deficiency Treatment Consortium experience. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(4), pp.1092-1098.
68. Shearer, W. and Demaret, C. (2014). David's Story. *Primary Immunodeficiency Disorders*, pp.313-326.
69. Smith-Garvin, J., Koretzky, G. and Jordan, M. (2009). T cell Activation. *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp.591-619.
70. Sobacchi, C., Marrella, V., Rucci, F., Vezzoni, P. and Villa, A. (2006). RAG - dependent primary immunodeficiencies. *Human Mutation*, 27(12), pp.1174-1184.
71. Takada, K. and Jameson, S. (2009). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol*, 9(12), pp.823-832.
72. Tchilian, E., Wallace, D., Wells, R., Flower, D., Morgan, G. and Beverley, P. (2001). A Deletion in the Gene Encoding the CD45 Antigen in a Patient with SCID. *The Journal of Immunology*, 166(2), pp.1308-1313.
73. Terabe, M. and Berzofsky, J. (2008). Chapter 8 The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Advances in Cancer Research*, pp.277-348.
74. Terrés-Speziale, A. (2006). Estimación de la incertidumbre y la variabilidad total en el laboratorio clínico. *Rev Mex Patol Clin*, 53(4), pp.185-196.

75. Therrell, B., Padilla, C., Loeber, J., Kneisser, I., Saadallah, A., Borrajo, G. and Adams, J. (2015). Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Seminars in Perinatology*, 39(3), pp.171-187.
76. Touzot, F., Moshous, D., Creidy, R., Neven, B., Frange, P., Cros, G., Caccavelli, L., Blondeau, J., Magnani, A., Luby, J., Ternaux, B., Picard, C., Blanche, S., Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S. and Cavazzana, M. (2015). Faster T-cell development following gene therapy compared with haploidentical HSCT in the treatment of SCID-X1. *Blood*, 125(23), pp.3563-3569.
77. Turul, T., Tezcan, I., Artac, H., de Bruin-Versteeg, S., Barendregt, B., Reisli, I., Sanal, O., van Dongen, J. and van der Burg, M. (2008). Clinical heterogeneity can hamper the diagnosis of patients with ZAP70 deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 168(1), pp.87-93.
78. Umetsu, D., Schlossman, C., Ochs, H. and Hershfield, M. (1994). Heterogeneity of phenotype in two siblings with adenosine deaminase deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 93(2), pp.543-550.
79. Urciuoli, P., Passeri, S., Ceccaretti, F., L, B., R, A., Lapi, S. and Nocchi, F. (2016). *Bloodtransfusion*. [online] Dx.doi.org. Available at: <http://dx.doi.org/10.2450%2F2009.0081-09> [Accessed 10 Apr. 2016].
80. van El, C., Cornel, M., Borry, P., Hastings, R., Fellmann, F., Hodgson, S., Howard, H., Cambon-Thomsen, A., Knoppers, B., Meijers-Heijboer, H., Scheffer, H., Tranebjaerg, L., Dondorp, W. and de Wert, G. (2013). Whole-genome sequencing in health care. *Eur J Hum Genet*, 21, pp.S1-S5.
81. van der Burg, M. and Gennery, A. (2011). Educational paper. *European Journal of Pediatrics*, 170(5), pp.561-571.
82. Vega, GB. (2009). Antígenos e inmunógenos. *Rev Fac Med UNAM*, 52(1), pp.41-42.
83. Vela, M., Ibarra, I., Fernández, C. and Belmont, L. (2012). Fundamentos teórico-prácticos para la toma correcta de la muestra de sangre del talón para el tamiz neonatal. *Acta Pediátrica de México*, 33(6), pp.273-278.
84. Villa, A., Notarangelo, L. and Roifman, C. (2008). Omenn syndrome: Inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(6), pp.1082-1086.
85. Villa, A., Santagata, S., Bozzi, F., Imberti, L. and Notarangelo, L. (1999). Omenn syndrome: a disorder of Rag1 and Rag2 genes. *J Clin Immunol*, 19(2), pp.87-97.

86. Williamson, A., Montgomery, J., South, M. and Wilson, R. (1977). A Special Report: Four-year Study of a Boy with Combined Immune Deficiency Maintained in Strict Reverse Isolation from Birth. *Pediatr Res*, 11(1), pp.63-64.
87. "Para la prevención y control de los defectos al nacimiento" NORMA Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2013. Diario Oficial de la Federación, 24 de junio de 2014.
88. (INEGI), I. (2016). *Instituto Nacional de Estadística y Geográfica (INEGI)*. [online] Inegi.org.mx. Available at: <http://www.inegi.org.mx> [Accessed 23 Feb. 2016].
89. Consejo Nacional de Población, (2012). *Base de Datos*. [online] Available at: <http://www.conapo.gob.mx> [Accessed 23 Feb. 2016].
90. UNICEF. (2015). *UNICEF | Children's Rights & Emergency Relief Organization*. [online] Unicef.org. Available at: <http://www.unicef.org> [Accessed 23 Feb. 2016].
91. Indicadores, (2016). [online] Available at: <http://www.datos.bancomundial.org> [Accessed 23 Feb. 2016].
92. Guía de Práctica Clínica del Niño con Inmunodeficiencia Primaria IDP. (2013). Red Asistencial Rebagliati.
93. Tamiz neonatal. Detección y tratamiento oportuno e integral del hipertiroidismo congénito. (2007). First ed. [ebook] México: Secretaría de Salud, pp.18-29. Available at: [http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=OCBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.salud.gob.mx%2Funidades%2Fcdi%2Fdocumentos%2FTamiz\\_Neonatal\\_lin\\_2007.pdf&ei=kKNGVZ\\_JGIuLyAS7\\_oGIDA&usq=AFQjCNEUxDn\\_UUrTqbsGMRITGW-TKC1GIg&bvm=bv.92291466,d.aWw](http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=OCBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.salud.gob.mx%2Funidades%2Fcdi%2Fdocumentos%2FTamiz_Neonatal_lin_2007.pdf&ei=kKNGVZ_JGIuLyAS7_oGIDA&usq=AFQjCNEUxDn_UUrTqbsGMRITGW-TKC1GIg&bvm=bv.92291466,d.aWw) [Accessed 2 May 2015].
94. STEMCELL Technologies, (2010). *Regulatory T cells*. [image] Available at: <http://www.nature.com/nri/posters/tregcells/index.html> [Accessed 9 Feb. 2016].
95. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn Screening: Towards a Uniform Screening Panel and System-Executive Summary. *PEDIATRICS* 2006; 117-S296-S307. 2006.
96. Principles and Practice of Screening for Disease. (1968). *Annals of Internal Medicine*, 69(5), p.1085.